

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Arbeitsgebiet Proteomik

Differentielle Proteomanalyse von Ewingsarkom- und Neuroblastomzelllinien
sowie methodische Arbeiten zur Analyse des Gesamtproteoms von Modell-
Mikroorganismen

Florian Weiland

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. Görg (i. R.)
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Parlar

Die Dissertation wurde am 22.12.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.02.2010 angenommen.

Eigenständigkeitserklärung:

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken (dazu zählen auch Internetquellen) entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

(Florian Weiland)

"Es gibt eine Theorie, die besagt, wenn jemals irgendwer genau herausfindet, wozu das Universum da ist und warum es da ist, dann verschwindet es auf der Stelle und wird durch noch etwas Bizarreres und Unbegreiflicheres ersetzt. - Es gibt eine andere Theorie, nach der das schon passiert ist." - Douglas Adams

Danksagung:

Ich danke Frau Prof. Angelika Görg nicht nur für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas, bei dem nicht nur die Fähigkeit zur Anwendung der 2D gefragt war, sondern auch die Möglichkeit neue Methoden zu entwickeln gegeben war, sondern auch für die wissenschaftliche Betreuung und hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Auch danke ich Herrn Prof. Stefan Burdach und Herrn Dr. Günther Richter für die gute Kooperation und die freundliche Überlassung und Anzucht der verwendeten Tumor-Zelllinien. Dank gilt auch Herrn Prof. Michael Hecker, Knut Büttner und Bernd Hessling für die freundliche Kooperation, Anzucht und Vorbereitung der *Bacillus subtilis* Kulturen.

Ich danke auch Herrn Prof. Rudi Vogel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und Herrn Prof. Harun Parlar für die Übernahme des Koreferates.

Weiter möchte ich besonderen Dank sagen an Andreas Klaus, für die gute Zusammenarbeit und Hilfe, sowie der unentbehrlichen Bereitschaft auch mal einen Kaffee mehr mitzutrinken. Dank geht auch an Carsten Lück, der während seiner Doktorarbeit immer ein offenes Ohr hatte und mit Rat zur Seite stand. Die Nachtschichten im MALDI-Labor sind unvergessen. Ich danke auch Dr. Walter Weiss, der immer bereit war meine Begeisterung über das Thema in logische Bahnen zu lenken. Dank gilt auch Ali Fanous, der bereit war unter meiner Knute eine Masterarbeit anzufertigen, als späterer Doktorand war er immer eine Bereicherung. An dieser Stelle sei auch Katharina Lorentz gedankt, die auch mal öfters (wie ich) bis spät abends im Labor war. Dank gilt auch an Iwona Proczek, deren Labor ich während meiner Schreibphase heimsuchen durfte.

Dank geht auch an meine Lektorin Eva Herold die meine teilweise kafkaesken Wortwelten bändigen konnten.

Last but not least geht natürlich auch Dank an meine Eltern, die mich immer unterstützten und wahrscheinlich froh sind, dass Sohnemann nach Abgabe der Diss. endlich mal arbeitet.

Die in dieser Dissertation verwendete Schriftart ist Linux-Libertine.
(<http://linuxlibertine.sourceforge.net>)

Veröffentlichungen:

- A Fanous, F Weiland, C Lück, A Görg, A Friess, H Parlar: A proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum* after exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). *Chemosphere* 2007, 69(1): 25-31.
- DO Serra, G Lücking, F Weiland, S Schulz, A Görg, OM Yantorno, M Ehling-Schulz: Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics*. 2008, 23-24: 4995-5010.
- A Görg, O Drews, C Lück, F Weiland, W Weiss: 2-DE with IPGs. *Electrophoresis*. 2009, June 30 Suppl. 1: S122-32.
- W Weiss, F Weiland, A Görg: Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Methods Mol Biol*. 2009, 564: 59-82.
- F Weiland, GH Richter, S Burdach, A Görg: Differential Proteome Analysis of Ewing Family of Tumors and Neuroblastoma Cell Lines. In Vorbereitung.

Posterpräsentationen:

- F Weiland, C Lück, A Klaus, G Reil, A Görg: Proteome analysis of *C. glutamicum* wild-type strains and mutants overproducing L-Lysine. *HUPO 4th Annual World Congress 2005*. Abstract Nr. 24.45 In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 4, No. 8, S.249, 2005.
- A Klaus, C Lück, F Weiland, A Görg: Two-Dimensional Gel Electrophoresis Of Low Abundance Proteins. *7 th Siena Meeting 2006*. Abstract Nr 132 S. 257 Abstractbook
- C Lück, F Weiland, A Klaus, A Görg: Differential Proteome Analysis Of *C. Glutamicum* Wild-type Vs. Overexpression Mutants And Proteomic Profiling After Growth On Different Carbon Sources. *7 th Siena Meeting 2006*. Abstract Nr 156 S. 281

Abstractbook

- F Weiland, C Lück, A Klaus, A Görg: Proteome Analysis Of *C. Glutamicum*: Strategies For The Detection / Identification Of Alkaline And Hydrophobic Proteins. *7 th Siena Meeting 2006*. **Abstract** Nr 250 S. 379 Abstractbook
- F Weiland, GH Richter, S Burdach, A Görg: Differential Proteome Analysis of Ewing Family of Tumors and Neuroblastoma Cell Lines. *HUPO 8 th Annual World Congress 2009*. **Abstract** Nr. C288

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	XV
Abkürzungsverzeichnis.....	XX
1 Einleitung.....	1
2 Zielsetzung der Arbeit.....	3
3 Stand des Wissens.....	5
3.1 Die Ewing-Familie von Tumoren.....	5
3.1.1 Epidemiologie.....	5
3.1.2 Histologie.....	6
3.1.3 Molekularbiologie.....	7
3.1.4 Therapie.....	8
3.1.5 Charakterisierung der verwendeten EFT-Zelllinien.....	9
3.1.5.1 Ewing-Sarkom Zelllinie A673.....	9
3.1.5.2 Ewing-Sarkom Zelllinie SBSR-AKS.....	10
3.1.5.3 Ewing-Sarkom Zelllinie SK-ES1.....	10
3.1.5.4 Ewing-Sarkom Zelllinie SK-N-MC.....	10
3.1.5.5 Ewing-Sarkom Zelllinie MHH-ES1.....	11
3.1.5.6 Ewing-Sarkom Zelllinie TC-71.....	11
3.1.6 Kurzübersicht der verwendeten EFT-Zelllinien.....	11
3.2 Das Neuroblastom.....	13
3.2.1 Epidemiologie.....	13
3.2.2 Histologie.....	14
3.2.3 Molekularbiologie.....	15
3.2.4 Einteilung der Neuroblastome in Risikogruppen.....	18
3.2.5 Das International Neuroblastoma Risk Group Staging System.....	19
3.2.6 Therapie.....	20
3.2.7 Charakterisierung der verwendeten Neuroblastomzelllinien.....	21
3.2.7.1 Neuroblastomzelllinie SiMa.....	21
3.2.7.2 Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y.....	22
3.2.7.3 Neuroblastomzelllinie MHH-NB-11.....	22
3.2.8 Kurzübersicht der verwendeten Neuroblastomzelllinien.....	22
3.3 Proteom-Analyse.....	23
3.3.1 Isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten.....	23
3.3.2 IEF mit immobilisierten pH-Gradienten.....	24
3.3.3 2D-Gelelektrophorese.....	25
3.3.4 Difference Gel Electrophoresis (DIGE).....	26
3.3.5 Western-Blotting nach 2D-Gelelektrophorese.....	27
3.3.6 MALDI-ToF-Massenspektrometrie.....	28
3.3.6.1 Peptide Mass Fingerprint.....	30
3.3.6.2 Tandem-MS.....	31
3.3.7 Proteinvorfraktionierung in IEF-Gelen aus granuliertem Sephadex.....	32

4 Material und Methoden.....	34
4.1 Anzucht der EFT- und Neuroblastomzelllinien.....	34
4.1.1 Verwendete Zelllinien.....	34
4.1.2 Anzuchtsmedium.....	34
4.1.3 Anzuchtsbedingungen.....	35
4.1.4 Zellernte.....	35
4.1.5 Proteinextraktion.....	35
4.2 Anzucht von Bacillus subtilis.....	36
4.2.1 Verwendete Zelllinie.....	36
4.2.2 Anzuchtsmedium.....	36
4.2.2.1 Belitsky-Minimalmedium.....	36
4.2.2.2 Lysogeny broth Medium.....	37
4.2.3 Zellkultivierung.....	37
4.2.3.1 Glycerinkultur.....	37
4.2.3.2 Übernachtskultur.....	37
4.2.3.3 Hauptkultur.....	38
4.2.4 Proteinextraktion.....	38
4.2.5 Abtrennung der Ribosomen.....	38
4.2.6 Extraktion der integralen Membranproteine.....	39
4.3 Anzucht von Corynebacterium glutamicum.....	41
4.3.1 Verwendete Zelllinie.....	41
4.3.2 Anzuchtsmedium.....	41
4.3.3 Wachstumsbedingungen.....	42
4.3.4 Wachstumskurve.....	42
4.3.5 Proteinextraktion.....	43
4.3.5.1 Proteinextraktion für anschließende Sephadex-Vorfraktionierung.....	43
4.3.5.2 Extraktion der integralen Membranproteine.....	44
4.3.6 Bestimmung des Proteingehalts der Extrakte.....	45
4.4 2D-Gelelektrophorese.....	46
4.4.1 Isoelektrische Fokussierung mit IPGs.....	46
4.4.1.1 Herstellung von IPG-Gelen.....	46
4.4.1.2 Rehydratisierung der IPG-Streifen.....	53
4.4.1.3 IEF mit der IPGPhor.....	54
4.4.2 SDS-PAGE.....	56
4.4.2.1 Herstellung von SDS-Gelen.....	56
4.4.2.2 Äquilibration der IPG-Streifen.....	58
4.4.2.3 Befüllen des Elektrophoresetanks.....	59
4.4.2.4 Laufparameter.....	60
4.4.2.5 Beendigung der SDS-PAGE.....	61
4.5 Proteinvisualisierung	61
4.5.1 Silberfärbung nach Blum et al. (modifiziert).....	61
4.5.2 Coomassie Brilliant-Blau Färbung.....	62
4.5.3 Flamingo Färbung.....	63
4.5.4 Emerald ProQ-Färbung.....	63
4.5.5 Diamond ProQ-Färbung.....	65
4.5.6 SyproRuby-Färbung.....	66
4.6 Gel Trocknung.....	67

4.7	Difference Gel Elektrophoresis (DIGE).....	68
4.7.1	Fluoreszenzlabeling der Proteine für DIGE.....	68
4.7.2	2D-Gelelektrophorese der DIGE-Proben.....	78
4.8	Computergestützte Auswertung der 2DE-DIGE Gele.....	78
4.8.1	Digitalisierung der Gele.....	78
4.8.2	Auswertung der DIGE-Gele.....	79
4.8.2.1	Progenese.....	79
4.9	Western-Blot Analyse der EFT- und Neuroblastomzelllinien.....	80
4.9.1	Western-Blotting.....	80
4.9.2	Glykoproteindetektion mit dem DIG Glycan Differentiation Kit.....	82
4.9.3	Digitalisierung und Auswertung der Western-Blots.....	86
4.9.4	Positionsbestimmung der Glykoproteine auf 2D-Gelen.....	86
4.10	Proteinidentifizierung durch MALDI-MS.....	87
4.10.1	Probenvorbereitung.....	87
4.10.2	MALDI-MS Parameter.....	89
4.10.3	Proteinidentifizierung.....	89
4.11	Trägerampholyt-Vorfraktionierung von Proteinen in Sephadex-IEF Gelen.....	90
4.12	Optimierung der IEF mit IPG für integrale Membranproteine.....	90
5	Ergebnisse.....	91

Tumorproteomics

5.1	Erfassung des Gesamtproteoms von EFT- und Neuroblastomzelllinien.....	91
5.1.1	Erfassung des Proteoms mit IPG 3-12	92
5.1.2	Kartierung der Proteine mit IPG 4-7.....	95
5.2	Differentielle Proteomanalyse der EFT- und Neuroblastomzelllinien.....	97
5.3	Proteinfärbetechniken zur Visualisierung von posttranslationalen Modifikationen.....	99
5.4	DIGE von 3 EFT- und 2 Neuroblastomzelllinien.....	102
5.4.1	Reproduzierbarkeit der biologischen Replikate.....	108
5.4.2	Reproduzierbarkeit der technischen Replikate.....	108
5.4.3	Differentielle Proteomanalyse mit IPG 3-12.....	109
5.5	Differentiell exprimierte Proteine von 6 EFT- und 3 NB- Zelllinien im pH-Bereich 3-12	130
5.6	Differentiell exprimierte Proteine von 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien im pH-Bereich 4-7...	153
5.7	Differentielle Proteomanalyse der EWS/FLI1 Typ 1/ Typ 2 EFT-Zelllinien	167
5.7.1	Differentiell exprimierte Proteine im pH-Bereich 3-12.....	167
5.7.2	Differentiell exprimierte Protein im pH-Bereich 4-7.....	177
5.8	Differentielle Proteomanalyse mit DIG Glycan Differentiation Kit.....	184
5.9	Differentielle Glykoproteomanalyse der EWS/FLI1 Typ 1/ Typ 2 EFT-Zelllinien.....	192

Erfassung des Gesamtproteoms

5.10	Methodenentwicklung zur Vorfraktionierung von Proteinen mit pI > 7	193
5.10.1	Klassische Sephadexvorfraktionierung.....	194

5.10.2 Sephadexvorfraktionierung mit anodalem Probenauftrag.....	196
5.10.3 Optimierungsschritte.....	198
5.10.3.1 Optimierung für höhere Spannung bei nachfolgender IEF mit IPG.....	198
5.10.3.2 Verwendung anderer Trägerampholyte.....	199
5.10.3.3 Weitere pI-Marker.....	199
5.10.4 Fazit.....	199
5.10.5 Vorfraktionierung von Proteinen mit pI >7 aus Bacillus subtilis.....	201
5.10.5.1 Proteinextrakt aus Bacillus subtilis mit ribosomalen Proteinen.....	201
5.10.5.2 Fazit	206
5.10.5.3 Ribosomal abgereicherter Proteinextrakt von Bacillus subtilis	207
5.10.5.4 Standardprotokoll zur Vorfraktionierung basischer Proteine.....	209
5.10.6 Fazit der Vorfraktionierung von Proteinen mit pI ≥ 7.....	210
5.11 Methodenentwicklung zur Trennung von Membranproteinen durch 2DE.....	212
5.11.1 2DE von Bacteriorhodopsin.....	212
5.11.2 2DE von integralen Membranproteinen aus Modell-Mikroorganismen.....	214
5.11.2.1 Membranproteinextrakt aus Corynebacterium glutamicum.....	216
5.11.2.2 Membranproteinextrakt aus Bacillus subtilis.....	222
5.11.3 Fazit.....	224
6 Diskussion.....	226
6.1 Differentiell exprimierte Proteine zwischen EFT- und Neuroblastom-Zelllinien.....	226
6.1.1 Serin Hydroxymethyltransferase, mitochondrial (SHMT2).....	227
6.1.2 Actin, cytoplasmic 1 (ACTB).....	228
6.1.3 Septin-2.....	229
6.1.4 Heterogenous Ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3).....	230
6.1.5 Annexin A2.....	231
6.1.6 Chloride intracellular channel protein 4 (CLIC4).....	231
6.1.7 Ezrin.....	233
6.1.8 V-Typ Proton ATPase Subunit B (V-ATPase B).....	233
6.1.9 Elongationsfaktor 1-γ (EF-1γ).....	234
6.1.10 Annexin A1.....	234
6.1.11 Fazit.....	235
6.2 Differentiell regulierte Proteine zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 Zelllinien.....	236
6.2.1 60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1).....	236
6.2.2 Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKM2).....	237
6.2.3 T-complex Protein 1 subunit alpha, gamma, epsilon.....	238
6.2.4 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L).....	238
6.2.5 Stress-70 protein, mitochondrial (HSPA9).....	239
6.2.6 Gamma-enolase (NSE).....	239
6.2.7 ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B).....	240
6.2.8 Septin-2.....	240
6.2.9 Heat shock protein beta-1 (HSPB1).....	240
6.2.10 Fazit.....	241
6.3 Differentielle Glykoproteomanalyse von EFT- und NB-Zelllinien.....	242
6.3.1 Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (HADHA).....	242
6.3.2 Lamin-B1 (LMNB1).....	243
6.3.3 ATPase family AAA domain-containing protein 3A (ATAD3A).....	243

6.3.4 Fazit.....	244
6.4 Differentiell regulierte Proteine zwischen EFT- und NB-Zelllinien in der Literatur.....	245
6.5 Methodenentwicklung zur Vorfraktionierung von Proteinen mit $pI > 7$	246
6.6 Methodenentwicklung zur 2D-elektrophoretischen Trennung von integralen Membranproteinen.....	246
7 Zusammenfassung.....	248
7.1 Differentielle Proteomanalyse von EFT- und NB-Zelllinien.....	248
7.2 Differentiell regulierte Proteine zwischen EFT- und NB-Zelllinien in der Literatur.....	249
7.3 Differentielle Proteomanalyse von EWS/FLI1 Typ1/Typ2 Zelllinien.....	249
7.4 Differentielle Glykoproteomanalyse von EFT- und NB-Zelllinien.....	250
7.5 Methodenentwicklung zur 2D-elektrophoretischen Vorfraktionierung von niedrig abundanten Proteinen mit einem $pI > 7$	250
7.6 Methodenentwicklung zur 2D-elektrophoretischen Trennung von integralen Membranproteinen.....	250
8 Abstract.....	252
8.1 Differential proteome analysis of Ewing Family of Tumors and Neuroblastoma cell lines.	252
8.2 Differentially expressed proteins in EFT- and NB cell lines in literature.....	253
8.3 Differential proteome analysis of EWS/FLI1 Type1/ Type2 cell lines.....	253
8.4 Differential glycoproteome analysis of EFT- and NB cell lines.....	254
8.5 Method development for 2D-elektrophoretical separation of low-abundant proteins with a $pI > 7$	254
8.6 Method development for separation of integral membrane proteins by 2DE.....	254
Anhang I – Identifizierte Proteine IPG 3-12.....	255
Anhang II - Identifizierte Proteine IPG 4-7.....	262
Anhang IV EWS/FLI1 Typ1/Typ2 Grafiken (IPG 3-12).....	267
Anhang V EWS/FLI1 Typ1/Typ2 Grafiken (IPG 4-7).....	288
Anhang V Abkürzungsverzeichnis der Proteinklassen.....	299
Anhang VI – Geräteliste.....	300
Anhang VII - Chemikalienliste.....	301
Literaturverzeichnis.....	303

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genetisches Modell der Neuroblastomentwicklung.....	16
Abbildung 2: Risikogruppeneinteilung nach NB2004.....	21
Abbildung 3: Prinzip der IEF.....	24
Abbildung 4: Prinzip der 2D-Gelelektrophorese.....	25
Abbildung 5: Eigenschaften der CyDyes und Vorbereitung für gemeinsame 2D- Gelelektrophorese.....	27
Abbildung 6: Aufbau eines diskontinuierlichen Semi-Dry Western-Blots.....	28
Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines MALDI-ToF Massenspektrometers.....	30
Abbildung 8: Prinzip des Peptide Mass Fingerprintings, die Proteinidentifikation erfolgt durch den Abgleich des erhaltenen und des theoretischen Massenspektrums.....	31
Abbildung 9: Prinzip der Tandem-MS Analyse durch CID am Beispiel eines MALDI-ToF-ToF Massenspektrometer.....	32
Abbildung 10: Wachstumskurve von <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032.....	42
Abbildung 11: Probenauftrag in individuellen cup-loading strip holdern (oben) und multiplem cup-loading strip holder („Manifold“) (unten).....	55
Abbildung 12: Positionierung des Probenhalters auf dem IPG-Streifen.....	55
Abbildung 13: Aufbringen des IPG Streifens auf das SDS Gel.....	60
Abbildung 14: Mastergel IPG 3-12. Durch Massenspektrometrie identifizierte, mit IPG 3-12 getrennte Proteine sind durch Zahlen gekennzeichnet und in Anhang I gelistet. Die Proteinbeladungsmenge von 500 µg setzt sich gleichmäßig aus allen in Tabelle 24 und 25 aufgelisteten Zelllinien.zusammen, Coomassie Brilliant Blau Färbung.	93
Abbildung 15: Mastergel IPG 4-7. Durch Massenspektrometrie identifizierte, mit IPG 4-7 getrennte Proteine sind durch Zahlen gekennzeichnet und in Tabelle Anhang II gelistet. Die Proteinbeladungsmenge von 500 µg setzt sich zu gleichen Teilen aus den in Tabelle 24 und 25 aufgelisteten Zelllinien zusammen. Coomassie Brillant Blau Färbung.....	95
Abbildung 16: Vergleich der mit Silber gefärbten Proteine der Zelllinie E1-1 (Neuroblastom) (A) und Zelllinie E2-1 (EFT) (B). DIGE-Gel (Image-Overlay) der mit Cy3 (E1-1) und Cy5 (E2-1) gelabelten Proteine beider Zelllinien (C). Rote Kästchen kennzeichnen differentiell exprimierte Proteine. IPG 4-9, T=12% SDS-Gele.....	97
Abbildung 17: Vergleich von ProQ-Diamond (B) und ProQ-Emerald (C) und der	

Gesamtproteinanfärbung SyproRuby (A). Blaue (ProQ-Diamond) und rote Kreise (ProQ-Emerald) auf dem SyproRuby-Gel kennzeichnen die auf den jeweiligen Gelen detektierten PTM. I+II kennzeichnen die gemeinsam auf B+C gefundenen PTM.....	100
Abbildung 18: DIGE-Gele IPG 3-12 (Image-overlay) der jeweiligen gemeinsam aufgetragen Proben und des internen Standards (IPS). Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte mit Cy5 (roter Kanal), IPS mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteinspots sind gelb dargestellt.....	103
Abbildung 19: DIGE-Gele IPG 3-12 (Image-overlay) der jeweiligen gemeinsam aufgetragen Proben und des internen Standards (IPS). Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte mit Cy5 (roter Kanal), IPS mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteinspots sind gelb dargestellt.....	104
Abbildung 20: DIGE-Gele IPG 3-12 (Image-overlay) der jeweiligen gemeinsam aufgetragen Proben und des internen Standards (IPS). Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte mit Cy5 (roter Kanal), IPS mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteinspots sind gelb dargestellt.....	105
Abbildung 21: DIGE-Gele IPG 3-12 (Image-overlay) der jeweiligen gemeinsam aufgetragen Proben und des internen Standards (IPS). Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte mit Cy5 (roter Kanal), IPS mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteinspots sind gelb dargestellt.....	106
Abbildung 22: Repräsentatives DIGE-Gel der differentiell regulierten Spots im pH-Bereich 3-12 zwischen den EFT-Zelllinien A673 (A), SBSR-AKS (B), SK-N-MC (E2) und den NB-Zelllinien SiMa (C) und SH-SY5Y (E1). Die Ziffern korrespondieren zu den in Tabelle 30 und Abbildung 39 aufgelisteten Proteinnummern.....	110
Abbildung 23: I: Repräsentatives DIGE Gel IPG 3-12, mit eingezeichneten, differentiell regulierten Spots. II und III: 3D-Darstellung der jeweiligen Proteinspots. IV+V: Expressionsprofil des jeweiligen Proteinspots, d.h. sein Expressionsniveau in den jeweiligen Zelllinien (biologische Replikate wurden in dieselbe Gruppe aufgenommen), NB-Zelllinien sind in roter Schrift dargestellt. Regulierungsfaktor des Proteins rechts neben dem Expressionsprofil. Die Abkürzungen der Zelllinien sind in Tabelle 26 aufgeführt.	111
Abbildung 24: II: Spot Nr.3: Sec1 family domain-containing protein 1.....	112
Abbildung 25: II: Spot Nr.5: Nicht identifiziertes Protein.....	113
Abbildung 26: II: Spot Nr.7: Nicht identifiziertes Protein.....	114
Abbildung 27: II: Spot Nr.9: Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic.....	115
Abbildung 28: II: Spot Nr.11: RuvB-like-1.....	116
Abbildung 29: II: Spot Nr.13: Nicht identifiziertes Protein.....	117

Abbildung 30: II: Spot Nr.15: Annexin A1.....	118
Abbildung 31: II: Spot Nr.17: Nicht identifiziertes Protein.....	119
Abbildung 32: II: Spot Nr.19: Nicht identifiziertes Protein.....	120
Abbildung 33: II: Spot Nr.20: Annexin A2.....	121
Abbildung 34: II: Spot Nr.23: Nicht identifiziertes Protein.....	122
Abbildung 35: II: Spot Nr.25: Complement component 1 Q subcomponent-binding protein....	123
Abbildung 36: II: Spot Nr.27: Chloride intracellular channel protein 1.....	124
Abbildung 37: II: Spot Nr.29: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	125
Abbildung 38: II: Spot Nr.31: Peroxiredoxin-2.....	126
Abbildung 39: Heatmap der differentiell regulierten Proteine im pH-Bereich 3-12. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.....	128
Abbildung 40: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	134
Abbildung 41: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	135
Abbildung 42: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	136
Abbildung 43: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	137
Abbildung 44: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	138

Abbildung 45: Übersicht der mit DIGE detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen den EFT- und NB-Zelllinien mit IPG 3-12. Nummern korrespondieren mit den in Tabelle 33 und Abbildung 51 angegebenen Proteinen.....	139
Abbildung 46: I: Repräsentatives DIGE Gel IPG 3-12, mit eingezeichneten, differentiell regulierten Spots. II und III: 3D-Darstellung der jeweiligen Proteinspots. IV+V: Expressionsprofil des jeweiligen Proteinspots, d.h. sein Expressionsniveau in den jeweiligen Zelllinien (biologische Replikate wurden in dieselbe Gruppe aufgenommen), NB-Zelllinien sind in roter Schrift dargestellt. Regulierungsfaktor des Proteins rechts neben dem Expressionsprofil. Die Abkürzungen der Zelllinien sind in Tabelle 31 aufgeführt.	140
Abbildung 47: II: Spot Nr.3: Actin, cytoplasmic 1	141
Abbildung 48: II: Spot Nr.5: hnRNP H3.....	142
Abbildung 49: II: Spot Nr.7: Annexin A2.....	143
Abbildung 50: II: Spot Nr.9: Chloride intracellular channel protein 4.....	144
Abbildung 51: Heatmap der differentiell regulierten Proteine zwischen EFT- und NB-Zelllinien im pH-Bereich 3-12. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.....	145
Abbildung 52: Heatmap der differentiell regulierten Proteine im pH-Bereich 3-12. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.....	148
Abbildung 53: Expressionsprofile der nach gezielter Suche und Bearbeiten der Spotmap zusätzlich detektierten differentiell regulierten Proteine zwischen 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien	150
Abbildung 54: Expressionsprofil zwischen 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien des nach gezielter Suche und Bearbeiten der Spotmap zusätzlich detektiertem, im 6 EFT- vs. 3 NB-Zelllinien differentiell regulierten Protein.....	151
Abbildung 55: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	154
Abbildung 56: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	155
Abbildung 57: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte	

Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt. Gel13 ist aufgrund eines Softwarefehlers während des Scanvorgangs nicht verwendbar.....	156
Abbildung 58: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	157
Abbildung 59: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.....	158
Abbildung 60: Übersicht der mit DIGE detektierten, differentiell regulierten Proteinspots zwischen EFT- und NB-Zelllinien im pH-Bereich 4-7. Die Nummern korrespondieren zu den in Tabelle 35 und Abbildung 65 angegebenen.....	159
Abbildung 61: I: Repräsentatives DIGE Gel IPG 4-7, mit eingezeichneten, differentiell regulierten Spots. II und III: 3D-Darstellung der jeweiligen Proteinspots. IV+V: Expressionsprofil des jeweiligen Proteinspots, d.h. sein Expressionsniveau in den jeweiligen Zelllinien (biologische Replikate wurden in dieselbe Gruppe aufgenommen), NB-Zelllinien sind in roter Schrift dargestellt. Regulierungsfaktor des Proteins rechts neben dem Expressionsprofil. Die Abkürzungen der Zelllinien sind in Tabelle 34 aufgeführt.	160
Abbildung 62: II: Spot Nr.3: Elongation factor 1-gamma.....	161
Abbildung 63: II: Spot Nr.5: Annexin A1.....	162
Abbildung 64: II: Spot Nr.7: Chloride intracellular channel protein 4.....	163
Abbildung 65: Heatmap der differentiell regulierten Proteine zwischen EFT- und NB-Zelllinien im pH-Bereich 4-7. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.....	164
Abbildung 66: Übersicht der durch DIGE detektierten, differentiell regulierten Proteinspots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 exprimierenden EFT-Zelllinien im pH-Bereich 3-12.....	168
Abbildung 67: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.....	169
Abbildung 68: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf	

- Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.....170
- Abbildung 69: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.....171
- Abbildung 70: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.....172
- Abbildung 71: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.....173
- Abbildung 72: Heatmap der differentiell regulierten Proteine zwischen den EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 exprimierenden Zelllinien im pH-Bereich 3-12. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.....174
- Abbildung 73: Übersicht der durch DIGE detektierten, differentiell regulierten Proteinspots zwischen EWS/FLI1Typ1 und Typ2 exprimierenden EFT-Zelllinien im pH-Bereich 4-7.....177
- Abbildung 74: Expressionsprofile der mit IPG 4-7 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 73 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang IV.....178
- Abbildung 75: Expressionsprofile der mit IPG 4-7 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 73 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang IV.....179
- Abbildung 76: Expressionsprofile der mit IPG 4-7 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 73 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang IV.....180

- Abbildung 77: Western-Blots der mit DIG-Label 1 gefärbten, differentiellen Glykoproteomanalyse von EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die vereinigten Western-Blots der EFT- und Neuroblastomzelllinien sind in (A) bzw. (B) dargestellt. (C) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen EFT-Zelllinien (D) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen Neuroblastomzelllinien. Buchstaben kennzeichnen die jeweilige Zelllinie, Zahlen das jeweilige biologische Replikat. Kennzeichnung des differentiell regulierten Proteins durch Ellipse (A-D) und Nummer (A,B).....185
- Abbildung 78: Western-Blots der mit DIG-Label 1 gefärbten, differentiellen Glykoproteomanalyse von EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die vereinigten Western-Blots der EFT- und Neuroblastomzelllinien sind in (A) bzw. (B) dargestellt. (C) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen EFT-Zelllinien (D) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen Neuroblastomzelllinien. Buchstaben kennzeichnen die jeweilige Zelllinie, Zahlen das jeweilige biologische Replikat. Kennzeichnung des differentiell regulierten Proteins durch Kreis (A-D) und Nummer (A,B). Geblottete 2D-Gele wurden mit IPG 3-12 und SDS-Gelen mit T=12% angefertigt.....186
- Abbildung 79: Vereinigte Western-Blots der jeweiligen Tumorarten und DIG-Label. (A) EFT-Zelllinien und DIG-Label 2. (B) Neuroblastomzelllinien und DIG-Label 2. (C) EFT-Zelllinien und DIG-Label 3. (D) Neuroblastomzelllinien und DIG-Label 3. (E) EFT-Zelllinien und DIG-Label 4. (F) Neuroblastomzelllinien und DIG-Label 4. Es konnte keine für eine Tumorart spezifische differentielle Glykosylierung gefunden werden, die in allen Zelllinien der jeweiligen Tumorart vorhanden bzw. nicht vorhanden war. Geblottete 2D-Gele wurden mit IPG 3-12 und SDS-Gelen mit T=12% angefertigt.....187
- Abbildung 80: Western-Blots der mit DIG-Label 5 gefärbten, differentiellen Glykoproteomanalyse von EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die vereinigten Western-Blots der EFT- und Neuroblastomzelllinien sind in (A) bzw. (B) dargestellt. (C) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen EFT-Zelllinien (D) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen Neuroblastomzelllinien. Buchstaben kennzeichnen die jeweilige Zelllinie, Zahlen das jeweilige biologische Replikat. Kennzeichnung des differentiell regulierten Proteins durch Kreis (A-D) und Nummer (A,B). Geblottete 2D-Gele wurden mit IPG 3-12 und SDS-Gelen mit T=12% angefertigt.....188
- Abbildung 81: Ausschnitt der mit DIG-Label 1 gefärbten Western-Blots der Zelllinien A-1 und G-1. Glykoproteine der Zelllinie A-1 sind blau, Glykoproteine der Zelllinie G-1 rot dargestellt. A zeigt, dass die Lage des vermeintlich in der Neuroblastom-Zelllinie G-1 vorkommende als differentiell reguliert angesehenen Glykoproteins Nr.1 nicht mit dem in den EFT-Zelllinien vorkommenden Protein Nr.1 übereinstimmt. B zeigt das als differentiell reguliertes Glykoprotein identifizierte Protein Nr. 1 an (siehe Abbildung 77).....190
- Abbildung 82: KSV, Start der Fokussierung.....194
- Abbildung 83: KSV, 450 Vh: Die pI-Marker beginnen zu fokussieren, pH-Bereich über 10,1 ist nicht mehr vorhanden.....194

Abbildung 84: KSV, 1500 Vh: Basischer Bereich über pH 10,1 ist nicht vorhanden, noch keine abgeschlossene Fokussierung der sauren pI-Marker.....	194
Abbildung 85: ASV, Start der Vorfraktionierung.....	196
Abbildung 86: ASV, 300 Vh, der pI-Marker 10,1 fokussiert nicht in einer scharfen Bande und wurde in nachfolgenden Versuchen durch pI-Marker 10,2 ersetzt.....	197
Abbildung 87: Ende der Fokussierung, 500 Vh. Sephadexgel mit 3mg Proteinextrakt aus Bacillus subtilis.....	200
Abbildung 88: Probennahme, die römischen Ziffern stehen für die einzelnen Fraktionen.....	200
Abbildung 89: Fraktion I: Die zu Abbildung 88 korrespondierende entnommene Sephadex-Fraktion, 2DE mit IPG 3-12 und T=15% SDS-Gel, Flamingofärbung. Fraktion II: Die zu Abbildung 88 korrespondierende entnommene Sephadex-Fraktion, 2DE mit IPG 3-12 und T=15% SDS-Gel, Flamingofärbung. Leichte Kreuzkontaminationen mit Fraktion I sind zu sehen (Roter Rahmen).....	202
Abbildung 90: Fraktion III + IV+V: Die zu Abbildung 88 korrespondierende entnommene Sephadex-Fraktion aus Bacillus subtilis Proteinextrakt, 2DE mit IPG 3-12 und T=15% SDS-Gel, Flamingofärbung. Keine Proteine nachweisbar.....	203
Abbildung 91: 2DE-Gel des vorfraktionierten Proteinextrakts aus Bacillus subtilis, Fraktion II, IPG 3-12, T=15% SDS-Gel, Flamingo-Färbung, Zahlen kennzeichnen identifizierte Proteine mit $pI \geq 7$. Auflistung der Proteine in Tabelle 48 und 49.....	203
Abbildung 92: 2DE des vorfraktionierten, ribosomal abgereicherten Proteinextrakts aus Bacillus subtilis, Fraktion II, Flamingofärbung, Zahlen kennzeichnen die identifizierten Proteine mit $pI \geq 7$	206
Abbildung 93: 2DE von Bacteriorhodopsin mit in AcN-Quellpuffer rehydratisiertem IPG 3-10, T=13%, Silberfärbung nach Blum (modifiziert).....	213
Abbildung 94: Theoretische Verteilung der hoch-abundanten Proteine von C. glutamicum, Membranproteine sind rot markiert, die gestrichelte Linie grenzt den zoom-in Bereich ein. Abundanz der Proteine linear proportional zu ihrer Größe auf der Abbildung.....	216
Abbildung 95: Identifizierte integrale Membranproteine aus C. glutamicum, 400 μ g Proteinbeladung, Quellpuffer XY (mit Detergenzien und 50% AcN). IPG 3,4-5,4; T=13%; Coomassie Brilliant Blau Färbung.....	217
Abbildung 96: Identifizierte integrale Membranproteine aus C. glutamicum, 400 μ g Proteinbeladung, Quellpuffer Y (mit Detergenzien, ohne AcN). PG 3,4-5,4; T=13%; Coomassie Brilliant Blau Färbung.....	218
Abbildung 97: 2D-Gel mit den identifizierten integralen Membranproteinen. IPG 3-12; T=13%;	

Flamingofärbung. Auflistung der identifizierten Proteine in in Abbildung 98.....222

Abbildung 98: Liste der identifizierten integralen Membranproteine aus *Bacillus subtilis* mit in Quellpuffer XY rehydratisiertem IPG 3-12.....223

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kurzübersicht der verwendeten EFT-Zelllinien.....	12
Tabelle 2: Biologisch-klinische Neuroblastomen-Typen.....	17
Tabelle 3: Stadieneinteilung von Neuroblastomen nach INSS.....	18
Tabelle 4: Risikoeinteilung von Neuroblastomen nach klinisch-biologischen Gesichtspunkten	19
Tabelle 5: Kurzübersicht der verwendeten Neuroblastomzelllinien.....	22
Tabelle 6: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 3-12, je 15 ml.....	47
Tabelle 7: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 6-12, je 15ml.....	48
Tabelle 8: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 4-9, je 15 ml.....	49
Tabelle 9: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 4-7, je 15 ml.....	50
Tabelle 10: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 3,4-5,4; je 15 ml.....	51
Tabelle 11: Parameter der IEF auf IPGPhor für 18 cm IPG-Streifen.....	55
Tabelle 12: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele.....	57
Tabelle 13: Durchführungsprotokoll der Silberfärbung nach Blum et al. (modifiziert) [166].....	62
Tabelle 14: Durchführungsprotokoll der Flamingo Färbung.....	63
Tabelle 15: Durchführungsprotokoll der Emerald ProQ-Färbung.....	64
Tabelle 16: Durchführungsprotokoll der Diamond ProQ-Färbung.....	66
Tabelle 17: Durchführungsprotokoll der SyproRuby-Färbung.....	67
Tabelle 18: Ettan DIGE-Imager Parameter.....	77
Tabelle 19: Parameter zur Durchführung des Western-Blots.....	81
Tabelle 20: Zugabevolumen der jeweiligen Lektine.....	84
Tabelle 21: Protokoll zur Durchführung der Glykoproteindetektion mit dem DIG Glycan Differentiation Kit.....	84
Tabelle 22: Parameter des Ettan-DIGE Imagers zur Detektion von Cy2-gelabelten Proteinen auf	

Tabellenverzeichnis	XVI
PVDF-Membranen.....	86
Tabelle 23: Parameter für das Ettan MALDI-ToF Pro.....	88
Tabelle 24: Kurzübersicht der verwendeten EFT-Zelllinien, die Spalte m/w bezeichnet das Geschlecht, die Spalte P/M bezeichnet ob die Zelllinie aus einem die Primärtumor oder einer Metastase gewonnen wurde. Die Spalte bezeichnet die Translokation die zur Expression von EWS/FLI-1 führt.....	90
Tabelle 25: Kurzübersicht der verwendeten Neuroblastomzelllinien, die Spalte m/w bezeichnet das Geschlecht des Patienten, die Spalte Alter gibt das Patientenalter in Jahren an, die Spalte P/M ob die Zelllinie aus einem Primärtumor oder einer Metastase gewonnen wurde. Die Spalte MYCN-Amp gibt die Amplifizierung von MYCN an.....	90
Tabelle 26: Die in diesem Vorversuch verwendeten Zelllinien und ihre jeweiligen Kürzel.....	101
Tabelle 27: Probenauftragsschema der einzelnen 2D-DIGE Gele. Die Kürzel A,B,C,E1,E2 stehen für die jeweilige Zelllinie, (siehe Tabelle 26), die Ziffern für das verwendete biologische Replikat. IPS = Internal pooled standard aller Zelllinien.....	102
Tabelle 28: Auflistung der im Rahmen der Prüfung der Reproduzierbarkeit der biologischen Replikate der einzelnen Zelllinien detektierten, differentiell regulierten Spots.....	107
Tabelle 29: Prüfung der Reproduzierbarkeit der jeweiligen technischen Replikate einer Zelllinie.....	108
Tabelle 30: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien im pH-Bereich 3-12. Die Spalte Faktor gibt den durchschnittlichen Regulierungsfaktor des Proteins an, pI den isoelektrischen Punkt, MW das Molekulargewicht an. Die Spalte Power zeigt die Teststärke an, der q-Wert die zu erwartenden falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Ergebnisse. Die Abkürzungen exp. und theor. stehen für experimentell ermittelte bzw. theoretische Werte. Peptide gibt die Anzahl der durch peptide mass fingerprint zuordenbare Peptide des Proteins an, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Proteinidentifizierung in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.....	127
Tabelle 31: Verwendete Zelllinien und ihre jeweiligen Kürzel.....	132
Tabelle 32: Für die jeweiligen 2D-DIGE-Gele verwendete Proben. Die Kürzel A-H stehen für die einzelnen Zelllinien, die Ziffern für das jeweilige biologische Replikat, dahinter die Tumorart. IPS= Internal pooled standard.....	133
Tabelle 33: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3-12 zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die Spalte Faktor gibt den Regulierungsfaktor des Proteins an, pI den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell	

gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.....	146
Tabelle 34: Verwendete Zelllinien und ihre jeweiligen Kürzel.....	153
Tabelle 35: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 4-7 zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die Spalte Faktor gibt den Regulierungsfaktor des Proteins an, pI den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.....	165
Tabelle 36: Für den Vergleich der EWS/FLI-1 Typ 1 und Typ 2 exprimierender EFT verwendete Zelllinien.....	167
Tabelle 37: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3-12 zwischen EWS/FLI-1 Typ1 und Typ 2 Zelllinien.. Die Spalte pI gibt den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.....	175
Tabelle 38: Für den Vergleich der EWS/FLI-1 Typ 1 und Typ 2 exprimierender EFT verwendete Zelllinien.....	176
Tabelle 39: Heatmap der differentiell regulierten Proteine zwischen den EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 exprimierenden Zelllinien im pH-Bereich 4-7. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.....	181
Tabelle 40: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3-12 zwischen EWS/FLI-1 Typ1 und Typ 2 Zelllinien.. Die Spalte pI gibt den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.....	182

Tabelle 41: Auflistung der verwendeten Lektine, deren Beschreibung und Kürzel.....	184
Tabelle 42: Liste der identifizierten Glykoproteine des Vergleichs zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien.....	189
Tabelle 43: Laufparameter für klassische Sephadexvorfraktionierung.....	195
Tabelle 44: Getestete Mischungsverhältnisse von Trägeramphlyten.....	195
Tabelle 45: Laufparameter für Sephadex mit anodalem Probenauftrag.....	197
Tabelle 46: Laufparameter für die Vorfraktionierung.....	201
Tabelle 47: Fokussierungsparameter für die IEF mit IPG 3-12.....	201
Tabelle 48: Liste der in der mit 2DE getrennten Fraktion II identifizierten Proteine, die bereits zuvor in der Protecs-Datenbank aufgelistet wurden.....	204
Tabelle 49: Liste der im Rahmen dieser Dissertation erstmals identifizierten Bacillus subtilis Proteine mit $pI \geq 7$ aus Fraktion II der Vorfraktionierung von 3mg Proteinmasse.....	205
Tabelle 50: Auflistung der in Fraktion II des ribosomal abgereicherten Bacillus subtilis Proteinextrakts identifizierten Proteine, die zuvor schon im Zusammenhang mit der 2DE beschrieben wurden.....	207
Tabelle 51: Auflistung der in Fraktion II des ribosomal abgereicherten Bacillus subtilis Proteinextrakts identifizierten Proteine, die im Zusammenhang mit der 2DE bisher nicht beschrieben wurden. Spalte „Im Normalextrakt“ bedeutet, dass dieses Protein in Fraktion II des vorfraktionierten Normalextrakts (Kapitel 5.10.5.2) von Bacillus subtilis bereits identifiziert wurde (siehe Tabelle 48 und 49).....	207
Tabelle 52: Zugabevolumina der jeweiligen Trägerampholyte in das Sephadex-Gel.....	208
Tabelle 53: Laufparameter der Vorfraktionierung.....	208
Tabelle 54: Durchführungsparameter der IEF mit IPG 3-12 der jeweiligen Fraktionen.....	209
Tabelle 55: Im Rahmen dieser Dissertation erstmalig identifizierte Proteine mit $pI \geq 7$ aus Bacillus subtilis im Zusammenhang mit der 2DE. Die Spalte "aus Normalextrakt" bedeutet, dass dieses Protein in der Fraktion II des nicht ribosomal abgereicherten Bacillus subtilis Proteinextrakt identifiziert wurde.....	210
Tabelle 56: Fokussierungsparameter für IEF mit IPG 3-10.....	212
Tabelle 57: Übersicht der verwendeten IPG-Streifen, deren Rehydratisierungsbedingungen und Probenbeladung.....	216

Tabelle 58: Liste der identifizierten integralen Membranproteine. Schwarze Schrift: In Dissertation von C. Lück [18] bereits identifiziert. Grüne Schrift: Zusätzliche identifizierte Membranproteine bei Verwendung von Lyse- bzw. Quellpuffer Y. Rote Schrift: Zusätzlich identifizierte integrale Membranproteine bei Verwendung von Lyse- bzw. Quellpuffer XY. 220

Tabelle 59: In der Arbeit von Zanini et al. detektierte, zwischen EFT- und NB-Zelllinien differentiell regulierte Proteine. Fett geschriebene Proteine wurden im Rahmen dieser Dissertation zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 exprimierenden Zelllinien als differentiell reguliert detektiert.....244

Abkürzungsverzeichnis

2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
A	Ampere
AA	Acrylamid
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i>
Bis	Bisacrylamid
C	Anteil Quervernetzer
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHCA	α -Cyano-4-hydroxy Zimtsäure
CBB	Coomassie Brilliant Blau
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups of Proteins</i>
Da	Dalton
DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EFT	<i>Ewing Family of Tumors</i>
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPS	<i>Internal Pooled Standard</i>
MALDI	<i>Matrix assisted Laser desorption / ionization</i>
<i>mid-log</i>	Mitte der logarithmischen Wachstumsphase
min	Minute
Min	Minimal
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältniss Masse zu Ladung
NB	Neuroblastom
NEPHGE	<i>Non-equilibrium-pH-Gradient Electrophoresis</i>
OD	Optische Dichte
Δ OD	Veränderung der optischen Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
<i>rpm</i>	<i>Revolutions per Minute</i>

SDS	Natrium-Dodecylsulfat
s	Sekunde
T	Gehalt an Acrylamid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
tif	<i>Tagged image file</i>
ToF	<i>Time of flight</i>
Tris	Trizma Base
V	Volt

1 Einleitung

Ewing-Sarkome sowie Neuroblastome sind Tumore, die aus der Neuralleiste stammen und zur Familie der kleinen, runden, blau-zelligen Tumore der Kindheit gehören [1] [2]. Die Differentialdiagnostik wurde in den letzten Jahren zwar erleichtert, aber die Entdeckung von neuen Biomarkern zur Prognose bzw. Differenzierung wäre in beiden Fällen wertvoll, da sie als zusätzliche Faktoren zur Einteilung der Patienten in die entsprechenden Risikogruppen dienen könnten [3].

Die Proteomanalyse bietet die Möglichkeit das aktuelle Zellgeschehen auf Proteinebene abzubilden. Der Vorteil der Proteomanalyse gegenüber genetischen Methoden ist der höhere Informationsgehalt, da bei letzteren nur die reine DNA-, bzw. mRNA-Sequenz berücksichtigt wird. Bei der Proteomanalyse werden auch die posttranslationalen Modifikationen erfasst, die unter anderem als „Ein-/ Ausschalter“ von Proteinen wirken können [4], bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen [5] und die strukturelle Integrität der Proteine [6] gewährleisten. Kleinste Veränderungen in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen können starke Auswirkungen auf die gesamte Zelle haben und spielen, im Falle von Glykosylierungen, bei der Krankheitsentstehung eine wichtige Rolle [7], [8], [9], [10], [11].

Allerdings unterliegt die Proteomanalyse mithilfe der 2-dimensionalen Gelelektrophorese (2DE) auch Limitierungen: Proteine, die nur in geringer Anzahl exprimiert sind liegen häufig unterhalb der Detektionsgrenze der Proteinanfärbungsmethoden, höhere Proteinbeladungen führen aber zu Problemen bei der Auflösung und vermehrter Proteinpräzipitation (siehe 1.3.7). Dieses Problem kann durch Proteinvorfractionierungsverfahren gelöst werden, allerdings gibt es bis dato noch keine Möglichkeit Proteine mit basischem isoelektrischen Punkt (pI) mittels der von Görg et al. [12] [13] entwickelten Vorfractionierungsmethode zu trennen.

Eine weitere Limitierung der 2DE ist die schlechte Trennung von hydrophoben bzw. integralen Membranproteinen. Membranproteine spielen häufig eine Schlüsselrolle in verschiedenen Prozessen der Zelle, wie z.B. Zelladhäsion, Signaltransduktion und Ionen-, bzw. Metabolitentransport, so dass sie von besonderem Interesse für die Entwicklung von

Medikamenten sind [14]. Eine zusätzliche Erschwerung der Trennung stellt die Tatsache dar, dass Membranproteine meist einen basischen pI haben und/ oder nur gering exprimiert sind [15],[16].

2 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund des erweiterten Informationsgehalts der differentiellen Proteomanalyse gegenüber genetischen Methoden ist ein tieferer Einblick in die Krankheitsbilder der Ewing-Sarkome und der Neuroblastome zu erwarten. Es können sowohl differentiell exprimierte Proteine, als auch Unterschiede in den posttranslationalen Modifikationen, die eine Veränderung des pIs des Proteins bewirken, durch die *Difference Gel Electrophoresis* (DIGE) detektiert werden, sowie differentielle Glykosylierungen einzelner Proteine durch 2D-Western-Blot Verfahren.

Aufgrund der in Kapitel 1 geschilderten Limitierungen der 2D-Gelelektrophorese ist die Entwicklung eines geeigneten Vorfraktionierungsverfahrens für Proteine mit basischem pI erforderlich um auch in diesem Bereich gering exprimierte Proteine detektieren zu können. Außerdem ist die Entwicklung einer geeigneten Methode zur besseren Trennung von hydrophoben bzw. integralen Membranproteinen mittels der 2D-Gelelektrophorese von großem Nutzen, da diese Proteinklasse ca. ein Drittel des Proteoms darstellt [14] und somit ein großer Teil an Informationen verloren, bzw. nicht mit in die Analyse eingeht.

Die Methodenentwicklung wurde mit *Corynebacterium glutamicum* und *Bacillus subtilis* als Modellsystem durchgeführt, da es aufgrund ihres wenig komplexen Proteoms schon Arbeiten zur Erfassung ihres Gesamtproteoms gibt [17] [18], die im Rahmen dieser Arbeit weitergeführt werden. In Kombination mit ihrer einfachen und schnellen Anzucht, und der damit leicht verfügbaren Biomasse, stellen diese beiden Mikroorganismen somit ein ideales Modellsystem dar.

Folgend sind die Ziele dieser Arbeit nochmals stichpunktartig aufgelistet:

- Differentielle Proteomanalyse von Ewing-Sarkom und Neuroblastomzelllinien durch DIGE zur besseren Differenzierung der Tumorarten, zur Entdeckung prognostischer Marker und für ein besseres Verständnis der Auswirkungen der differentiell exprimierten Proteine auf die Stoffwechselfvorgänge innerhalb der Zelle.

- Differentielle Glykoproteinanalyse zum Auffinden von spezifischen Veränderungen der Glykosylierung von Proteinen einer Tumorart .
- Weiterentwicklung der von Görg et al. [12], [13] entwickelten Methode zur Vorfraktionierung, um diese auch für Proteine mit basischem pI zugänglich zu machen.
- Entwicklung einer Methode zur 2D-Gelelektrophoretischen Trennung von integralen Membranproteinen.

3 Stand des Wissens

3.1 Die Ewing-Familie von Tumoren

Das Ewing-Sarkom wurde erstmals 1866 von Lücke [19] und 1890 von Hildebrand [20] beschrieben. In den Jahren 1921 [21], 1924 [22] und 1939 [23] wurden erste Fallstudien von James Ewing, nach dem später der Tumor benannt wurde, publiziert. Zur Familie der Ewing Tumoren (EFT) zählen die ossären Ewing-Sarkome, Ewing-Sarkome der Weichteile, der kleinzellige Tumor der Thoraxwand (Askin Tumor), maligne periphere neuroektodermale Tumore (MPNET) und atypische Ewing-Sarkome [24].

3.1.1 Epidemiologie

Das Ewing-Sarkom ist der zweit häufigste Knochentumor der im Kindesalter auftritt [25]. Er tritt hauptsächlich in der hellhäutigen Bevölkerung auf, nur äußerst selten bei Menschen afrikanischen oder asiatischen Ursprungs [26]. Der Grund hierfür könnte in einem interethnischen Polymorphismus der an der Entstehung von Ewing-Sarkomen beteiligten Genregion liegen [27]. Die alterstandardisierte Inzidenzrate liegt bei 3 pro Million. Die Mehrheit der Patienten (60%) ist männlich. Die meisten Patienten (57,1%) erkranken zwischen dem 10. und dem 19. Lebensjahr, der Median des Alters bei Krankheitsentdeckung beträgt 15 Jahre. Die häufigste Lokalisation der Primärtumore ist mit 32% der untere Extremitätenbereich, in 16% aller Fälle der Oberschenkelknochen. In 26% aller Fälle ist die Tumorlokalisierung im Becken. Ewing-Sarkome befinden sich zu 70-80% in den Röhrenknochen der Extremitäten, MPNET zu mehr als einem Drittel im Stammskelett und zu 20% im Becken, während atypische Ewing-Sarkome ca. 10% aller Befunde darstellen [28].

Die 5-Jahresüberlebensprognose liegt bei alleiniger Lokalthherapie bei 10% [29], durch die systemische Polychemotherapie konnte sie auf 50-60% erhöht werden [30]. Als negative prognostische Faktoren gelten Metastasen, numerische und strukturelle Veränderungen von Chromosom 12 (meist im Verbund mit einem „komplexen Karyotyp“, d.h. mehreren Veränderungen, auch auf anderen Chromosomen) [31]. Beckentumore haben eine ungünstige Prognose, da sie in der Regel spät entdeckt werden, sowie Tumore mit einem Volumen von

mehr als 100 ml [32]. Bei Auftreten eines Rezidivs innerhalb der ersten zwei Jahre beträgt die Überlebensprognose 7%, bei später auftretendem Rezidiv 32% [32],[33].

3.1.2 Histologie

Die EFT zeichnet sich aus durch einförmige runde Zellen mit kleinen, stark anfärbbaren Zellkernen, ohne scharfen Zytoplasmagrenzen. Die Zahl der Mitosen ist nur mäßig hoch. Das umgebende Gewebe ist zumeist stark nekrotisiert, mit ausgedehnter Knochendestruktion mit infiltrativem Tumorwachstum. Typische Charakteristika der EFT sind in 80% der Fälle PAS-Positivität aufgrund von Glykogenablagerungen im Zytoplasma sowie Nachweis von Vimentin [34]. Die Morphologie der Tumoren kann zwischen lobuär, organähnlich oder diffus variieren. Weitere Varianten beinhalten größere Zellen und unterschiedliche Grade neuraler Differenzierung [35]. Die Histogenese des Ewing Sarkoms ist unbekannt, da neurale Marker exprimiert werden können, allerdings sich auch Charakteristika von mesenchymalen bzw. epithelialen Zellen zeigen können [36]. Zur Zeit wird folgende Hypothese in Betracht gezogen: Die Ewing-Tumor-Stammzelle ist eine Zelle der embryonalen Neuralleiste, die sich im Stadium der Differenzierung zu einer mesenchymalen Zelle befindet, allerdings durch die EWS-Fli1 induzierte Exprimierung von EZH2 blockiert ist [37]. Eine weitere Eigenschaft der EFT ist die hohe Expression des MIC2-Gens, das für das Membranprotein CD99 kodiert [38]. Weitere Studien konnten allerdings zeigen, dass diese MIC2 Expression keine spezifische Eigenschaft der EFT ist, sondern MIC2 auch von einer Vielzahl anderer Tumoren und teilweise von Normalgewebe exprimiert wird [39].

Die EFT wird wie folgt eingeteilt [40],[41]:

Ewing-Sarkom:	Gering differenzierter ossärer Tumor mit kleinen, runden, blauen Zellen, Expression von maximal einem neuralen Marker
atypisches Ewing-Sarkom:	großzellige Morphologie, fehlende Glykogenablagerungen
MPNET:	Expression mindestens zweier neuraler Marker und/oder Homer-Wright-Rosetten

Die für die EFT typischen exprimierten neuronalen Marker sind NSE (Neuron Specific Enolase), NGF (Nerve Growth Factor), HNK-1, Synaptophysin, Chromogranin, Neurofilament (70kDa) und NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) [40],[42],[43].

3.1.3 Molekularbiologie

Die EFT vereinende molekulargenetische Eigenschaften ist die durch Translokation veränderte Region q12 auf Chromosom 22. In der Region q12 liegt die 7 Kilobasen große Region EWSR1 in der die Translokationsbruchstellen zwischen Exon 7 und Exon 11 des Gens EWS liegen [44]. In 83% der Fälle liegt eine Translokation der Region q24 von Chromosom 11 auf die Region q12 des Chromosoms 22 (t(11;22)(q24;q12)) vor [45],[46]. Diese Translokation resultiert in der Expression des anormalen Hybridproteins EWS-FLI1, bei der das N-terminale Ende des EWS mit der C-terminalen, DNA-bindenden Domäne von FLI1 verbunden wird [47]. Es werden mehrere Typen des EWS-FLI1 Hybridproteins unterschieden, wobei Folgende die häufigsten sind: Das Exon 7 des Gens EWS kann entweder mit dem Exon 6 von FLI1 (Typ 1), dem Exon 5 von FLI1 (Typ 2) [48]. FLI1 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der ETS (*E26 Transformation Specific*) Proteine. Das Hybridprotein EWS-FLI1 ist ein stärkerer Transkriptionsaktivator als FLI1 und kann bei Überexpression Zellveränderungen Vorschub leisten [49]. In ca. 10% der Fälle liegt eine t(21;22)(q24;q12) Translokation vor, die zur Expression des Hybridproteins EWS-ERG führt [48]. Äußerst selten ist das Vorkommen anderer Translokationen, die in der Expression von EWS-ETV1 (t(7;22)(p22;q12)), EWS-E1AF (t(17;22)(q12;q12)) und EWS-FEV (t(2;21;22)(q33;q22;q12)) resultieren [50],[51],[52]. In allen Fällen ist das EWS-Protein mit einem Protein der ETS-Familie fusioniert.

3.1.4 Therapie

Die zur Zeit durchgeführte Therapiestudie Euro-E.W.I.N.G 99 sieht folgendes Protokoll vor [53]:

Zunächst erfolgt an alle Patienten eine Gabe von 6 Blöcken Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin und Etoposid (VIDE). Anschließend werden die Patienten in 3 Risikogruppen eingeteilt:

R1 (Standardrisiko):

- Keine Metastasen
- Weniger als 10% vitale Zellen nach Induktionstherapie im Tumorresektat (= gutes Ansprechen auf Chemotherapie)
- Tumolvolumen < 200ml

R2 (Hochrisikogruppe):

R2loc: - Keine Metastasen

- Mehr als 10% vitale Zellen nach Induktionstherapie im Tumorresektat (=schlechtes Ansprechen auf Chemotherapie)

oder: - Tumor mit Volumen > 200ml

R2pulm: - Lungen- oder Pleurametastasen

R3 (Experimentelle Gruppe): - Metastasen in Knochen, Knochenmark oder multifokal.

Falls möglich erfolgt nach der Induktionstherapie eine Resektion des Tumors mit anschließender einmaliger Gabe von Vincristin, Actinomycin D und Ifosfamid (VAI). Bei schlechtem Ansprechen des Patienten auf die Chemotherapie und/oder bei Tumoren mit schlecht rezesierbaren Grenzen erfolgt eine Radiotherapie. Anschließend findet in

Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit eine Konsolidierungstherapie statt. Die Mitglieder der Risikogruppen R1, R2loc und R2pulm werden in 2 Untergruppen zufällig unterteilt.

R1-Gruppe 1: 7 Blöcke Vincristin, Actinomycin D, Cyclophosphamid (VAC)

R1-Gruppe 2: 7 Blöcke Vincristin, Actinomycin D, Ifosfamid (VAI)

R2loc-Gruppe 1: 7 Blöcke VAI

R2loc-Gruppe 2: Busulphan- und Melphalan-Hochdosistherapie

R2pulm-Gruppe1: 7 Blöcke VAI und Radiotherapie

R2pulm-Gruppe2: Busulphan- und Melphalan-Hochdosistherapie

Die experimentelle Gruppe R3

R3: Busulphan- und Melphalan-Hochdosistherapie
Treasulfan- und Melphalan-Hochdosistherapie mit
PBPC-rescue
Melphalan-Etoposid-Hochdosistherapie
Alternativen in Phase-II der Studie

3.1.5 Charakterisierung der verwendeten EFT-Zelllinien

3.1.5.1 Ewing-Sarkom Zelllinie A673

Die Zelllinie A673 stammt von einer 15-jährigen weiblichen Patientin und wurde 1973 etabliert [54]. Zunächst wurde der Tumor als primäres Rhabdomyosarkom klassifiziert, eine zytogenetische Analyse im Jahr 2003 berichtete die Diagnose auf Ewing-Tumor. Der Tumor hat einen komplexen Karyotyp mit einer Vielzahl von Umgestaltungen auf den Chromosomen 3, 5, 8, 9 und 16. Unbalancierte Translokationen der(1)t(1;19), t(5;8), der(16)t(3;16), der(9)t(9;13) und der(11)t(11;13) sowie der Verlust von DNA auf den Chromosomen 3 und 4. Das für den Ewing-Tumor typische Hybridprotein EWS-FLI1 (Typ 1) wird exprimiert, die charakterisierende t(11;22)-Translokation liegt aber durch weitere Derivatisierung auf Chromosom 13 [der(13)t(11;13)(q13;q14)t(11;22)(q24;q12)] [55],[56].

3.1.5.2 Ewing-Sarkom Zelllinie SBSR-AKS

SBSR-AKS ist eine Zelllinie, die aus einer extraossären Metastase in der Leistengegend einer 17-jährigen weiblichen Patientin etabliert wurde. Die Tumorzellen exprimieren das Hybridprotein EWS-FLI1 (Typ 1) [37].

3.1.5.3 Ewing-Sarkom Zelllinie SK-ES1

Diese Zelllinie wurde 1971 etabliert. Die Originalprobe stammt aus dem Knochengewebe eines 18-jährigen männlichen Patienten europäischer Abstammung. Die Tumorzellen haben die typische Translokation $t(11;22)(q24;q12)$ und exprimieren das Hybridprotein EWS-FLI1 (Typ 2), die Anzahl der Chromosomen schwankt zwischen 44 und 51 mit einem Modalwert von 49 [56], [57],[58]. Weitere chromosomale Modifikationen sind $der(3)t(3;12)(q21;q13)$, $del(3)(q21)$, $inv(1)(p36.1q21)$ und $der(16)t(5;16)(q13;p13.3)$. Es wurden 3 Y-autosomale Marker, aber kein normales Y-Chromosom gefunden [58].

3.1.5.4 Ewing-Sarkom Zelllinie SK-N-MC

SK-N-MC stammt von einem 15-jährigen Mädchen, bei dem 3 Jahre zuvor ein Neuroblastom in der linken Brustwand entdeckt wurde. 1971 wurde ein zweites Tumor-Wiedererscheinen entdeckt. Die Biopsie dieses Gewebes wurde zur Etablierung der Zelllinie SK-N-MC im Jahre 1973 verwendet [59].

Diese Zelllinie besitzt als charakteristische Eigenschaft *double-minutes* Chromosome (Chromosome, die repliziert werden, obwohl sie kein Centromer besitzen), die nach 42 Tagen im Kulturmedium in 70% der Zellen vorkamen, nach 244 Tagen allerdings nur noch in 14% aller Zellen [59].

Zunächst wurde die Zelllinie als Neuroblastom klassifiziert [59], später als Askin Tumor [60], der wiederum den Ewing-Sarkomen zugeordnet wurde. Die Zellen haben einen komplexen Karyotyp mit der Translokation $t(2;11;22;21)(q32;q24;q12;q11)$ und exprimieren das Hybridprotein EWS-FLI1 (Typ 1) [60], [61],[62]. Weitere chromosomale Veränderungen sind die Translokation $t(1;3)(q22;q27)$ und $t(1;4)(p36;p13)$ [60].

3.1.5.5 Ewing-Sarkom Zelllinie MHH-ES1

Die Zelllinie MHH-ES1 wurde aus einer peritonealen Metastase im Bauchwasser eines 12-jährigen männlichen, türkischen Patienten etabliert. Der Primärtumor war im linken Beckenbereich lokalisiert [63]. Der Karyotyp ist hyperdiploid mit 12% Polyploidität: 49(46-51)<2n>XXY, +X, +1, +8, +12, -17, dup(1)(q31.1q32.2), del(3)(p11), der(4)t(4;?6)(p14;p11), t(6;7)(q11;p11), der(8)t(8;11)(p12;q13) [64]. Die Translokation t(11;22)(q24;q12) resultiert in der Expression des Hybridprotein EWS-FLI1 (Typ 2) [65].

3.1.5.6 Ewing-Sarkom Zelllinie TC-71

TC-71 (*Tissue Culture* 71) wurde 1981 aus dem Ewing-Tumor des Oberarmknochens eines 22-jährigen männlichen Patienten etabliert. Die Zellen haben einen komplexen Karyotyp mit multiplen numerischen und strukturellen chromosomalen Veränderungen: 76(65-84)<3n>XX, -Y, +1, +2, -3, +6, +8, -9, +11, -17, +21, +2-11 mar, t(1;7)(q25;p11), del(2)(q36), t(2;14)(q12;q32)3q+, ?5, del(6)(q26), del(7)(q31), t(7;11)(q21,q23), t(8;14)(q11;p11), add(3)(q29), add(6)(q25)x2-3, del(8)(p22), add(8)(p22), del(9)(p24), add(14)(p11). Diese Zelllinie trägt die Translokation t(11;22)(q24;q12) doppelt und exprimiert das Hybridprotein EWS-FLI1 (Typ 1) [60], [64].

3.1.6 Kurzübersicht der verwendeten EFT-Zelllinien

Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Merkmale der verwendeten EFT-Zelllinien nochmals kurz auf.

Zelllinie	Alter	m/ w	Lokalisation	P/M	Translokation	Hybridprotein, Typ
A673	15	w	Muskel	P	der(13)t(11;13)(q13q14)t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1, Typ 1
SBSR-AKS	17	w	Leiste	M	-	EWS-FLI1, Typ 1
SK-ES1	18	m	Knochen	P	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1, Typ 2
SK-N-MC	15	w	Brustwand	M	t(2;11;22;21)(q32;q24;q12;q11)	EWS-FLI1, Typ 1
MHH-ES1	12	m	Bauchfell	M	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1, Typ 2
TC-71	22	m	-	M	t(11;22)(q24;q12)x2	EWS-FLI1, Typ 1

Tabelle 1: Kurzübersicht der verwendeten EFT-Zelllinien

3.2 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein Tumor der embryonalen Neuralleiste [66] und wurde erstmals 1863 von Virchow [67] beschrieben. Während der fötalen Entwicklung der Nebennieren treten dort sogenannte Neuroblastome *in situ* bis zu 200-mal häufiger auf, als sich später klinisch manifestieren [68]. Deren Ursprung liegt während der Entwicklung des embryonalen Nervensystems, bei der es häufig zu Rückbildungen kommt, die durch massiven auftretenden Zelltod der unreifen Neuroblasten gekennzeichnet sind (Involution) [69],[70]. Im Verlauf der Entwicklung des Nebennierenmarks entstehen Aggregate aus unreifen Zellen (Neuroblastische Knötchen) die vermutlich später entweder das Nebennierenmark bilden oder rückgebildet werden [71]. Es ist noch unklar ob Neuroblastome *in situ* Reste der embryonalen Entwicklung, Hyperplasien oder Neoplasien sind [72]. Ein Neuroblastom kann auch spontaner Reifung zum Ganglioneuroblastom und schließlich zum gutartigen Ganglioneurom unterliegen [73]. Es sind auch Fälle bekannt, in denen sich das Neuroblastom spontan zurückgebildet hat [74],[75].

3.2.1 Epidemiologie

Das Neuroblastom macht 7-10% aller Krebserkrankungen bei Kindern aus und ist der meistdiagnostizierte Krebs im Verlauf der Kindheit. Die Inzidenzrate liegt bei 58 Fällen pro 1.000.000 Kindern und Jahr [76]. Der Median des Alters bei Diagnose liegt bei 18 Monaten, 98% aller Fälle werden bis zum 10. Lebensjahr diagnostiziert [77]. Der Primärtumor ist in ungefähr der Hälfte der Fälle im Nebennierenmark, im Rest der Fälle in den paraspinalen Ganglien der Brust und des Abdomens, sowie den Beckenganglien lokalisiert. Eine Metastasierung findet schon früh statt und prägt oft das klinische Bild als Frühsymptom [78]. Patienten mit schon pränatal entstandenem Neuroblastom haben zu ca. 66% Lebermetastasen, 10% Hautmetastasen, 2% Skelettmetastasen und zu 20% kombinierte Metastasierung der Leber, Haut, Lymphknoten und Knochen. Bei Patienten im Alter von 4-12 Monaten verringert sich der Anteil der Lebermetastasen auf 33% während der Anteil der Knochenmetastasen auf 20% steigt [79].

Neuroblastome zeigen eine hohe Variabilität des klinischen Verhaltens. Dies kann zwischen spontaner Regression [74],[75] und tödlichem Tumorfortschritt schwanken. Dieses Verhalten zeigt sich auch bei Patienten mit metastasierten Tumoren [80]. Um die Überlebensrate von

erkrankten Neugeborenen zu verbessern wurden mehrere Massen-Screenings [81],[82],[83] durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die Zahl der diagnostizierten Neuroblastomen um 50-100% anstieg, diese in der Mehrzahl aber günstige prognostische Faktoren (siehe Tabelle 2) zeigten. Allerdings zeigte sich im Vergleich zur nicht gescreenten Gruppe keine Veränderung in der Anzahl der fortgeschrittenen Neuroblastome bei Kindern älter als einem Jahr und keine Verbesserung der Überlebensrate [83],[84]. Aufgrund des hochvariablen klinischen Verhaltens und der Ergebnisse der Massenscreenings wird angenommen, dass Neuroblastome aus mindestens zwei klinisch-biologischen Unterarten (siehe 3.2.3) bestehen.

3.2.2 Histologie

Makroskopisch lassen Neuroblastome einen lobulierten, weichen Tumor erkennen, und der in den meisten Fällen durch Nekrosen und Verkalkungen gekennzeichnet ist. Neuroblastome imponieren als kleine, blaue, runde Zellen, mit dichtem Kern und spärlichem Zytoplasma, die gelegentlich als Homer-Wright-Rosetten angeordnet sind [85],[86].

Zur Gruppe der neuroblastischen Tumore gehören Neuroblastome, Ganglioneuroblastome sowie Ganglioneurome und werden laut der *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC) [87] in 4 Grundklassen eingeteilt:

<i>International Neuroblastoma Pathology Classification</i>		Prognose
Neuroblastom	(arm an Schwann'schen Stroma-Zellen)	
< 1,5 Jahre	Kaum differenzierter oder sich differenzierender Tumor mit niedrigem oder mittleren Mitose-Karyorrhexis-Index (MKI)	Günstig
1,5-5 Jahre	Sich differenzierender Tumor mit niedrigem MKI	Günstig
< 1,5 Jahre	Undifferenzierter Tumor	Ungünstig
< 1,5 Jahre	Hoher MKI	Ungünstig

1,5-5 Jahre	Undifferenzierter oder kaum differenzierter Tumor	Ungünstig
1,5-5 Jahre	Mittlerer oder hoher MKI	Ungünstig
≥ 5 Jahre	Alle Neuroblastome	Ungünstig
Ganglioneuroblastom, gemischt (reich an Schwann'schen Stroma-Zellen)		
		Günstig
Ganglioneurom (Schwann'sche Stroma-Zellen dominieren)		
Reifend		Günstig
Reif		Günstig
Ganglioneuroblastom, nodulär (Mischform aus Stroma-reich, Stroma-dominant und Stroma-arm)		
		Ungünstig

3.2.3 Molekularbiologie

Es wird angenommen, dass Neuroblastome aus mindestens 2 verschiedenen biologisch-klinischen Gruppen bestehen. Diese Gruppen unterscheiden sich durch die in Tabelle 2 dargestellten chromosomalen Eigenschaften [77]. Laut dem genetischen Modell [77] haben alle Neuroblastome eine gemeinsame Vorläuferzelle, die sich jedoch in unterschiedlicher Weise weiterentwickelt und so die unterschiedlichen Neuroblastomtypen entstehen. Der erste Typ ist durch hyperdiploiden, fast triploiden Karyotyp gekennzeichnet, der durch eine mitotische Fehlfunktion entsteht. Strukturelle chromosomale Veränderungen kommen nur selten, wenn überhaupt, vor. Aufgrund der ihnen typischen Expression von TrkA, einem Tyrosinkinase Rezeptor für NGF (Nerve Growth Factor), differenzieren sie sich bei Anwesenheit von NGF aus, oder sterben bei Fehlen von NGF ab. Der zweite Typ zeichnet sich durch einen fast diploiden oder fast tetraploiden Karyotyp aus, allerdings mit ausgeprägten strukturellen chromosomalen Veränderungen. Zwei Subtypen werden innerhalb des zweiten Typs unterschieden: Typ 2A zeichnet sich durch eine 11q und/oder 14q Deletion aus, der Typ 2B ist durch einen Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 1p, mit MYCN-Amplifikation,

gekennzeichnet. Beiden Subtypen ist eine Multiplikation von 17q gemein [77]. Das Genetische Modell der Neuroblastomentwicklung ist nochmals kurz in Abbildung 1 dargestellt.

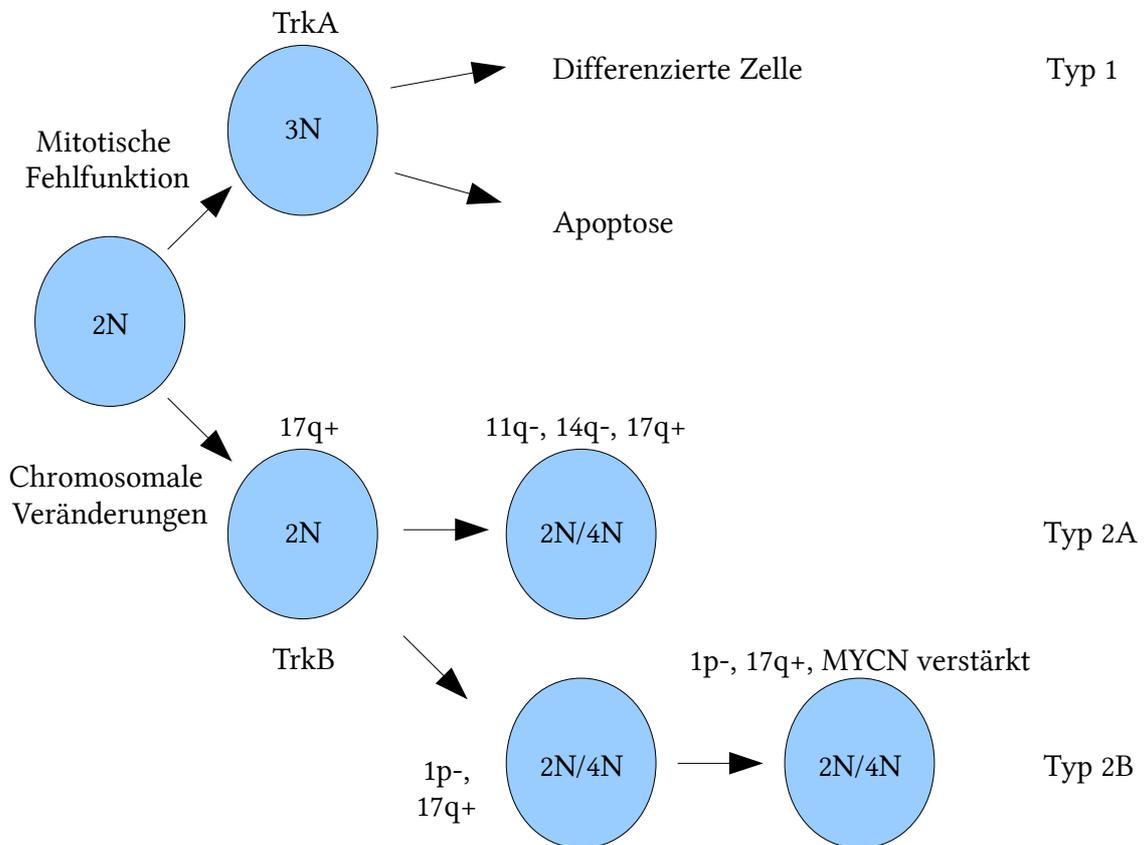


Abbildung 1: Genetisches Modell der Neuroblastomentwicklung [77]

22% aller Neuroblastome zeigen eine Amplifikation des Gens MYCN [88]. Dieses Gen ist normalerweise auf dem äußeren Teil des kurzen Arms von Chromosom 2p24 als *single-copy* lokalisiert, aber in Zellen mit MYCN Amplifikation (bis zu 140-facher Verstärkung[89]) zeigt sich dieses Gen auch auf *double-minute*-Chromosomen und homogen anfärbenden Regionen (HSR) der DNA [90]. Diese MYCN Amplifikation ist konsistent im Primärtumor und Metastasen eines Patienten [91] und deutet auf eine aggressive Form des Neuroblastoms hin [92],[93]. MYCN bildet mit MAX (MYC associated factor X) einen Transkriptionsaktivator, der für die Regulierung der Gene ODC, MCM7 und MRP1 zuständig ist [94],[95]. Diese Gene sind für Regulierung des Zellzyklus zuständig, eine Überexpression verhindert wahrscheinlich den Eintritt der Zellen in die G0-Phase [96]. Es besteht außerdem eine Korrelation zwischen der Amplifikation von MYCN und dem Verlust der Heterozygotie des kurzen Arms von

Chromosom 1 im Bereich p36.1 und p36.3 [97]. Allerdings gibt es in Neuroblastomen mit nur einer MYCN-Kopie keinen Zusammenhang zwischen einem hohen zellulären MYCN-Proteingehalt und einer ungünstigen Prognose [98]. Weitere Eigenschaften von aggressiven Neuroblastomen sind Deletionen auf den Chromosomen 1, 3 und 11 (del1p, del3p und del11q) [99],[100].

Eigenschaft	Typ 1	Typ 2A	Typ 2B
MYCN	Normal	Normal	Verstärkt
DNA-Ploidie	Hyperdiploid oder fast triploid	Fast diploid oder fast tetraploid	Fast diploid oder fast tetraploid
Multiples 17q	Selten	Häufig	Häufig
11q, 14q Verlust der Heterozygotie	Selten	Häufig	Selten
1p Verlust der Heterozygotie	Selten	Selten	Häufig
TrkA-Expression	Hoch	Gering/Fehlt	Gering/Fehlt
TrkB-Expression	Verkürzt	Gering/Fehlt	Hoch
TrkC-Expression	Hoch	Gering/Fehlt	Gering/Fehlt
Alter	< 1 Jahr	> 1 Jahr	1-5 Jahre
INSS-Stadium	1, 2, 4S	3 oder 4	3 oder 4
5-Jahres-Überlebensrate	95%	40-50%	25%

Tabelle 2: Biologisch-klinische Neuroblastomen-Typen

Eine Studie fand 19 differentiell exprimierte Gene zwischen Neuroblastomen mit ungünstiger Prognose und Neuroblastomen mit günstiger Prognose [101]. Eine Hochregulierung von DLK1, PRSS3, ARC, SLIT3, MYCN sowie eine Herunterregulierung von CNR1, ROBO2 und BTBD3 deuten auf einen ungünstigen Verlauf der Krankheit hin [101]. Eine weitere Studie der differentiellen mRNA-Expression zwischen Stadium-4- und Stadium-4S- Neuroblastomen (siehe Tabelle 3) fand, dass beide Stadien für sich spezifische Genexpressionsmuster aufweisen [102]. Als weiterer prognostischer Marker für einen ungünstigen Verlauf wird die Expression von Skp2 diskutiert [103].

3.2.4 Einteilung der Neuroblastome in Risikogruppen

In aktuellen Studien wird das *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) [104] (Tabelle 3) durch molekularbiologische und histopathologischen Eigenschaften der Tumore erweitert und es werden die in Tabelle 4 beschriebenen Risikogruppen eingeteilt [81],[82],[83]:

Stadium	Beschreibung
1	Lokalisierter Tumor auf Ursprungsorgan begrenzt, Resektion des ganzen Tumors möglich, kein Lymphknotenbefall
2a	Begrenzung des Ursprungsorgans überschritten, jedoch nicht die Mittellinie, Resektion des gesamten Tumors nicht möglich, kein Lymphknotenbefall
2b	Lokalisierter Tumor, Begrenzung des Ursprungsorgans überschritten, homolateraler Lymphknotenbefall
3	Tumor überschreitet Mittellinie mit homolateralem Lymphknotenbefall, bei Mittellinientumor können Lymphknoten beidseitig befallen sein oder Lymphknotenbefall kontralateral wenn Tumor Mittellinie nicht überschreitet
4	Fernmetastasen
4S	wie 1 oder 2, aber mit Fernmetastasen in Leber, Haut, nur bei Säuglingen

Tabelle 3: Stadieneinteilung von Neuroblastomen nach INSS

INSS-Stadium	Geringes Risiko	Mittleres Risiko	Hohes Risiko
1	Alle	-	-
2A, 2B	< 1 Jahr 1-21 Jahre, MYCN nicht vervielfältigt 1-21 Jahre, MYCN vervielfältigt, günstige Histologie	-	1-21 Jahre, MYCN vervielfältigt, ungünstige Histologie
3	-	<1 Jahre, MYCN nicht vervielfältigt 1-21 Jahre, MYCN nicht vervielfältigt, günstige Histologie	0-21 Jahre, MYCN vervielfältigt 1-21 Jahre, MYCN nicht vervielfältigt, ungünstige Histologie
4	-	< 1 Jahr, MYCN nicht vervielfältigt	< 1 Jahr, MYCN vervielfältigt 1-21 Jahre
4S	MYCN nicht vervielfältigt, günstige Histologie, DNA Index >1	MYCN nicht vervielfältigt, ungünstige Histologie, DNA Index = 1	MYCN vervielfältigt

Tabelle 4: Risikoeinteilung von Neuroblastomen nach klinisch-biologischen Gesichtspunkten

3.2.5 Das *International Neuroblastoma Risk Group Staging System*

Eine korrekte Stadieneinteilung mit Hilfe des INSS kann schwierig sein, da es möglich ist, dass ein und der selbe Tumor entweder Stadium 1 oder 3, je nach dem Ausmaß der operativen Entfernung, zugeordnet werden kann [105]. Des weiteren können Patienten, die unter Beobachtung stehen weil eine Tumorregression erwartet wird, nicht korrekt eingeteilt werden [106]. Eine weitere Einschränkung ist die Beurteilung der Beteiligung der Lymphknoten zur korrekten Einteilung, dies hängt aber von der Gründlichkeit des behandelnden Arztes ab [104], [105],[107]. Aufgrund dieser Unzulänglichkeiten wurde das *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRGSS) entwickelt, um eine bessere Vergleichbarkeit der klinischen Neuroblastom-Studien zu gewährleisten [108]. Die genaue Einteilung ist folgend kurz beschrieben:

Stadium	Beschreibung
L1	Lokalisierter Tumor der keine wichtigen Strukturen laut den <i>Image-defined risk factors (IDRF)</i> [108] befallen hat und auf einen Körperteil begrenzt ist.
L2	Lokoregionaler Tumor mit einem oder mehreren IDRF
M	Fernmetastasen
MS	< 18 Monate, Metastasen in Leber, Haut und/oder Knochenmark

3.2.6 Therapie

Die zur Zeit durchgeführte Theraphiestudie NB2004 [109] sieht folgende Vorgehensweise vor:

Zunächst erfolgt eine Entnahme von Tumorgewebe um die Diagnose histologisch zu sichern und den Tumor molekulargenetisch zur Risikogruppeneinteilung (Abbildung 2) zu beurteilen. Patienten, die der niedrigen Risikogruppe angehören werden 6-12 Monate beobachtet, da hier eine hohe Wahrscheinlichkeit einer spontanen Tumorregression besteht. Falls es zu keiner spontanen Regression kommt, erfolgt eine Chemotherapie mit Doxorubicin, Vincristin und Cyclophosphamid.

Die Gruppe mit mittlerem Risiko erhält eine Chemotherapie mit Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid, Etoposid, Vindesin, Cisplatin, Ifosfamid und Dacarbazin. Eine zusätzliche externe Radiotherapie erfolgt bei noch aktivem, inoperablen Resttumor nach mehr als der Hälfte der Chemotherapie. Bei Nichtansprechen der Therapie werden die Patienten der Hochrisikogruppe zugeordnet. Nach der Chemotherapie erhalten die Patienten eine orale Behandlung mit 13-cis-Retinsäure.

Die Hochrisikogruppe wird randomisiert in 2 Untergruppen aufgeteilt in der eine Gruppe zusätzlich zur Chemotherapie (siehe mittlere Risikogruppe) Topotecan erhält. Bei Metajodbenzylguanidin (MIGB)-speicherndem Resttumor (MIGB reichert sich in 90% der Neuroblastomzellen an [68]) erfolgt anschließend eine systemische Radiotherapie mit I¹³¹-MIBG. Der nächste Therapieschritt ist eine Hochdosistherapie mit Melphalan, Etoposid und Carboplatin mit autologem Stammzellrescue und abschließend eine orale Behandlung mit 13-cis-Retinsäure. Bei aktiven Resterkrankungen erfolgt zusätzlich eine externe Radiotherapie.

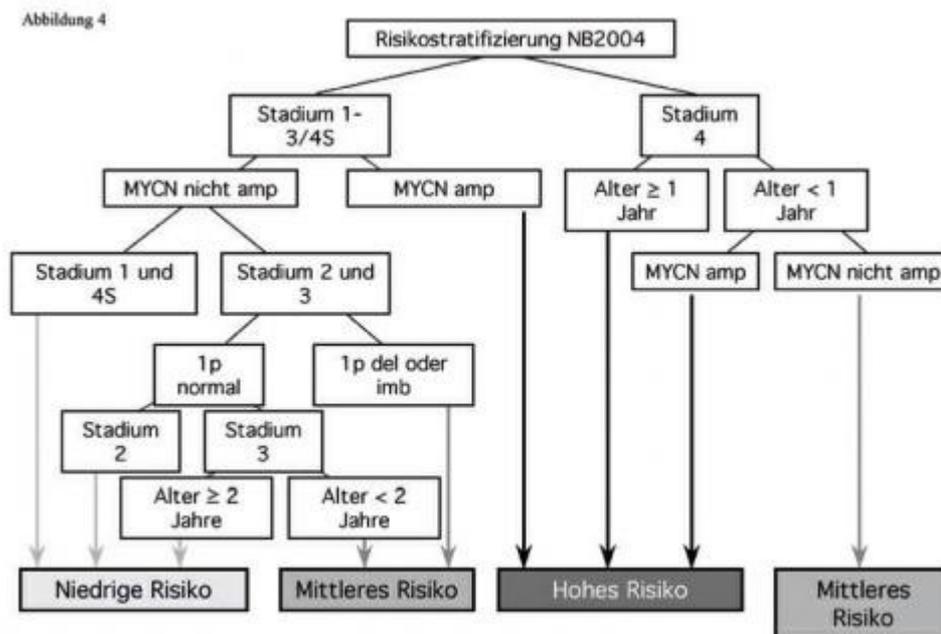


Abbildung 2: Risikogruppeneinteilung nach NB2004

3.2.7 Charakterisierung der verwendeten Neuroblastomzelllinien

3.2.7.1 Neuroblastomzelllinie SiMa

Diese Zelllinie wurde 1991 aus dem Nierengewebe eines Rezidivs nach Chemotherapie eines Stadium 3 (INSS)-Neuroblastoms eines 20 Monate alten männlichen Patienten etabliert. Der Karyotyp ist annähernd tetraploid mit $88/89 < 4n > XXY/XXYY, -Y, -11, -17, -17, der(1q_{h++})t(1;17)(p34-35;q12) \times 2, t(6;9)(p21;q33) \times 2, ?inv(12)(q21q24) \times 2, der(22)t(17;22)(q21;p12) \times 2$. Die prognostischen Marker sind bei dieser Zelllinie widersprüchlich, da sich die Zellen in einem Stadium der fortgeschrittenen Differenzierung befinden, was in Gegensatz zum Karyotyp und der 5-10 fachen MYCN-Amplifikation und 50-100 MYCN-enhaltenden double-minute Chromosomen [64] auf eine günstige Prognose hindeutet [110].

3.2.7.2 Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y

Die Zelllinie SH-SY5Y ist eine klonierte Subzelllinie der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH [111]. SK-N-SH wurde aus dem Knochenmark einer 4-jährigen weiblichen Patientin mit metastasiertem Neuroblastom im Jahre 1970 etabliert [59]. Der Karyotyp ist fast diploid mit $46/47(42-48) <2n>X/XX, +7, ins(1)(q32q11q43), add(9)(q34), der(22)t(?17;22)(q22;q13)$ [112]. Double-minute Chromosome sind nicht vorhanden [59]. Das Gen MYCN wird gering exprimiert, die Mehrheit der Zellen besitzt drei MYCN-Kopien durch Gen-Amplifikation [113]. Die Zelllinie exprimiert stark das Gen MYCC [98].

3.2.7.3 Neuroblastomzelllinie MHH-NB-11

MHH-NB11 wurde 1986 aus der Neuroblastometastase in der Niere eines 4-jährigen männlichen Patienten etabliert [114]. der Karyotyp ist bimodal hyperdiploid / tetraploid $54(48-54) <2n>XY, +1, +1, +2, +6, +7, +8, +13, +20, der(1)t(1;?)(p32;?)x2, der(13)t(13;?2HSR)(q33;?2p23)$ [64]. MYCN ist 20-fach amplifiziert [114].

3.2.8 Kurzübersicht der verwendeten Neuroblastomzelllinien

In Tabelle 5 sind die verwendeten Neuroblastomzelllinien nochmals kurz dargestellt.

Name der Zelllinie	m/w	Alter	Lokalisation	P/M	MYCN-Amp
SiMa	m	1,7	Niere	M	5-10-fach
SH-SY5Y	w	4	Knochenmark	M	3-fach
MHH-NB-11	m	4	Niere	M	20-fach

Tabelle 5: Kurzübersicht der verwendeten Neuroblastomzelllinien

3.3 Proteom-Analyse

Der Begriff „Proteom“ wurde 1994 von Marc Wilkins geprägt und ist als „Gesamtheit aller exprimierten PROTEINE eines GenOMs unter definierten Bedingungen (z.B. Druck, pH-Wert, Temperatur, usw.) zu einem bestimmten Zeitpunkt“ definiert [115], [116]. Der Begriff „Proteomik“ wurde auf einer National Academy of Sciences-Tagung im Jahre 2002 wie folgt definiert: *„Proteomics represents the effort to establish the identities, quantities, structures, and biochemical and cellular functions of all proteins in an organism, organ, or organelle, and how these properties vary in space, time, and physiological state. Proteomics is thus a huge, long-term task, much more involved than sequencing the genome.“* [117].

3.3.1 Isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten

Das Prinzip der isoelektrischen Fokussierung mit TA beruht darauf, dass diese in Kombination mit einem elektrischen Feld einen kontinuierlichen pH-Gradienten erzeugen. Proteine in diesem Feld wandern zu dem pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entspricht (Abbildung 3) [118]. Da auch die TA an ihrem jeweiligen pI fokussieren hängt die Stabilität des pH-Gradienten von ihrer Pufferkapazität an und in der Nähe ihres pI ab. Außerdem müssen die TA an ihrem pI eine akzeptable Leitfähigkeit aufweisen um übermäßige elektrische Feldstärken zu vermeiden [119]. Trägerampholyte sollten, wenn die Theorie betrachtet wird, einen über die Zeit stabilen pH-Gradienten bilden. In der Praxis ist dies jedoch eingeschränkt, da Instabilitäten des pH-Gradienten aus der unterschiedlichen Leitfähigkeit und Pufferkapazitäten der TA und der Oxidation bzw. Reduktion der TA an der Anode bzw. Kathode entstehen [120]. Ein weiteres Problem der IEF mit TA ist der sogenannte Kathodendrift (auch Plateau-Phänomen genannt) [121], [122]: Der pH-Gradient „zerfällt“ hauptsächlich am basischen Ende, der pH-neutrale Bereich dehnt sich immer weiter aus, der pH-Gradient verflacht. Dies bedeutet für die Praxis, dass der pH-Gradient am Ende der IEF selten über pH 7 hinaus geht [123], [124]. Zur Trennung von basischen Proteinen mittels IEF mit TA wurde 1977 von O'Farrell die *non-equilibrium pH-Gradient electrophoresis* (NEPHGE) entwickelt [123]. Allerdings ist NEPHGE keine Endpunkt-Methode, daher ist die Reproduzierbarkeit eingeschränkt.

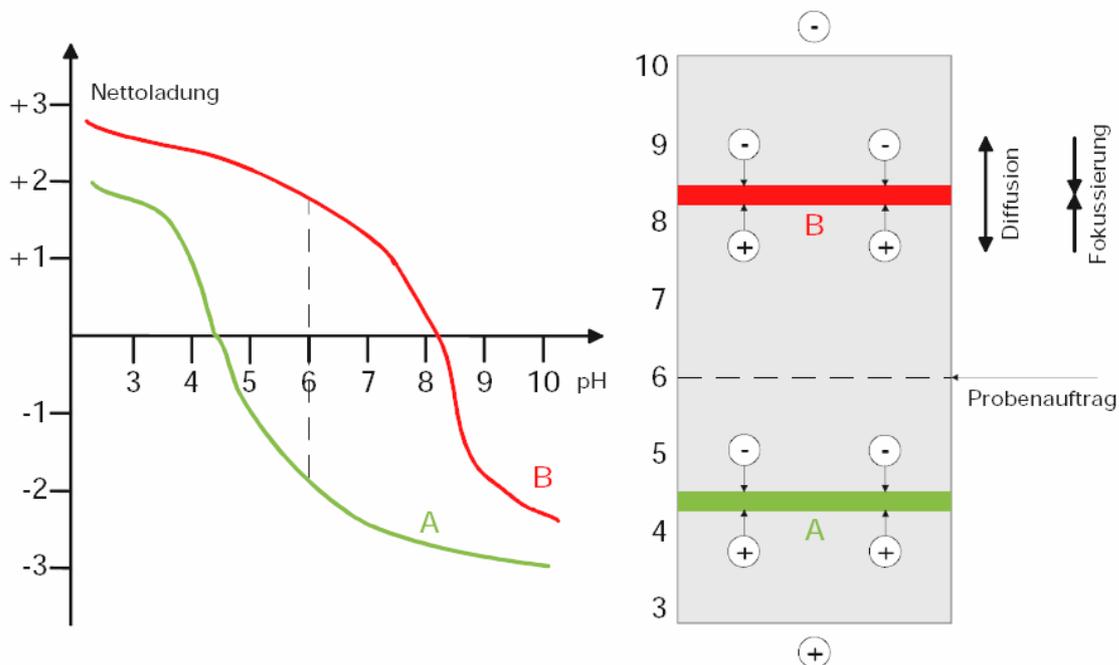


Abbildung 3: Prinzip der IEF

Die Abbildung zeigt die Wanderung und Ladungsverhältnisse zweier Proteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten im pH-Gradienten.

3.3.2 IEF mit immobilisierten pH-Gradienten

Die pH-Gradient Instabilitäten und die daraus folgende Nichtreproduzierbarkeit der IEF mit TA wurden 1982 durch die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten (IPGs) überwunden [125]. Im Unterschied zur IEF mit TA wird beim IPG der pH-Gradient durch „Immobiline“ gebildet, die mit einer Polyacrylamidmatrix kopolymerisiert werden. Die Immobiline gehören zu einer Reihe von 10 Acrylamidderivaten, die jeweils eine Carboxyl- oder tertiäre Aminogruppe tragen und verschiedene pK-Werte zwischen 1 und 13 puffern. Durch die Immobilisierung des pH-Gradienten wird eine gegenüber der IEF mit TA erhöhte Reproduzierbarkeit [126], [127] erreicht. Weitere Vorteile sind die Erzeugung „maßgefertigter“ IPGs, die eine Auflösung von $\Delta pI=0,001$ bieten [128], [129], [130] reproduzierbare Trennung von basischen Proteinen [131], [132], sowie eine erhöhte Ladungskapazität [133].

3.3.3 2D-Gelelektrophorese

Die hochauflösende 2D-Gelelektrophorese geht auf das Jahr 1975 zurück, als O'Farrell eine trägerampholyt-basierte IEF unter Zugabe von Harnstoff, Detergenzien und β -Mercaptoethanol zur Solubilisierung der Proteine, mit der SDS-PAGE kombinierte [134]. Aufgrund der Nachteile der IEF mit TA ist diese Methode auf Proteine mit einem pI zwischen 4 und 7 beschränkt. Zusätzlich leidet die Reproduzierbarkeit. Die Probleme der mangelnden Reproduzierbarkeit und der schlechten Auftrennung von Proteinen mit einem pI > 7 wurden 1988 durch Görg *et al.* mit der Einführung der 2D-Gelelektrophorese mit IPGs überwunden [129] und wird seither fortlaufend optimiert [14], [132] [135], [136], [137], [138], [139]. Das Prinzip der 2D-Gelelektrophorese ist in Abbildung 4 dargestellt.

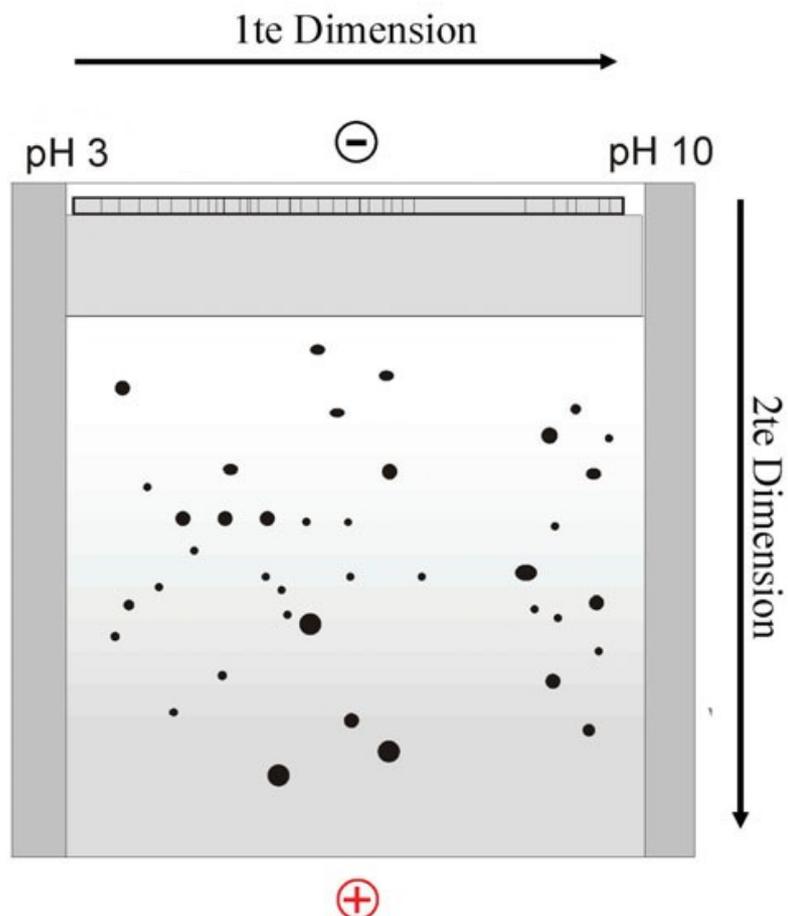


Abbildung 4: Prinzip der 2D-Gelelektrophorese

Die Trennung der Proteine erfolgt nach zwei unterschiedlichen Parametern: Trennung nach pI (1. Dimension) (IEF) und die Trennung nach Molekulargewicht (2. Dimension) (SDS-PAGE).

3.3.4 Difference Gel Electrophoresis (DIGE)

Bei der differentiellen Proteomanalyse werden von mindestens 2 Proteinproben, die von unterschiedlichem Ausgangsmaterial (z.B. Vergleich von Wildtyp- und Mutationsstamm einer Mikroorganismenart, Normalgewebe und krankhaftes Gewebe...) stammen, die unterschiedlichen Proteinexpressionsmuster auf den 2D-Gelen miteinander verglichen. Der klassische Ansatz ist hierbei die Proben auf verschiedenen Gelen aufzutrennen und nach der Anfärbung der Proteine miteinander zu vergleichen. Dies birgt jedoch einige Nachteile, da 2D-Gele niemals identisch sind, sondern sich aufgrund von Inhomogenitäten der SDS-Gele, pH-Bereiche und elektrischen Felder immer Ungenauigkeiten ergeben [140]. Diese Ungenauigkeiten können bei der anschließenden Analyse durch die Auswertungssoftware zwar behoben werden, aber dies erhöht den Arbeitsaufwand beträchtlich. Ein weiteres Problem sind die Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Proteine in der Probe, die ca. 4 Zehnerpotenzen umfasst [140]. Somit muss eine Proteindetektionsmethode, die alle quantitativen Proteinexpressionsunterschiede erfassen will, einen linearen Bereich von mindestens 10^5 aufweisen. Deshalb wurde zur Vereinfachung der differentiellen Proteomanalyse die Difference Gel Electrophorese (DIGE) entwickelt (Abbildung 5) [140]. Bei dieser Methode werden die Proben vor der 2D-Gelelektrophorese mit verschiedenen sogenannten *CyDyes* gelabelt, und zusammen auf einem 2D-Gel getrennt. *CyDyes* sind cyanidbasierte Fluoreszenzfarbstoffe, die durch eine *labeling*-Reaktion an der ϵ -Aminogruppe von Lysin binden. Beim sogenannten *minimal-labeling* wird 1 Lysinrest pro Protein und 1-2% aller Proteine mit dem *CyDye* derivatisiert. Um die elektrophoretische Mobilität der derivatisierten Proteine während der 2D-Gelelektrophorese nicht zu beeinträchtigen tragen die *CyDyes* eine positive Ladung und haben alle ungefähr das gleiche Molekulargewicht [140]. Die Detektion der Proteine erfolgt bei für den jeweiligen *CyDye* spezifischen Wellenlängen. Das experimentelle Design der DIGE-Versuche wurde 2003 von Alban *et al.* durch Einbeziehung eines *Internal Pooled Standards* (IPS) erweitert [141]. Der IPS umfasst alle im gesamten Experiment verwendeten Proben zu gleichen Proteinmengen und wird mit einem dritten *CyDye* gelabelt. Die einzelnen DIGE-Gele umfassen somit 3 verschiedenen gelabelte Proben. Bei der anschließenden Auswertung der DIGE-Gele durch Software erfolgt die Normalisierung die Signalintensität der *CyDyes* zum IPS. Um die standardisierte Signalintensität eines Proteins zu

ermitteln wird die Signalintensität des Proteins aus dem IPS in Verhältnis zur Signalintensität des co-detektierten Proteins der Probe gesetzt. Da somit nur die normalisierten Signalintensitäten der einzelnen Proteine auf allen DIGE-Gelen miteinander verglichen werden, muss keine weitere Normalisierung erfolgen. Durch die Einbeziehung eines IPS wird die Verlässlichkeit der Quantifizierung von Proteinmengen deutlich erhöht [141].

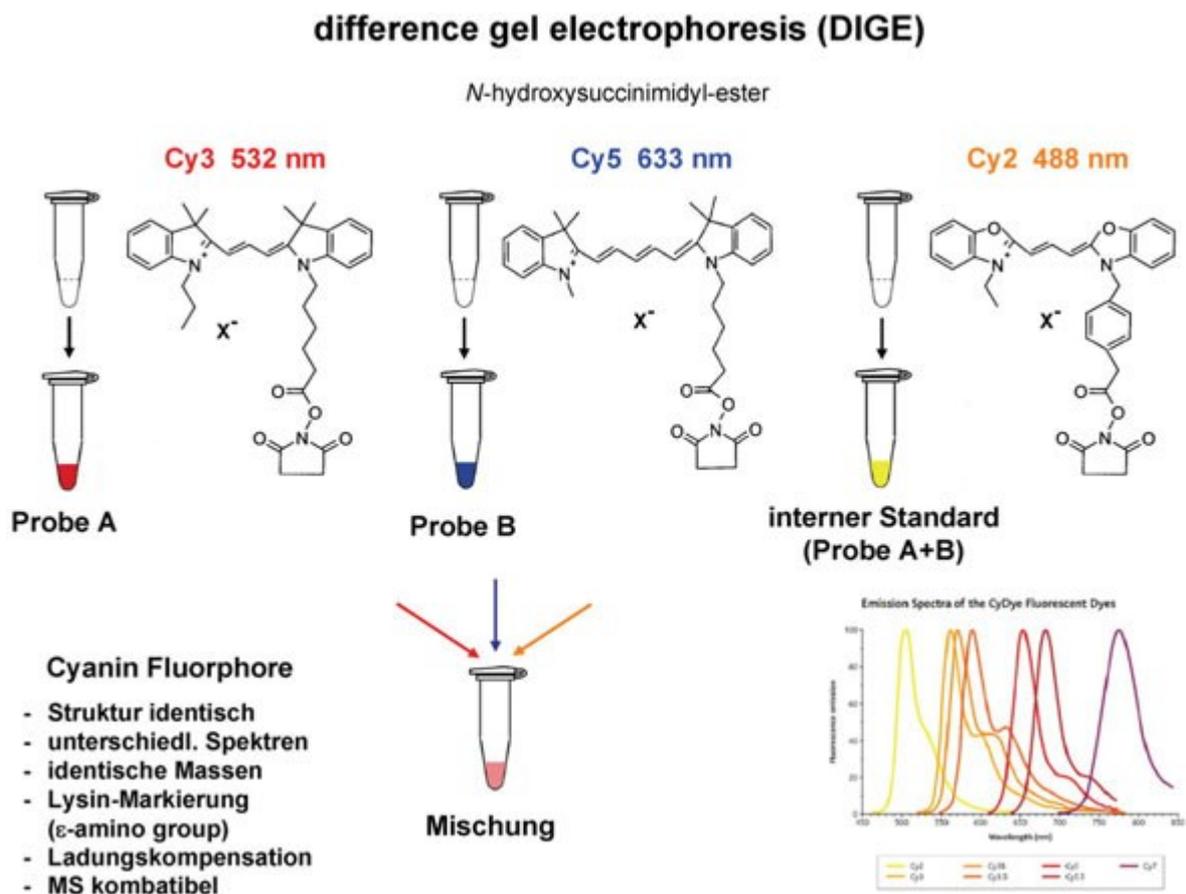


Abbildung 5: Eigenschaften der CyDyes und Vorbereitung für gemeinsame 2D-Gelelektrophorese

3.3.5 Western-Blotting nach 2D-Gelelektrophorese

Beim Western-Blot werden die Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch auf eine Membran transferiert. Dadurch werden sie für die anschließende Detektion der Glykoproteine durch Lektine frei verfügbar [142]. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete System des *Semi-Dry-Blotting* wurde 1984 von Kyhse-Anderson eingeführt [143], bei dem die

Proteine durch Isotachyphorese auf die Membran überführt werden. Die Vorteile eines Semi-Dry Western-Blots sind die rasche und einfache Versuchsdurchführung und die optionale Verwendbarkeit eines diskontinuierlichen Transferpuffersystems zur verbesserten Proteintransferierung. Der Aufbau eines Semi-Dry Western-Blots besteht aus mehreren Lagen Filterpapier, die in Transferpuffer getränkt sind, darauf liegt die Blotting-Membran und das Polyacrylamid-Gel, abschließend liegen mehrere Lagen in Transferpuffer getränktem Filterpapier auf dem Gel. Bis zu 6 dieser Transfer-Units können zwischen der Anode und der Kathode liegen (Abbildung 6) [143].

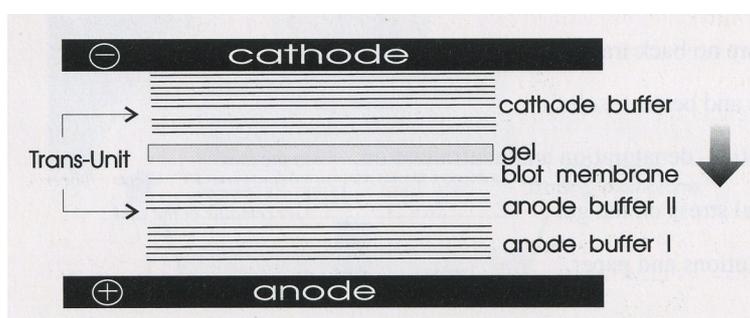


Abbildung 6: Aufbau eines diskontinuierlichen Semi-Dry Western-Blots [143]

3.3.6 MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Ein Massenspektrometer lässt sich in 3 Grundkomponenten zerlegen: Die Ionenquelle, in der die Ionen erzeugt werden, den Massenanalysator, in dem die Ionen nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung getrennt bzw. unterscheidbar gemacht werden und den Detektor. Bei der Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization Massenspektrometrie (MALDI-MS), die 1988 von Karas und Hillenkamp [144] entwickelt wurde, ist die Ionenquelle eine kristalline Matrix, die die Ionisierungsenergie eines gepulsten Lasers an die ko-kristallisierten Analytmoleküle weitergibt. Zusammen mit der 1989 von Fenn et al. entwickelten *Electro-Spray-Ionization*-Massenspektrometrie (ESI-MS) [145] stellt die MALDI Massenspektrometrie den wichtigsten Vertreter dar, um schwerflüchtige organischen Moleküle für die Massenanalyse zugänglich zu machen.

Die Trennung der Ionen erfolgt im Massenanalysator. Bei MALDI-*Time-of-Flight*-Massenspektrometern (MALDI-ToF) werden die Moleküle nach ihrer Ionisierung durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Dabei werden massearme Moleküle stärker beschleunigt als massereiche. Durch den daraus folgenden Unterschied in der Endgeschwindigkeit der Moleküle mit unterschiedlicher Masse und deren Flug durch eine feldfreie Driftröhre werden die unterschiedlichen Molekülmassen voneinander getrennt. Aufgrund von Unschärfereffekten (Abschirmung) wird die Laserenergie nicht auf alle Moleküle einer Masse gleich verteilt. Desweiteren ist durch Kollisionen während der Desorption die Anfangsgeschwindigkeit der Ionen einer Masse nicht uniform. Außerdem ist der Startpunkt aller Ionen nicht gleich. Diese Unschärfen werden durch ein zum Laserpuls zeitversetztes Einschalten des elektrischen Beschleunigungsfeldes [146] und durch einen Ionenspiegel (Reflektor) teilweise ausgeglichen. Der Reflektor bietet zwei Vorteile: Zum einen wird der Flugweg der Ionen verlängert was eine schärfere Fokussierung ermöglicht, zum anderen dringen Ionen mit einer höheren Geschwindigkeit tiefer in das gegenpolige elektrische Feld des Reflektors ein. Dies führt zu einer schärferen Fokussierung der Ionen einer Masse, da die energetisch höheren Ionen durch die tiefere Penetration des Reflektorfeldes einen längeren Weg zurücklegen, aber aufgrund ihrer höheren Geschwindigkeit zeitgleich mit den Ionen einer niedrigeren Energie am Detektor auftreffen [146], [147]. Der schematische Aufbau eines MALDI-ToF Massenspektrometers ist in Abbildung 7 nochmals kurz aufgezeigt.

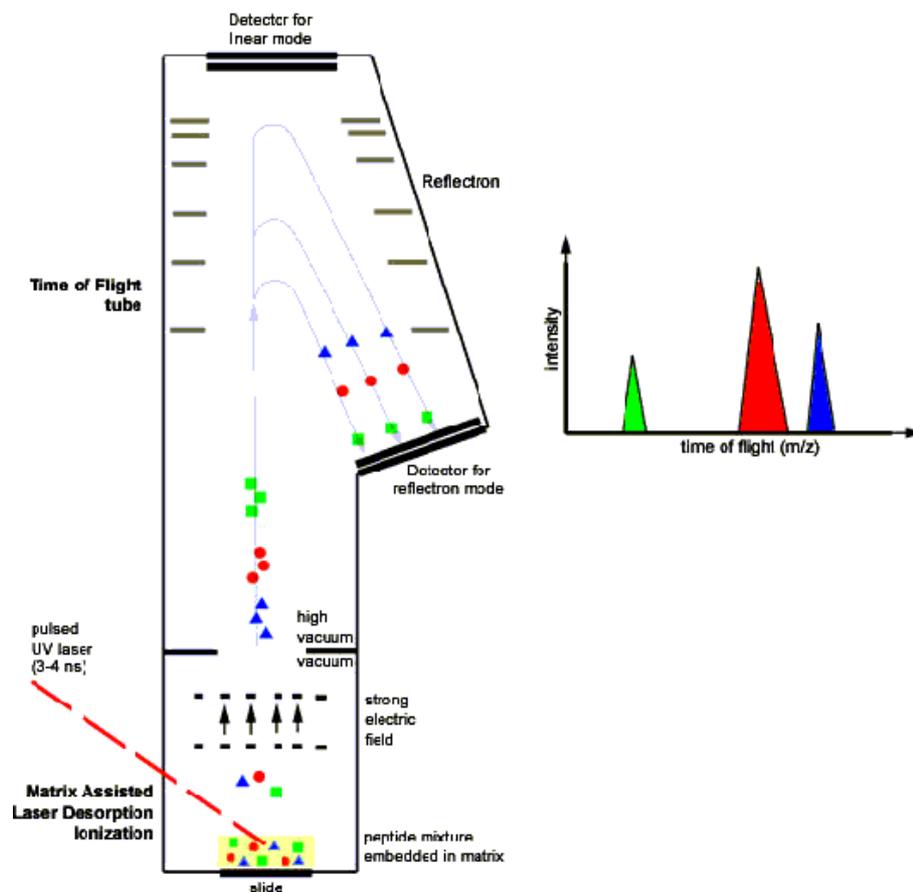


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines MALDI-ToF Massenspektrometers

3.3.6.1 Peptide Mass Fingerprint

Die Identifikation von Proteinen mittels der Massenspektrometrie erfolgt entweder durch *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) oder durch Aminosäuresequenzanalyse durch Fragmentierung des Analyten, oder einer Kombination beider Techniken.

Beim PMF nach 2D-Gelelektrophorese werden die einzelnen Proteine enzymatisch gespalten und die Peptidfragmente einer Massenanalyse unterzogen (Abbildung 8). Durch Einsatz einer spezifischen Protease (z.B. Trypsin) erhält man eine für ein Protein typische Längenverteilung, und somit Massenverteilung, von Peptiden. Dieses Gemisch wird durch den Massenspektrometer analysiert und die einzelnen Massen der Peptide werden in einer Liste ausgegeben. Die Identifikation des Proteins erfolgt durch Abgleich mit der theoretischen Massenverteilung nach *in silico*-Verdau aller Proteine eines Organismus. Die Nachteile des PMF sind die Identifikationsprobleme bei mangelnder Auflösung des 2D-Gels und daraus

resultierenden Vermischungen von unterschiedlichen Proteinen, keine Anwendbarkeit bei nicht-sequenzierten Organismen, da hier die Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine unbekannt ist und Nichtanalysierbarkeit von Posttranslationalen Modifikationen (PTM) der Proteine da nur die Aminosäuresequenz in die Masse der theoretische Peptide mit eingeht.

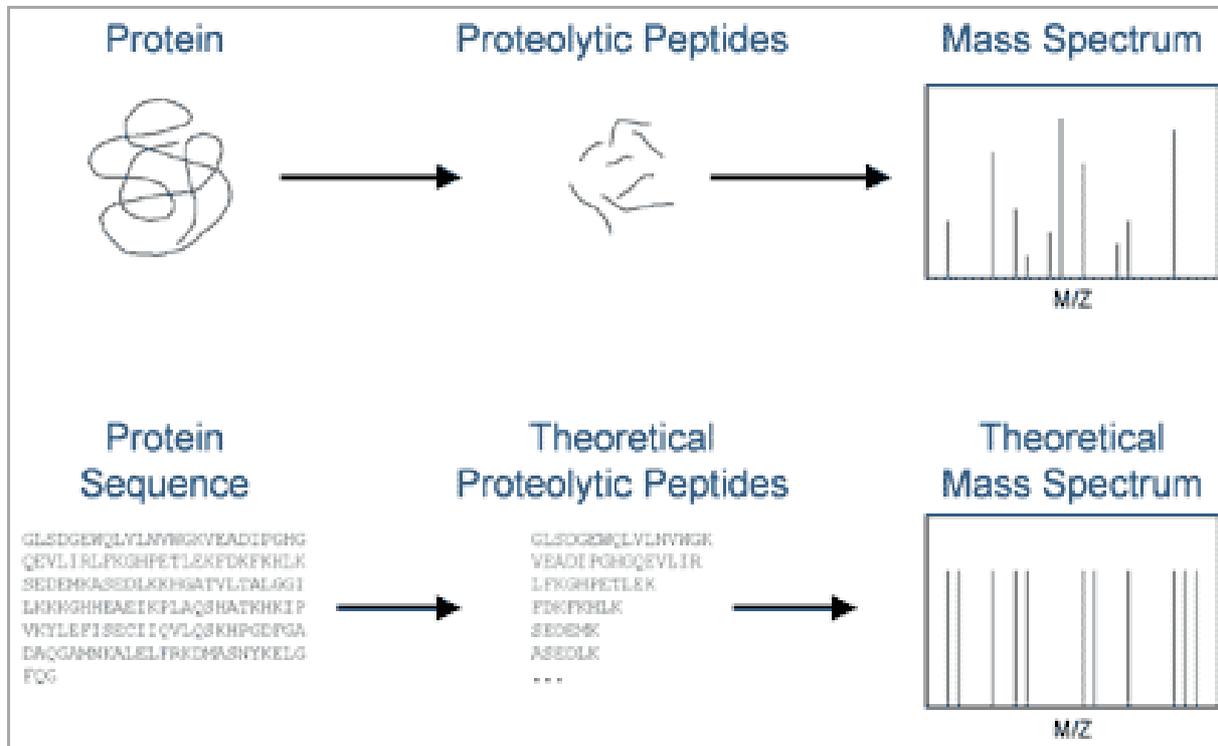


Abbildung 8: Prinzip des Peptide Mass Fingerprintings, die Proteinidentifikation erfolgt durch den Abgleich des erhaltenen und des theoretischen Massenspektrums.

3.3.6.2 Tandem-MS

Bei der Proteinidentifikation durch Aminosäuresequenzanalyse durch Fragmentierung des Analyten, wird üblicherweise zunächst wie beim PMF vorgegangen. Aus dem erhaltenen Massenspektrum wird dann das intensivste Signal als sogenanntes *Parent-Ion* ausgewählt und durch erhöhte Energiezufuhr fragmentiert. Die übliche Art der Fragmentierung ist die *Collision-induced Dissociation* (CID) [148]. Nach der Ionisierung und Beschleunigung der Analyten werden sämtliche Analyten bis auf das *Parent-Ion* aussortiert, dieses wird durch kinetische Energie in der Kollisionkammer in Fragmente zerlegt. Anschließend werden die Fragmente in einem zweiten Massenanalysator (= Tandem-MS bzw. MS-MS) getrennt und detektiert. Zur Aminosäuresequenzanalyse wird die Kollisionsenergie so gewählt, dass nur die

Peptidbindungen brechen. Aus der Massendifferenz der unterschiedlich langen Fragmente lässt sich so die Aminosäuresequenz berechnen [148], [149] (Abbildung 9).

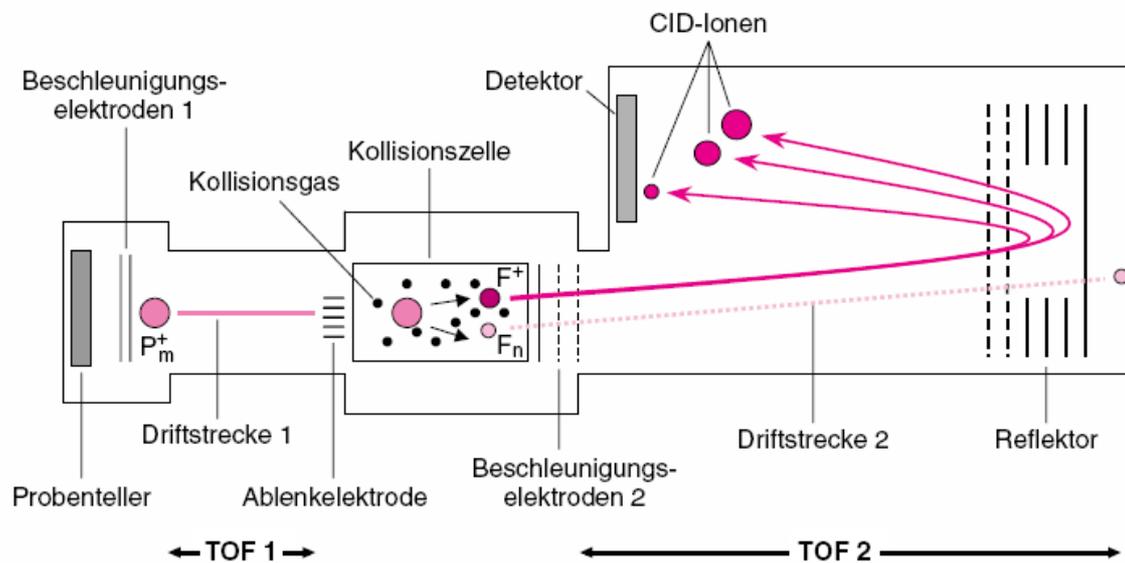


Abbildung 9: Prinzip der Tandem-MS Analyse durch CID am Beispiel eines MALDI-ToF-ToF Massenspektrometers [150]

3.3.7 Proteinvorfractionierung in IEF-Gelen aus granuliertem Sephadex

Aufgrund von Begrenzungen in der Proteinladekapazität von IPG-Gradienten (Verschlechterung der Auflösung aufgrund von Überladung) können nicht alle gering exprimierten Proteine auf einem 2D-Gel mit weitem IPG-Gradienten dargestellt werden [13]. Durch ultraenge (< 1pH-Einheit) IPG-Streifen wird die Auflösung beträchtlich erhöht, allerdings zeigt sich eine erhöhte Proteinpräzipitierung an den Elektroden [12], [130], [151], [152]. Durch die Präzipitierung von Proteinen mit einem pI außerhalb des Intervalls des pH-Gradienten werden auch Proteine mit einem pI, der innerhalb des pH-Gradienten liegt, kopräzipitiert [13]. Dies zeigt sich in dem paradoxen Phänomen, dass eine erhöhte Proteinbeladung nicht unbedingt die Anzahl der detektierbaren Proteine auf einem 2D-Gel erhöht [13].

Zur Lösung dieser Probleme wurden verschiedene Vorfraktionierungsmethoden entwickelt. Die meisten haben allerdings teils gravierende Nachteile [12]:

- Komplizierte Apparatur
- Verdünnung der Probe nach oder während der Trennung
- Verlust von Proteinen aufgrund von Präzipitierungen
- Kreuzkontamination der verschiedenen Fraktionen

Die IEF in granulierten Flachbett-Gelen zur Vorfraktionierung wurde ursprünglich von Radola [153], [154] zur nativen Trennung von Proteinen entwickelt. Diese Methode wurde 2002 von Görg et al. [12] für denaturierende Umgebungen weiterentwickelt. Die Vorteile dieser Methode sind [12]:

- Hocheffizienter elektrophoretischer Proteintransfer der vorfraktionierten Probe aus dem Sephadex-Gel auf den IPG-Streifen, ohne Verdünnung.
- Völlig Kompatibilität zur IPG-IEF: Keine weitere Vorbereitung der Probe durch Elution oder Entsalzung. Trägerampholytgehalt wirkt sich nicht störend auf die IEF mit IPG aus.

Durch diese Methode der Vorfraktionierung konnten Proben im Milligramm-Bereich auf ultragenen IPGs aufgetragen werden, so dass sich eine stark erhöhte Zahl von Proteinen zeigte, ohne Präzipitierungen an den Elektroden [155]. Eine weitere Verbesserung der Methode konnte durch den Einsatz von farbigen pI-Markern [156] erzielt werden, da nun Verlauf des pH-Gradienten direkt einsehbar ist und die einzelnen Fraktionen ohne eine Oberflächen-pH-Elektrode bestimmt werden können.

4 Material und Methoden

4.1 Anzucht der EFT- und Neuroblastomzelllinien

4.1.1 Verwendete Zelllinien

EFT-Zelllinien:

- A673 (A)
- SBSR-AKS (B)
- SK-ES1 (D)
- SK-N-MC (E2)
- MHH-ES1 (F)
- TC-71 (H)

Neuroblastomzelllinien:

- SiMa (C)
- SH-SY5Y (E1)
- MHH-NB-11 (G)

4.1.2 Anzuchtsmedium

Zur Anzucht wurde RMPI-Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) verwendet. Die Inhaltsstoffe sind folgend aufgelistet:

- 10% Fötale Kälberserum
- 2 mM Glutamin
- 100 u/ml Penicillin
- 100 mg/ml Streptomycin

4.1.3 Anzuchsbedingungen

Die Anzucht der Zelllinien wurde von der Arbeitsgruppe „Funktionelle Genomik pädiatrischer Krebskrankheiten“ der Kinderklinik der Technischen Universität München durchgeführt. Die jeweiligen Zelllinien wurden in RPMI-Medium in Kulturflaschen bei 37 °C und unter einer befeuchteten 5%igen CO₂ Atmosphäre angezogen.

4.1.4 Zellernte

Die Zellernte erfolgte sobald die jeweilige Zelllinie eine Zellzahl von $1,2 \times 10^8$ Zellen erreicht hatte.

4.1.5 Proteinextraktion

Reagenzlösung:

- Lysis-Puffer (7M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 4% CHAPS; 30mM Tris; pH 8,5):
Zu 21 g Harnstoff und 7,62 g Thioharnstoff 23,08 ml *Aqua bidest*, 2,57 ml Proteaseinhibitor und 2,85 ml PSC-Protectorreagenz zugeben und lösen. Zugabe von 500 mg Mischbettionenaustauscher Serolit MB-1 und 45 Minuten rühren lassen. Durch Faltenfilter filtrieren, 40 ml in frisches Becherglas überführen. Zugabe von 1,6 g CHAPS und 0,15 g Tris unter rühren lösen. Mit HCl auf pH 8,5 titrieren. Anschließend aliquotieren und bei -80 °C lagern.

Das Zellpellet wurde in Lysis-Puffer aufgenommen. Pro 130mg Zellen wurden 500µl Lysis-Puffer hinzugegeben. Je 250µl der Zellsuspension wurde anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall für 30 Sekunden mit einer Pulszeit von 0,5 s bei 60 Watt. Nach Kühlung der Probe für 1 Minute auf Eis wurde die Ultraschallbehandlung wiederholt. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C und 20.000 g für 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C eingefroren.

4.2 Anzucht von *Bacillus subtilis*

4.2.1 Verwendete Zelllinie

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendete Zelllinie war *Bacillus subtilis* 168 trpC2 [157].

4.2.2 Anzuchtsmedium

4.2.2.1 Belitsky-Minimalmedium

Die Anzucht von *Bacillus subtilis* 168 trpC2 erfolgte in Belitsky-Minimalmedium (BMM) (modifiziert nach Stülke et al.) [158]:

Grundmedium:

- 0,015 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0,008 M $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0,027 M KCl
- 0,007 M $\text{Na}_3\text{-Citrat}$
- 0,050 M Tris-HCl

Das Grundmedium wurde pro 100 ml wie folgt supplementiert:

- 0,2 M KH_2PO_4 : 0,5 ml
- 1,0 M $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$: 0,2 ml
- 5 mM $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,2 ml
- 25 mM $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$: 0,04 ml
- 0,05 M L-Glutamat, pH 7,5 : 0,9ml
- 39 mM L-Tryptophan : 0,2 ml
- 20% (w7v) Glukose : 0,5 ml

Anschließend wurde das Medium steriltfiltriert.

4.2.2.2 Lysogeny broth Medium

Das *lysogeny broth* Medium (LB-Medium) [159] setzt sich aus folgenden Inhaltsstoffen zusammen:

- 5 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l Trypton
- 0,5 g/l NaCl

Anschließend wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt. Für Plattenkulturen wurden zusätzlich 15 g/l Agar hinzugegeben.

Das Medium wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert.

4.2.3 Zellkultivierung

4.2.3.1 Glycerinkultur

Für die Stammhaltung wurden 20 ml steriles LB Medium in einem 100 ml Kolben mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft. Nach Inkubation bei 37°C, 180 U/min und Erreichen einer OD500 von 0,5 wurden 5 ml steriles Glycerol zugegeben, die Kultur in 750 µl Aliquots in sterile Stammhaltungsröhrchen abgefüllt und sofort bei -70°C eingefroren..

4.2.3.2 Übernachtkultur

Für eine Übernachtkultur (ÜN-Kultur) als Vorkultur wurden fünfmal 20 ml BMM in 100 ml Kolben vorbereitet. Nach Animpfen des ersten Kolbens mit 250 µl frisch aufgetauter Glycerinkultur wurde in einer Verdünnungsreihe jeweils 1 ml Kultur weitergegeben. Die Kolben wurden über Nacht bei 37°C, 180 U/min inkubiert. Am nächsten Tag wurde jene ÜN-Kultur mit einer OD500 von 0,5-1,0 (exponentielle Wachstumsphase) zum Animpfen der Hauptkultur ausgewählt.

4.2.3.3 Hauptkultur

1 l BMM wurde in einem 5 l Kolben mit einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C und 180 U/min im Schüttelschrank bis zu einer OD500 von 0,5 angezogen. Die Proben wurden direkt nach der Probennahme bei 8000 U/min und 4°C 10 min. zentrifugiert, wonach der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet wurde zweimal mit 50 ml kaltem TE-Puffer gewaschen und wiederum durch zentrifugieren (siehe 4.2.3.2) pelletiert und zur kurzfristigen Lagerung bei -20°C eingefroren.

4.2.4 Proteinextraktion

Das Zellpellet wurde in 2 ml kaltem TE-Puffer resuspendiert und in eine vorgekühlte Mini-Cell eingefüllt. Der Aufschluss erfolgte unter einem Arbeitsdruck von 900 psi an einer French® Pressure Cell, wobei dieser Vorgang zweimal wiederholt wurde. Um Zellwandtrümmer und DNA zu pelletieren, wurden zunächst die Zellextrakte bei 8000 U/min 4°C 20 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein 2-ml Reaktionsgefäß überführt und bei 14000 U/min und 4°C 30 min wiederum zentrifugiert. Zur Lagerung wurde der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

4.2.5 Abtrennung der Ribosomen

Die Abtrennung der Ribosomen erfolgte nach Matsuo et al. [160].

Reagenzlösungen:

- **Puffer A:**
 - 10 mM Tris-HCl pH 7,6
 - 10 mM Mg(CH₃COO)₂
 - 100 mM CH₃COONH₄

- 6 mM β -Mercaptoethanol
- 2mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Das Zellpellet wurde in 3 ml Puffer A resuspendiert. Dann erfolgte der Zellaufschluss mit der French Press. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 30 min. bei 4°C mit 14.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 100 min. bei 4°C mit 240.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, der die cytosolische Fraktion enthielt, wurde abgenommen und bei -70 °C eingefroren.

4.2.6 Extraktion der integralen Membranproteine

Die Extraktion der integralen Membranproteine wurde nach dem Protokoll von Eymann et al. [161] durchgeführt.

Reagenzlösungen:

- LB-Medium: Siehe Kapitel 4.2.2.2
- TE Puffer A (10mM Tris/HCl; 1mM EDTA; pH 7,5)
Für 1 Liter Lösung werden 1,21 g Tris/HCl und 0,29 g EDTA mit einem Liter *Aqua bidest* gemischt und mit HCl auf pH 7,5 titriert.
- TE Puffer B (10mM Tris/HCl; 1mM EDTA; 1mM Pefabloc; pH 7,5)
Für 1 Liter Lösung werden 1,21 g Tris/HCl; 0,29 g EDTA und 0,2 g Pefabloc mit einem Liter *Aqua bidest* gemischt und mit HCl auf pH 7,5 titriert.
- Saccharose Puffer(0,5 M Saccharose; 20mM Maleinsäure/KOH; 20mM MgCl₂; 0,4% (w/v) Lysozym; 0,01% (w/v) DNase I; 1mM Pefabloc; pH6,5)
Zur Herstellung von einem Liter Lösung werden in 500 ml *Aqua bidest*. 171,15 g Saccharose mit 2,32 g Maleinsäure mit 1,9 g MgCl₂ gelöst. Mit *Aqua bidest*. auf 900 ml

auffüllen und mit KOH auf pH 6,5 titrieren. Anschließend mit 4 g Lysozym; 0,1 g DNase I und 0,2 g Pefabloc mischen und mit *Aqua bidest.* auf 1 Liter auffüllen.

- Inkubationswasser (1mM Pefabloc)
Für 1 Liter Lösung werden 1 Liter *Aqua bidest* mit 0,2 g Pefabloc gemischt.
- Salzpuffer (20mM Tris/HCl; 10mM EDTA; 1M NaCl; 1mM Pefabloc; pH 7,5)
Für 1 Liter Lösung werden 2,42 g Tris; 2,9 g EDTA; 58,4 g NaCl und 0,2 g Pefabloc in 900ml *Aqua bidest.* gelöst. Anschließend mit HCl auf pH 7,5 titriert und mit *Aqua bidest.* auf 1 Liter aufgefüllt.
- Homogenisierungspuffer (100mM Na₂CO₃/HCl; 10mM EDTA; 100mM NaCl; pH 11)
Für einen Liter Lösung werden 10,6 g Na₂CO₃; 2,9 g EDTA und 5,84 g NaCl in 900 ml *Aqua bidest.* gelöst. Anschließend mit HCl auf pH 11 titrieren und mit *Aqua bidest.* auf 1 Liter auffüllen.
- DDM-Puffer (15mM n-dodecyl-β-D-Maltosid)
Für 1 Liter Lösung werden 7,65 g n-dodecyl-β-D-Maltosid in 1 Liter *Aqua bidest* gelöst.

Durchführung:

Die Anzucht von *Bacillus subtilis* erfolgte in 2 x 1 Liter LB-Medium bis zu einer OD₅₄₀ von 1,0 (exponentielle Wachstumsphase). Anschließend wurden die Zellen zweimal in auf 4 °C gekühltem TE Puffer A gewaschen. Zur Gewinnung der Protoplasten wurden die Zellen für 2 Stunden in Saccharose Puffer inkubiert und bei 3.000 g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 ml Inkubationswasser resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C auf einem Rotationsschüttler (500 rpm) inkubiert um die Zellen durch osmotischen Schock zu lysieren. Zelltrümmer und intakte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6.000 g bei 4°C (10 Minuten) entfernt. Der Überstand wurde abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in 2 ml TE Puffer B resuspendiert und der Zellaufschluss durch Ultraschall abgeschlossen (30W; 4 x 30s). Nach anschließender Zentrifugation (6.000g; 10

Minuten; 4°C) wurde der Überstand abgenommen und mit dem auf Eis gelagerten Überstand vereint. Der restliche Rohextrakt wurde für 60 Minuten bei 4°C und 100.000g ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde als cytosolische Fraktion in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde in 8 ml Salzpuffer homogenisiert, für 30 Minuten bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend nochmals, wie oben beschrieben, ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet in 2 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und nochmals ultrazentrifugiert (siehe oben). Es folgte ein abschließender Waschschrift mit 8 ml TE Puffer mit nochmaliger Ultrazentrifugation (siehe oben). Das Pellet wurde in 200 µl TE Puffer resuspendiert, anschließend mit DDM-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde für 10 Minuten bei 4°C und 20.000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Membranprotein-Fraktion in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

4.3 Anzucht von *Corynebacterium glutamicum*

4.3.1 Verwendete Zelllinie

Es wurde die Zelllinie *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 verwendet.

4.3.2 Anzuchtsmedium

- *Brain-Heart-Infusion-Medium*
37 g BHI in 1 Liter *Aqua bidest.* lösen. Für 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren.

Zur Anzucht von *Corynebacterium glutamicum* wurde *Brain-Heart-Infusion* (BHI) Medium verwendet. Das Medium wurde laut Vorschrift angesetzt.

4.3.3 Wachstumsbedingungen

Die Anzucht von *C. glutamicum* erfolgte in Schikane-Kolben bei 30°C auf einem Rotationsschüttler mit 120 rpm. Zunächst wurde eine Vorkultur angesetzt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 7 herangezogen. Von dieser Vorkultur wurde dann 1 ml auf 150 ml BHI-Medium gegeben.

4.3.4 Wachstumskurve

Als Zeitpunkt der Zellernte wurde die Mitte der logarithmischen Wachstumsphase gewählt, da hier die meisten exprimierten Proteine zu erwarten sind. Um die Mitte der logarithmischen Wachstumsphase zu bestimmen wurde die Wachstumskurve von drei *C. glutamicum* Anzuchten bestimmt.

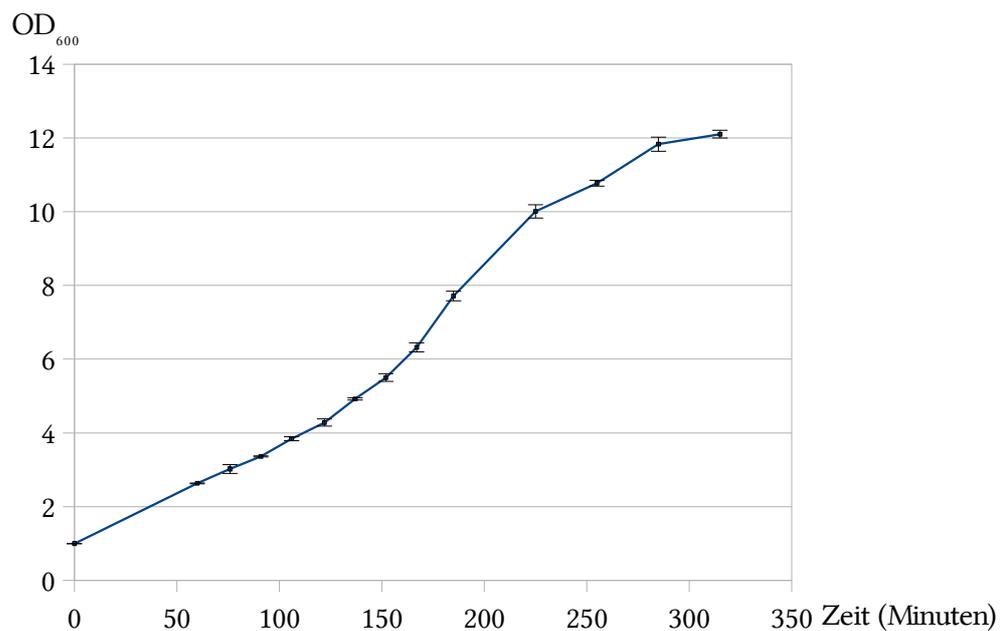


Abbildung 10: Wachstumskurve von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Aufgrund der Wachstumskurve wurde die Mitte der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD_{600} von 7 festgelegt.

4.3.5 Proteinextraktion

4.3.5.1 Proteinextraktion für anschließende Sephadex-Vorfraktionierung

Reagenzlösungen:

- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,144% Na₂HPO₄; 0,024% KH₂PO₄; pH 8,0)
Zur Herstellung von 1 Liter Lösung werden 0,8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,144 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄ in 800 ml *Aqua bidest.* gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt. Mit *Aqua bidest.* auf 1 Liter auffüllen. Für 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren.
- Harnstoff-/ Thioharnstoff Lysepuffer (7M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4% CHAPS; 2% DTT; 2% Pharmalyte 3-10)
Zu 21 g Harnstoff und 7,62 g Thioharnstoff werden in 28,5 ml *Aqua bidest.* gelöst. Zugabe von 500 mg Mischbettionenaustauscher Serolit MB-1 und 45 Minuten bei Raumtemperatur rühren lassen. Lösung über Faltenfilter filtrieren. Zu 40 ml Lösung werden 1,6 g CHAPS; 0,8 g DTT und 800 µl Pharmalyte 3-10 zugegeben. Aliquotieren und bei -80 °C lagern.

100 ml eines Schikane-Kolbens wurden in 10 x 10 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und die Zellen bei 4°C und 8000 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2,5 ml eiskaltem PBS Puffer resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets von vier Zentrifugenröhrchen vereint und in 7,5 ml PBS Puffer aufgenommen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 2,5 ml Harnstoff/Thioharnstoff-Lysis-Puffer aufgenommen. Je 250 µl der Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss wurde durch Ultraschallbehandlung beschleunigt. Es erfolgten 30 Pulse (jeweils 0.5 Sekunden) bei 60 Watt. Nach der Beschallung wurden die Proben eine Minute auf Eis gekühlt und ein zweites Mal behandelt, um eine vollständige Zellyse zu erhalten. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 4°C und 5000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren.

4.3.5.2 Extraktion der integralen Membranproteine

Die Extraktion der Membranproteine erfolgte nach dem Protokoll von Schluesener et al. [162]:

Reagenzlösungen:

- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,144% Na₂HPO₄; 0,024% KH₂PO₄; pH 8,0)
Zur Herstellung von 1 Liter Lösung werden 0,8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,144 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄ in 800 ml *Aqua bidest.* gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt. Mit *Aqua bidest.* auf 1 Liter auffüllen. Für 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren.
- Desintegrationspuffer (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,144% Na₂HPO₄; 0,024% KH₂PO₄; 0,4 % MgCl; pH 7,3)
Zur Herstellung von 1 Liter Lösung werden 0,8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,144 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄ und 4,06 g MgCl in 800 ml *Aqua bidest.* gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit HCl auf 7,3 eingestellt. Mit *Aqua bidest.* auf 1 Liter auffüllen. Für 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren.

Zunächst wurden 8 ml Zellkultur bei 8000 U/ min und 4 °C für 10 Minuten in einem Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dies wurde 4 mal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml Desintegrationspuffer resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 250µl aliquotiert. Der Zellaufschluss wurde durch Ultraschall beschleunigt. Es erfolgten 30 Pulse zu je 0,5 Sekunden bei 60 Watt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 1 Minute gekühlt und der Zellaufschluss wiederholt. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 15000 U/min und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 120.000 g bei 4°C für 60 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet in 1 ml 2,5 M NaBr resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Danach erfolgte ein letzter Waschschrift mit *Aqua*

bidest. und erneuter Ultrazentrifugation. Das Pellet wurde anschließend in entweder in Lysepuffer Y oder Lysepuffer XY aufgenommen. Lysepuffer Y und Lysepuffer XY sind als Teil der Methodenentwicklung zur Trennung von integralen Membranproteinen in Kapitel 5.8 beschrieben.

4.3.6 Bestimmung des Proteingehalts der Extrakte

Der Proteingehalt der verwendeten Extrakte wurde mit dem *2D-Quant-Kit* von GE Healthcare bestimmt.

Zunächst wird 4 µl der Probe in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl *Precipitant* gemischt. Nach 2 Minuten Standzeit bei Raumtemperatur wird 500µl *Co-Precipitant* hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wird 10 Minuten bei 20 °C und 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Eventuelle Flüssigkeitsreste im Reaktionsgefäß werden für 1 Minute bei 20.000g abzentrifugiert und mit einer 10µl-Pipette entfernt. Das sich im Reaktionsgefäß befindende Proteinpellet wird in 400 µl *Aqua bidest.* und 100 µl *Copper Solution* aufgenommen. Nachdem sich das Proteinpellet vollständig gelöst hatte wird 1000 µl *Working-Solution* in das Reaktionsgefäß gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 480 nm in einem Spektroskop gemessen. Die Proteinkonzentration wird durch Abgleich mit der Absorption bekannter Proteinmengen errechnet.

4.4 2D-Gelelektrophorese

4.4.1 Isoelektrische Fokussierung mit IPGs

4.4.1.1 Herstellung von IPG-Gelen

Reagenzlösungen:

- Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30% T,3% C):
29,1 g Acrylamid und 0,9 g Bisacrylamid in 80 ml *Aqua bidest.* lösen und auf 100 ml auffüllen, 1 g Mischbettionenaustauscher Serolit MB-1 zugeben, 10 Minuten rühren und filtrieren
- Ammonium-Persulfat-Lösung (40%-ige Lösung):
0,4 g Ammoniumpersulfat in 1 ml *Aqua bidest.* lösen
- Immobiline-Lösungen:
Immobiline pK 1,0; pK 3,6; pK 4,6; pK 6,2; pK 7,0; pK 8,5; pK 9,3; pK 10,3; pK 13 als Fertiglösungen (GE Healthcare LifeSciences bzw. Sigma-Aldrich/Fluka)
- TEMED (100%)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 5 verschiedene IPGs verwendet. Die jeweiligen Komponenten werden nach den in Tabellen 6-10 aufgelisteten Volumina gemischt und mit HCl bzw. NaOH auf pH 7 titriert. Für ein 25 x 20 x 0,5 mm³ großes IPG Gel werden jeweils ca. 15 ml der sauren bzw. basischen Lösung benötigt. Die Katalysatoren (TEMED und Ammoniumpersulfat) werden erst unmittelbar vor dem Gießen des IPG-Gels hinzugegeben.

	IPG 3-12	
Saure Lösung	Immobiline [pK]	Basische Lösung
1287 µl	1	-
306 µl	3,6	-
413 µl	4,6	-
557 µl	6,2	335 µl
496 µl	7	168 µl
112 µl	8,5	698 µl
84	9,3	157 µl
25 µl	10,3	342 µl
1 µl	13	258 µl
6,45 ml	H ₂ O	10,8 ml
3,75 g	Glycerol	-
2,25 ml	AA (29,1/0,9)	2,25 ml
9 µl	TEMED	9 µl
15 µl	APS	15 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 3-12, je 15 ml

	IPG 6-12	
Saure Lösung	Immobiline [pK]	Basische Lösung
-	1	-
1367 µl	3,6	-
-	4,6	-
188 µl	6,2	251 µl
326 µl	7	125 µl
365 µl	8,5	84 µl
497 µl	9,3	32 µl
50 µl	10,3	485 µl
-	13	345 µl
6,98 ml	H ₂ O	11,4 ml
3,75 g	Glycerol	-
2,25 ml	AA (29,1/0,9)	2,25 ml
9 µl	TEMED	9 µl
15 µl	APS	15 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 6-12, je 15ml

	IPG 4-9	
Saure Lösung	Immobiline [pK]	Basische Lösung
-	1	-
830 µl	3,6	147 µl
236 µl	4,6	425 µl
233 µl	6,2	360 µl
23 µl	7	296 µl
251 µl	8,5	71 µl
221 µl	9,3	663 µl
-	10,3	-
-	13	-
8,25 ml	H ₂ O	11,1 ml
3,75 g	Glycerol	-
2 ml	AA (29,1/0,9)	2 ml
9 µl	TEMED	9 µl
15 µl	APS	15 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 4-9, je 15 ml

	IPG 4-7	
Saure Lösung	Immobiline [pK]	Basische Lösung
-	1	-
578 µl	3,6	302 µl
110 µl	4,6	738 µl
450 µl	6,2	152 µl
-	7	269 µl
-	8,5	876 µl
-	9,3	-
-	10,3	-
-	13	-
8,9 ml	H ₂ O	10,7 ml
3,75	Glycerol	-
2 ml	AA (29,1/0,9)	2 ml
9 µl	TEMED	9 µl
15 µl	APS	15 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 4-7, je 15 ml

	IPG 3,4-5,4	
Saure Lösung	Immobiline [pK]	Basische Lösung
87 µl	1	-
523 µl	3,6	75 µl
200 µl	4,6	746 µl
-	6,2	-
282 µl	7	750 µl
-	8,5	-
-	9,3	-
-	10,3	-
-	13	-
9,9 ml	H ₂ O	11,4 ml
3,75 g	Glycerol	-
2 ml	AA (29,1/0,9)	2 ml
9 µl	TEMED	9 µl
15 µl	APS	15 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung IPG 3,4-5,4; je 15 ml

Durchführung:

Die Gießkassette, bestehend aus zwei 200 x 260 mm großen Glasplatten, einer Gelträgerfolie (GelBond PAGFilm) und einer 0,5 mm starken Silikongummi-Dichtung.

Zuerst muss die obere Glasplatte (d.h. Glasplatte mit Gummidichtung) mit einem hydrophobisierenden Reagenz (Repel Silane) vorbehandelt werden, damit sich später das polymerisierte Gel von der Glasplatte ablösen lässt. Anschließend pipettiert man einige Tropfen Wasser auf die Glasplatte ohne Dichtung, und walzt mit Hilfe einer Hartgummiwalze die Gel-Trägerfolie (GelBond PAGFilm) mit der hydrophoben Seite nach unten luftblasenfrei auf. Danach wird die Deckglasplatte mit der Dichtung (Dicke: 0.5 mm) nach unten auf die Gel-Trägerfolie aufgelegt. Die Kassette wird zusammengeklammert und ca. eine halbe Stunde in den Kühlschrank bei 4°C gestellt, um zu verhindern, dass die Gellösung nach dem Einfüllen vorzeitig bzw. zu schnell polymerisiert.

Zur Herstellung der Polymerisationslösung benötigt man sowohl eine basische und eine saure Immobilinlösung, wobei letztere zum Aufbau eines Dichtegradienten (und damit zur Stabilisierung des pH-Gradienten) zusätzlich 25% Glycerol enthält. Die Menge an Acrylamid und Bisacrylamid ist in beiden Lösungen identisch. Der pH-Wert entspricht den in Tabellen 6-10 angegebenen Anfangs- und Endpunkten des pH-Gradienten. Vor dem eigentlichen Gießvorgang müssen beide Lösungen mit 1N Salzsäure bzw. 1N Natronlauge auf einen pH von 7,0 titriert werden, damit eine optimale Polymerisationskinetik erzielt wird. Den Radikalstarter TEMED und das Ammoniumpersulfat gibt man erst unmittelbar vor dem Gießvorgang hinzu.

Das Gießen des Gels erfolgt mit der Gradientengießtechnik für ultradünne Gele nach Görg *et al.* [163]. Hierzu wird ein Gradientenmischer auf einen Magnetrührer gestellt und der Auslaufschlauch in den oberen Spalt der Gießkassette eingeführt, wobei das Auslassventil des Gradientenmischers noch geschlossen sein muss. Die saure Lösung wird in die Mischkammer mit einem Magnetrührer gegeben. Bevor die basische Lösung in die andere Kammer mit einem sich darin befindenden Nivellierstab hineinpipettiert wird, ist es notwendig, den Verbindungstunnel zwischen den beiden Kammern kurz zu entlüften. Zum Gießen des Gels öffnet man das Durchlassventil und das Auslassventil zur gleichen Zeit, um die vorgekühlte Glasplatte bis knapp unterhalb der Oberkante zu befüllen. Während des gesamten Vorgangs ist es wichtig darauf zu achten, dass der Flüssigkeitspegel in beiden Zylindern des Mischers gleichmäßig schnell fällt. Weitere Details siehe [139].

Nach dem Gießvorgang lässt man die Kassette 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen, um eine Nivellierung des Dichtegradienten zu erhalten, bevor das Gel eine Stunde lang in einem Trockenschrank bei 50 °C auspolymerisiert wird. Nach Beendigung der Polymerisation wird die Kassette geöffnet und das auf der Trägerfolie gebundene Gel vorsichtig von der Glasplatte abgelöst. Im Folgenden wäscht man das Gel 6 x 10 Minuten in *Aqua bidest.*, um nicht einpolymerisierte Monomere zu entfernen, und daraufhin noch weitere 30 Minuten in einer 2%-igen Glycerollösung. Im Anschluss wird das Gel über Nacht in einem staubfreien Schrank mit Hilfe eines Ventilators bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird die Oberfläche des Gels mit einer Schutzfolie abgedeckt und kann dann mehrere Monate bei -20°C gelagert

werden. Vor Gebrauch werden die getrockneten IPG Gele mit Hilfe einer Papierschneidemaschine in 3 mm breite Einzelstreifen geschnitten und die Schutzfolie abgezogen.

4.4.1.2 Rehydratisierung der IPG-Streifen

Prinzip: Vor Verwendung der IPG-Streifen müssen diese rehydratisiert werden, damit in ihnen Bedingungen für völliges Entfalten, in-Lösung-Gehen der Proteine, Reduktion der Disulfid-Brücken und Verhinderung von Carbamylierungen herrschen. Dies geschieht durch Quellen der IPG-Streifen in der Rehydratisierungslösung.

Reagenzlösungen:

- Quellpuffer (6M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 1% CHAPS, 200 mM HED; 0,5% Pharmalyte 3-10):

18,02 g Harnstoff und 7,612 g Thioharnstoff in 30,8 ml *Aqua bidest.* lösen.

Mit einer Spatelspitze (500 mg) Mischbettionenaustauscher versetzen, 45 Minuten rühren. Danach filtrieren und 0,4 g CHAPS, 960 µl HED und 200 µl Pharmalyte 3-10 zu 40 ml des Filtrats zugeben. Der Quellpuffer wird in Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Aufgetauter Quellpuffer sollte nicht wieder eingefroren werden!

Die Rehydratisierung der IPG-Streifen erfolgt entweder in einer Quellkassette oder in einem Reswelling Tray. Für einen 18 cm langen IPG-Streifen pipettiert man 350 µl (bzw. 450 µl im Falle eines 24 cm langen IPG-Streifens) der Quelllösung in eine Vertiefung des Trays und legt den IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei hinein. Der IPG-Streifen muss über die gesamte Länge mit Flüssigkeit benetzt und frei beweglich sein. Im Anschluss wird er mit 2 ml Silikonöl überschichtet und der Tray geschlossen. Die Rehydratisierung erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur (20°C).

4.4.1.3 IEF mit der IPGPhor

Durchführung

Die über Nacht rehydratisierten IPG-Streifen werden aus dem Reswelling Tray herausgenommen und kurz in *Aqua bidest.* getaucht, um überschüssigen Quellpuffer zu entfernen und somit ein Auskristallisieren von Harnstoff bei der darauffolgenden IEF zu unterbinden. Anschließend legt man die IPG-Streifen mit der Gelseite nach oben auf ein mit *Aqua bidest.* angefeuchtetes Filterpapier und entfernt durch vorsichtiges Andrücken mit einem weiteren mit *Aqua bidest.* benetzten Filterpapier das auf der Geloberfläche haftende, überschüssige Wasser.

Bei der IPGPhor verwendet man sogenannte *Strip-Holder* die je einen IPG-Gelstreifen aufnehmen können (Abb. 11), und der durch Auflegen auf die Kühlplatte gleichzeitig mit dem Elektrodenkontaktbereich verbunden ist. Anstelle individueller Strip-Holder kann auch ein multipler Strip-Holder (*Manifold*) (Abb. 11) verwendet werden. Die gequollenen IPG-Streifen werden in den *Strip-Holdern* so positioniert, dass das saure Ende zur Anode zeigt (Abb. 12). Auf das anodale und kathodale Ende des Gelstreifens wird jeweils ein 1 mm starkes mit destilliertem Wasser angefeuchtetes Filterpapier (Größe: 3x5 mm²) aufgelegt und leicht angedrückt. Die einzelnen, beweglichen Elektroden werden darauf platziert. Anschließend bringt man den ebenfalls beweglichen Probenauftragsbehälter (*Sample cup*) angrenzend an die Elektrode an der Anode an, so dass er dicht mit dem Gelstreifen abschließt. Auf den gesamten Streifen werden ca. 4 ml *Dry Strip Cover Fluid* pipettiert. Anschließend wird die in Lysispuffer gelöste Probe in den Probenauftragsbehälter gegeben und mit einigen Tropfen *Dry Strip Cover Fluid* überschichtet. Die Temperatur während der IEF beträgt 20°C.

Die Parameter der IEF hängen von den verwendeten IPG-Streifen ab und sind in Tabelle 11 aufgelistet.

pH-Gradient	μA / IPG-Streifen	150 V	300 V	600 V	Linearer Gradient auf 8000V	8000V	Voltstunden
3-12	50	1 h	1 h	2 h	1 h	2,5 h	20.000
6-12	70	1 h	1 h	2 h	1 h	4 h	32.000
4-7	50	1 h	1 h	2,5 h	1 h	5,5 h	44.000
4-9	50	1 h	1 h	2 h	1 h	5 h	40.000
3,4-5,4	50	1 h	1 h	2,5 h	1 h	7 h	56.000

Tabelle 11: Parameter der IEF auf IPGPhor für 18 cm IPG-Streifen

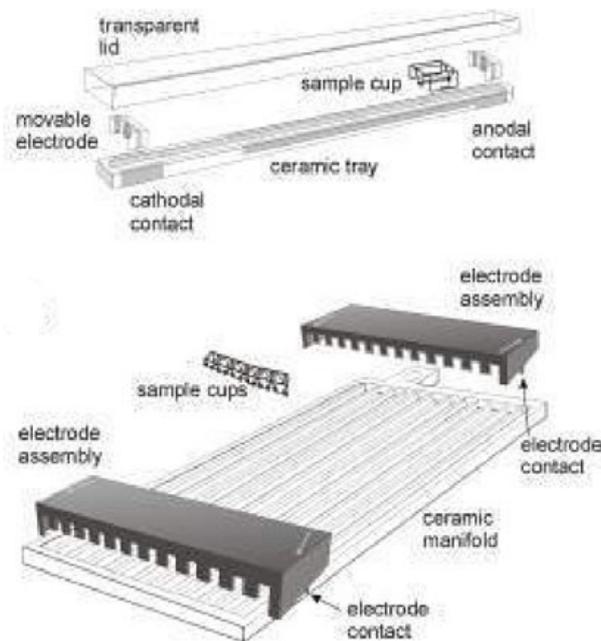


Abbildung 11: Probenanfrage in individuellen cup-loading strip holdern (oben) und multiplem cup-loading strip holder („Manifold“) (unten) [165]



Abbildung 12: Positionierung des Probenhalters auf dem IPG-Streifen [131]

Nach Beendigung der IEF werden die IPG-Streifen in eine Klarsichthülle gelegt und bis zur weiteren Verwendung für die SDS-PAGE bei -70°C gelagert.

4.4.2 SDS-PAGE

Nach der IEF werden die Proteine in der zweiten Dimension mit Hilfe einer SDS-PAGE nach ihrer Masse (genauer: Molekülgröße bzw. hydrodynamischem Radius) getrennt. Man kann durch verschiedene Acrylamidkonzentrationen das Trennverhalten der zweiten Dimension verändern. Durch eine höhere Konzentration von Acrylamid (AA) werden die niedermolekularen Proteine besser getrennt, während bei geringeren Konzentrationen die hochmolekularen Proteine besser getrennt werden.

4.4.2.1 Herstellung von SDS-Gelen

Reagenzlösungen:

- Acrylamidlösung (30,8% T; 2,6% C)

Um 1 Liter der Lösung herzustellen, löst man 300 g AA und 8,0 g Bis-AA in etwa 500 ml *Aqua bidest.* und füllt dann auf 1000 ml auf. Anschließend wird die Lösung mit 10 g Mischbettionenaustauscher Serolit MB-1 versetzt, eine Stunde gerührt und filtriert.

- Gelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS)
18,2 g Trizma-Base und 0,4 g SDS in etwa 80 ml *Aqua bidest.* lösen. Mit 4 N HCl auf pH 8,8 titrieren und mit *Aqua bidest.* auf 100 ml auffüllen.
- Ammoniumpersulfatlösung (10%)
1,0 g Ammoniumpersulfatlösung (APS) in 10 ml *Aqua bidest.* lösen (frisch ansetzen).
- Glycerollösung (50% Glycerol; 0,01% Bromphenolblau)
250 ml Glycerol (100%) in 250 ml *Aqua bidest.* lösen, mit 50 mg Bromphenolblau versetzen und für einige Minuten rühren.
- Überschichtungspuffer (Gelpuffer-gesättigtes 2-Butanol)
Zu 20 ml Gelpuffer werden 30 ml 2-Butanol gegeben und die Lösung einige Minuten gerührt. Vor der Verwendung müssen sich beide Phasen wieder getrennt haben. Zum

Überschichten der Gellösung wird nur die obere, leichtere 2-Butanolphase verwendet.

- TEMED (100%)

Gellösung	T=12%	T=15%
Acrylamidlösung	350,6 ml	438,3 ml
Glycerol	45 g	45 g
Gelpuffer	225 ml	225 ml
<i>Aqua bidest.</i>	283,4 ml	195,8 ml
APS (10%)	6 ml	6 ml
TEMED	100 µl	100 µl
Gesamtvolumen	900 ml	900 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele

Durchführung

Aufbau der Gießkammer

Zwei durch ein Scharnier verbundene Glasplatten stellen zusammen mit einem 1 mm starken Abstandshalter (*Spacer*) eine Gießkassette (204 mm x 255 mm x 1mm) dar. Da am oberen Ende 2 cm zum Fixieren des IPG-Gelstreifens mit Agaroselösung frei bleiben müssen, ergibt sich eine effektive Trenndistanz von 18 cm. Zwischen die einzelnen Gießkassetten werden alternierend Klarsichtfolien eingeordnet und zur gleichmäßigen Druckverteilung an beide Enden noch Schaumgummimatten eingesetzt. Zum Schließen der Gießkammer justiert man die Deckplatte und schraubt sie über Kreuz fest.

Gießen der SDS-Gele

Am Anfang wird das an der Kammer angebrachte Gießreservoir mit einem Trichter verschlossen, in den man im Anschluss die kurz zuvor mit TEMED und APS versetzte Gellösung gießt. Anschließend gibt man Glycerollösung dazu, die durch ihre höhere Dichte die Gellösung im Einflussbereich verdrängt und die Gellösung unterschichtet.

Die SDS-Gele werden nach dem Gießen an der Oberkante mit je 1 ml Gelpuffer-gesättigtem 2-Butanol überschichtet, damit eine glatte und horizontale Gelkante entsteht. Der Polymerisationsvorgang dauert bei Raumtemperatur mindestens drei Stunden, wird aber

zwecks besserer Reproduzierbarkeit meistens über Nacht durchgeführt.

Nach abgeschlossener Polymerisation entnimmt man die Glasplatten und wäscht sie außen sorgfältig mit destilliertem Wasser ab, auch das Butanol wird von der Geloberfläche abdekantiert. Damit vom Spülvorgang noch vorhandenes Wasser ablaufen kann, stellt man die Gießkassetten mit der Oberkante nach unten auf ein Drahtgestell. Die beiden randständigen Gele in der Gießkammer werden i.A. verworfen, da bei diesen keine gleichmäßige Dicke gewährleistet ist.

4.4.2.2 Äquilibrierung der IPG-Streifen

Die Äquilibrierung der IEF-Gele vor der SDS-Elektrophorese dient vor allem dazu, die fokussierten Proteine optimal mit SDS zu beladen. Ohne diesen Schritt wäre ein unzureichender Proteintransfer aus der ersten in die zweite Dimension gegeben, verbunden mit einer vertikalen Streifenbildung, die auf die in diesem Fall nur sukzessive in Lösung gehenden Proteine zurückzuführen ist [164]. Der Zusatz von Harnstoff und Glycerol verbessert den Transfer, während Iodacetamid im zweiten Äquilibrierschritt zur Alkylierung der Sulfhydrylgruppen dient und somit eine sukzessive Reoxidation (*Spot-Streaking*) der Proteine während der SDS-PAGE verhindert.

Reagenzlösungen:

- Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS)
18,2 g Trizma-Base und 0,4 g SDS in etwa 80 ml Aqua bidest. lösen. Mit 4 N HCl auf pH 8,8 titrieren und mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen.
- Äquilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, 2 % SDS in 0,05 M Trenngelpuffer, pH 8,8)
180 g Harnstoff, 150 g Glycerol, 10 g SDS und 16,5 ml Trenngelpuffer in Aqua bidest. lösen und auf 500 ml mit Aqua bidest. auffüllen.

Durchführung

Zur Äquilibration werden die IPG-Gelstreifen mit der Gelseite nach oben in einen leeren IPG-Strip-Tray gelegt. Nun gießt man 100 ml Äquilibrationpuffer, in dem zuvor 1 g DTT gelöst wurden, in den Tray und bewegt die Flüssigkeit 15 Minuten auf einem Horizontalschüttler. Nach Abgießen des ersten Versorgungspufferung werden die IPG-Streifen für weitere 15 Minuten in 100 ml Äquilibrationpuffer, in dem 4,8 g Iodacetamid gelöst wurde, geschüttelt. Im Anschluss daran werden die IPG Gelstreifen sofort für die zweite Dimension eingesetzt.

4.4.2.3 Befüllen des Elektrophoresetanks

Reagenzlösungen:

- Tankpufferkonzentrat (4-fach konzentriert)
19,9 g SDS, 58 g Trizma Base und 299,6 g Glycin in 5,0 Liter Aqua bidest. lösen.
- Bromphenolblau-Lösung : (0,25 % Bromphenolblau in Trenngelpuffer)
25 mg Bromphenolblau in 10 ml Trenngelpuffer lösen.
- Agaroselösung
Man gibt zu 100 ml Tankpuffer (2-fach konzentriert) 500 mg Agarose und 100 µl Bromphenolblaulösung, kocht die Lösung auf, bis sie klar ist und temperiert sie anschließend im Wasserbad auf 80°C.

Man befüllt die Tankkammer mit 5,625 Liter Aqua bidest., gibt im Anschluss 1,875 Liter des Tankpuffer-Konzentrats hinzu und schaltet die Umwälzpumpe ein. Einbringen der äquilibrierten IPG-Streifen in die Gelkassetten.

Zunächst werden die äquilibrierten IPG-Streifen kurz in den Tankpuffer getaucht, um das darauffolgende Einschleiben in die Gießkassette zu erleichtern. Hierzu fasst man den IPG-Gelstreifen mit einer Pinzette an einem Ende und führt den Streifen mit der Gelseite zum Bearbeitenden zeigend und der Kathode nach rechts in die Kassette ein (Abb. 13 (1)).

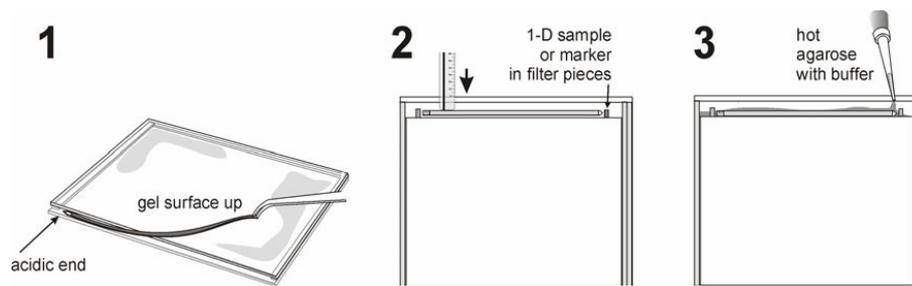


Abbildung 13: Aufbringen des IPG Streifens auf das SDS Gel.

Einbringung (1 und 2) eines IPG-Streifens in ein vertikales SDS-Gel und Fixierung mit Agarose (3) [165]

Mit einem kleinen Spatel kann der IPG-Streifen nun nach unten geschoben werden, bis er auf dem SDS-Gel aufliegt. Rechts neben den Gelstreifen wird nun ein mit zuvor 7 μ l Molekulargewichtsmarkerlösung getränktes und anschließend getrocknetes Filterpapierstück (5 x 2mm²) eingebracht. (Abb. 13 (2)). Anschließend fixiert man den IPG-Streifen und das Filterpapierstückchen mit ca. 5 ml ca. 70-80°C heißer Agaroselösung, die nach wenigen Minuten bei Raumtemperatur erstarrt (Abb. 13 (3)). Der aufgezeigte Arbeitsvorgang wird für alle IPG-Streifen durchgeführt. Daraufhin werden die Gießkassetten in die Tankkammer eingebracht, dass sich der IPG-Gelstreifen am oberen Ende befindet. Zum Schluss wird der Tank noch mit 2 Liter 2-fach konzentriertem Tankpuffer bis zur Markierung aufgefüllt

4.4.2.4 Laufparameter

Der Proteintransfer vom IPG-Streifen auf das SDS-Gel erfolgt für 1 h bei 50 mA, danach 1 h bei 80mA. Anschließend wird die Stromstärke auf 160 mA (alle Angaben für 10 SDS-Gele) erhöht. Die Spannung wird auf 200 V begrenzt. Die Trennzeit beträgt bei diesen Parametern etwa 18 h (bei 20°C).

4.4.2.5 Beendigung der SDS-PAGE

Die Trennung wird gestoppt, wenn die Bromphenolblaufront der Agaroselösung das SDS-Gel vollständig durchwandert hat. Daraufhin werden die Kassetten aus dem Tank entnommen und mit einem Spatel vorsichtig geöffnet. Der IPG-Streifen und die Agaroseüberschichtung werden entfernt, und das Gel in eine Glaswanne mit Fixierlösung überführt.

4.5 Proteinvisualisierung

Nach Beendigung der SDS-PAGE müssen die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit geschah dies durch Silberfärbung, Coomassie Blau und Fluoreszenzdetektion.

4.5.1 Silberfärbung nach Blum *et al.* (modifiziert)

Reagenzlösungen:

- Fixierlösung (40% Ethanol; 10% Essigsäure):
1 Liter Lösung werden mit 400ml Ethanol, 100ml Essigsäure und 500ml *Aqua bidest.* gemischt
- Sensitivierlösung (0,02% Natriumthiosulfat):
200mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat werden in 1 Liter *Aqua bidest.* gelöst.
- Silbernitratlösung (0,2% Silbernitrat; 0,02% Formaldehyd)
2 g Silbernitrat in 1 Liter *Aqua bidest.* lösen und kurz vor Gebrauch 200 µl Formaldehyd (37%-ig) zugeben.
- Entwicklerlösung (3% Natriumcarbonat; 0,05% Formaldehyd; 0,005% Natriumthiosulfat)
30 g Natriumcarbonat und 5 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat in 1 Liter *Aqua bidest.* lösen und unmittelbar vor Gebrauch 0,5 ml Formaldehyd (37%-ige Lsg.) hinzufügen.

- Stopplösung (0,5% Glycin)
5 g Glycin in 1 Liter *Aqua bidest.* lösen.

Pro 2DE-Gel werden 500 ml der jeweiligen Lösungen benötigt.

Durchführung

Die Durchführung der Färbung erfolgt entsprechend dem in Tabelle 13 aufgeführten Protokoll.

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit
Fixieren	Fixierlösung	> 3h
Waschen	30% Ethanol	20 Minuten
Waschen	15% Ethanol	20 Minuten
Waschen	<i>Aqua bidest.</i>	20 Minuten
Sensitivieren	Sensitivierlösung	1 Minute
Waschen	<i>Aqua bidest.</i>	3 x 20 s
Imprägnieren mit Silbernitratlösung	Silbernitratlösung	Mind. 20 Minuten
Waschen	<i>Aqua bidest.</i>	3 x 20 s
Entwickeln	Entwicklerlösung	2-5 Minuten
Waschen	<i>Aqua bidest.</i>	20 s
Stoppen	Stopplösung	Mind. 5 Minuten
Lagern	<i>Aqua bidest.</i>	-

Tabelle 13: Durchführungsprotokoll der Silberfärbung nach Blum et al. (modifiziert) [166]

4.5.2 Coomassie Brillant-Blau Färbung

Die verwendeten Färbemethoden sind kolloidale CBB-Färbungen, basierend auf der Methode von Neuhoff *et. al.* [167], [168].

Nach einer mindestens dreistündigen Fixierung in 40% Ethanol und 10% Essigsäure wird das Gel in 500 ml der Färbelösung gelegt, und die Proteine mindestens 3 Stunden angefärbt. Die Entfärbung findet in mehreren Schritten durch 25% Ethanol und 8% Essigsäure statt. Als

Färbelösung wurde zunächst RotiBlue G-250 (Fa. Roth) verwendet. Dazu wurden 100 ml des 5-fach Konzentrats in 300 ml *Aqua bidest.* und 100 ml Methanol verdünnt.

Alternativ wurde die Coomassie Färbemethode *Blue Silver* verwendet [169]:

- 200ml *Aqua bidest.* mit 100ml H_2PO_4 (85%-ig) und 100 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mischen und lösen.
- 1,2 g Coomassie G-250 zugeben und lösen
- 600 ml *Aqua bidest.* hinzugeben
- Unter Rühren 200 ml Methanol hinzugeben.

Die Färbung erfolgte wie oben unter „RotiBlue“ beschrieben. Die Coomassie-Blau-Färbung wurde gewählt, wenn die Proteine anschließend mit MALDI-MS identifiziert wurden.

4.5.3 Flamingo Färbung

Flamingo ist eine Fluorezenzfärbung, die von der Firma Biorad als Fertiglösung angeboten wird. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 14 wiedergegeben.

Arbeitsschritt	Reagenzlösung	Dauer
Fixieren	Fixierlösung	> 3h
Färbung	Flamingo-Färbelösung	3 h
Entfärbung (optional)	0,1% Tween-20	10 Minuten

Tabelle 14: Durchführungsprotokoll der Flamingo Färbung.

4.5.4 Emerald ProQ-Färbung

Die Emerald ProQ-Färbung ist eine für Glykoproteine spezifische Fluoreszenzfärbung und wird von der Firma Invitrogen vertrieben. Die Färbung wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

Reagenzlösungen:

- Fixierlösung (40% Ethanol; 5% Eisessig)
Zur Herstellung von 1 Liter Fixierlösung werden 500 ml *Aqua bidest.* mit 400 ml Ethanol und 50 ml Eisessig gemischt. Anschließend wird die Lösung auf 1 Liter mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.
- Waschlösung (3% Eisessig)
Zur Herstellung von 1 Liter Lösung werden 900 ml *Aqua bidest.* mit 30 ml Eisessig gemischt und anschließend auf 1 Liter mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.
- Oxidierer (mitgelieferte Stammlösung)
Inhalt einer mitgelieferten Flasche „Oxidierer“ in 250 ml Waschlösung auflösen und danach mit Waschlösung auf 500 ml auffüllen.
- Färbelösung
10 Reagenzröhrchen Emerald ProQ-Reagenz (mitgeliefert) auf Raumtemperatur erwärmen und in jedes Reagenzröhrchen 0,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) geben und gut mischen. Inhalt von 10 Reagenzröhrchen in 250 ml *staining buffer* (mitgeliefert) verdünnen. Innerhalb von 2-3 Stunden verbrauchen

Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 15 angegeben. Volumenangaben pro 2D-Gel. Durchführung auf Horizontalschüttler.

Arbeitsschritt	Reagenzlösung	Dauer
Fixieren	1 Liter Fixierlösung	1 h
2. Fixieren	1 Liter Fixierlösung	über Nacht
Waschen	1 Liter Waschlösung	15-20 Minuten
2. Waschen	1 Liter Waschlösung	15-20 Minuten
Oxidieren	0,5 Liter Oxidierer	1 h im Dunkeln
Waschen (5 mal Wiederholen)	1 Liter Waschlösung	15-20 Minuten im Dunkeln
Färben	0,25 Liter Färbelösung	2,5 h im Dunkeln
Waschen	1 Liter Waschlösung	15-30 Minuten im Dunkeln
Waschen(1 mal Wiederholen)	1 Liter Waschlösung	30-45 Minuten im Dunkeln

Tabelle 15: Durchführungsprotokoll der Emerald ProQ-Färbung.

Anschließend wurde das Gel auf dem Typhoon 9600 (GE Healthcare) eingescannt. Die Anregungswellenlänge beträgt 470-500 nm, die Emissionswellenlänge 520 nm.

Anschließend wurde eine SyproRuby-Färbung (siehe Kapitel 4.5.6) durchgeführt.

4.5.5 Diamond ProQ-Färbung

Die Diamond ProQ-Färbung ist eine für Phosphoproteine spezifische Färbung, die von der Firma Invitrogen vertrieben wird.

Reagenzlösungen:

- Fixierlösung (40% Ethanol; 10% Eisessig)
Zur Herstellung von 1 Liter Fixierlösung werden 500 ml *Aqua bidest.* mit 400 ml Ethanol und 100 ml Eisessig gemischt. Anschließend wird die Lösung auf 1 Liter mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.
- Entfärbelösung (20% Acetonitril; 50 mM Natriumacetat; pH 4,0)

Für 5 Liter Entfärbelösung 1074 ml *Aqua bidest.* mit 65,2 ml Eisessig gemischt. Dazu werden 34,02 g in 250 ml *Aqua bidest.* gelöstes Natriumacetat hinzugegeben und gemischt. Danach werden 1 Liter Acetonitril und 2611 ml *Aqua bidest* zugegeben und gemischt.

Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 16 angegeben. Die Volumenangaben sind für jeweils ein 2D-Gel, alle Schritte erfolgen auf einem Horizontalschüttler.

Arbeitsschritt	Reagenzlösung	Dauer
Fixieren	0,5 Liter Fixierer	1 h
2. Fixieren	0,5 Liter Fixierer	über Nacht
Waschen (2 mal wiederholen)	0,5 Liter <i>Aqua bidest.</i>	20 Minuten
Färben	0,5 Liter Färbelösung	2 h im Dunkeln
Entfärben (2 mal wiederholen)	0,5 Liter Entfärbelösung	30 Minuten im Dunkeln
Waschen (1 mal wiederholen)	0,5 Liter <i>Aqua bidest.</i>	5 Minuten im Dunkeln

Tabelle 16: Durchführungsprotokoll der Diamond ProQ-Färbung.

Anschließend wurde das Gel auf dem Typhoon 9600 (GE Healthcare) eingescannt. Die Anregungswellenlänge beträgt 532 nm mit 560 nm *longpass*, die Emissionswellenlänge 514 nm mit 570 nm *bandpass*.

Anschließend wurde eine SyproRuby-Färbung (siehe Kapitel 4.5.6) durchgeführt.

4.5.6 SyproRuby-Färbung

SyproRuby ist eine Fluoreszenzfärbung der Firma Invitrogen und wird als Fertiglösung vertrieben. Das Durchführungsprotokoll ist in Tabelle 17 angegeben, alle Angaben beziehen sich auf ein 2D-Gel, Durchführung auf Horizontalschüttler. Ein vorheriger Fixierschritt ist hier nicht notwendig, da es sich um einen zweiten Färbeschritt nach Diamond- oder Emerald ProQ handelt.

Reagenzlösungen:

- Waschlösung (10% Methanol; 7% Eisessig)

Zu Herstellung von 1 Liter Lösung werden 100 ml Methanol mit *Aqua bidest* auf 500 ml aufgefüllt und 70 ml Eisessig hinzugegeben. Die Lösung wird mit *Aqua bidest.* auf 1 Liter aufgefüllt und gemischt.

- Färbelösung (mitgelieferte Fertiglösung)

Arbeitsschritt	Reagenzlösung	Dauer
Färben	0,5 Liter Färbelösung	über Nacht
Waschen	0,5 Liter Waschlösung	30 Minuten

Tabelle 17: Durchführungsprotokoll der SyproRuby-Färbung.

4.6 Geltrocknung

2D-Gele müssen, um eine Zerstörung zu verhindern, vor der Lagerung speziell getrocknet werden.

Reagenzlösung:

- Schrumpflösung (30% Ethanol; 10% Glycerol)
100g Glycerol und 300 ml Ethanol mit *Aqua bidest.* auf 1 Liter auffüllen.

Durchführung

Nach dem Einscannen wird ein Gel ca. 8 - 10 Minuten in 500 ml Schrumpflösung geschüttelt. Zusätzlich werden pro Gel zwei Cellophanfolien in einer weiteren Glaswanne ebenfalls in die Schrumpflösung eingelegt. Im Anschluss daran spannt man ein Gel feucht zwischen die beiden Cellophanfolien auf einen Rahmen. Dabei ist es wichtig, die eingeschlossene Flüssigkeit mit einem Glasstab herauszudrücken, um spätere Risse im Gel zu vermeiden. Die Gele werden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet (vorteilhafterweise mit einem Ventilator) und danach zur Aufbewahrung in eine Klarsichtfolie eingeschweißt.

4.7 Difference Gel Elektrophoresis (DIGE)

Bei der DIGE werden die Proteine vor der 2DE mit CyDye Farbstoffen *gelabelt*. Bei der Methode des *minimal labeling* wird nur ein Lysinrest eines Proteins, und nur ca. 3% sämtlicher Proteine im Extrakt *gelabelt*. Durch dieses *labeling* ändert sich der isoelektrische Punkt des Proteins nicht signifikant, und seine Masse erhöht sich nur um ca. 450 Da. Dadurch wird sichergestellt, dass sich das Proteinmuster im Vergleich zu den mit Coomassie Blau gefärbten Gelen nicht signifikant verändert, was die Zuordnung der Spots erleichtert.

4.7.1 Fluoreszenzlabeling der Proteine für DIGE

Die CyDye Farbstoffe wurden vor ihrem ersten Gebrauch in DMF aufgenommen. Das DMF sollte möglichst frisch sein (nicht älter als drei Monate), da es nach einiger Zeit in Aminokomponenten zerfällt, die die *labeling* Reaktion stören. Die gelösten CyDyes sind bei -20°C für maximal 6 Monate haltbar. Direkt vor dem *labeling* wurden die Farbstoffe mit DMF auf eine Konzentration von 400 pM verdünnt. 50 µg der Proteinprobe wurden unter Kühlung der Probe auf Eis mit 400 pmol des CyDyes gemischt. Die *labeling* Reaktion fand anschließend im Dunkeln für 30 Minuten statt. Durch Zugabe von 10 mM Lysin pro 400 pmol CyDye wurde die Reaktion gestoppt. Nach weiteren 10 Minuten auf Eis wurde 1 µl 50% DTT und 1 µl Pharmalyte (pH 3-10) pro 50 µl der Probenlösung zugegeben.

Die zu vergleichenden Extrakte wurden mit Cy3 oder Cy5 *gelabelt*, anschließend gemischt und der Cy2 *gelabelte* interne vereinte Standard (IPS) zugegeben. Der IPS bestand aus der vereinten Mischung aller im DIGE Versuch eingesetzten Extrakte. Die jeweils eingesetzte Proteinmenge der Extrakte im IPS war identisch. Das genaue Durchführungsprotokoll für die DIGE-Versuche mit 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien ist auf den Seiten 69-71 dargestellt, das Protokoll der Versuche mit 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien auf den Seiten 72-76.

Name	Cy3	Cy5	Cy2
Gel 01	A1	A2	IPS
Gel 02	A2	B1	IPS
Gel 03	B1	B2	IPS
Gel 04	B2	C1	IPS
Gel 05	C1	C2	IPS
Gel 06	C2	E-1-1	IPS
Gel 07	E-1-1	E-1-2	IPS
Gel 08	E-1-2	E-2-1	IPS
Gel 09	E-2-1	E-2-2	IPS
Gel 10	E-2-2	A1	IPS
Gel 11	A1	B1	IPS
Gel 12	A2	B2	IPS
Gel 13	B1	C1	IPS
Gel 14	B2	C2	IPS
Gel 15	C1	E-1-1	IPS
Gel 16	C2	E-1-2	IPS
Gel 17	E-1-1	E-2-1	IPS
Gel 18	E-1-2	E-2-2	IPS
Gel 19	E-2-1	A1	IPS
Gel 20	E-2-2	A2	IPS

Name	Inhalt	μg	c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	μl	Label
Tube 1	A1	100	4,77	21,0	Cy3
Tube 2	A2	100	4,80	20,8	Cy3
Tube 3	B1	100	8,08	12,4	Cy3
Tube 4	B2	100	7,99	12,5	Cy3
Tube 5	C1	100	5,04	19,8	Cy3
Tube 6	C2	100	3,52	28,4	Cy3
Tube 7	E-1-1	100	4,82	20,7	Cy3
Tube 8	E-1-2	100	4,72	21,2	Cy3
Tube 9	E-2-1	100	6,30	15,9	Cy3
Tube 10	E-2-2	100	5,61	17,8	Cy3
Tube 11	A1	100	4,77	21,0	Cy5
Tube 12	A2	100	4,80	20,8	Cy5
Tube 13	B1	100	8,08	12,4	Cy5
Tube 14	B2	100	7,99	12,5	Cy5
Tube 15	C1	100	5,04	19,8	Cy5
Tube 16	C2	100	3,52	28,4	Cy5
Tube 17	E-1-1	100	4,82	20,7	Cy5
Tube 18	E-1-2	100	4,72	21,2	Cy5
Tube 19	E-2-1	100	6,30	15,9	Cy5
Tube 20	E-2-2	100	5,61	17,8	Cy5
Tube 21	IPS	1000	5,25	190,6	Cy2
	A1	100	4,77	21,0	Cy2
	A2	100	4,80	20,8	Cy2
	B1	100	8,08	12,4	Cy2
	B2	100	7,99	12,5	Cy2
	C1	100	5,04	19,8	Cy2
	C2	100	3,52	28,4	Cy2
	E-1-1	100	4,82	20,7	Cy2
	E-1-2	100	4,72	21,2	Cy2
	E-2-1	100	6,30	15,9	Cy2
	E-2-2	100	5,61	17,8	Cy2

10% größeres Volumen zum Ausgleich von Pipettenungenauigkeiten.

Labeling: 30 Minuten im Dunkeln auf Eis.
 Entsprechend dem Labelvolumen wird eine 10 mM Lysinlösung zum Stoppen der Reaktion hinzugegeben
 und 10 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert.

Name	Inhalt	μg	c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	μl	Label	μl Label	μl Lysin
Tube 1	A1	110	4,77	23,06	Cy3	2,2	2,2
Tube 2	A2	110	4,80	22,92	Cy3	2,2	2,2
Tube 3	B1	110	8,08	13,61	Cy3	2,2	2,2
Tube 4	B2	110	7,99	13,77	Cy3	2,2	2,2
Tube 5	C1	110	5,04	21,83	Cy3	2,2	2,2
Tube 6	C2	110	3,52	31,25	Cy3	2,2	2,2
Tube 7	E-1-1	110	4,82	22,82	Cy3	2,2	2,2
Tube 8	E-1-2	110	4,72	23,31	Cy3	2,2	2,2
Tube 9	E-2-1	110	6,30	17,46	Cy3	2,2	2,2
Tube 10	E-2-2	110	5,61	19,61	Cy3	2,2	2,2
Tube 11	A1	110	4,77	23,06	Cy5	2,2	2,2
Tube 12	A2	110	4,80	22,92	Cy5	2,2	2,2
Tube 13	B1	110	8,08	13,61	Cy5	2,2	2,2
Tube 14	B2	110	7,99	13,77	Cy5	2,2	2,2
Tube 15	C1	110	5,04	21,83	Cy5	2,2	2,2
Tube 16	C2	110	3,52	31,25	Cy5	2,2	2,2
Tube 17	E-1-1	110	4,82	22,82	Cy5	2,2	2,2
Tube 18	E-1-2	110	4,72	23,31	Cy5	2,2	2,2
Tube 19	E-2-1	110	6,30	17,46	Cy5	2,2	2,2
Tube 20	E-2-2	110	5,61	19,61	Cy5	2,2	2,2
Tube 21	IPS	1100	5,25	209,63	Cy2	22	22
	A1	110	4,77	23,06	Cy2	2,2	2,2
	A2	110	4,80	22,92	Cy2	2,2	2,2
	B1	110	8,08	13,61	Cy2	2,2	2,2
	B2	110	7,99	13,77	Cy2	2,2	2,2
	C1	110	5,04	21,83	Cy2	2,2	2,2
	C2	110	3,52	31,25	Cy2	2,2	2,2
	E-1-1	110	4,82	22,82	Cy2	2,2	2,2
	E-1-2	110	4,72	23,31	Cy2	2,2	2,2
	E-2-1	110	6,30	17,46	Cy2	2,2	2,2
	E-2-2	110	5,61	19,61	Cy2	2,2	2,2

Änderung des Gesamtvolumens um Labelvolumen + Lysinvolumen:

Name	Inhalt	μg	c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Volumen [μl]
Tube 1	A1	110	4,01	27,46
Tube 2	A2	110	4,03	27,32
Tube 3	B1	110	6,11	18,01
Tube 4	B2	110	6,05	18,17
Tube 5	C1	110	4,19	26,23
Tube 6	C2	110	3,09	35,65
Tube 7	E-1-1	110	4,04	27,22
Tube 8	E-1-2	110	3,97	27,71
Tube 9	E-2-1	110	5,03	21,86
Tube 10	E-2-2	110	4,58	24,01
Tube 11	A1	110	4,01	27,46
Tube 12	A2	110	4,03	27,32
Tube 13	B1	110	6,11	18,01
Tube 14	B2	110	6,05	18,17
Tube 15	C1	110	4,19	26,23
Tube 16	C2	110	3,09	35,65
Tube 17	E-1-1	110	4,04	27,22
Tube 18	E-1-2	110	3,97	27,71
Tube 19	E-2-1	110	5,03	21,86
Tube 20	E-2-2	110	4,58	24,01
Tube 21	IPS	1100	4,34	253,63
	A1	110	4,01	27,46
	A2	110	4,03	27,32
	B1	110	6,11	18,01
	B2	110	6,05	18,17
	C1	110	4,19	26,23
	C2	110	3,09	35,65
	E-1-1	110	4,04	27,22
	E-1-2	110	3,97	27,71
	E-2-1	110	5,03	21,86
	E-2-2	110	4,58	24,01

Zugabe von DTT und Pharyalyten 3-10 auf jeweils 2% des Gesamtvolumens, 1h im Dunkeln auf Eis inkubieren:

Name	Inhalt	μg	Volumen [μl]	μl DTT	μl Pharyalyte	V (neu) [μl]	c neu [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
Tube 1	A1	110	27,46	0,57	0,57	28,60	3,85
Tube 2	A2	110	27,32	0,57	0,57	28,45	3,87
Tube 3	B1	110	18,01	0,37	0,37	18,76	5,86
Tube 4	B2	110	18,17	0,38	0,38	18,92	5,81
Tube 5	C1	110	26,23	0,55	0,55	27,32	4,03
Tube 6	C2	110	35,65	0,74	0,74	37,13	2,96
Tube 7	E-1-1	110	27,22	0,57	0,57	28,35	3,88
Tube 8	E-1-2	110	27,71	0,58	0,58	28,86	3,81
Tube 9	E-2-1	110	21,86	0,46	0,46	22,77	4,83
Tube 10	E-2-2	110	24,01	0,50	0,50	25,01	4,40
Tube 11	A1	110	27,46	0,57	0,57	28,60	3,85
Tube 12	A2	110	27,32	0,57	0,57	28,45	3,87
Tube 13	B1	110	18,01	0,37	0,37	18,76	5,86
Tube 14	B2	110	18,17	0,38	0,38	18,92	5,81
Tube 15	C1	110	26,23	0,55	0,55	27,32	4,03
Tube 16	C2	110	35,65	0,74	0,74	37,13	2,96
Tube 17	E-1-1	110	27,22	0,57	0,57	28,35	3,88
Tube 18	E-1-2	110	27,71	0,58	0,58	28,86	3,81
Tube 19	E-2-1	110	21,86	0,46	0,46	22,77	4,83
Tube 20	E-2-2	110	24,01	0,50	0,50	25,01	4,40
Tube 21	IPS	1100	253,63	5,28	5,28	264,19	4,16
	A1	110	27,46	0,57	0,57		
	A2	110	27,32	0,57	0,57		
	B1	110	18,01	0,37	0,37		
	B2	110	18,17	0,38	0,38		
	C1	110	26,23	0,55	0,55		
	C2	110	35,65	0,74	0,74		
	E-1-1	110	27,22	0,57	0,57		
	E-1-2	110	27,71	0,58	0,58		
	E-2-1	110	21,86	0,46	0,46		
	E-2-2	110	24,01	0,50	0,50		

Volumen, das 50 μg Proteinmasse entspricht:

Name	μl	μg
A1	13,00	50
A2	12,93	50
B1	8,53	50
B2	8,60	50
C1	12,42	50
C2	16,88	50
E-1-1	12,89	50
E-1-2	13,12	50
E-2-1	10,35	50
E-2-2	11,37	50
IPS	12,01	50

Pipettierschema für die Gele (auf 50 μl Gesamtvolumen mit Lysispuffer auffüllen):

Name	Tube (Cy3)	Tube (Cy5)	IPS	μl Probe (Cy3)	μl Probe (Cy5)	μl IPS	μl Lysis
Gel 01	Tube 1	Tube 12	Tube 21	13,00	12,93	12,01	12,06
Gel 02	Tube 2	Tube 13	Tube 21	12,93	8,53	12,01	16,53
Gel 03	Tube 3	Tube 14	Tube 21	8,53	8,60	12,01	20,86
Gel 04	Tube 4	Tube 15	Tube 21	8,60	12,42	12,01	16,97
Gel 05	Tube 5	Tube 16	Tube 21	12,42	16,88	12,01	8,70
Gel 06	Tube 6	Tube 17	Tube 21	16,88	12,89	12,01	8,22
Gel 07	Tube 7	Tube 18	Tube 21	12,89	13,12	12,01	11,99
Gel 08	Tube 8	Tube 19	Tube 21	13,12	10,35	12,01	14,52
Gel 09	Tube 9	Tube 20	Tube 21	10,35	11,37	12,01	16,27
Gel 10	Tube 10	Tube 11	Tube 21	11,37	13,00	12,01	13,62
Gel 11	Tube 1	Tube 13	Tube 21	13,00	8,53	12,01	16,46
Gel 12	Tube 2	Tube 14	Tube 21	12,93	8,60	12,01	16,46
Gel 13	Tube 3	Tube 15	Tube 21	8,53	12,42	12,01	17,05
Gel 14	Tube 4	Tube 16	Tube 21	8,60	16,88	12,01	12,51
Gel 15	Tube 5	Tube 17	Tube 21	12,42	12,89	12,01	12,69
Gel 16	Tube 6	Tube 18	Tube 21	16,88	13,12	12,01	7,99
Gel 17	Tube 7	Tube 19	Tube 21	12,89	10,35	12,01	14,75
Gel 18	Tube 8	Tube 20	Tube 21	13,12	11,37	12,01	13,51
Gel 19	Tube 9	Tube 11	Tube 21	10,35	13,00	12,01	14,64
Gel 20	Tube 10	Tube 12	Tube 21	11,37	12,93	12,01	13,69

Name	Cy3	Cy5	Cy2
Gel 1	A-1	B-1	IPS
Gel 2	A-1	B-1	IPS
Gel 3	A-1	B-1	IPS
Gel 4	B-2	C-1	IPS
Gel 5	B-2	C-1	IPS
Gel 6	B-2	C-1	IPS
Gel 7	C-2	D-1	IPS
Gel 8	C-2	D-1	IPS
Gel 9	C-2	D-1	IPS
Gel 10	D-2	E1-1	IPS
Gel 11	D-2	E1-1	IPS
Gel 12	D-2	E1-1	IPS
Gel 13	E1-2	E2-1	IPS
Gel 14	E1-2	E2-1	IPS
Gel 15	E1-2	E2-1	IPS
Gel 16	E2-2	F-1	IPS
Gel 17	E2-2	F-1	IPS
Gel 18	E2-2	F-1	IPS
Gel 19	F-2	G-1	IPS
Gel 20	F-2	G-1	IPS
Gel 21	F-2	G-1	IPS
Gel 22	G-3	H-1	IPS
Gel 23	G-3	H-1	IPS
Gel 24	G-3	H-1	IPS
Gel 25	H-2	A-2	IPS
Gel 26	H-2	A-2	IPS
Gel 27	H-2	A-2	IPS

Reaktionsgefäß	Inhalt	μg	$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$	μl	Label
1	A-1	150	5,14	29,18	Cy3
2	A-2	150	6,58	22,80	Cy5
3	B-1	150	7,42	20,22	Cy5
4	B-2	150	8,21	18,27	Cy3
5	C-1	150	7,17	20,92	Cy5
6	C-2	150	7,53	19,92	Cy3
7	D-1	150	10,32	14,53	Cy5
8	D-2	150	11,70	12,82	Cy3
9	E1-1	150	3,63	41,32	Cy5
10	E1-2	150	2,83	53,00	Cy3
11	E2-1	150	11,57	12,96	Cy5
12	E2-2	150	10,68	14,04	Cy3
13	F-1	150	7,82	19,18	Cy5
14	F-2	150	7,57	19,82	Cy3
15	G-1	150	4,10	36,59	Cy5
16	G-3	150	2,99	50,17	Cy3
17	H-1	150	14,65	10,24	Cy5
18	H-2	150	11,12	13,49	Cy3

19	IPS	1350	6,29	214,74	Cy2
	A-1	75	5,14	14,59	Cy2
	A-2	75	6,58	11,40	Cy2
	B-1	75	7,42	10,11	Cy2
	B-2	75	8,21	9,14	Cy2
	C-1	75	7,17	10,46	Cy2
	C-2	75	7,53	9,96	Cy2
	D-1	75	10,32	7,27	Cy2
	D-2	75	11,70	6,41	Cy2
	E1-1	75	3,63	20,66	Cy2
	E1-2	75	2,83	26,50	Cy2
	E2-1	75	11,57	6,48	Cy2
	E2-2	75	10,68	7,02	Cy2
	F-1	75	7,82	9,59	Cy2
	F-2	75	7,57	9,91	Cy2
	G-1	75	4,10	18,29	Cy2
	G-3	75	2,99	25,08	Cy2
	H-1	75	14,65	5,12	Cy2
	H-2	75	11,12	6,74	Cy2

Zum Ausgleich von Pipettenungenauigkeiten werden 10% größere Volumina angesetzt.

Korrigierte Volumina:

Reaktionsgefäß	Inhalt	µg	c [µg/µl]	µl	Label	µl Label	µl Lysin
1	A-1	165,0	5,14	32,10	Cy3	3,3	3,3
2	A-2	165,0	6,58	25,08	Cy5	3,3	3,3
3	B-1	165,0	7,42	22,24	Cy5	3,3	3,3
4	B-2	165,0	8,21	20,10	Cy3	3,3	3,3
5	C-1	165,0	7,17	23,01	Cy5	3,3	3,3
6	C-2	165,0	7,53	21,91	Cy3	3,3	3,3
7	D-1	165,0	10,32	15,99	Cy5	3,3	3,3
8	D-2	165,0	11,70	14,10	Cy3	3,3	3,3
9	E1-1	165,0	3,63	45,45	Cy5	3,3	3,3
10	E1-2	165,0	2,83	58,30	Cy3	3,3	3,3
11	E2-1	165,0	11,57	14,26	Cy5	3,3	3,3
12	E2-2	165,0	10,68	15,45	Cy3	3,3	3,3
13	F-1	165,0	7,82	21,10	Cy5	3,3	3,3
14	F-2	165,0	7,57	21,80	Cy3	3,3	3,3
15	G-1	165,0	4,10	40,24	Cy5	3,3	3,3
16	G-3	165,0	2,99	55,18	Cy3	3,3	3,3
17	H-1	165,0	14,65	11,26	Cy5	3,3	3,3
18	H-2	165,0	11,12	14,84	Cy3	3,3	3,3
19	IPS	1485,0	6,29	236,21	Cy2	29,7	29,7
	A-1	82,5	5,14	16,05	Cy2	1,65	1,65
	A-2	82,5	6,58	12,54	Cy2	1,65	1,65

B-1	82,5	7,42	11,12	Cy2	1,65	1,65
B-2	82,5	8,21	10,05	Cy2	1,65	1,65
C-1	82,5	7,17	11,51	Cy2	1,65	1,65
C-2	82,5	7,53	10,96	Cy2	1,65	1,65
D-1	82,5	10,32	7,99	Cy2	1,65	1,65
D-2	82,5	11,70	7,05	Cy2	1,65	1,65
E1-1	82,5	3,63	22,73	Cy2	1,65	1,65
E1-2	82,5	2,83	29,15	Cy2	1,65	1,65
E2-1	82,5	11,57	7,13	Cy2	1,65	1,65
E2-2	82,5	10,68	7,72	Cy2	1,65	1,65
F-1	82,5	7,82	10,55	Cy2	1,65	1,65
F-2	82,5	7,57	10,90	Cy2	1,65	1,65
G-1	82,5	4,10	20,12	Cy2	1,65	1,65
G-3	82,5	2,99	27,59	Cy2	1,65	1,65
H-1	82,5	14,65	5,63	Cy2	1,65	1,65
H-2	82,5	11,12	7,42	Cy2	1,65	1,65

Labeling-Reaktion: 30 Minuten im Dunkeln auf Eis

Entsprechend dem Labelvolumen wird eine 10 mM Lysinlösung zum Stoppen der Reaktion hinzugegeben, dementsprechend Änderung des Gesamtvolumens um Labelvolumen + Lysinvolumen

Reaktionsgefäß	Inhalt	μg	$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$	Volumen [μl]
1	A-1	165	5,14	32,10
2	A-2	165	5,21	31,68
3	B-1	165	5,72	28,84
4	B-2	165	6,18	26,70
5	C-1	165	5,57	29,61
6	C-2	165	5,79	28,51
7	D-1	165	7,30	22,59
8	D-2	165	7,97	20,70
9	E1-1	165	3,17	52,05
10	E1-2	165	2,54	64,90
11	E2-1	165	7,91	20,86
12	E2-2	165	7,48	22,05
13	F-1	165	5,96	27,70
14	F-2	165	5,81	28,40
15	G-1	165	3,52	46,84
16	G-3	165	2,67	61,78
17	H-1	165	9,24	17,86
18	H-2	165	7,70	21,44
19	IPS	1485,0	5,02	295,61
	A-1	82,5	4,26	19,35
	A-2	82,5	5,21	15,84
	B-1	82,5	5,72	14,42

D-1	82,5	7,30	11,29
D-2	82,5	7,97	10,35
E1-1	82,5	3,17	26,03
E1-2	82,5	2,54	32,45
E2-1	82,5	7,91	10,43
E2-2	82,5	7,48	11,02
F-1	82,5	5,96	13,85
F-2	82,5	5,81	14,20
G-1	82,5	3,52	23,42
G-3	82,5	2,67	30,89
H-1	82,5	9,24	8,93
H-2	82,5	7,70	10,72

Zugabe von DTT (100 mg / 60 μ l *Aqua bidest.*) und Pharmalyte 3-10 auf jeweils 2% des Gesamtvolumens,
1h im Dunkeln auf Eis inkubieren

Reaktionsgefäß	Inhalt	μ g	Volumen [μ l]	μ l DTT	μ l Pharmalyte	V (neu) [μ l]	c neu [μ g/ μ l]
1	A-1	165	32,10	0,67	0,67	33,44	4,93
2	A-2	165	31,68	0,66	0,66	32,99	5,00
3	B-1	165	28,84	0,60	0,60	30,04	5,49
4	B-2	165	26,70	0,56	0,56	27,81	5,93
5	C-1	165	29,61	0,62	0,62	30,85	5,35
6	C-2	165	28,51	0,59	0,59	29,70	5,56
7	D-1	165	22,59	0,47	0,47	23,53	7,01
8	D-2	165	20,70	0,43	0,43	21,56	7,65
9	E1-1	165	52,05	1,08	1,08	54,22	3,04
10	E1-2	165	64,90	1,35	1,35	67,61	2,44
11	E2-1	165	20,86	0,43	0,43	21,73	7,59
12	E2-2	165	22,05	0,46	0,46	22,97	7,18
13	F-1	165	27,70	0,58	0,58	28,85	5,72
14	F-2	165	28,40	0,59	0,59	29,58	5,58
15	G-1	165	46,84	0,98	0,98	48,79	3,38
16	G-3	165	61,78	1,29	1,29	64,36	2,56
17	H-1	165	17,86	0,37	0,37	18,61	8,87
18	H-2	165	21,44	0,45	0,45	22,33	7,39
19	IPS	1485,0	295,61	6,15	6,15	307,92	4,82
	A-1	82,5	19,35	0,40	0,40		
	A-2	82,5	15,84	0,33	0,33		
	B-1	82,5	14,42	0,30	0,30		
	B-2	82,5	13,35	0,28	0,28		
	C-1	82,5	14,81	0,31	0,31		

E2-2	82,5	11,02	0,23	0,23
F-1	82,5	13,85	0,29	0,29
F-2	82,5	14,20	0,30	0,30
G-1	82,5	23,42	0,49	0,49
G-3	82,5	30,89	0,64	0,64
H-1	82,5	8,93	0,19	0,19
H-2	82,5	10,72	0,22	0,22

Volumen, das 50 µg Proteinmasse entspricht:

Name	µl	µg	Reaktionsgefäß
A-1	10,13	50	1
A-2	10,00	50	2
B-1	9,10	50	3
B-2	8,43	50	4
C-1	9,35	50	5
C-2	9,00	50	6
D-1	7,13	50	7
D-2	6,53	50	8
E1-1	16,43	50	9
E1-2	20,49	50	10
E2-1	6,58	50	11
E2-2	6,96	50	12
F-1	8,74	50	13
F-2	8,96	50	14
G-1	14,79	50	15
G-3	19,50	50	16
H-1	5,64	50	17
H-2	6,77	50	18
IPS	10,37	50	19

Die einzelnen Proben wurden anschließend gemäß dem Versuchsaufbau gemischt und die 2DE gestartet.

4.7.2 2D-Gelelektrophorese der DIGE-Proben

IEF, Äquibrierung und SDS-PAGE wurden im Wesentlichen unter den in Kapitel 2.2 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die hauptsächlichen Unterschiede bestehen in der Verwendung von *low-fluorescent* Glasplatten, da die SDS-Gele in den Glaskassetten gescannt wurden und die Eigenfluoreszenz der normalen Glasplatten Signale überlagern können. Der zweite Unterschied ist der Ausschluss von Licht während der IEF und der zweiten Dimension zur Vermeidung von irreversiblen Reaktionen der CyDyes mit Licht (*photo-bleaching*).

4.8 Computergestützte Auswertung der 2DE-DIGE Gele

Die Auswertung der DIGE-Gele erfolgte auf einem Computersystem bestehend aus einem Core2 Quad-PC, Ettan DIGE-Imager und der Auswertungssoftware Progenesis.

4.8.1 Digitalisierung der Gele

Die Digitalisierung der Gele erfolgte durch den Ettan DIGE-Imager. Der Imager wurde mit der mitgelieferten Kalibrierungsfolie kalibriert. Zum Einscannen der Gekassetten wurden diese abgetrocknet, von Flusen befreit und anschließend durch den Imager digitalisiert. Die Belichtungsintensität wurde so gewählt, dass die stärksten Signale der *gelabelten* Proteine ungefähr 35.000 Einheiten betragen. Die einzelnen Fluoreszenzkanäle wurden von der Imager Steuerungssoftware als *Tagged image*-Datei abgespeichert. Die Parameter des Scan-Vorgangs sind in Tabelle 18 dargestellt.

Belichtungsintensität Cy3-Kanal	0,9
Belichtungsintensität Cy5-Kanal	1,0
Belichtungsintensität Cy2-Kanal	2,0
Auflösung	100 µm
Matrix Typ	Gel
Färbemethode	<i>Pre-labeling</i>

Tabelle 18: Ettan DIGE-Imager Parameter

4.8.2 Auswertung der DIGE-Gele

4.8.2.1 Progenesis

Zur Analyse der DIGE-Gele wurde auch die Auswertungssoftware Progenesis (Nonlinear Dynamics) verwendet. Zunächst wurden alle Tiff-Dateien der eingescannten Gele in das Programm geladen. Als erster Arbeitsschritt stand die Zuteilung der Dateien der einzelnen Cy3, Cy5 und Cy2 Kanäle zu den jeweiligen DIGE-Gelen an. Anschließend wurde ein Cy2-Gel als Standardgel ausgewählt um alle anderen Gele durch *warping* mit diesem deckungsgleich zu machen. Dieser Arbeitsschritt muss mit besonderer Sorgfalt durchgeführt werden, da von der Genauigkeit des Abgleichs der Gele die Qualität der anschließenden statistischen Auswertung abhängt. Die nachfolgende Spotdetektion erfolgte automatisch, es konnten hierbei keine Parameter (wie in anderen Auswertungsprogrammen üblich) ausgewählt werden. Der nächste Arbeitsschritt war die Einteilung der Gele in Gruppen. Es wurden zunächst alle Cy3 und Cy5 Kanäle, die zu einer Zelllinie gehören, in einer Gruppe zusammengefasst. Alle Zelllinien wurden danach einzeln miteinander verglichen, und detektierte Spots mit einer ANOVA $> 0,05$ und einer Power $< 0,80$ wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Der Parameter Power gibt die Teststärke, d.h. die Aussagekraft eines statistischen Tests in der Form $1-\beta$ (β = Wahrscheinlichkeit einen Fehler 2. Art zu begehen = Nullhypothese beibehalten obwohl Alternativhypothese gilt) an. Der Wert β sollte bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ (Wahrscheinlichkeit einen Fehler 1. Art zu begehen = Nullhypothese zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist) das vierfache von α betragen [170], also 0,2. Dementsprechend wurde die untere Grenze für die Power auf 0,8 festgelegt. Als letzter Schritt der Analyse wurde überprüft ob sich die detektierten Proteine der EFT-Zelllinien gegenüber denen der Neuroblastomzelllinien konsistent verhielten, d.h. dass die Standardabweichung der einzelnen Mittelwerte der Zelllinien der jeweiligen Tumorarten sich nicht überlappten. Proteinspots, die nicht in allen EFT-Zelllinien gegenüber den Neuroblastomzelllinien stärkere bzw. schwächere Signalintensitäten aufwiesen, wurden aus dem Endergebnis entfernt.

4.9 Western-Blot Analyse der EFT- und Neuroblastomzelllinien

4.9.1 Western-Blotting

Reagenzlösungen:

- Transferpuffer 10-fach (3% Tris; 14,4% Glycin; 1% SDS)
Für einen Liter Lösung 30 g Tris, 144 g Glycin und 10g SDS in 1 Liter *Aqua bidest.* lösen.
- Transferpuffer 1-fach (0,3% Tris; 1,44% Glycin; 0,1% SDS; 15% Methanol)
Für einen Liter Lösung werden 100 ml Transferpuffer 10-fach mit 750 ml *Aqua bidest.* und 150 ml Methanol gemischt. Die Lösung danach für 30 Minuten unter Rühren durch ein Wasserstrahlpumpenvakuum entgasen. Sofort verwenden.
- Tris gepufferte Salzlösung (TBS) (0,61% Tris; 0,88% Natriumchlorid; pH 7,5)
Für 5 Liter Lösung mischt man 30,30 g Tris und 43,85 g NaCl mit 5 Liter *Aqua bidest.* Anschließend titriert man mit 25 ml HCl (25%-ig) auf pH 7,5.
- NaCl-Lösung (0,9% NaCl)
Für einen Liter Lösung werden 9 g NaCl in einem Liter *Aqua bidest.* gelöst.
- Methanol ($\geq 99,9\%$)

Durchführung:

Zunächst werden die Graphitelektroden der Western-Blot Apparatur für 2-3 Stunden mit *Aqua bidest* vollständig benetzt. Währenddessen werden die PVDF-Membranen (Immobilon P; 0,45 μm Porengröße; Millipore GmbH) auf 16 x 20 cm^2 , sowie die Blotting-Filterpapiere (GE

Healthcare) auf $18 \times 20 \text{ cm}^2$ zugeschnitten. 500 ml Transferpuffer 1-fach werden in eine Glaswanne gegeben und ein Blotting-Filterpapier luftblasenfrei hineingelegt. Danach erfolgt die Vorbereitung der PVDF-Membranen: In eine Glaswanne wird eine dünne Schicht Methanol vorgelegt und die PVDF-Membran darin vollständig benetzt. Das überschüssige Methanol wird abgekippt und die Membran in 500 ml *Aqua bidest* für 3 Minuten auf einem Schüttler gewaschen. Eventuelle Luftblasen müssen durch Wenden der Membran schnellstmöglich entfernt werden, da sonst ein Austrocknen der Membran droht und das Vorbereiten wiederholt werden muss. Danach wird die Membran luftblasenfrei auf das in der Glaswanne mit dem Transferpuffer 1-fach eingelegten Blotting-Filterpapier gelegt. Ein weiteres Blotting-Filterpapier wird luftblasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt so dass es vollständig mit Transferpuffer 1-fach überdeckt ist. Weitere Blotting-Filterpapiere und PVDF-Membranen können in der selben Glaswanne gelagert werden. Nun wird die obere Seite der Glaskassette des 2D-Gels abgenommen und das Gel mit einem Skalpell auf $15 \times 18 \text{ cm}^2$ zugeschnitten. Idealerweise sollte man für die IEF 18 cm IPGs verwenden und die Trenndistanz der SDS-PAGE des 2D-Gels auf 15 cm begrenzen.

Nun wird die Western-Blot Apparatur zusammengesetzt: Die Graphitelektroden werden mit einem fusselfreien Tuch von überschüssigem Wasser befreit und mit Transferpuffer 1-fach befeuchtet. Auf die Anode wird ein vorbereitetes Blotting-Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt. Mit einem Reagenzglas werden sowohl überschüssiger Transferpuffer als auch Luftblasen herausgerollt. Anschließend wird die PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Blotting-Filterpapier aufgelegt und mit Transferpuffer 1-fach benetzt. Auf die PVDF-Membran wird nun das 2D-Gel luftblasenfrei aufgelegt. Das später die hochmolekularen, kathodalen Proteine tragende Ende der Membran wird durch Abschneiden einer kleinen Ecke markiert. Das zweite, vorbereitete Blotting-Filterpapier wird luftblasenfrei auf das 2D-Gel aufgelegt. Zusätzlich wird auf das obere Blotting-Filterpapier etwas Transferpuffer 1-fach gegeben und eventuelle Luftblasen und überschüssiger Transferpuffer mit einem Reagenzglas herausgerollt. Die Kathode wird luftblasenfrei aufgelegt und der Western-Blot gemäß den in Tabelle 19 aufgeführten Parametern durchgeführt.

Spannung	20 V
Stromstärke	0,8 mA/ cm ² Blotting-Filterpapier-Oberfläche
Dauer des Western-Blot	2 Stunden

Tabelle 19: Parameter zur Durchführung des Western-Blots

Nach dem Western-Blot werden die PVDF-Membranen für 2 x 5 Minuten NaCl-Lösung und 1 x 3 Minuten in *Aqua bidest.* gewaschen. Falls eine Detektion von Glykoproteinen am nächsten Tag stattfand wurde wie unter 2.8.1 beschrieben fortgefahren, ansonsten wurde die PVDF-Membran zwischen zwei trockenen Blotting-Filterpapieren über Nacht getrocknet.

4.9.2 Glykoproteindetektion mit dem DIG Glycan Differentiation Kit

Reagenzlösungen:

- Tris gepufferte Salzlösung (TBS) (0,61% Tris; 0,88% Natriumchlorid; pH 7,5)
Für 5 Liter Lösung mischt man 30,30 g Tris und 43,85 g NaCl mit 5 Liter *Aqua bidest.*
Anschließend titriert man mit 25 ml HCl (25%-ig) auf pH 7,5.
- Ponceau S Färbelösung (0,2% Ponceau S; 3% Essigsäure)
Für 500ml Färbelösung 1 g Ponceau S in 485 ml *Aqua bidest* und 14 ml Essigsäure lösen.
- Maleinsäure-Puffer (1,161% cis-Butendisäure; 0,877% NaCl)
Zur Herstellung von 500 ml Lösung werden 5,8 g cis-Butendisäure und 4,38 g NaCl in 500 ml *Aqua bidest.* gelöst. Anschließend wird mit pulverförmiger NaOH der pH-Wert auf 7,5 titriert.

- *Blocking-Reagenz 10-fach* (10% *Blocking-Reagent*; 1,161% cis-Butendisäure; 0,877% NaCl)
Für 500 ml *Blocking-Reagenz* werden 50 g *Blocking Reagent* (Roche Applied Science) mit 500 ml Maleinsäure-Puffer unter rühren und erwärmen gelöst. Die Lösung wird anschließend autoklaviert. Lagerung bei -20 °C.
- *Blocking-Reagenz 1-fach* (1% *Blocking Reagent*; 0,161% cis-Butendisäure; 0,968% NaCl, 0,549% Tris; pH 7,5)
Zur Herstellung von 1 Liter Lösung werden 100 ml *Blocking-Reagenz 10-fach* mit 900 ml TBS gemischt. Sofort verwenden.
- *Puffer 1* (0,02% MgCl₂-Hexahydrat; 0,016% MnCl₂-Dihydrat; 0,015% CaCl₂-Dihydrat, 0,61% Tris; 0,88% NaCl; pH 7,5)
Für einen Liter Lösung werden 0,20 g MgCl₂-Hexahydrat; 0,16 g MnCl₂-Dihydrat und 0,15 g CaCl₂-Dihydrat in einem Liter TBS gelöst.
- *Lektin GNA, Digoxigenin-labeled* (1mg/ ml GNA; 50mM Tris-HCl, 0,05% Natriumazid; pH 7,0)
Mitgelieferte Fertiglösung
- *Lektin SNA, Digoxigenin-labeled* (1mg/ ml SNA; 50mM Tris-HCl, 0,05% Natriumazid; pH 7,0)
Mitgelieferte Fertiglösung
- *Lektin MAA, Digoxigenin-labeled* (1mg/ ml MAA; 50mM Tris-HCl, 0,05% Natriumazid; pH 7,0)
Mitgelieferte Fertiglösung
- *Lektin PNA, Digoxigenin-labeled* (1mg/ ml PNA; 50mM Tris-HCl, 0,05% Natriumazid; pH 7,0)
Mitgelieferte Fertiglösung

- Lektin DSA, Digoxigenin-*labeled* (1mg/ ml DSA; 50mM Tris-HCl, 0,05% Natriumazid; pH 7,0)
Mitgelieferte Fertiglösung
- Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt.
Mitgelieferte Fertiglösung
- NBT/ BCIP
Mitgelieferte Fertiglösung
- Puffer 2 (1,211% Tris; 0,584% NaCl; 1,017% MgCl₂-Hexahydrat; pH 9,5)
Zur Herstellung von 1 Liter Lösung werden 12,11 g Tris; 5,84 g NaCl und 10,17 g MgCl₂-Hexahydrat in einem Liter *Aqua bidest.* gelöst und mit 200 µl HCl (25%-ig) auf pH 9,5 titriert.
- Methanol (≥ 99,5%)

Durchführung:

Falls die PVDF-Membran nach dem Western-Blot getrocknet und über Nacht gelagert wurde wird sie wie unter 2.8 beschrieben mit Methanol befeuchtet und anschließend mit *Aqua bidest* gewaschen. Nach dem Waschschrift mit *Aqua bidest* erfolgt eine Überprüfung des Proteintransfers auf die PVDF-Membran mit Ponceau S. Dazu wird die PVDF-Membran für 5 Minuten in 500 ml Ponceau S-Lösung in einer Glaswanne auf einem Schüttler inkubiert. Danach wird die Membran für 3 x 5 Minuten auf einem Schüttler in einer Glaswanne in *Aqua bidest.* inkubiert um den Membranhintergrund zu entfärben. Bei positivem Ergebnis wird die PVDF-Membran in eine Melamin-Schale, die 200 ml *Blocking*-Reagenz 1-fach enthält, gelegt, abgedeckt und über Nacht auf einem Schüttler inkubiert um die Membran abzusättigen. Zusätzlich wird durch die *Blocking*-Reagenz die PVDF-Membran entfärbt. Am nächsten Tag wird die *Blocking*-Reagenz abgeschüttet und die PVDF-Membran wird 2 x 10 Minuten in TBS und danach 1 x 10 Minuten in Puffer 1 auf einem Schüttler inkubiert. Zur Lektininkubierung wird die PVDF-Membran in 90 ml Puffer 1 plus dem jeweiligem Lektin für 4 Stunden auf

einem Schüttler inkubiert (Tabelle 20 zeigt die jeweiligen Volumina). Anschließend erfolgen drei Waschriffe mit TBS von jeweils 10 Minuten. Nun folgt die Inkubierung der PVDF-Membran mit den Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten (ADFF). Dazu wird die PVDF-Membran in 90 ml TBS und 20 μ l ADFF für 4 Stunden abgedeckt auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgen drei Waschriffe mit TBS von jeweils 10 Minuten. Nach den Waschriffen wird die Anfärbung der Lektine durchgeführt. Die PVDF-Membran wird für 20 Minuten ohne schütteln in 90 ml Puffer 2 und 400 μ l NBT/ BCIP inkubiert. Die Färbereaktion wird durch Waschen der PVDF-Membran für 3 x 1 Minute in *Aqua bidest* gestoppt. Anschließend werden die PVDF-Membranen zwischen zwei Blotting-Filterpapieren über Nacht getrocknet und am nächsten Tag eingescannt. Die einzelnen Schritte der Glykoproteindetektion mithilfe des DIG Glycan *Differentiation Kits* sind nochmals kurz in Tabelle 21 dargestellt.

Lektin	Volumen
GNA	20 μ l
SNA	20 μ l
DSA	20 μ l
MAA	100 μ l
PNA	200 μ l

Tabelle 20: Zugabevolumen der jeweiligen Lektine

Reagenz	Dauer
TBS	2 x 10 Minuten
Puffer 1	1 x 10 Minuten
Lektininkubation	4 h
TBS	3 x 10 Minuten
ADFF-Inkubation	4 h
TBS	3 x 10 Minuten
Färbung	20 Minuten
Stoppen	3 x 1 Minute

Tabelle 21: Protokoll zur Durchführung der Glykoproteindetektion mit dem DIG Glycan *Differentiation Kit*

4.9.3 Digitalisierung und Auswertung der Western-Blots

Die Western-Blots wurden mithilfe eines Epson Expression 1680 Pro Scanners als *tagged image file* eingescannt. Die Auflösung betrug 200 dpi bei einer Farbtiefe von 16-bit Graustufen. Anschließend wurden die Dateien in das Programm Progenesis geladen um die einzelnen Western-Blots einer Lektinart mittels *warping* deckungsgleich zu machen. Die *gewarpten* Bilddateien werden standardmäßig von Progenesis in einem separaten Ordner gespeichert aus dem sie in das Programm Photofiltre geladen wurden um die einzelnen deckungsgleichen Westernblots einer Lektin- und Tumorart zu einem *Master-Blot* verschmolzen wurden. Diese Master-Blots einer Lektin- und Tumorart wurden miteinander verglichen um differentielle Glykosylierungen zwischen den beiden Tumorraten zu detektieren. Da bei der Anfertigung der Western-Blots kein interner Standard zugegeben wurde, erfolgte keine Quantifizierung der unterschiedlichen Farbintensität um Proteine mit differentiellen Glykosylierungen zu detektieren, sondern es wurden nur vorhandene oder nicht vorhandene Farbreaktionen gewertet.

4.9.4 Positionsbestimmung der Glykoproteine auf 2D-Gelen

Das Muster der angefärbten Glykoproteine auf den PVDF-Membranen unterscheidet sich erheblich vom Muster der auf einem 2D-Gel unspezifisch angefärbten Proteine, da sich die Zahl der sichtbaren Proteine stark von einander unterscheidet. Durch die Verwendung von Lektinen, die nur auf bestimmte Glykosylierungsarten ansprechen, verringert sich die Zahl der angefärbten Glykoproteine nochmals. Dies macht eine korrekte Positionsbestimmung dieser Glykoproteine auf den 2D-Gelen, zur späteren Probenahme und Identifikation mittels MALDI-MS, schwierig.

Um diese Positionsbestimmung zu vereinfachen wird ein weiterer Western-Blot angefertigt, bei dem die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2 *gelabelt* werden (siehe 2.5.1). Nach der Durchführung des Western-Blots und der Durchführung der Glykoproteindetektion (siehe 2.8 und 2.8.1, allerdings unter Ausschluss von Licht) wird die PVDF-Membran mit dem Ettan-DIGE Imager eingescannt

(Parameter siehe Tabelle 22). Die angefärbten Glykoproteine werden weiß, die Cy2 gelabelten Proteine schwarz dargestellt. Somit lässt sich die Position der Glykoproteine auf einem 2D-Gel genau bestimmen.

Parameter	Wert
Belichtungsintensität Cy2-Kanal	1,5
Matrix Typ	Membran
Auflösung	100 µm
Färbemethode	<i>Pre-labeling</i>

Tabelle 22: Parameter des Ettan-DIGE Imagers zur Detektion von Cy2-gelabelten Proteinen auf PVDF-Membranen

4.10 Proteinidentifizierung durch MALDI-MS

4.10.1 Probenvorbereitung

Reagenzlösungen:

- Entfärbelösung (50% Acetonitril; 25mM NH_4HCO_3)
Für 100 ml Entfärbelösung werden 50 ml Acetonitril mit 50 ml *Aqua bidest.* und 0,2 g NH_4HCO_3 gemischt.
- Trypsinlösung (12,5ng /µl Trypsin; 1mM HCl; 23,3 mM NH_4HCO_3 ; pH 8,1)
20µg Trypsin werden mit 1500 µl 25mM NH_4HCO_3 -Lösung gemischt und mit 100 µl 1mM HCl auf pH 8,1 titriert.
- Elutionslösung (50% Acetonitril; 0,5% Trifluoressigsäure)
Für 100ml Elutionslösung werden 50 ml Acetonitril mit 49,5 ml *Aqua bidest* und 0,5 ml Trifluoressigsäure gemischt. Maximal 2 Wochen verwenden.
- MALDI-Matrix (2,5mg/ml CHCA; 2,5 mg/ml DHB; 1% Trifluoressigsäure; 10 mM

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_3$) [171]

Zur Herstellung von 1 ml Matrix werden 9,2 mg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_3$ in 2 ml H_2O gelöst. Mit 500 μl dieser Lösung werden 2,5 mg CHCA, 2,5 mg DHB, 10 μl Trifluoressigsäure und 490 μl *Aqua bidest.* gemischt. Die Matrix ist vor Licht zu schützen und maximal eine Woche haltbar.

- Waschlösung (2mg/ml Diammoniumcitrat) [171]

Für 1 ml Waschlösung werden 2 mg Diammoniumcitrat mit 1 ml *Aqua bidest.* gemischt.

Durchführung:

Nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Blau wurden die zu identifizierenden Proteinspots von Hand gepickt. Dazu wurden Pipettenspitzen mit einem Skalpell auf den jeweilige Spotdurchmesser zugeschnitten und der Spot ausgestanzt. Anschließend wurde das Gelstück in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die aus den 2D-Gelen ausgestanzten Gelstücke wurden zunächst mit jeweils 100 μl Entfärbelösung dreimal für 20 Minuten bei 37°C und 300 rpm im Thermomixer (Eppendorf) gewaschen. Nach dem Entfernen der letzten Entfärbelösung wurden die Proben 30 Minuten lang in der SpeedVac vollständig getrocknet. Danach wurden die Proben mit 10 μl Trypsinlösung versetzt und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die Elution der restlichen Peptide aus dem Gelstück erfolgte mittels 30 μl Elutionslösung. Diese Lösung wurde in das Gefäß mit dem Gelstück gegeben und 20 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Dieser Überstand wurde mit dem Überstand des tryptischen Verdau vereint und 90 Minuten in der SpeedVac vollständig getrocknet. Nicht zur sofortigen Messung benötigte Proben wurden bei -20°C eingefroren. Vor der Messung wurde die Probe in 5 μl Elutionslösung aufgenommen und 5 Minuten im Ultraschallbad gelöst. Zur Kristallisation der Matrix wurde die *Dried Droplet* Methode verwendet. Es wurden 1 μl der Probe mit 1 μl der Matrix gemischt, von dieser Mischung 1 μl auf den MALDI-Proben-träger pipettiert und unter dem Abzug getrocknet. Anschließend

wurden die auskristallisierte Matrix-Peptidmischung für 5 Sekunden mit 1,5 µl Waschpuffer gewaschen und danach die Flüssigkeit wieder abgezogen.

4.10.2 MALDI-MS Parameter

Die externe Kalibrierung des Ettan MALDI-ToF-Pro Massenspektrometers erfolgte durch ein Gemisch aus Bradykinin Fragment 1-7, Angiotensin II (human), P₁₄R und ATCH Fragment 18-39 (human) und wurde alle zwei Wochen durchgeführt. Die interne Kalibrierung der Proben erfolgte durch die Eigenverdauprodukte von Trypsin: Trypsin II und Trypsin IV. Die weiteren Einstellungen sind in Tabelle 23 wiedergegeben.

Modus	Reflektor	
<i>Low-mass rejection</i>	500 m/z	
Beschleunigungsspannung	20.000 V	
<i>Pulsed extraction</i> / Fokussierungsmasse	Ein / 2000 m/z	
<i>Target region</i> / <i>auto-adjust</i>	30% / Ein	
Aufsummierte Spektren	300	
Selektive Aufsummierung	Parameter	
	Minimal	Maximal
m/z	800	4000
Signalintensität	8 Einheiten	100 Einheiten

Tabelle 23: Parameter für das Ettan MALDI-ToF Pro

4.10.3 Proteinidentifizierung

Die Proteinidentifizierung fand durch Vergleich mit der IPI Human-Datenbank Version 3.46 statt. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn die *expectation* (d.h. Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses) $\leq 0,01$ war bzw. der Score-C.I. % (Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins) $\geq 99\%$ war.

4.11 Trägerampholyt-Vorfraktionierung von Proteinen in Sephadex-IEF Gelen

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Weiterentwicklung dieser Methode um diese auch für Proteine mit einem $pI > 7$ verfügbar zu machen. Die genaue Vorgehensweise wird in Kapitel 5.10 beschrieben.

4.12 Optimierung der IEF mit IPG für integrale Membranproteine

Das Kapitel 5.11 beschäftigt sich mit der Optimierung der 2D-elektrophoretischen Trennung von integralen Membranproteinen. Die genaue Vorgehensweise ist dort beschrieben.

5 Ergebnisse

5.1 Erfassung des Gesamtproteoms von EFT- und Neuroblastomzelllinien

Die Zelllinien wurden vom Lehrstuhl für funktionelle Genomik und Transplantationsbiologie der Technischen Universität München (Prof. Burdach) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinien wurden deshalb für diese Dissertation ausgewählt, da sie auch am Lehrstuhl von Prof. Burdach für die mRNA-Analyse verwendet werden. Dadurch sind die in dieser Dissertation gewonnenen Daten der 2DE direkt mit den Daten der mRNA-Analyse vergleichbar, bzw. ergänzen sich gegenseitig. Die wichtigsten Merkmale der verwendeten Zelllinien sind nochmals kurz in Tabelle 24 und Tabelle 25 dargestellt.

Zelllinie	Alter	m/w	Lokalisation	P/M	Translokation	Hybridprotein, Typ
A673	15	w	Muskel	P	der(13)t(11;13)(q13q14)t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1, Typ 1
SBSR-AKS	17	w	Leiste	M	-	EWS-FLI1, Typ 1
SK-ES1	18	m	Knochen	P	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1, Typ 2
SK-N-MC	15	w	Brustwand	M	t(2;11;22;21)(q32;q24;q12;q11)	EWS-FLI1, Typ 1
MHH-ES1	12	m	Bauchfell	M	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1, Typ 2
TC-71	22	m	-	M	t(11;22)(q24;q12)x2	EWS-FLI1, Typ 1

Tabelle 24: Kurzübersicht der verwendeten EFT-Zelllinien, die Spalte m/w bezeichnet das Geschlecht, die Spalte P/M bezeichnet ob die Zelllinie aus einem Primärtumor oder einer Metastase gewonnen wurde. Die Spalte bezeichnet die Translokation die zur Expression von EWS/FLI-1 führt.

Name der Zelllinie	m/w	Alter	Lokalisation	P/M	MYCN-Amp
SiMa	m	1,7	Niere	M	5-10-fach
SH-SY5Y	w	4	Knochenmark	M	3-fach
MHH-NB-11	m	4	Niere	M	20-fach

Tabelle 25: Kurzübersicht der verwendeten Neuroblastomzelllinien, die Spalte m/w bezeichnet das Geschlecht des Patienten, die Spalte Alter gibt das Patientenalter in Jahren an, die Spalte P/M ob die Zelllinie aus einem Primärtumor oder einer Metastase gewonnen wurde. Die Spalte MYCN-Amp gibt die Amplifizierung von MYCN an.

5.1.1 Erfassung des Proteoms mit IPG 3-12

Um das Auflösungsvermögen dieses „Übersichtsgradienten“ zu testen wurde ein 2D-Gel mit einer Gesamtproteinbeladungsmenge von 500µg hergestellt. Die Probe setzte sich aus jeweils 55,6 µg Proteinmenge aus den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zusammen (siehe Tabelle 24 und 25). Dies sollte eine möglichst hohe Anzahl an Proteinspots gewährleisten, da alle in dieser Dissertation verwendeten Zelllinien zu gleichen Teilen in der Probe vorkamen. Die IEF wurde wie in Kapitel 4.4 angegeben durchgeführt. Die zweite Dimension erfolgte in einem SDS-Gel mit T=12%. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt (Abbildung 14), ausgestanzt und für die Massenspektrometrie vorbereitet (siehe 4.10). Die Identifikation erfolgte durch MALDI-MS mit *Peptide Mass Fingerprinting*.

Es wurden insgesamt 878 Proteine detektiert und für die MALDI-MS Analyse ausgestanzt. Davon konnten 465 Proteine identifiziert werden. Die Proteine wurden mithilfe der Datenbank Proteinatlas [172] in Klassen eingeteilt. Proteine, die in mehreren Klassen vertreten sind, wurden in allen jeweiligen Klassen gelistet. Es wurde auch der experimentell ermittelte pI und Molekulargewicht der Proteine mit angegeben, so dass Isoformen der Proteine unterschieden und näher charakterisiert werden können. Durch diese Kartierung ist es zudem möglich, die in der Literatur als differentiell reguliert angesehenen Proteine auf dem DIGE-Gelen Mastergel zuzuordnen und die Resultate zu vergleichen. Die Liste der identifizierten Proteine ist in Anhang I aufgeführt. Aus dieser Liste ist ersichtlich, dass die meisten identifizierten Proteine der Klasse der Enzyme zuzuordnen sind, eine weitere große Anzahl an identifizierten Proteinen umfassende Gruppe ist die der potentiellen Krebsmarker. Allerdings ließen sich auch mithilfe der Proteinatlas-Datenbank nicht alle Proteine in Klassen einteilen, so dass eine große Zahl Protein nicht eingeteilt werden konnte, diese sind am Ende der Tabelle gelistet.

Die Trennung der Proteine der EFT- und Neuroblastozelllinien mit IPG 3-12 zeigt eine im basischen Bereich gute Auflösung, allerdings leidet die Auflösung im pH-Bereich 4-7 aufgrund der in diesem Bereich zahlreich vorkommenden und vieler stark exprimierter Proteine. Die Verteilung des Proteinmusters aufgrund der Acrylamidkonzentration (T-Wert) von 12% auf dem 2D-Gel ist auch äußerst zufriedenstellend, da die Proteine mit geringem

Molekulargewicht sehr gut getrennt sind, die Proteine mit mittlerem und großem Molekulargewicht fast ebenso.

Um die geringere Auflösung im sauren Bereich zu verbessern, und damit die Datenbasis in den anstehenden Experimenten, wurde zusätzlich ein IPG 4-7 eingesetzt, der diesen Bereich besser auflöst.

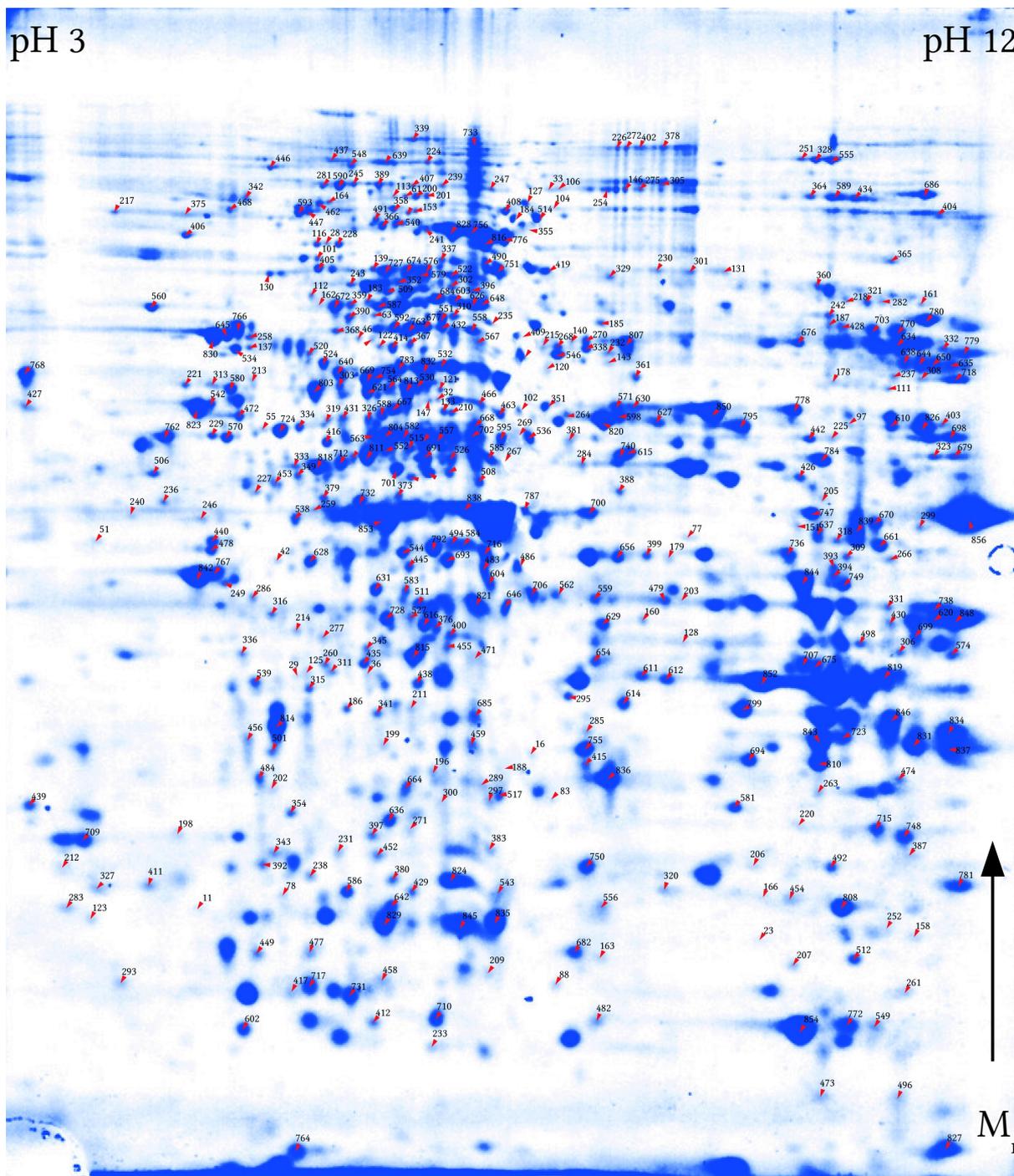


Abbildung 14: Mastergel IPG 3-12. Durch Massenspektrometrie identifizierte, mit IPG 3-12 getrennte Proteine sind durch Zahlen gekennzeichnet und in Anhang I gelistet. Die Proteinbeladungsmenge von 500 μ g setzt sich gleichmäßig aus allen in Tabelle 24 und 25 aufgelisteten Zelllinien zusammen, Coomassie Brilliant Blau Färbung.

5.1.2 Kartierung der Proteine mit IPG 4-7

Die Vorgehensweise der Identifizierung der Proteine ist die selbe wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass statt eines IPG 3-12 ein IPG 4-7 verwendet wurde um diesen pH-Bereich besser aufzulösen. (Abbildung 15). Es wurden 574 Proteine detektiert (zum Vergleich: IPG 3-12: 878 detektierte Proteine) und für die MALDI-MS Analyse ausgestanzt, davon 237 Proteine identifiziert. Von diesen 237 identifizierten Proteinen sind 118 nicht mit IPG 3-12 identifiziert worden. Dies zeigt auch den Nutzen zusätzlich einen engeren pH-Gradienten zu wählen, da durch die verbesserte Auflösung die Anzahl der neu identifizierten Proteine, gemessen an der Zahl aller identifizierten Proteine in diesem pH-Bereich, ungefähr die Hälfte beträgt. Das 2D-Gel mit IPG 4-7 zeigt eine deutlich verbesserte Auflösung der Proteine, die mit IPG 3-12 noch stark gedrängt waren. Auch hier zeigt sich, dass der verwendete T-Wert der SDS-Gele von 12% optimal für die Verwendung mit menschlichen Zelllinien ist, da auch hier die fast die komplette Höhe des 2D-Gels von Proteinen belegt ist. Somit ist für die Proteine im pH Bereich 4-7 eine optimale Auflösung in der ersten und zweiten Dimension erreicht worden. Die Auflösung könnte durch die Verwendung von engen, überlappenden pH-Gradienten noch weiter gesteigert werden [130], allerdings würde dies den Arbeitsaufwand beträchtlich steigern. Als Kompromiss zwischen Auflösung und bewältigbarem Arbeitsaufwand wurde deshalb die anstehende differentielle Proteomanalyse der EFT- und Neuroblastomzelllinien mit einer Kombination von IPG 3-12 und IPG 4-7 durchgeführt.

Die identifizierten Proteine wurden wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben in Klassen eingeteilt, wobei auch hier wie bei IPG 3-12 die größte Klasse die der Enzyme ist. Die Liste der identifizierten Proteine ist in Anhang II ersichtlich, Proteine die ausschließlich mit IPG 4-7 (nicht mit IPG 3-12) identifiziert wurden, sind in Anhang II fett gekennzeichnet.

5.2 Differentielle Proteomanalyse der EFT- und Neuroblastomzelllinien

Nach Optimierung der 2D-Elektrophorese für die Auftrennung von EFT- und Neuroblastomzelllinien und der Kartierung der mit Massenspektrometrie identifizierten Proteine, musste eine geeignete Methode für die differentielle Proteomanalyse von EFT- und Neuroblastomzelllinien gefunden werden. In die nähere Auswahl kam die Anfärbung der Proteine mit Silber nach Blum und die *Difference Gel Electrophoresis* (DIGE).

Zur Entscheidungsfindung, welche der beiden Methoden besser geeignet ist, wurden zwei mal drei Silbergele und drei DIGE-Gel angefertigt. Zum Vergleich wurden die Zelllinien SH-SY5Y (E1) und SK-N-MC (E2) herangezogen. Die Silbergele wurden mit IPG 4-9 und T=12% SDS-Gelen erstellt (Parameter siehe Kapitel 4.4). Jedes mit Silber angefärbte 2D-Gel hat eine Proteinbeladungsmenge von 150 µg der jeweiligen Zelllinie. Für ein DIGE-Gel wurden 50µg Proteinmenge der Zelllinie SH-SY5Y (E1) mit Cy3, 50µg Proteinmenge der Zelllinie SK-N-MC (E2) mit Cy5 gelabelt. Zusätzlich wurde zur besseren Quantifizierbarkeit der Fluoreszenzsignale der gelabelten Protein ein *Internal Pooled Standard* (IPS), der aus gleichen Proteinmengen (je 25µg) der Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-MC bestand, mit Cy2 gelabelt. Anschließend wurden die gelabelten Proben und der IPS vereint und auf mit IPG 4-9 und T=12% SDS-Gelen unter Lichtausschluss getrennt, und mit dem Ettan-DIGE-Imager eingescannt.

Wie auf Abbildung 16 ersichtlich, ist die Silberfärbung eine sehr sensitive Anfärbemethode, die bei den zwei repräsentativen Gelen, die für diese Abbildung ausgewählt wurden, auch die Regulierung der jeweiligen Proteinspots gut darstellen kann. Der Vergleich mit dem DIGE-Gel zeigt, dass die differentiell regulierten Proteine zwischen der Silberfärbung und DIGE-Gelen weitestgehend übereinstimmen.

Das DIGE-Gel zeigt eine ähnlich hohe Sensitivität wie die Silberfärbung, hat allerdings den Vorteil, dass durch den internen Standard eine Quantifizierung der Proteinspots verlässlicher ist als bei einer Silberfärbung [141], außerdem ist durch den Auftrag von 2 Proben pro Gel die Gel-zu-Gel Variabilität verringert, was einen verlässlicheren Vergleich der Proben ermöglicht.

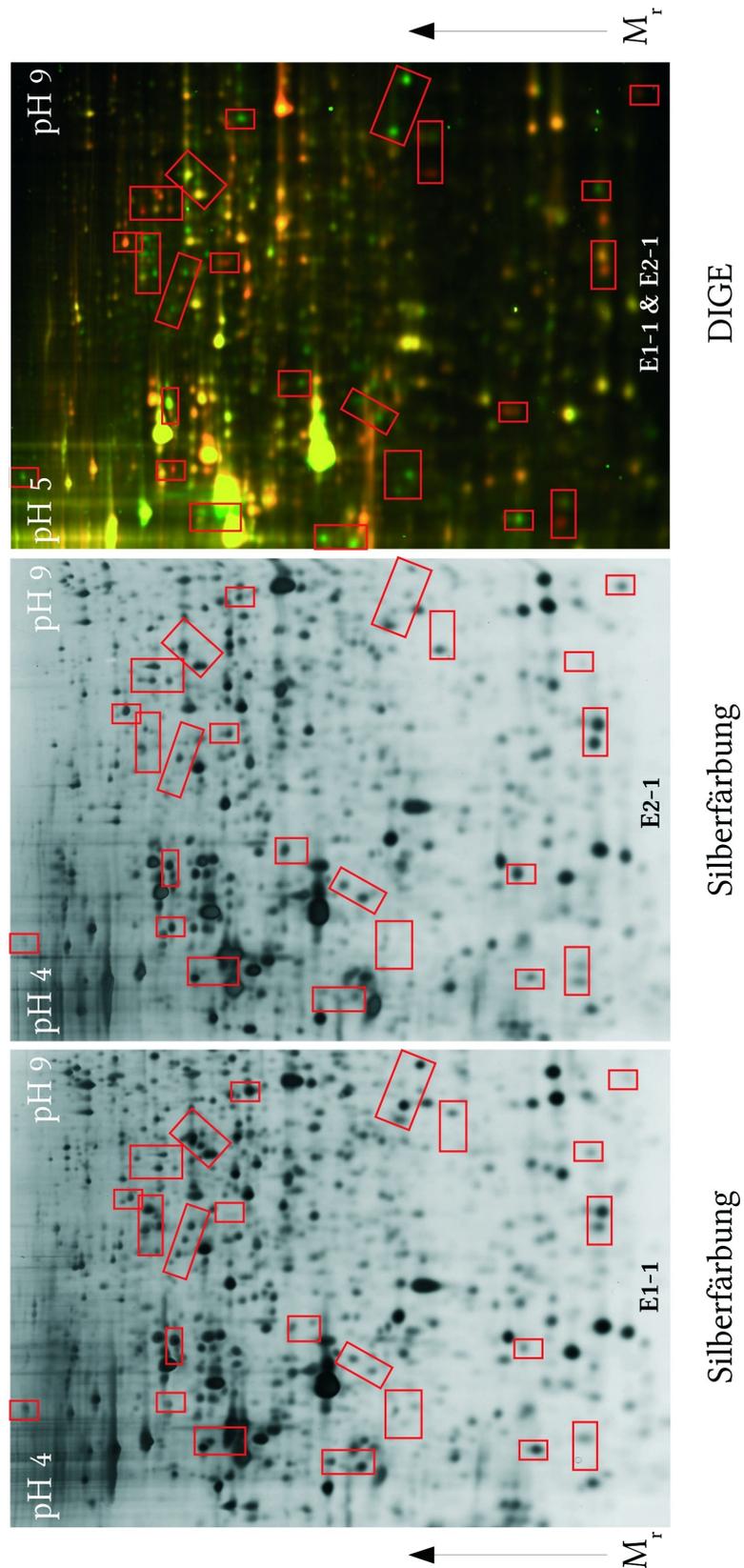


Abbildung 16: Vergleich der mit Silber gefärbten Proteine der Zelllinie E1-1 (Neuroblastom) (A) und Zelllinie E2-1 (EFT) (B). DIGE-Gel (Image-Overlay) der mit Cy3 (E1-1) und Cy5 (E2-1) gelabelten Proteine beider Zelllinien (C). Rote Kästchen kennzeichnen differenziell exprimierte Proteine. IPG 4-9, T=12% SDS-Gele.

5.3 Proteinfärbetechniken zur Visualisierung von posttranslationalen Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen (PTM) von Proteinen spielen bei der Entstehung von Krankheiten, insbesondere Tumoren eine große Rolle [7], [8], [9], [10], [11]. Die 2DE bietet die Möglichkeit aposttranlationale Modifikationen aufzuzeigen. Dadurch ist ein schneller Vergleich der Unterschiede in den PTMs der Proteine, inklusive deren Isoformen, möglich. Diese Färbetechniken stellen somit eine Ergänzung zur DIGE-Technologie dar, da somit nicht nur die differentielle Regulierung von Proteinen durch DIGE erfasst wird, sondern auch eventuell nicht differentiell regulierte Proteine, die allerdings sich zwischen Tumorarten in ihren PTMs unterscheiden.

Auf Abbildung 17 sind eine spezifische Glykoproteinanfärbung (ProQ-Emerald), eine spezifische Phosphoproteinanfärbung (ProQ-Diamond) und eine universelle Fluoreszenz-Proteinfärbung mit SyproRuby gegenübergestellt. Die SyproRuby-Färbung ist eine unspezifische Proteinfärbemethode, die nach der Färbung mit dern für eine PTM spezifische Färbung durchgeführt wird, um die Proteine, die eine PTM tragen auf den DIGE-Gelen lokalisierbar zu machen.

Um die Spezifität der jeweiligen Färbetechnik zu überprüfen wurden von den Zelllinien A673 (EFT), SH-SY5Y (NB) und SK-N-MC (EFT) jeweils ein Gel für die Anfärbung mit ProQ-Emerald und ProQ-Diamond angefertigt. Dazu wurden von jeder Zelllinie je 200µg Proteinmenge mit IPG 4-9 und T=12% SDS-Gelen getrennt (Parameter siehe Kapitel 4.4). Anschließend wurden die Proteine mit ProQ-Emerald oder ProQ-Diamond angefärbt. Anschließend wurden die Gele mit dem Scanner Typhoon 9600 eingescannt.

Wie auf Abbildung 17 ersichtlich unterscheiden sich die Proteinanfärbemuster zwischen den verschiedenen Techniken, mit wenigen Überlappungen, stark. Es lässt sich auch erkennen, das die Proteinmuster der ProQ-Emerald und ProQ-Diamond Gele eine Subpopulation des mit SyproRuby erhaltenen Proteinmusters sind. Durch die wenigen Übereinstimmungen der Proteinmuster zwischen ProQ-Emerald und ProQ-Diamond lässt sich auf eine hohe Spezifität

der Färbetechniken schließen. Der Nachweis von Glykoproteinen wurde in Kapitel 5.8 mit 2D-Western blotting mit anschließendem Lectin-Assay durchgeführt, da durch den verwendeten Lectin-Assay auch verschiedene Glykosylierungsarten unterschieden werden können. Der Nachweis differentieller Phosphorylierungen ist auch durch die DIGE-Technologie möglich, da eine differentielle Phosphorylierung auch eine Veränderung des pI des Proteins bewirkt.

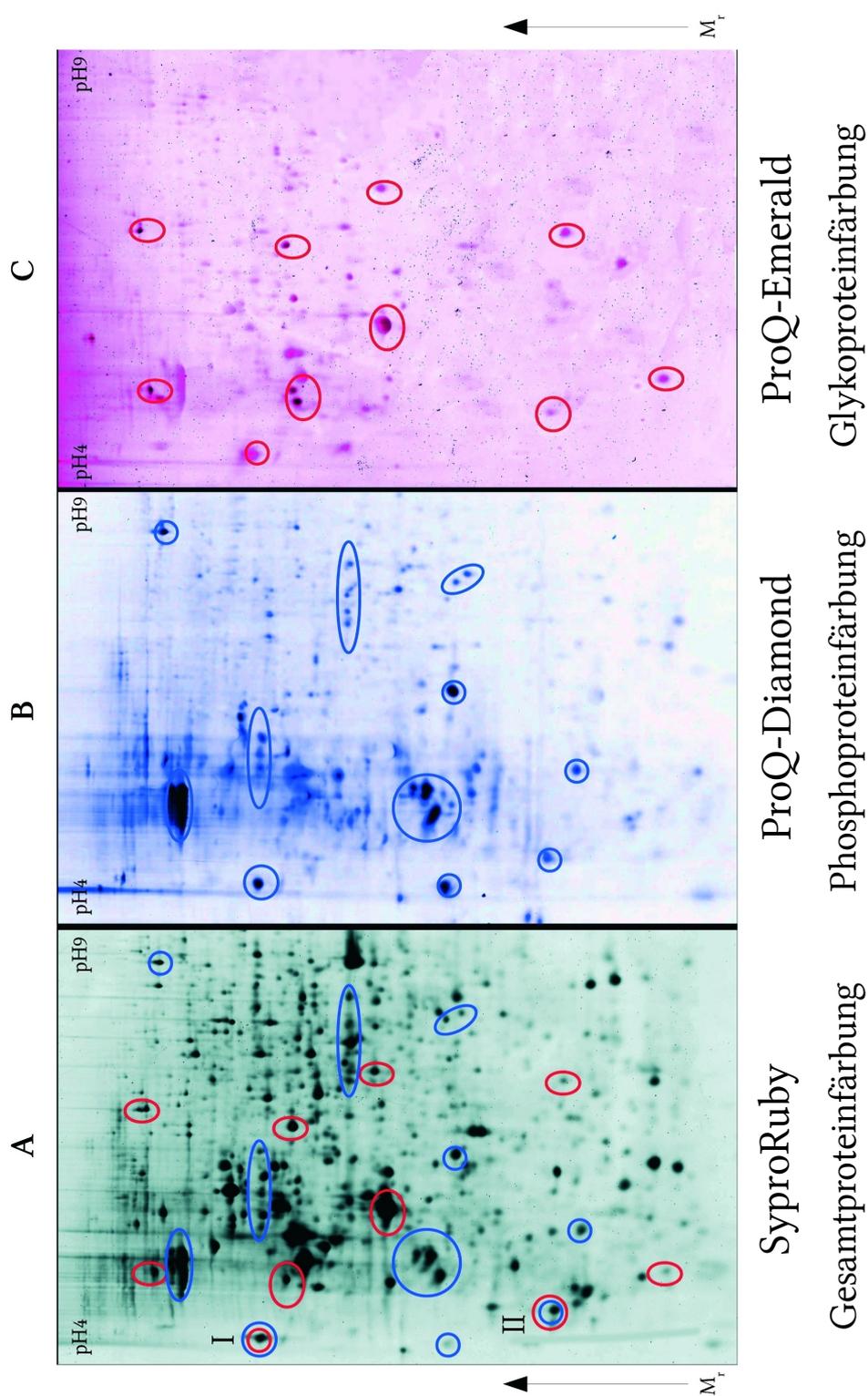


Abbildung 17: Vergleich von ProQ-Diamond (Phosphoproteinfärbung) (B) und ProQ-Emerald (Glykoproteinfärbung) (C) und der Gesamtproteinfärbung SyproRuby (A). Blaue (ProQ-Diamond) und rote Kreise (ProQ-Emerald) auf dem SyproRuby-Gel kennzeichnen die auf den jeweiligen Gelen detektierten PTM. I+II kennzeichnen die gemeinsam auf B+C gefundenen PTM.

5.4 DIGE von 3 EFT- und 2 Neuroblastomzelllinien

Nach den zuvor aufgeführten Vorversuchen zum differentiellen Vergleich von EFT- und Neuroblastomzelllinien, wurde wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und der Möglichkeit der Quantifizierung der unterschiedlich regulierten Proteine, die DIGE-Technologie ausgewählt und verwendet. Insgesamt wurden drei EFT- und zwei Neuroblastomzelllinien miteinander verglichen, wobei von jeder Zelllinie zwei biologische Replikate und davon wiederum jeweils drei technische Replikate zur statistischen Absicherung der Ergebnisse, durchgeführt wurden. Ein Überblick über das DIGE-Experiment, in dem alle angefertigten Gele aufgelistet sind, ist in Tabelle 27 aufgeführt. Anschließend wurden die Gele mithilfe des Ettan-DIGE Imagers eingescannt und die Bilddateien (siehe Abbildungen 18-21) in die Software „Progenesis“ geladen.

Zelllinie	Kürzel	Tumorart
A673	A	EFT
SBSR-AKS	B	EFT
SiMa	C	NB
SH-SY5Y	E1	NB
SK-N-MC	E2	EFT

Tabelle 26: Die in diesem Vorversuch verwendeten Zelllinien und ihre jeweiligen Kürzel.

Gel Nummer	Cy3 gelabelte Probe	Cy5 gelabelte Probe	Cy2 gelabelte Probe
1	A-1 (EFT)	A-2 (EFT)	IPS
2	A-2 (EFT)	B-1 (EFT)	IPS
3	B-1 (EFT)	B-2 (EFT)	IPS
4	B-2 (EFT)	C-1 (NB)	IPS
5	C-1 (NB)	C-2 (NB)	IPS
6	C-2 (NB)	E1-1 (NB)	IPS
7	E1-1 (NB)	E1-2 (NB)	IPS
8	E1-2 (NB)	E2-1 (EFT)	IPS
9	E2-1 (EFT)	E2-2 (EFT)	IPS
10	E2-2 (EFT)	A-1 (EFT)	IPS
11	A-1(EFT)	B-1 (EFT)	IPS
12	A-2 (EFT)	B-2 (EFT)	IPS
13	B-1 (EFT)	C-1 (NB)	IPS
14	B-2 (EFT)	C-2 (NB)	IPS
15	C-1 (NB)	E1-1 (NB)	IPS
16	C-2 (NB)	E1-2 (NB)	IPS
17	E1-1 (NB)	E2-1 (EFT)	IPS
18	E1-2 (NB)	E2-2 (EFT)	IPS
19	E2-1 (EFT)	A-1 (EFT)	IPS
20	E2-2 (EFT)	A-2 (EFT)	IPS

Tabelle 27: Probenauftragsschema der einzelnen 2D-DIGE Gele. Die Kürzel A,B,C,E1,E2 stehen für die jeweilige Zelllinie, (siehe Tabelle 26), die Ziffern für das verwendete biologische Replikat. IPS = Internal pooled standard aller Zelllinien.

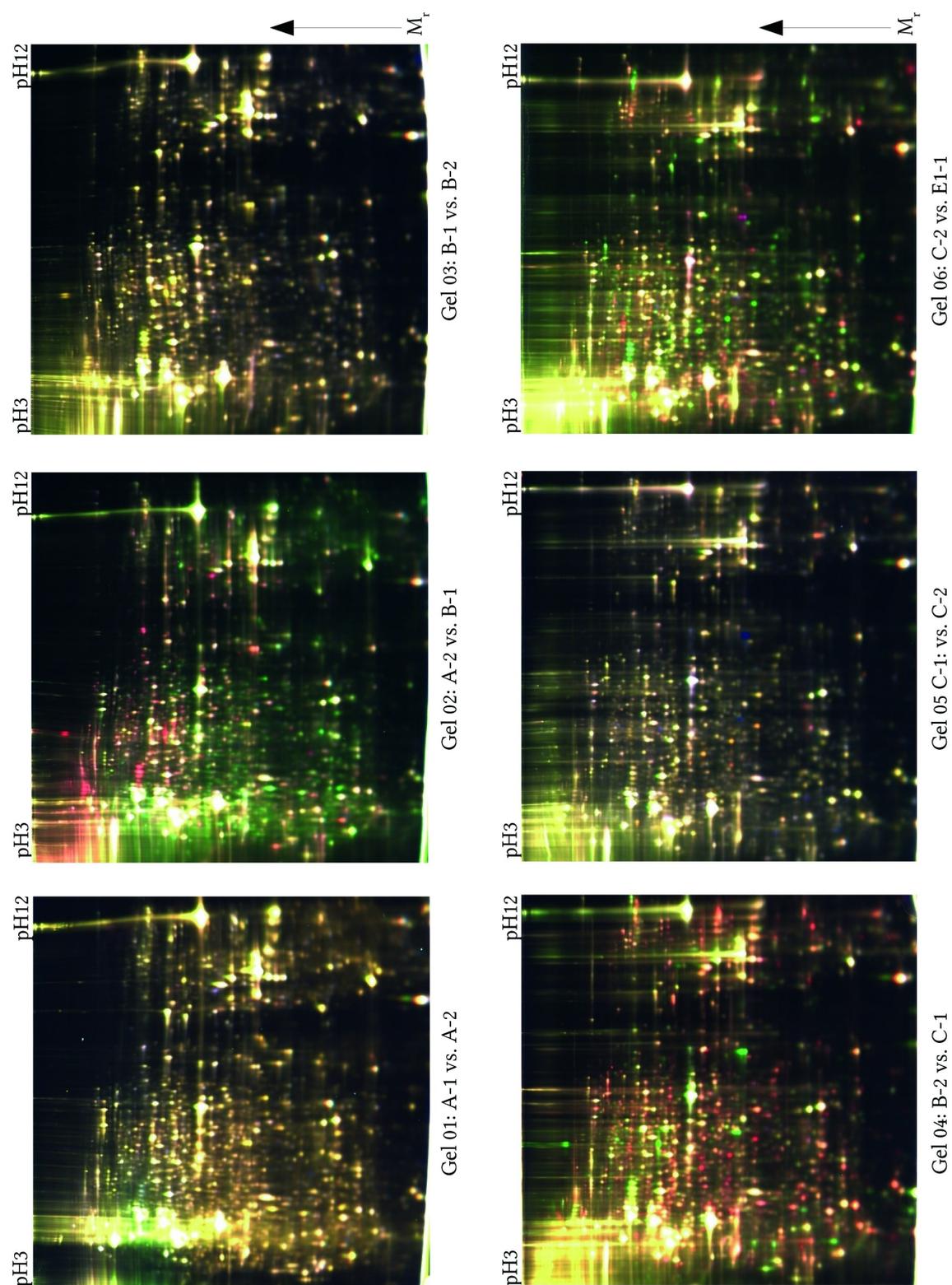


Abbildung 18: DIGE-Gele IPG 3-12 (Image-overlay) der jeweiligen gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards (IPS). Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte mit Cy5 (roter Kanal), IPS mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteinspots sind gelb dargestellt.

Gel01: A-1 (EFT) vs. A-2 (EFT)

Gel02: A-2 (EFT) vs. B-1 (EFT)

Gel03: B-1 (EFT) vs. B-2 (EFT)

Gel04: B-2 (EFT) vs. C-1 (NB)

Gel05: C-1 (NB) vs. C-2 (NB)

Gel06: C-2 (NB) vs. E1-1 (NB)

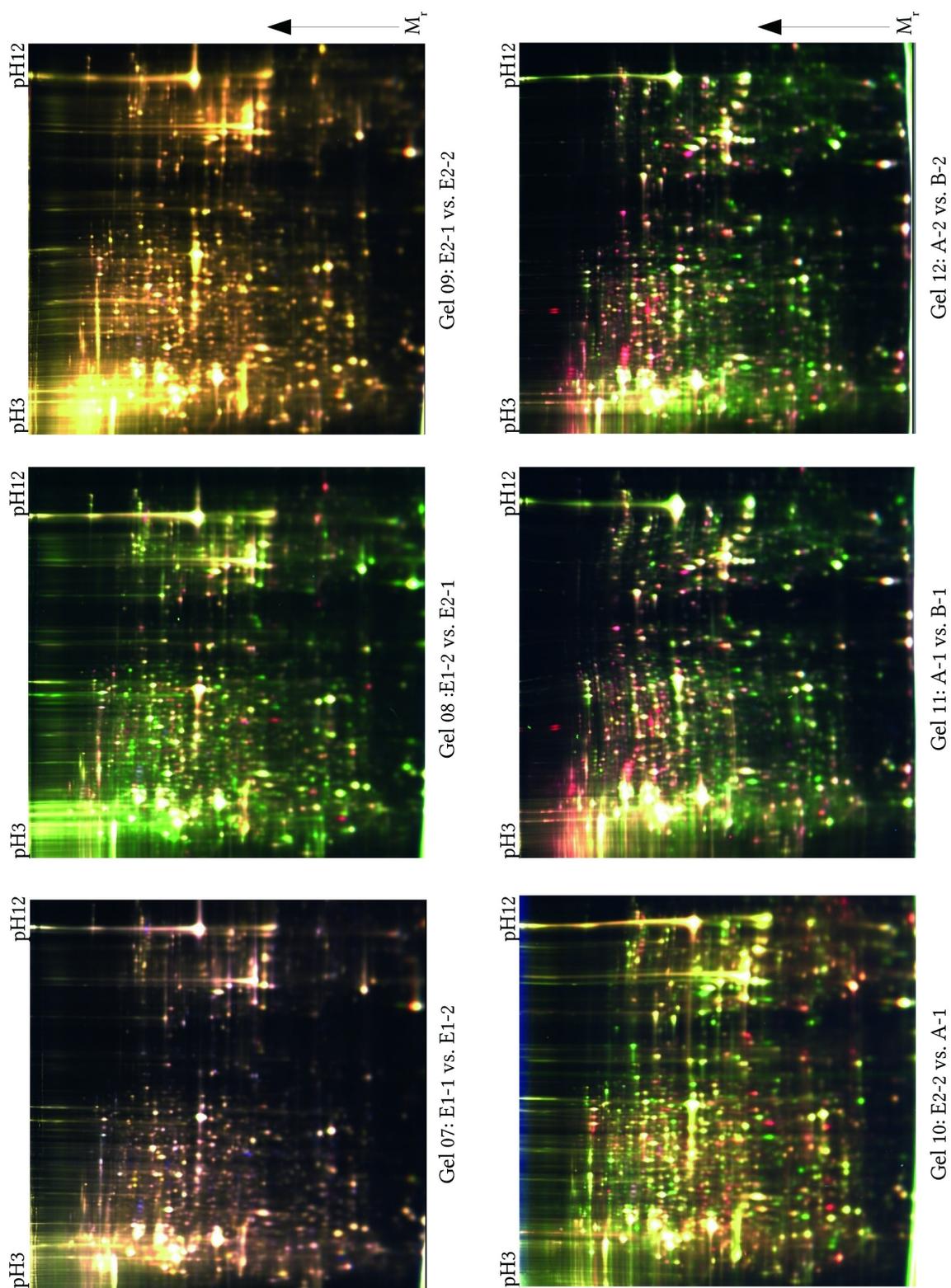


Abbildung 19: DIGE-Gele IPG 3-12 (Image-overlay) der jeweiligen gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards (IPS). Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte mit Cy5 (roter Kanal), IPS mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteinspots sind gelb dargestellt.

Gel07: E1-1 (NB) vs. E1-2 (NB)

Gel08: E1-2 (NB) vs. E2-1 (EFT)

Gel09: E2-1 (EFT) vs. E2-2 (EFT)

Gel10: E2-2 (EFT) vs. A-1 (EFT)

Gel11: A-1 (EFT) vs. B-1 (EFT)

Gel12: A-2 (EFT) vs. B-2 (EFT)

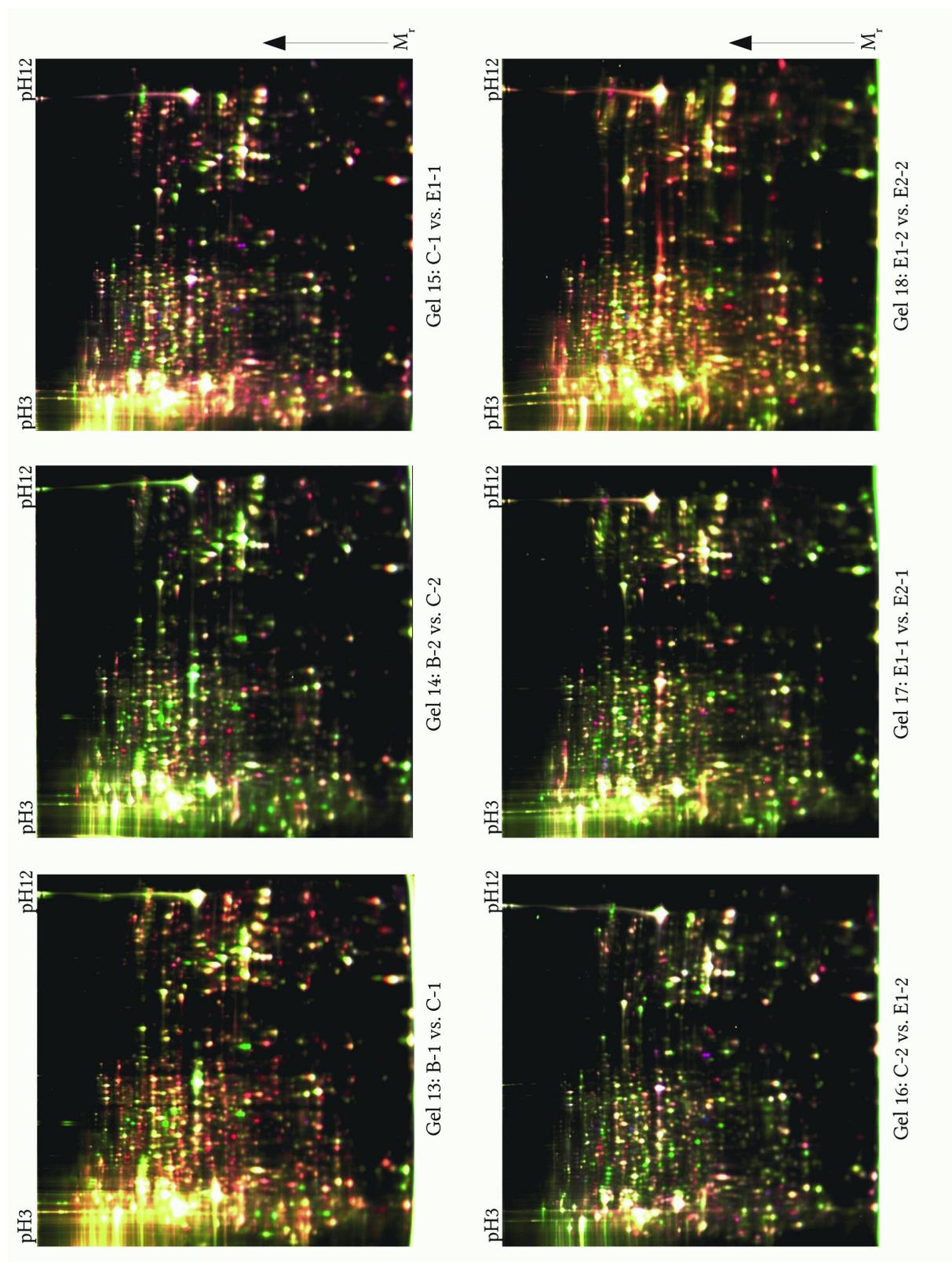


Abbildung 20: DIGE-Gele IPG 3-12 (Image-overlay) der jeweiligen gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards (IPS). Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte mit Cy5 (roter Kanal), IPS mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteinspots sind gelb dargestellt.

Gel13: B-1 (EFT) vs. C-1 (NB)

Gel14: B-2 (EFT) vs. C-2 (NB)

Gel15: C-1 (NB) vs. E1-1 (NB)

Gel16: C-2 (NB) vs. E1-2 (NB)

Gel17: E1-1 (NB) vs. E2-1 (EFT)

Gel18: E1-2 (NB) vs. E2-2 (EFT)

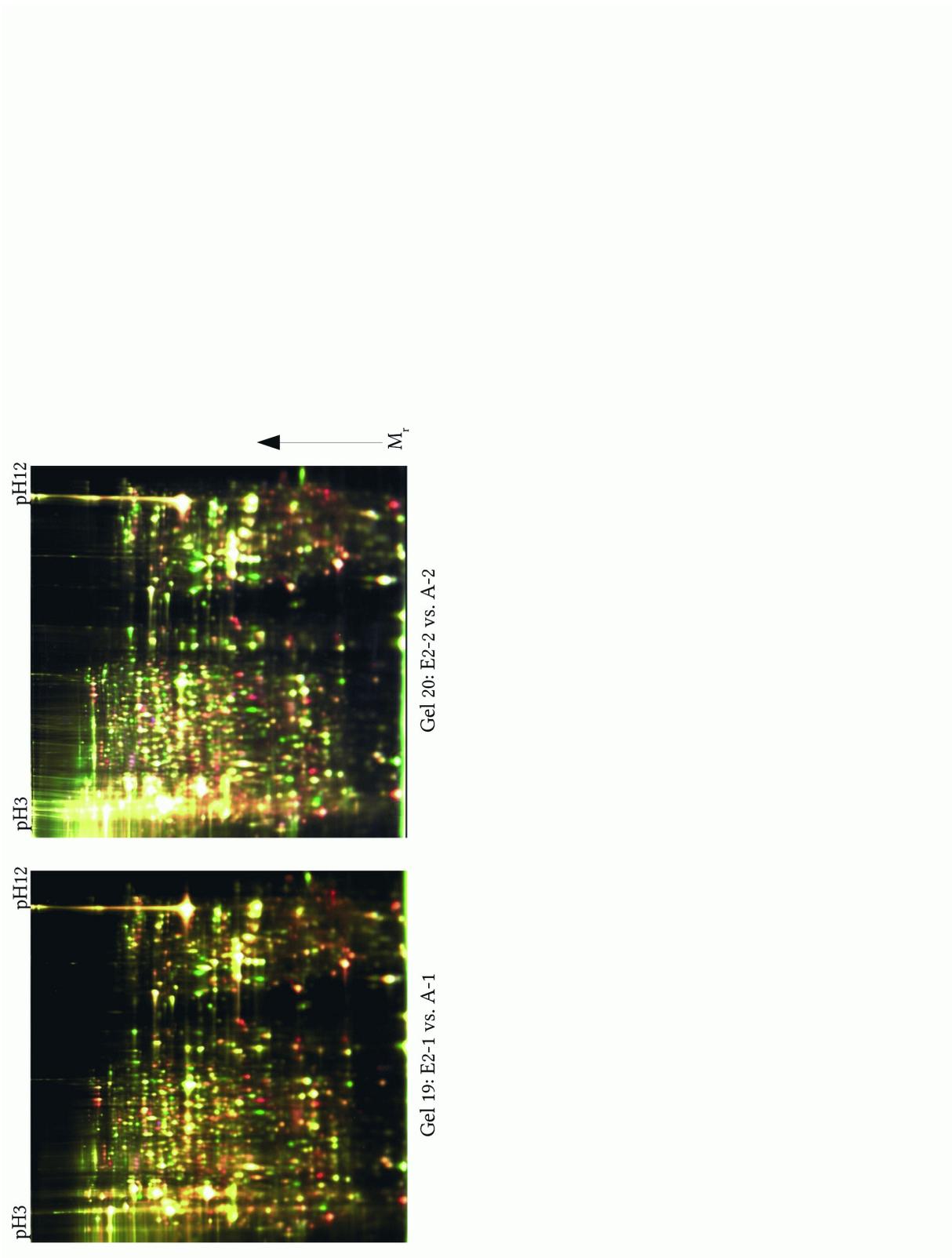


Abbildung 21: DIGE-Gele IPG 3-12 (Image-overlay) der jeweiligen gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards (IPS). Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte mit Cy5 (roter Kanal), IPS mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteinspots sind gelb dargestellt.

Gel19: E2-1 (EFT) vs. A-1 (EFT) Gel20: E2-2 (EFT) vs. A-2 (EFT)

5.4.1 Reproduzierbarkeit der biologischen Replikate

Um die Reproduzierbarkeit der Anzucht der jeweiligen Zelllinie zu überprüfen wurde die Gele mithilfe der Software „Progenesis“ überprüft. Der softwareeigene Algorithmus konnte 474 Spots detektieren, diese wurden einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Als Nullhypothese wurde $H_0: \mu_1 \neq \mu_2$ (Mittelwerte der beiden Gruppen unterscheiden sich) angenommen. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt, d.h. Spots mit einem Wert der ANOVA $\geq 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit) und einer Power (Teststärke) von $< 0,80$ wurden als nicht differentiell reguliert verworfen. Durchschnittlich wurden bei 5,1% aller detektierten Spots eine differentielle Regulierung gefunden, dies entspricht einer Reproduzierbarkeit der Anzucht der jeweiligen Zelllinien von knapp 95%. Die detaillierten Angaben zur Reproduzierbarkeit der biologischen Replikate sind in Tabelle 28 aufgelistet.

Verglichene Zelllinien	Anzahl differentiell regulierter Spots
A-1 vs. A-2	28 (5,9%)
B-1 vs. B-2	18 (3,8%)
C-1 vs. C-2	33 (7,0%)
E1-1 vs. E1-2	23 (4,9%)
E2-1 vs. E2-2	18 (3,8%)
	Durchschnittlich: 24 (5,1%)

Tabelle 28: Auflistung der im Rahmen der Prüfung der Reproduzierbarkeit der biologischen Replikate der einzelnen Zelllinien detektierten, differentiell regulierten Spots.

5.4.2 Reproduzierbarkeit der technischen Replikate

Um die Reproduzierbarkeit der technischen Replikate zu überprüfen wurden die entsprechenden Bilddateien in Gruppen mit jeweils zwei Mitgliedern eingeteilt. Anschließend wurde eine statistische Auswertung durchgeführt, Proteinspots mit einer ANOVA $\geq 0,05$ und einer Power $< 0,80$ wurden als nicht differentiell reguliert verworfen. Wie aus Tabelle 29 zu erkennen, liegt die mittlere technische Reproduzierbarkeit bei 97,9%, d.h. das durchschnittlich 2,1% der detektierten Proteinspots der technischen Replikate als differentiell reguliert eingestuft werden.

Zelllinie	Anzahl der differentiell regulierten Spots	Gele der Gruppe 1	Gele der Gruppe 2
A-1	3 (0,6%)	Gel01 (Cy3) Gel19 (Cy5)	Gel11 (Cy3) Gel10 (Cy5)
A-2	8 (1,7%)	Gel02 (Cy3) Gel01 (Cy5)	Gel12 (Cy3) Gel20(Cy5)
B-1	7 (1,5%)	Gel03 (Cy3) Gel02 (Cy5)	Gel13 (Cy3) Gel11 (Cy5)
B-2	10 (2,1%)	Gel04 (Cy3) Gel03 (Cy5)	Gel14(Cy3) Gel12 (Cy5)
C-1	16 (3,4%)	Gel05 (Cy3) Gel04 (Cy5)	Gel15 (Cy3) Gel13 (Cy5)
C-2	9 (1,9%)	Gel06 (Cy3) Gel05 (Cy5)	Gel16 (Cy3) Gel14 (Cy5)
E1-1	18 (3,8%)	Gel07 (Cy3) Gel06 (Cy5)	Gel17 (Cy3) Gel15 (Cy5)
E1-2	11 (2,3%)	Gel08 (Cy3) Gel07 (Cy5)	Gel18 (Cy3) Gel16 (Cy5)
E2-1	11 (2,3%)	Gel09 (Cy3) Gel08 (Cy5)	Gel19 (Cy3) Gel17 (Cy5)
E2-2	6 (1,3%)	Gel10 (Cy3) Gel09 (Cy5)	Gel20 (Cy3) Gel18 (Cy5)
	Durchschnittlich: 10 (2,1%) Technische Reproduzierbarkeit: 97,9%		

Tabelle 29: Prüfung der Reproduzierbarkeit der jeweiligen technischen Replikate einer Zelllinie.

5.4.3 Differentielle Proteomanalyse mit IPG 3-12

Die in Kapitel 5.4 erstellten DIGE-Gele wurden anschließend auf differentiell exprimierte Proteine zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien hin überprüft. Ein Proteinspot wurde als differentiell exprimiert betrachtet, wenn er zwischen allen EFT- und Neuroblastomzelllinien (nicht innerhalb der EFT- bzw. Neuroblastomzelllinien) eine ANOVA $< 0,05$, eine Power $\geq 0,80$ hatte. Eine weitere Voraussetzung war die konsistente Expression des Proteinspots zwischen den EFT- und Neuroblastomzelllinien. Das Konsistenz-Kriterium sollte die Anzahl der falsch-positiv für eine Tumorart typischen detektierten Proteine reduzieren, die ein großes Problem bei der Suche nach Biomarkern darstellen (von den tausenden potentiellen Biomarkern, die die

Proteomik bisher lieferte konnten nur wenige validiert werden [173]. Ein für eine Tumorart typisches Protein sollte über alle Zelllinien einer Tumorart ein Expressionsniveau haben, das sich auch eindeutig von der anderen Tumorart unterscheidet.

Mithilfe der Software „Progenesis“ konnten 32 differentiell regulierte Proteine detektiert werden (Abbildung 22), die den zuvor beschriebenen Anforderungen entsprechen. Von diesen Proteinen konnten mithilfe der MALDI-Massenspektrometrie 14 identifiziert werden. Diese Proteine sind laut Proteinatlas [172] den Klassen der Enzyme, Plasmaproteine, Transporter und den potentiellen Krebsbiomarkern zuzuordnen. Die graphische Darstellung der Expressionsprofile (die biologischen und technischen Replikate einer Zelllinie wurden in einer Gruppe zusammengefasst) und die dreidimensionale Darstellung der Spots zeigen die Abbildungen 23-38. Zu beachten ist, dass die 3-dimensionale Darstellung nicht normalisiert ist und deshalb quantitative Unterschiede nicht unbedingt korrekt darstellt. So können z.B. kleinere Regulierungen „größer“ aussehen als stärkere. Diese Darstellung dient lediglich zur Verifikation ob der detektierte Spot tatsächlich ein Protein ist (ähnlich einer „3D-Glockenkurve“) oder ein Artefakt (Stachelform). Zur besseren Übersicht sind sämtliche, als differentiell reguliert detektierten Spots nochmals in Abbildung 39 als *Heatmap* dargestellt, erweiterte Inforamtionen über die Proteine sind in Tabelle 30 angegeben.



Abbildung 22: Repräsentatives DIGE-Gel der differentiell regulierten Spots im pH-Bereich 3-12 zwischen den EFT-Zelllinien A673 (A), SBSR-AKS (B), SK-N-MC (E2) und den NB-Zelllinien SiMa (C) und SH-SY5Y (E1). Die Ziffern korrespondieren zu den in Tabelle 30 und Abbildung 39 aufgelisteten Proteinnummern.

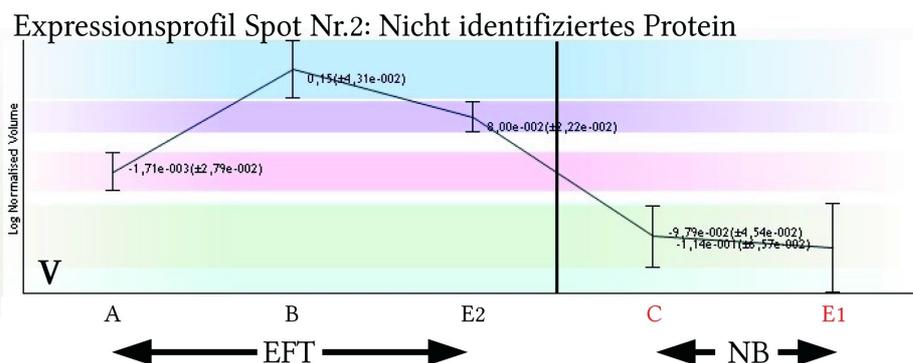
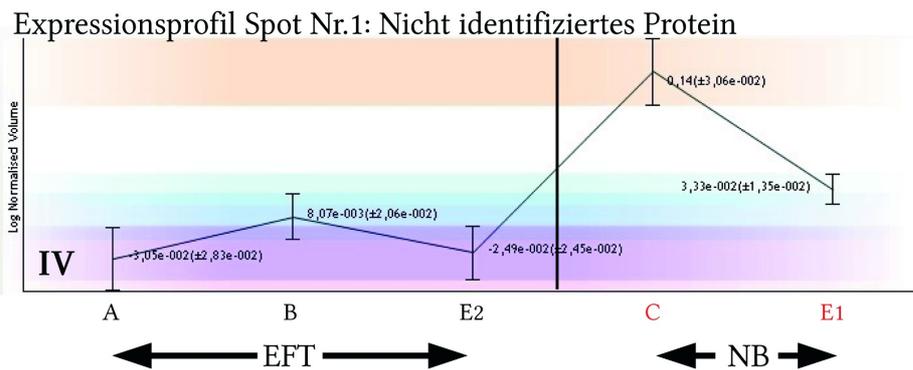
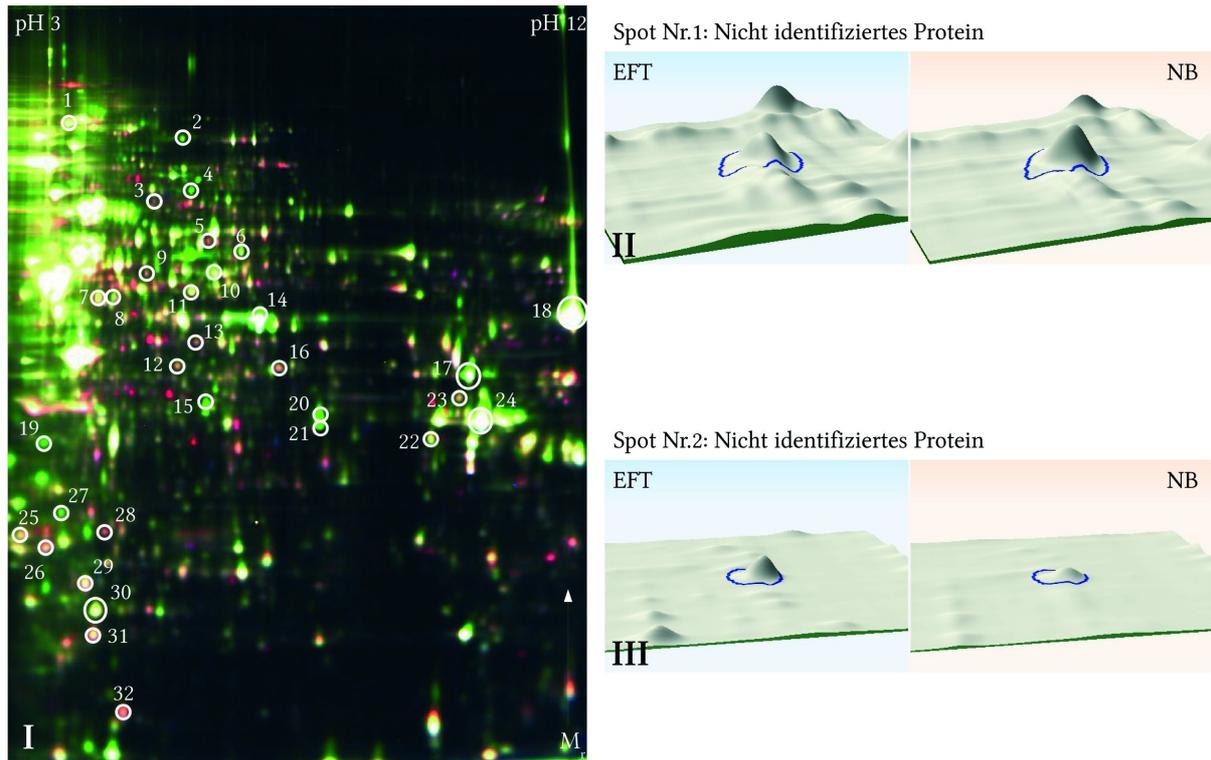


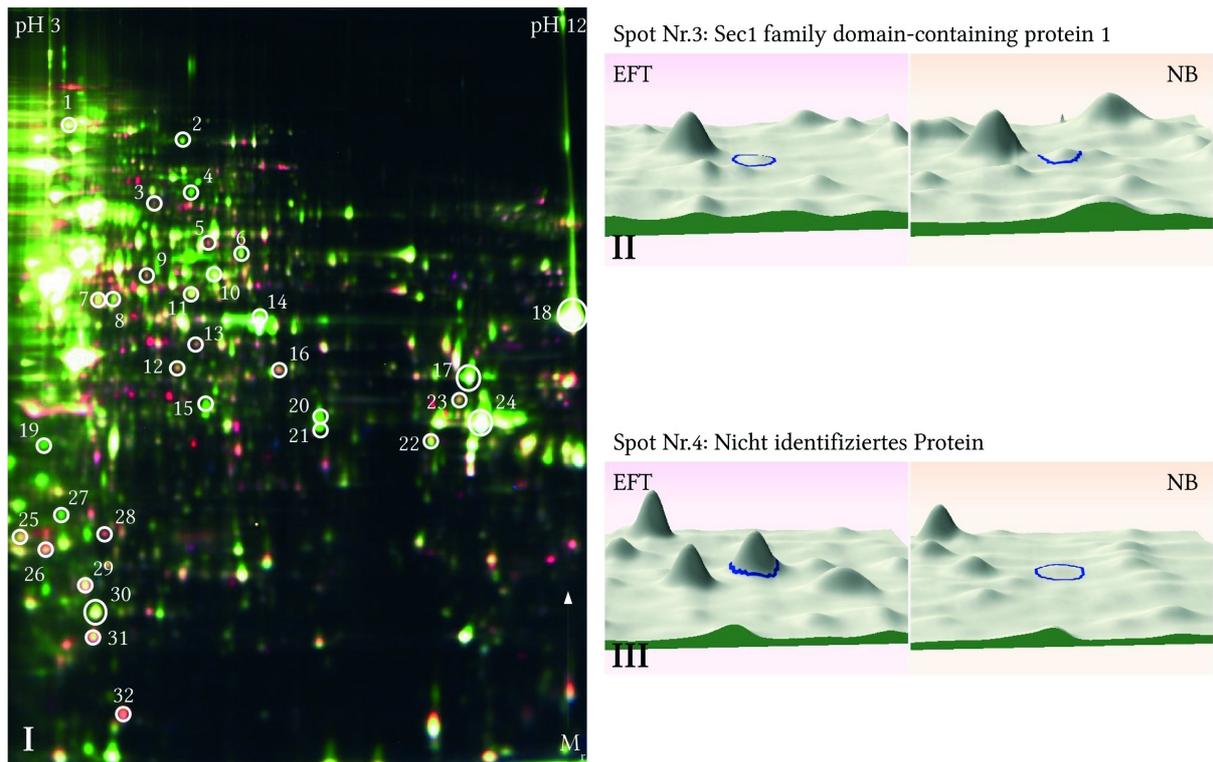
Abbildung 23: I: Repräsentatives DIGE Gel IPG 3-12, mit eingezeichneten, differenziell regulierten Spots. II und III: 3D-Darstellung der jeweiligen Proteinspots. IV+V: Expressionsprofil des jeweiligen Proteinspots, d.h. sein Expressionsniveau in den jeweiligen Zelllinien (biologische Replikate wurden in dieselbe Gruppe aufgenommen), NB-Zelllinien sind in roter Schrift dargestellt. Regulierungsfaktor des Proteins rechts neben dem Expressionsprofil. Die Abkürzungen der Zelllinien sind in Tabelle 26 aufgeführt.

II: Spot Nr.1: Nicht identifiziertes Protein.

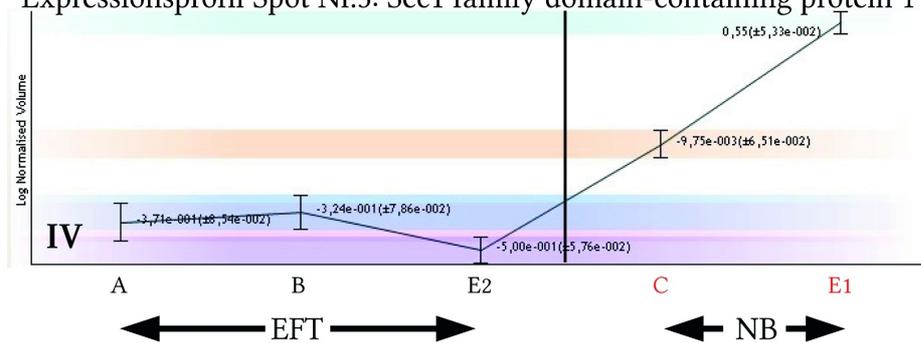
III: Spot Nr.2: Nicht identifiziertes Protein

IV: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.1)

V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.2)



Expressionsprofil Spot Nr.3: Sec1 family domain-containing protein 1



Expressionsprofil Spot Nr.4: Nicht identifiziertes Protein

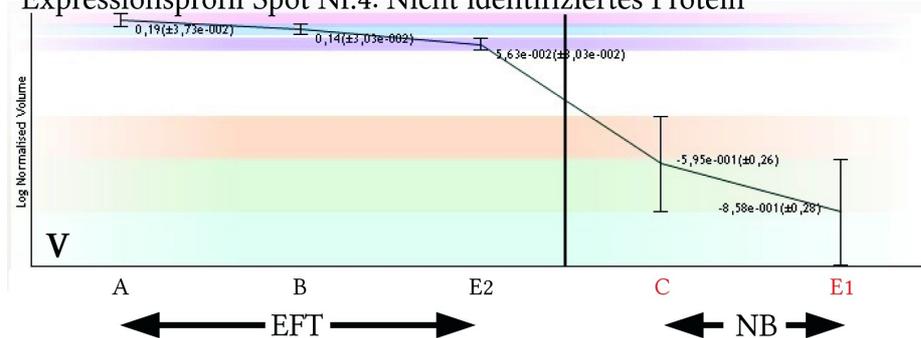
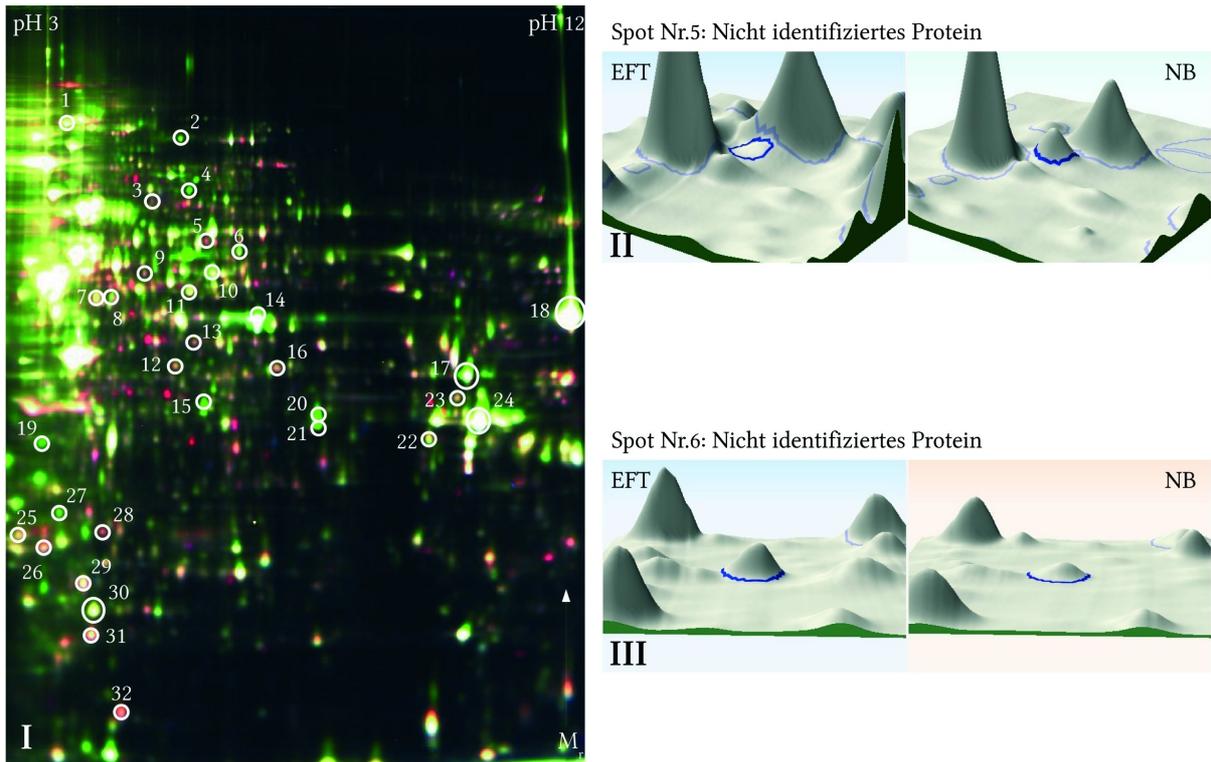
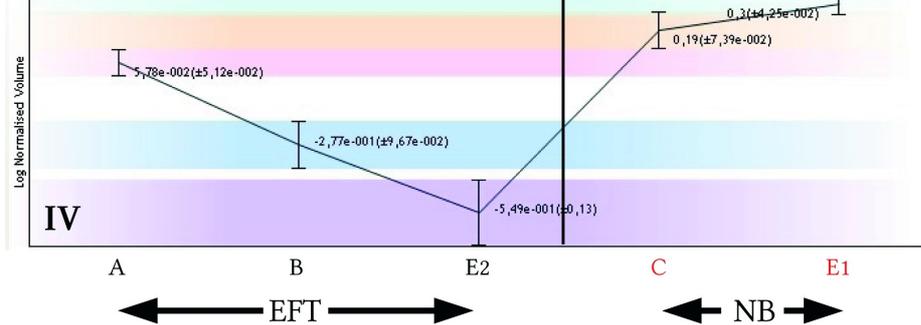


Abbildung 24: II: Spot Nr.3: Sec1 family domain-containing protein 1
 III: Spot Nr.4: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil von Sec1 family domain-containing protein 1 (Spot Nr.3)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.4)

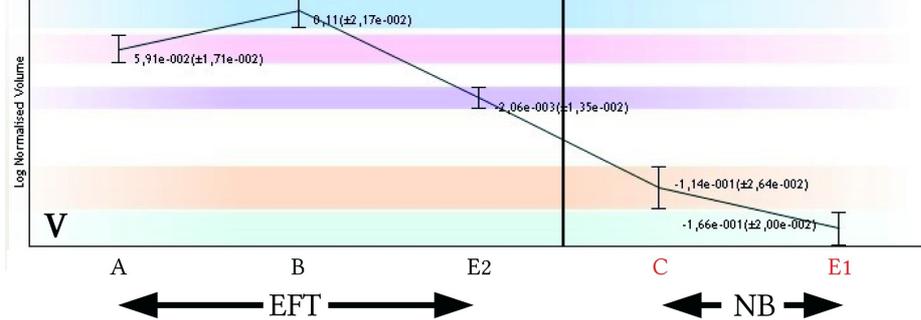


Expressionsprofil Spot Nr.5: Nicht identifiziertes Protein



**EFT/NB:
-3,7**

Expressionsprofil Spot Nr.6: Nicht identifiziertes Protein



**EFT/NB:
+1,6**

Abbildung 25: II: Spot Nr.5: Nicht identifiziertes Protein
 III: Spot Nr.6: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.5)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.6)

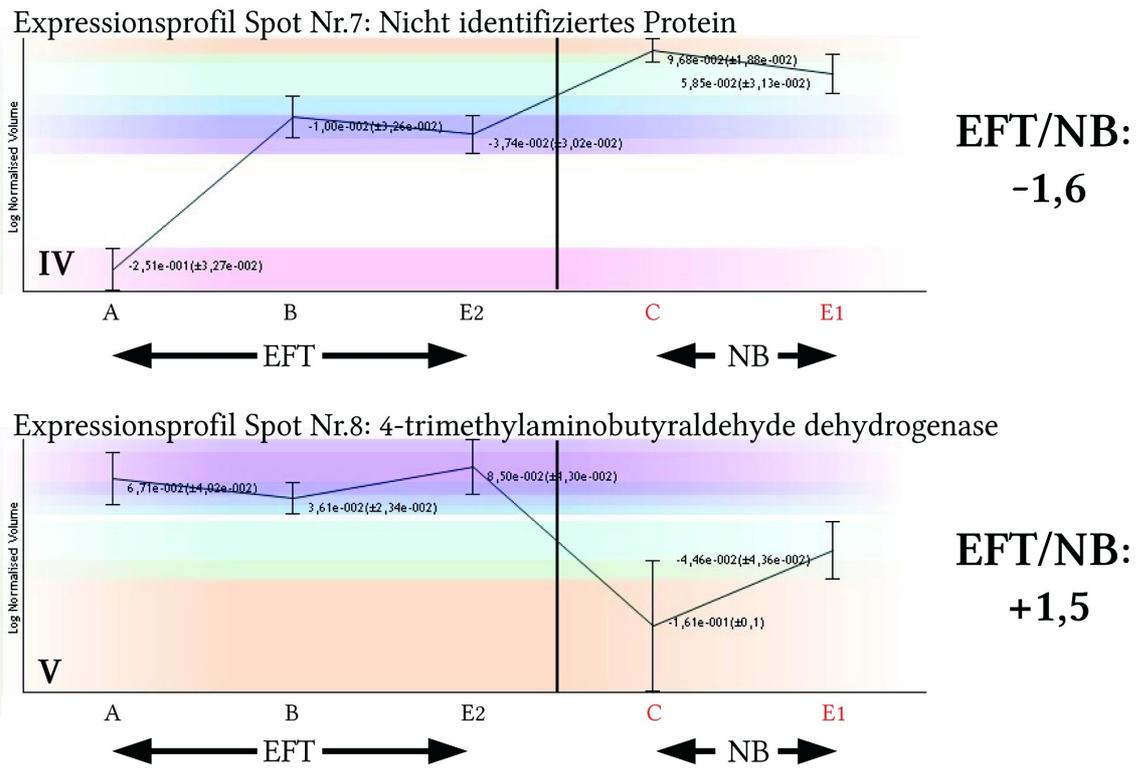
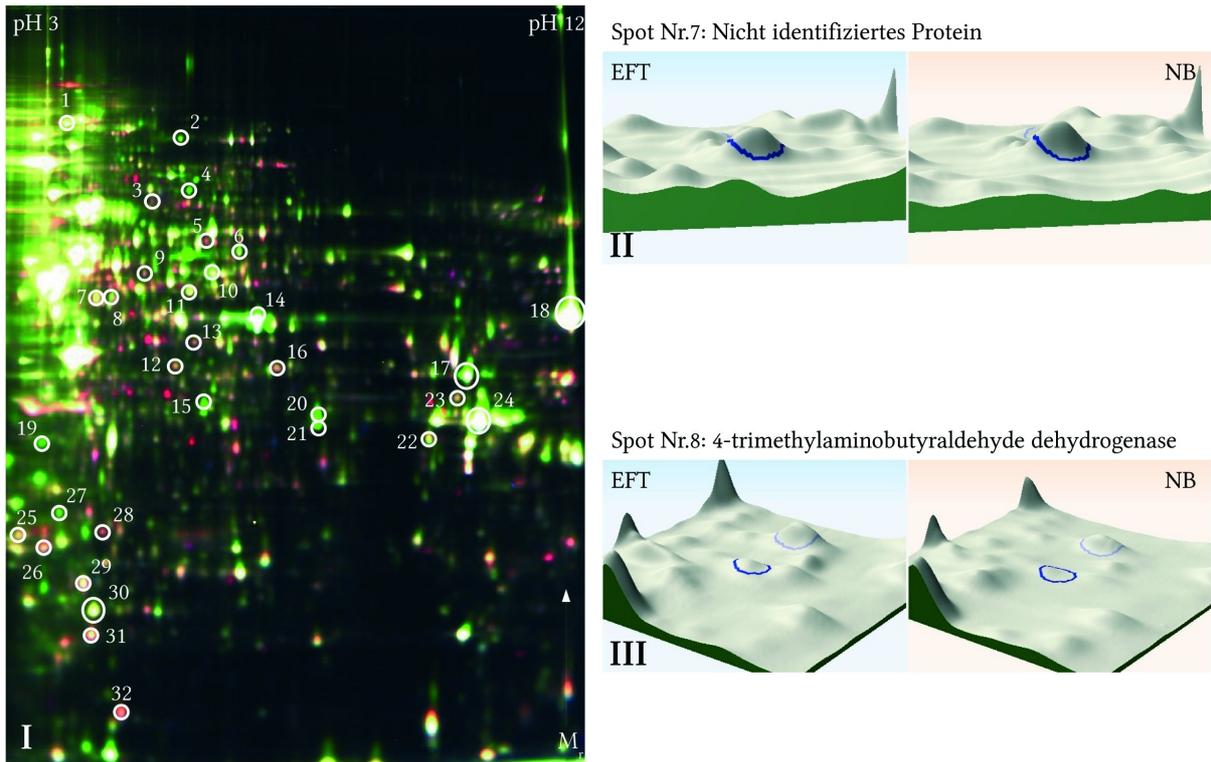
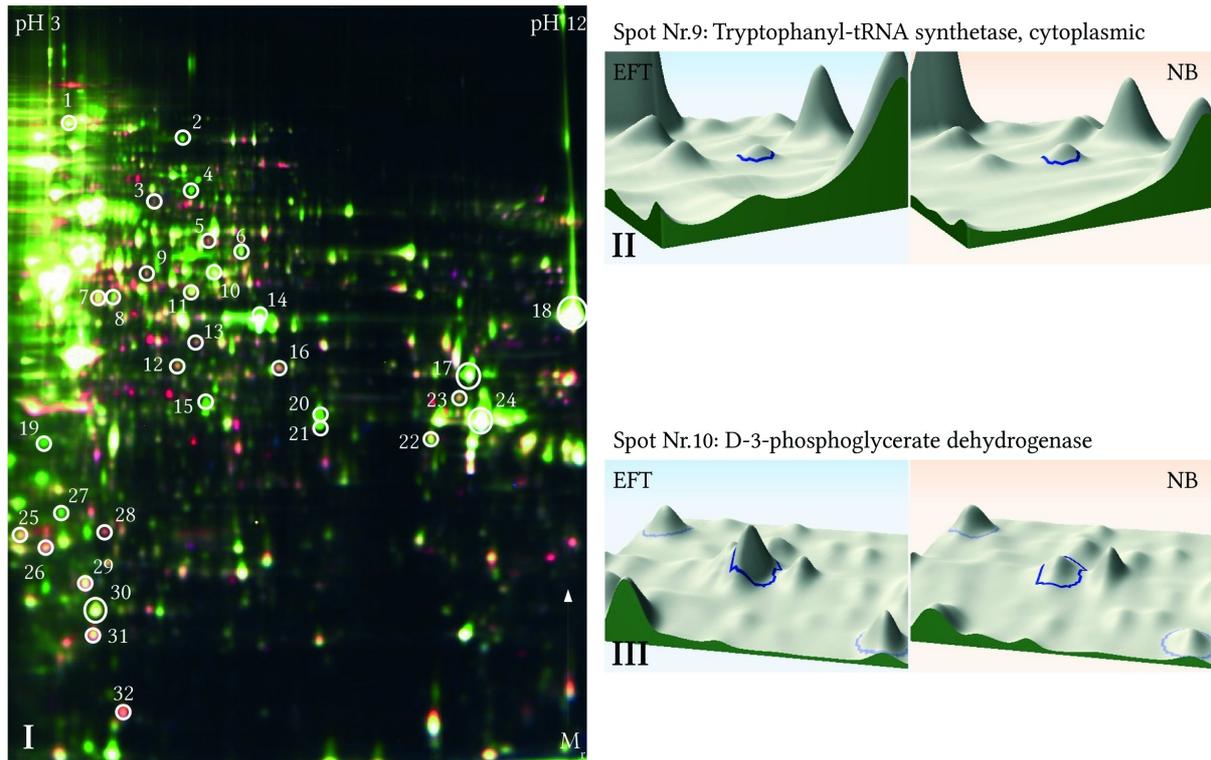
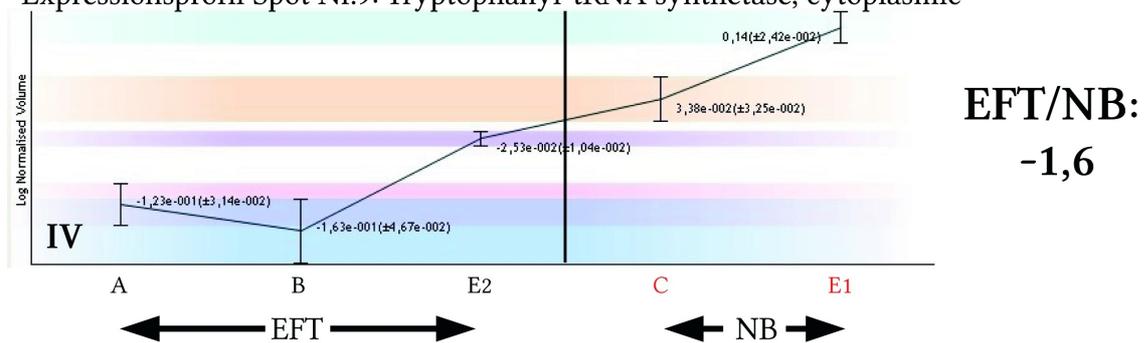


Abbildung 26: II: Spot Nr.7: Nicht identifiziertes Protein
 III: Spot Nr.8: 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase
 IV: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.7)
 V: Expressionsprofil von 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (Spot Nr.8)



Expressionsprofil Spot Nr.9: Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic



Expressionsprofil Spot Nr.10: D-3-phosphoglycerate dehydrogenase

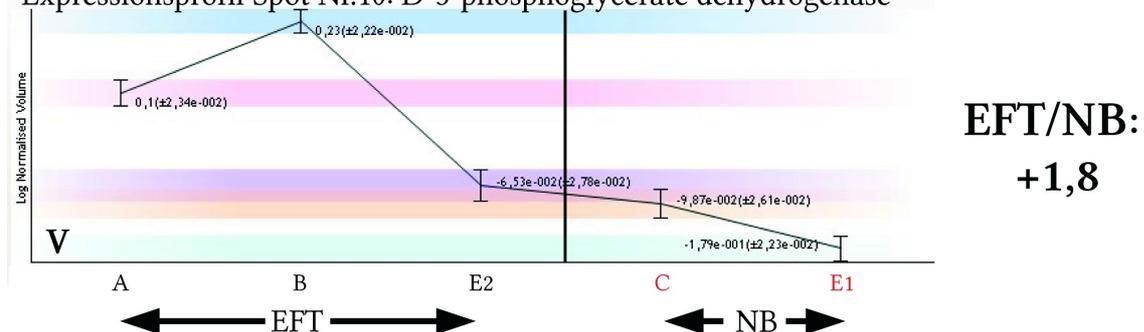
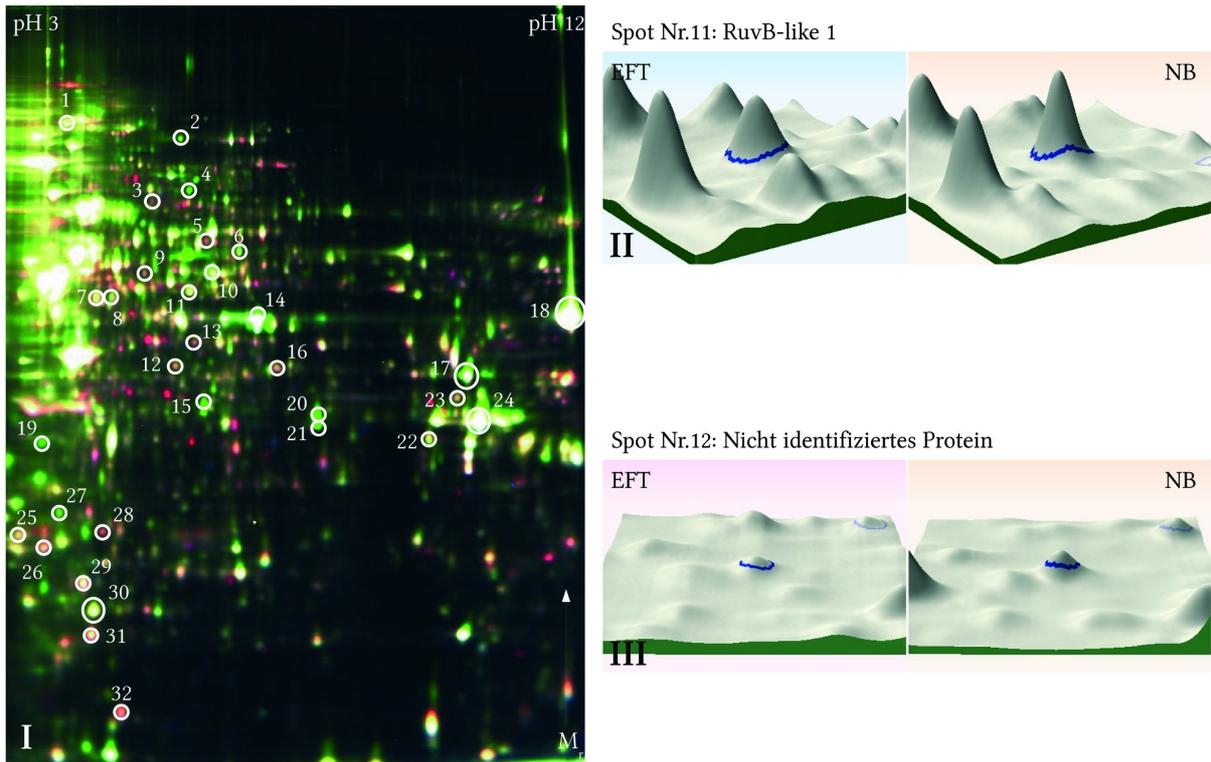
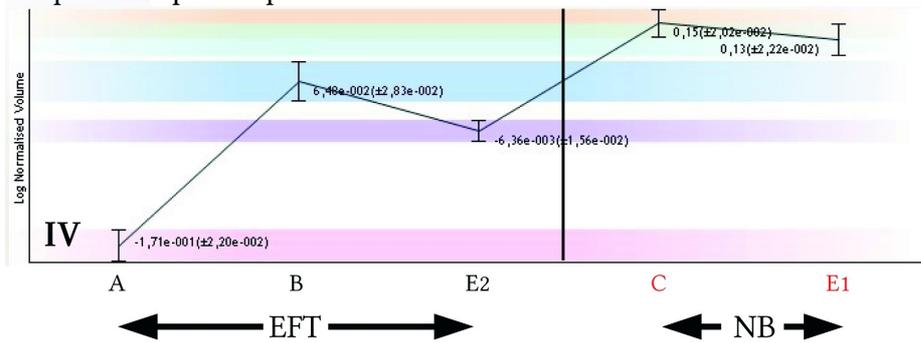


Abbildung 27: II: Spot Nr.9: Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic
 III: Spot Nr.10: D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
 IV: Expressionsprofil von Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (Spot Nr.9)
 V: Expressionsprofil von D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (Spot Nr.10)

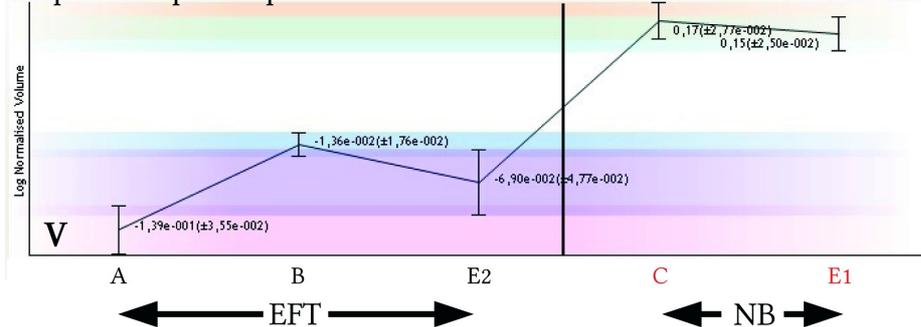


Expressionsprofil Spot Nr.11: RuvB-like 1



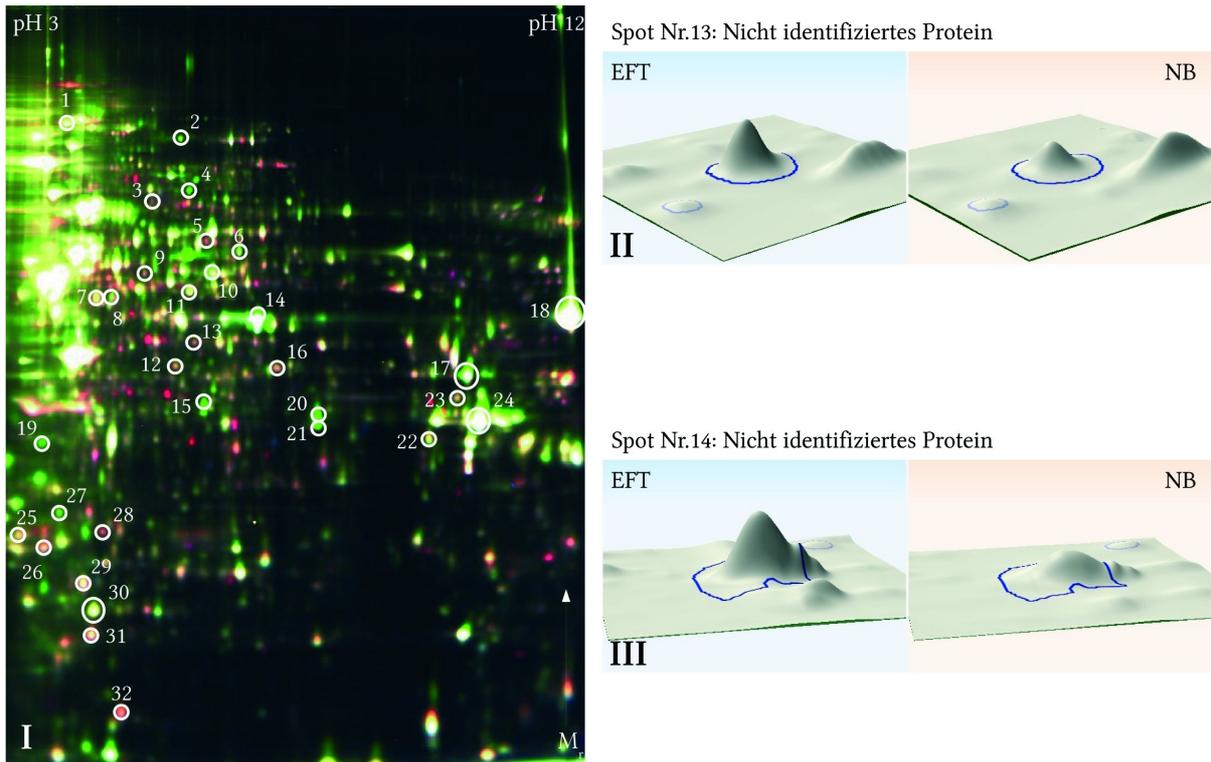
**EFT/NB:
-1,6**

Expressionsprofil Spot Nr.12: Nicht identifiziertes Protein

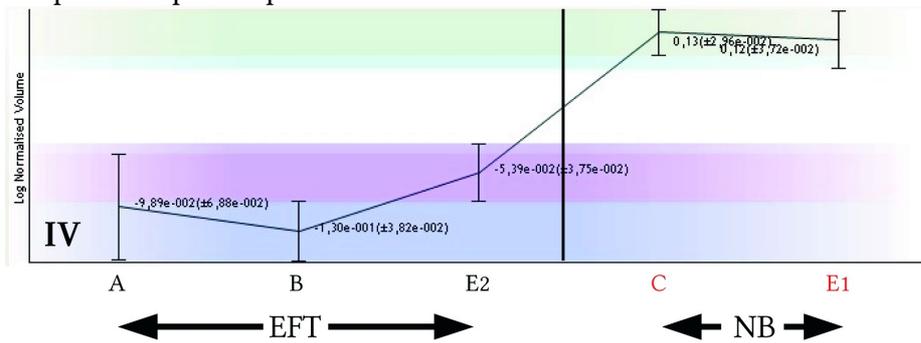


**EFT/NB:
-1,7**

Abbildung 28: II: Spot Nr.11: RuvB-like-1
 III: Spot Nr.12: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil von RuvB-like-1 (Spot Nr.11)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.12)

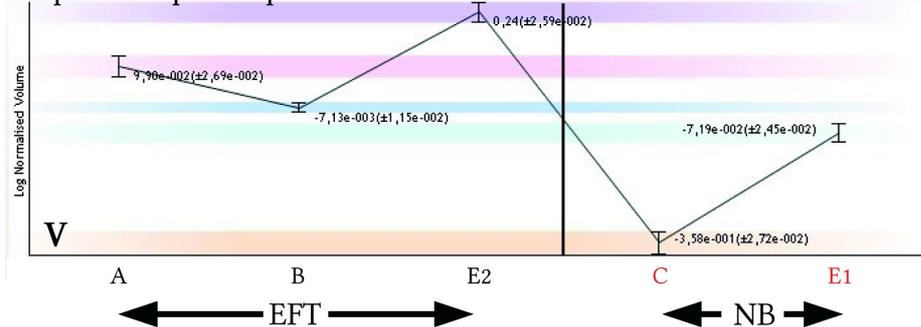


Expressionsprofil Spot Nr.13: Nicht identifiziertes Protein



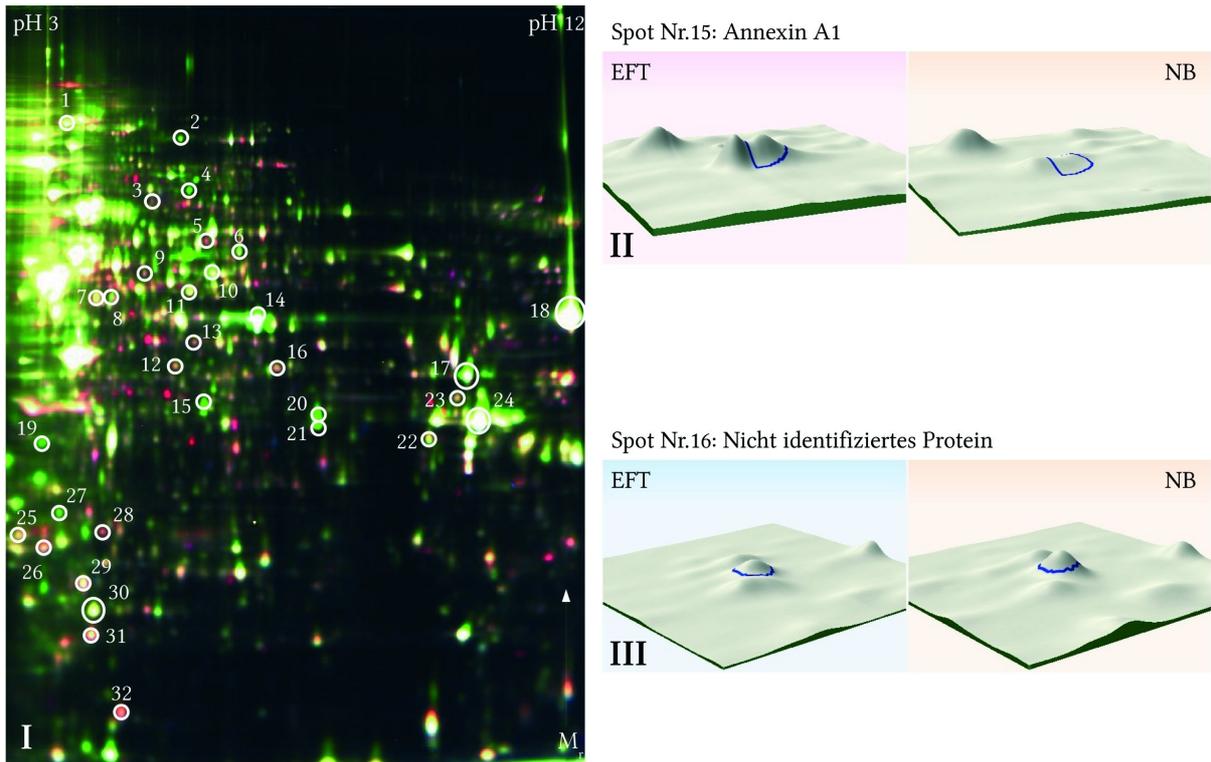
**EFT/NB:
+1,7**

Expressionsprofil Spot Nr.14: Nicht identifiziertes Protein

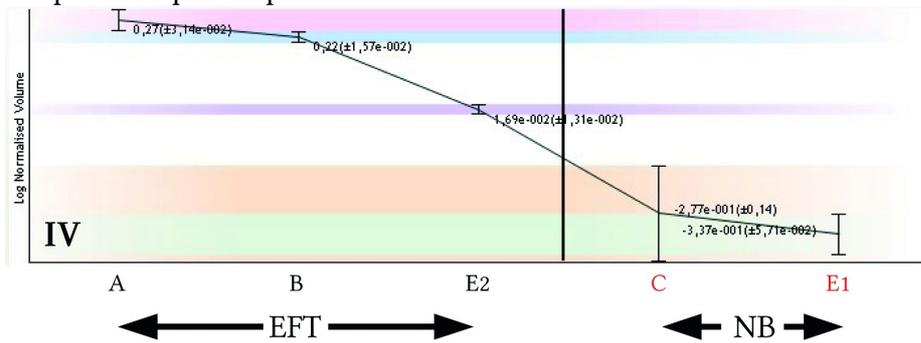


**EFT/NB:
+2,0**

Abbildung 29: II: Spot Nr.13: Nicht identifiziertes Protein
 III: Spot Nr.14: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.13)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.14)



Expressionsprofil Spot Nr.15: Annexin A1



Expressionsprofil Spot Nr.16: Nicht identifiziertes Protein

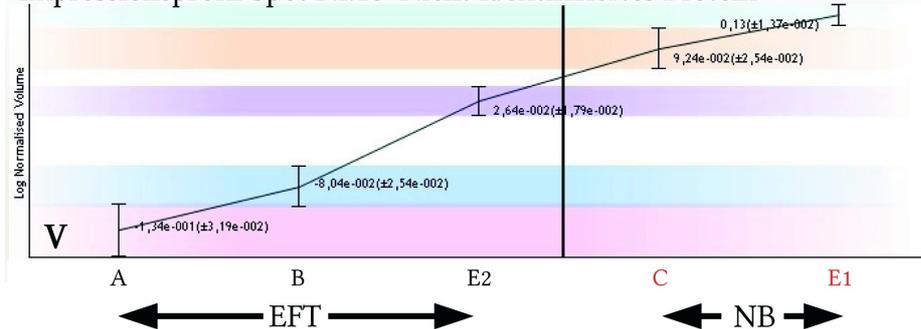
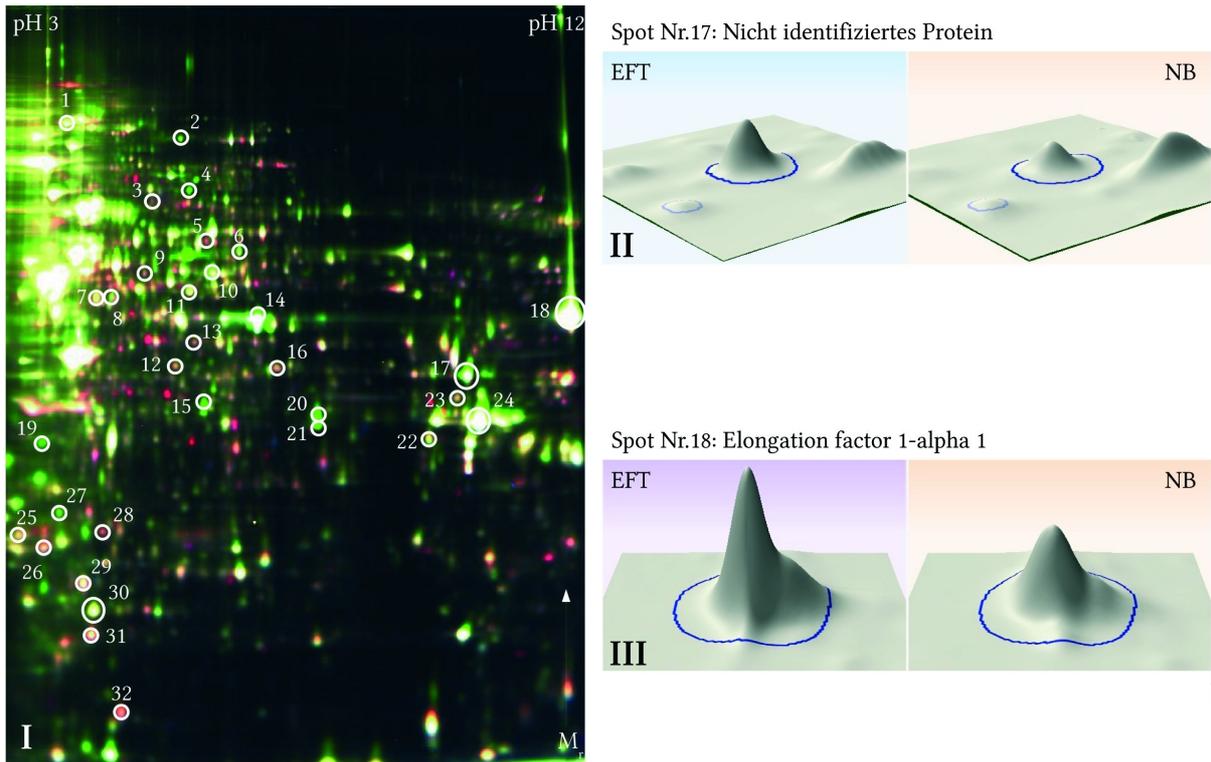
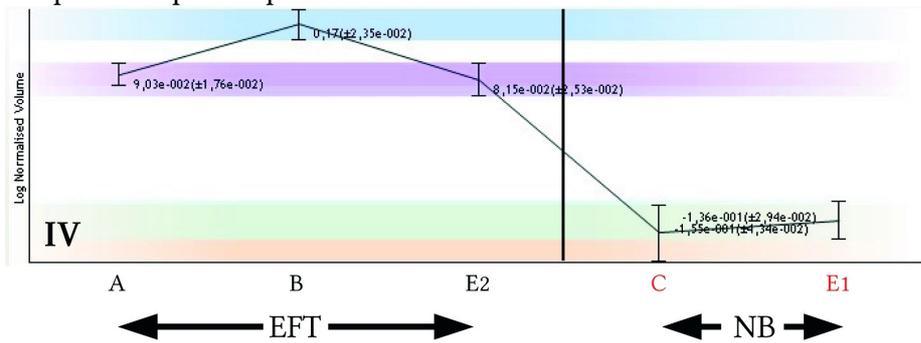


Abbildung 30: II: Spot Nr.15: Annexin A1
 III: Spot Nr.16: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil von Annexin A1 (Spot Nr.15)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.16)



Expressionsprofil Spot Nr.17: Nicht identifiziertes Protein



Expressionsprofil Spot Nr.18: Elongation factor 1-alpha 1

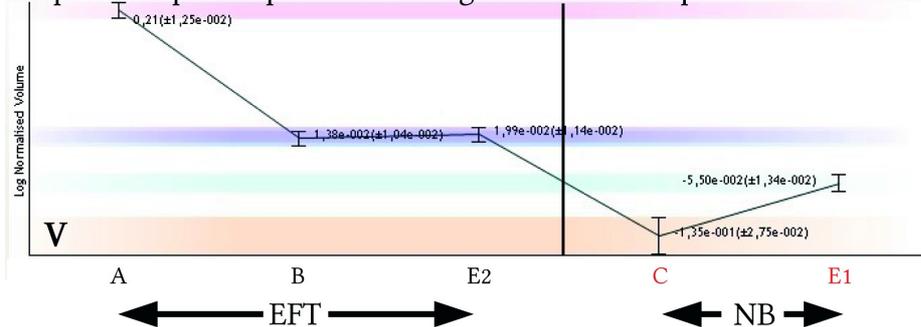
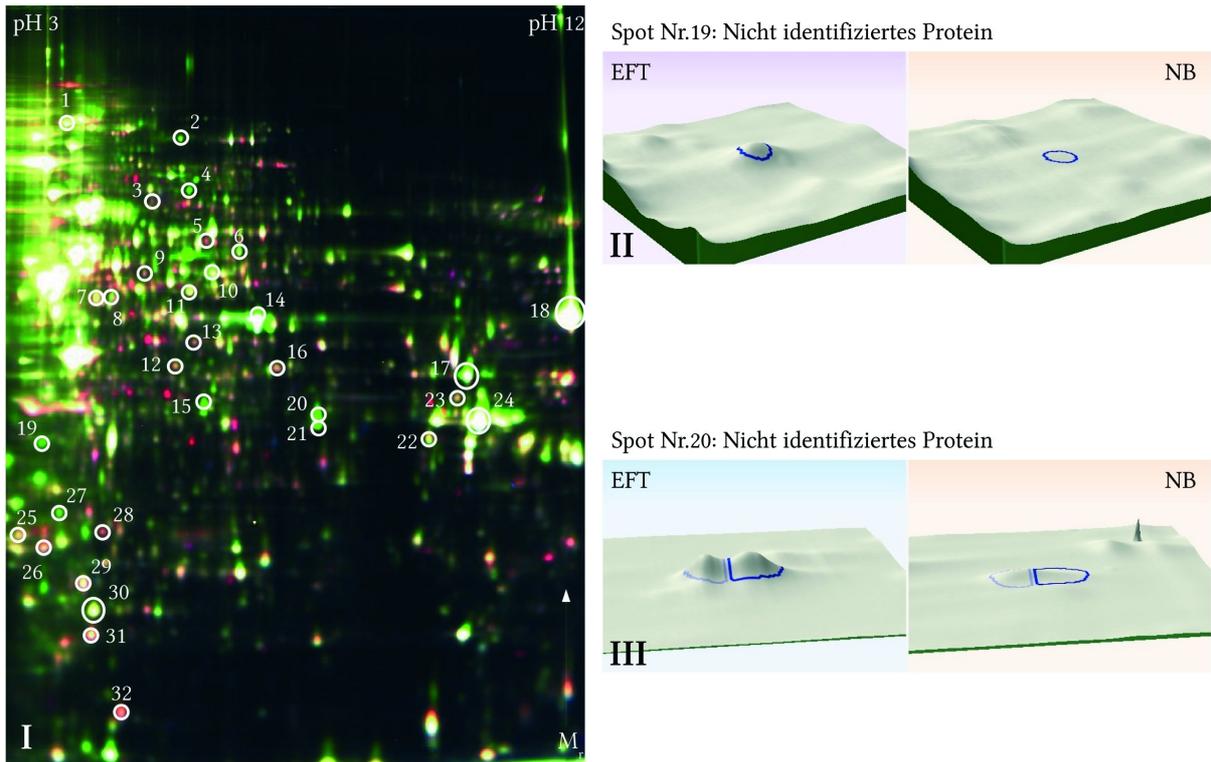
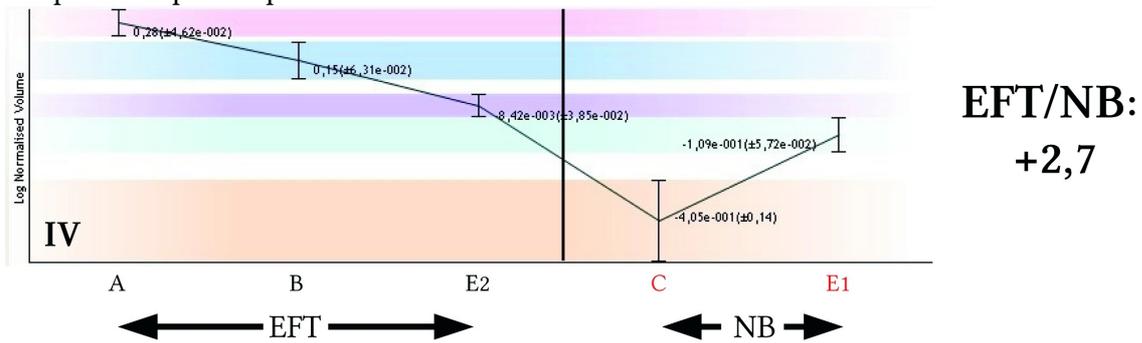


Abbildung 31: II: Spot Nr.17: Nicht identifiziertes Protein
 III: Spot Nr.18: Elongation factor 1-alpha 1
 IV: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.17)
 V: Expressionsprofil von Elongation factor 1-alpha 1 (Spot Nr.18)



Expressionsprofil Spot Nr.19: Nicht identifiziertes Protein



Expressionsprofil Spot Nr.20: Nicht identifiziertes Protein

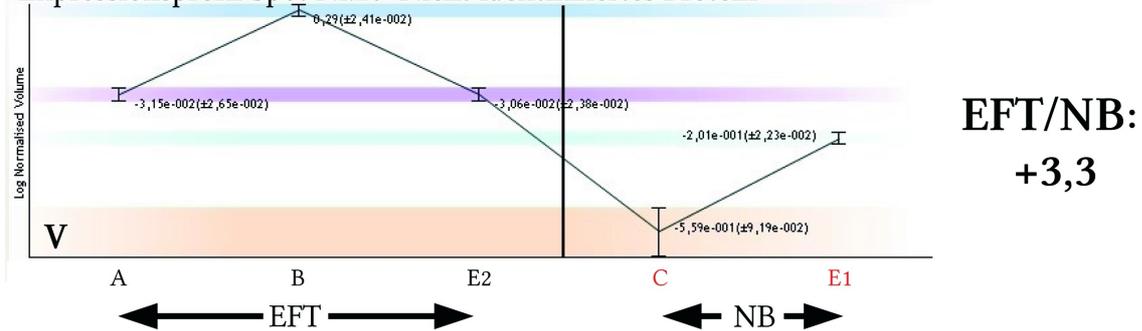
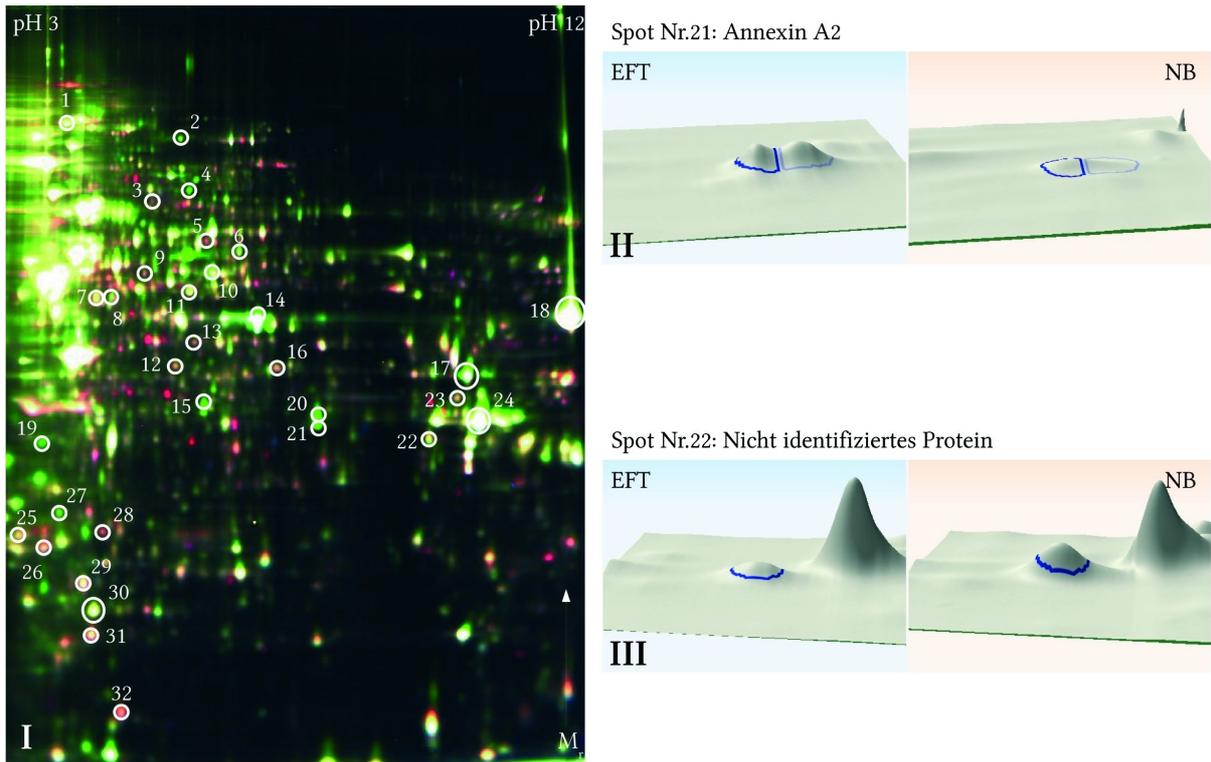
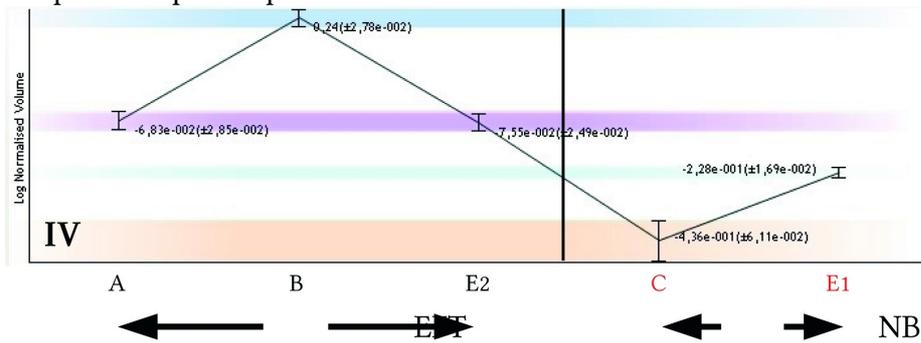


Abbildung 32: II: Spot Nr.19: Nicht identifiziertes Protein
 III: Spot Nr.20: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.19)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.20)

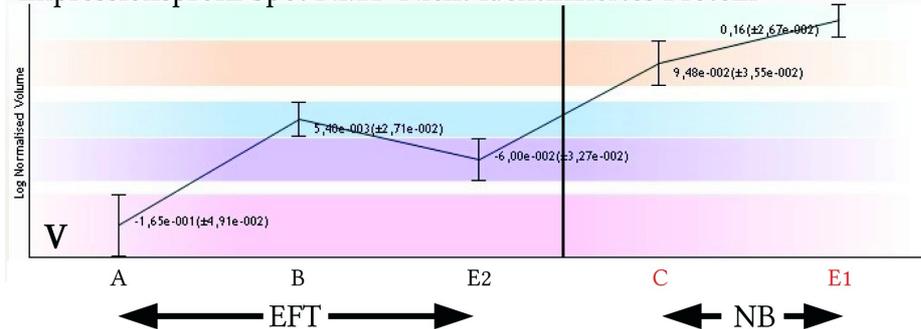


Expressionsprofil Spot Nr.21: Annexin A2



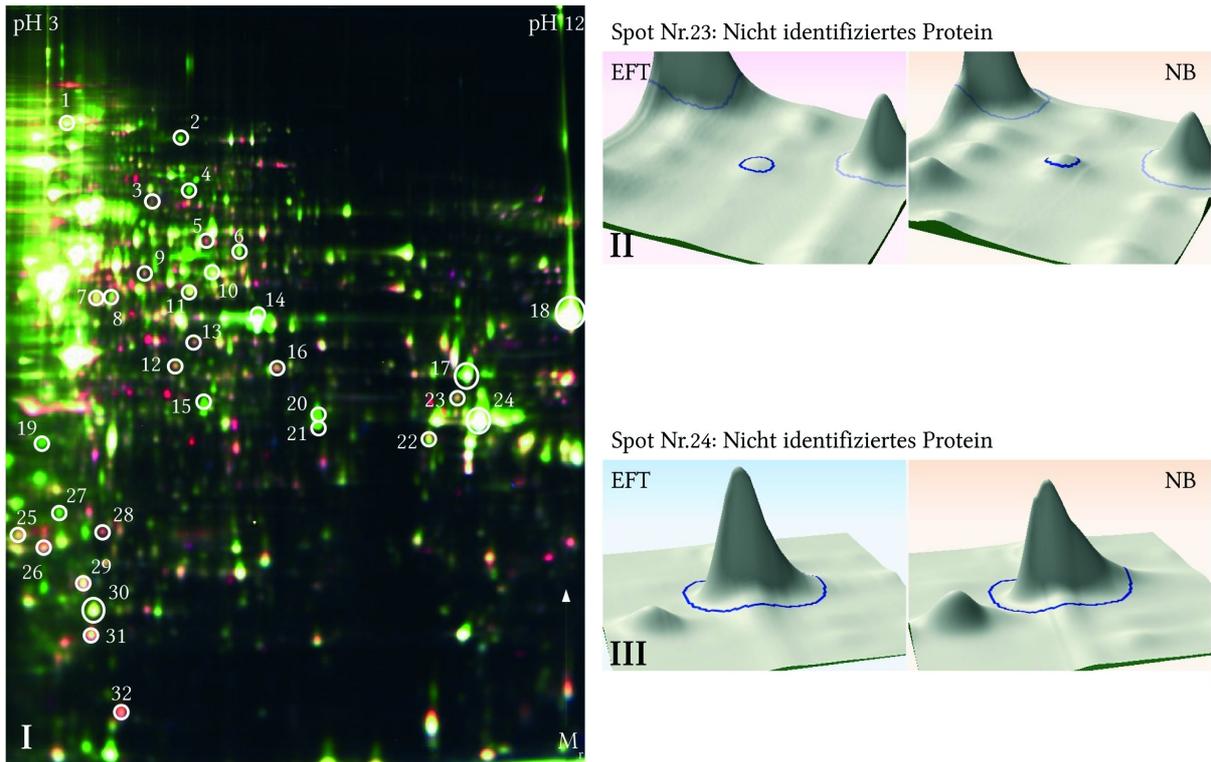
**EFT/NB:
+2,5**

Expressionsprofil Spot Nr.22: Nicht identifiziertes Protein

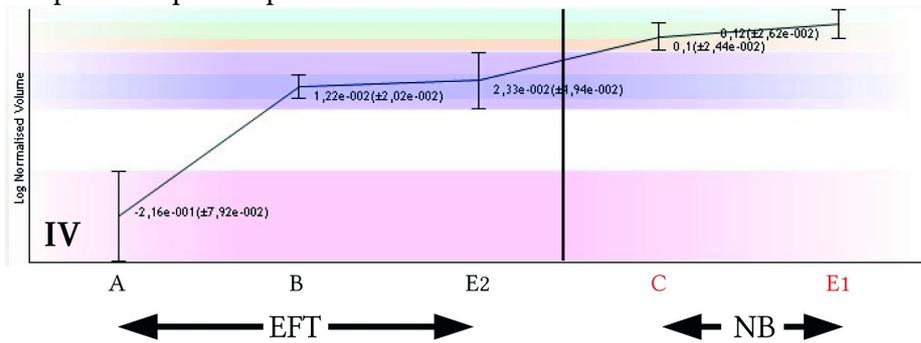


**EFT/NB:
-1,6**

Abbildung 33: II: Spot Nr.20: Annexin A2
 III: Spot Nr.21: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil von Annexin A2 (Spot Nr.20)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.21)

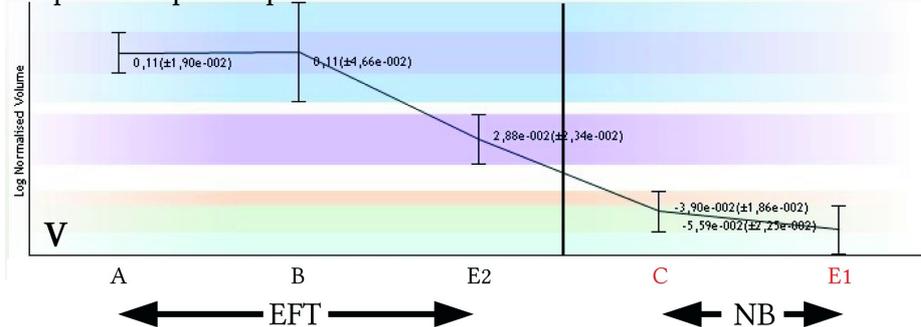


Expressionsprofil Spot Nr.23: Nicht identifiziertes Protein



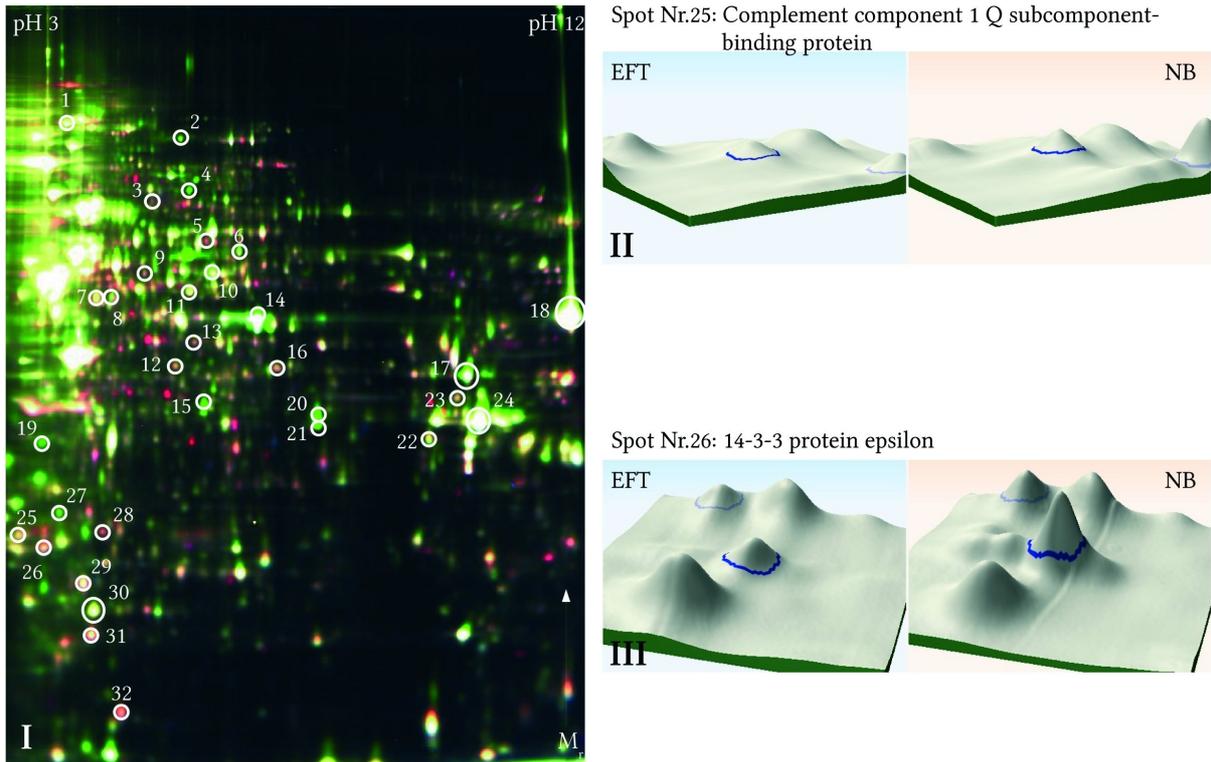
**EFT/NB:
-1,5**

Expressionsprofil Spot Nr.24: Nicht identifiziertes Protein

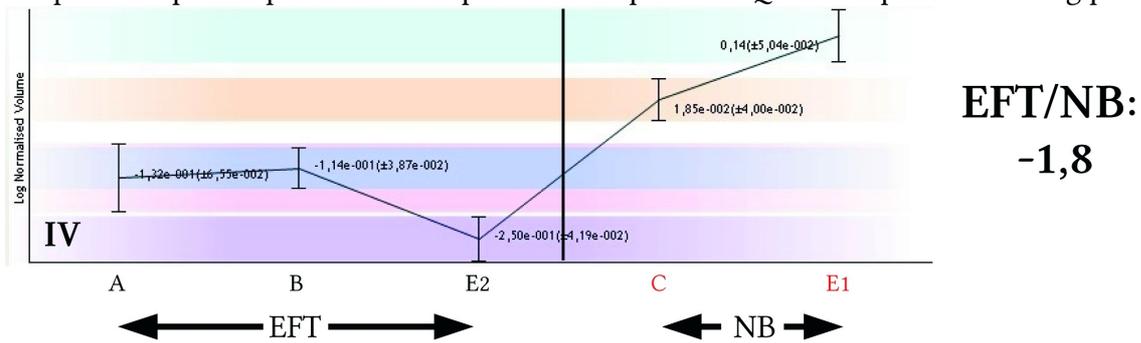


**EFT/NB:
+1,4**

Abbildung 34: II: Spot Nr.23: Nicht identifiziertes Protein
 III: Spot Nr.24: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.23)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.24)



Expressionsprofil Spot Nr.25: Complement component 1 Q subcomponent-binding protein



Expressionsprofil Spot Nr.26: 14-3-3 protein epsilon

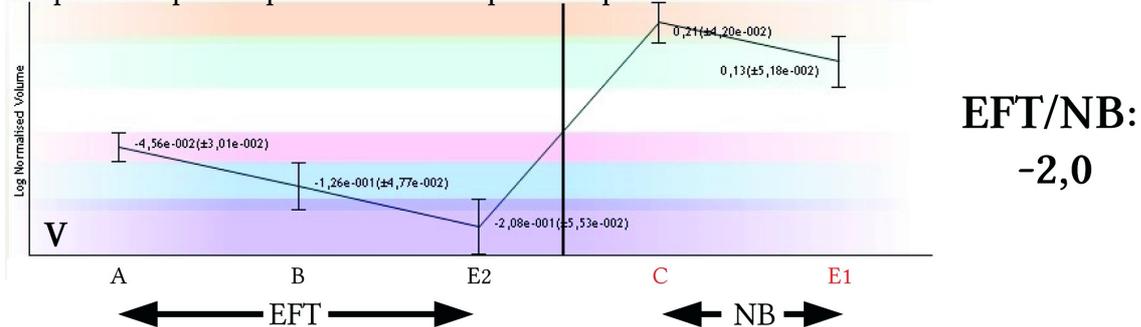
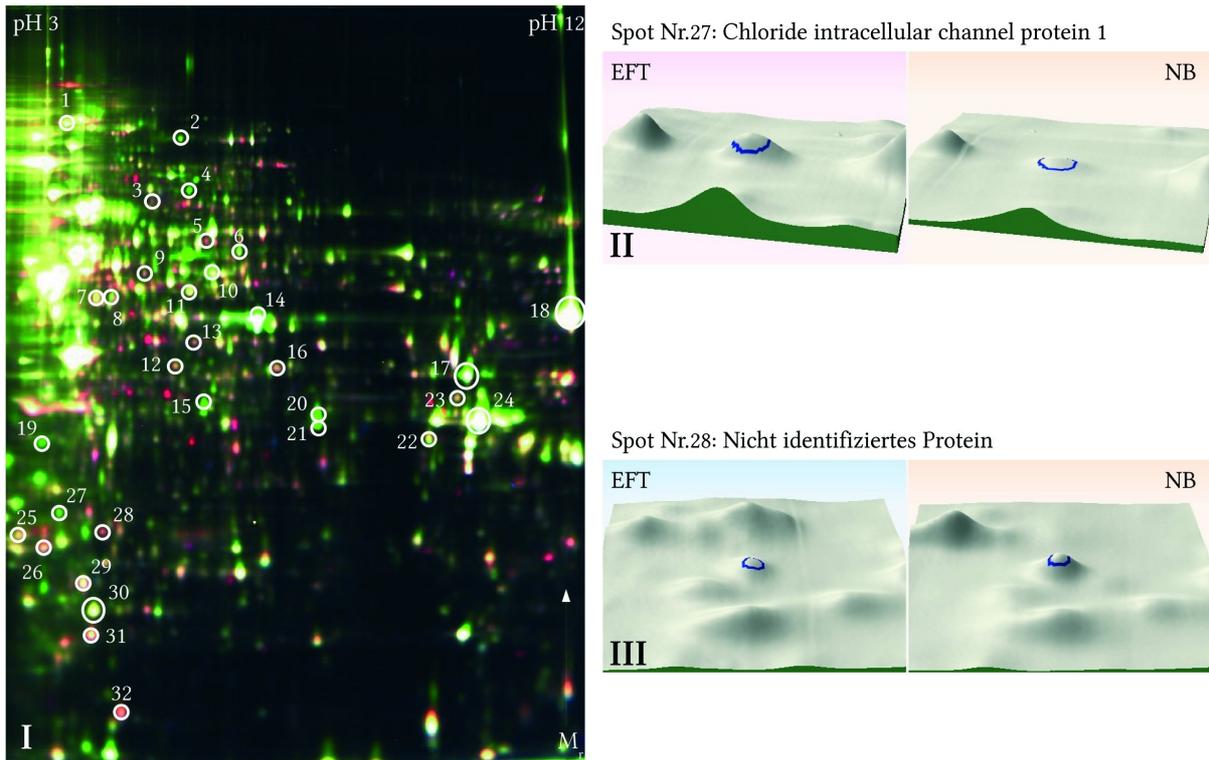


Abbildung 35: II: Spot Nr.25: Complement component 1 Q subcomponent-binding protein

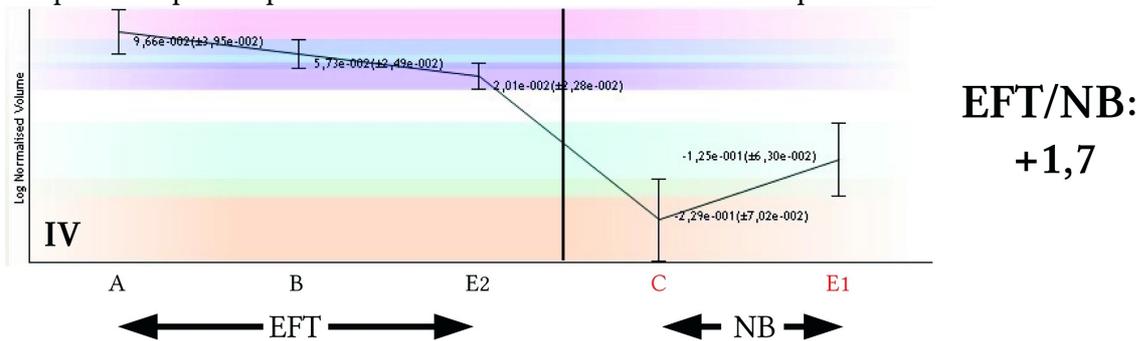
III: Spot Nr.26: 14-3-3 protein epsilon

IV: Expressionsprofil Complement component 1 Q subcomponent-binding protein (Spot Nr.25)

V: Expressionsprofil vonm 14-3-3 protein epsilon (Spot Nr.26)



Expressionsprofil Spot Nr.27: Chloride intracellular channel protein 1



Expressionsprofil Spot Nr.28: Nicht identifiziertes Protein

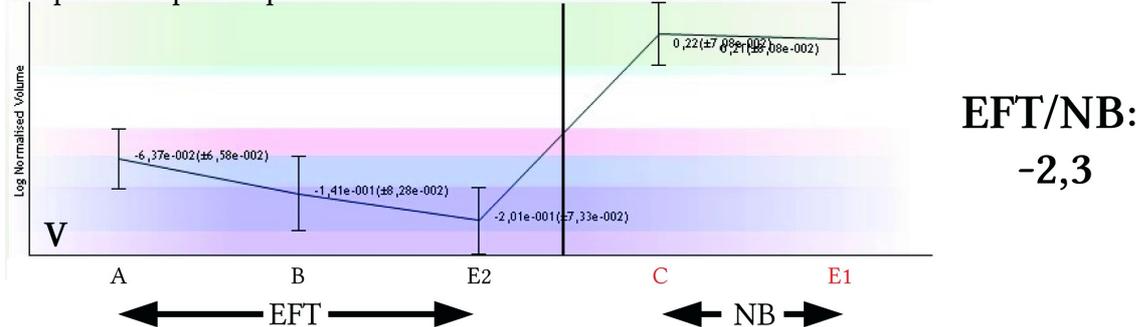
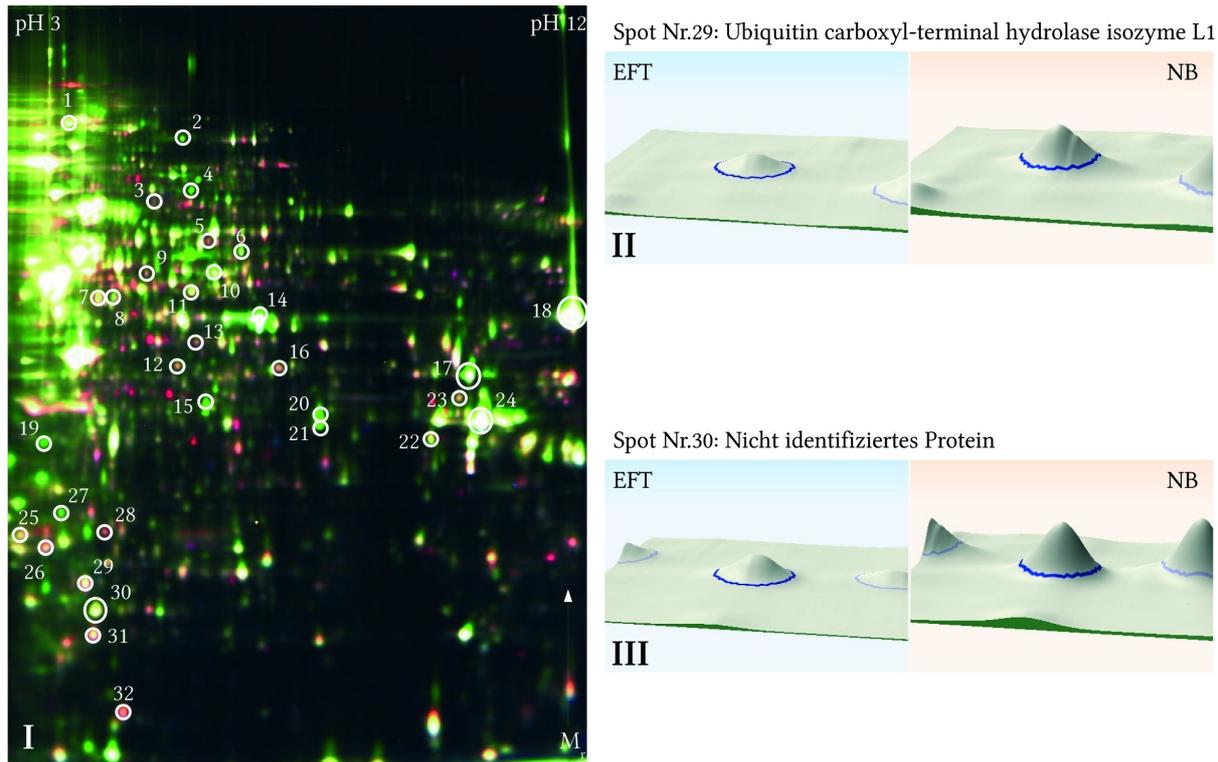
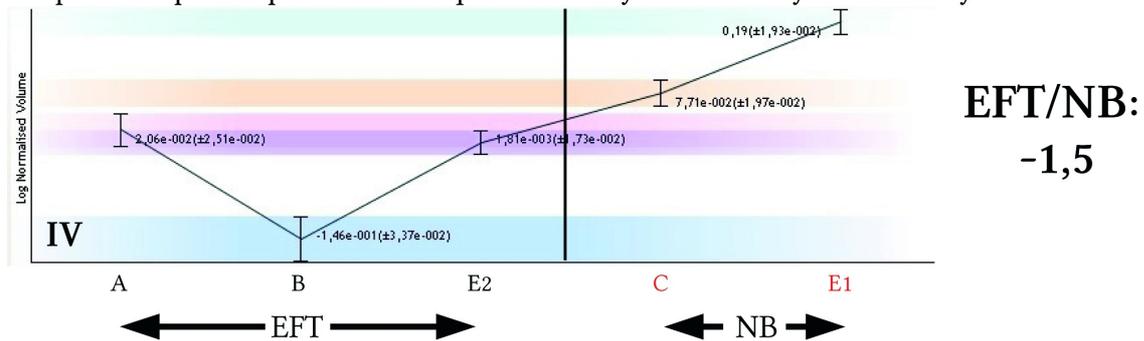


Abbildung 36: II: Spot Nr.27: Chloride intracellular channel protein 1
 III: Spot Nr.28: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil von Chloride intracellular channel protein 1 (Spot Nr.27)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.28)



Expressionsprofil Spot Nr.29: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1



Expressionsprofil Spot Nr.30: Nicht identifiziertes Protein

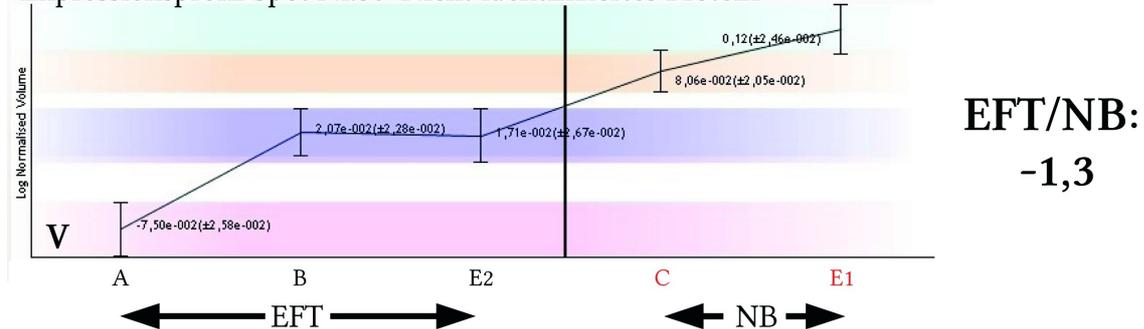
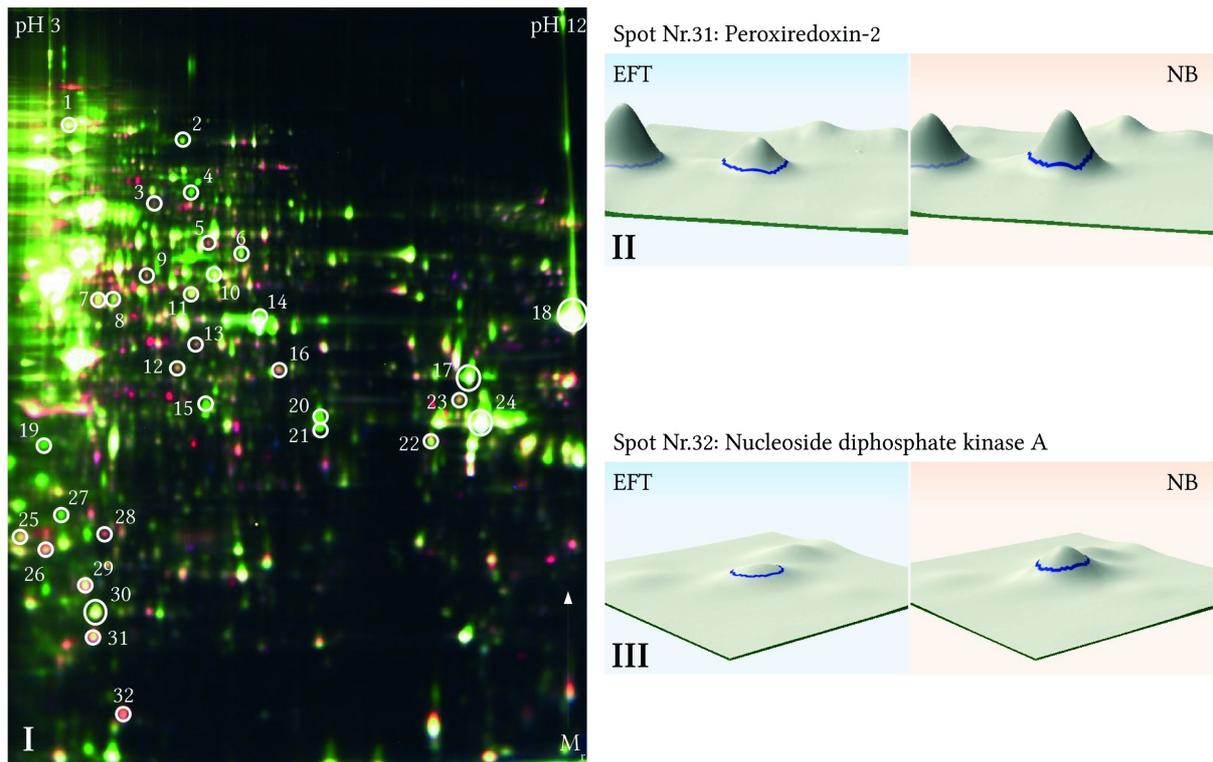


Abbildung 37: II: Spot Nr.29: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1

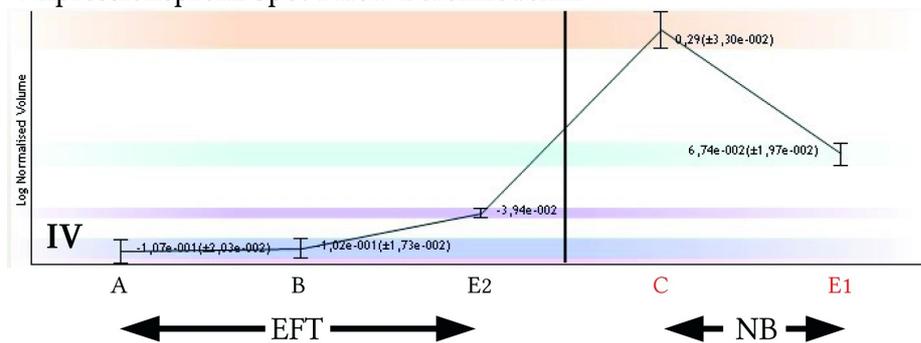
III: Spot Nr.30: Nicht identifiziertes Protein

IV: Expressionsprofil von Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1, (Spot Nr.29)

V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.30)

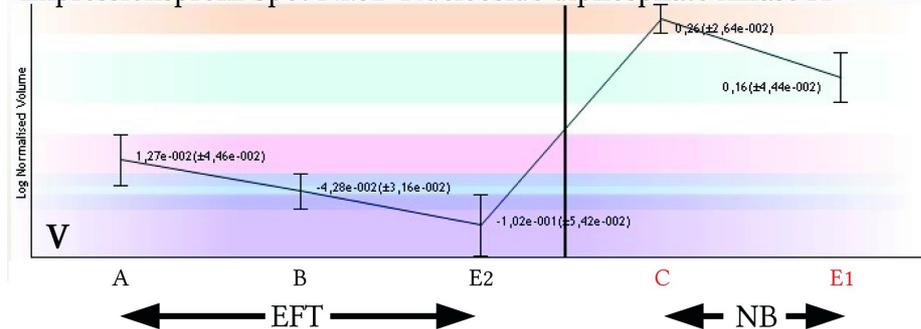


Expressionsprofil Spot Nr.31: Peroxiredoxin-2



**EFT/NB:
-1,9**

Expressionsprofil Spot Nr.32: Nucleoside diphosphate kinase A



**EFT/NB:
-1,8**

Abbildung 38: II: Spot Nr.31: Peroxiredoxin-2

III: Spot Nr.32: Nucleoside diphosphate kinase A

IV: Expressionsprofil von Peroxiredoxin-2 (Spot Nr.31)

V: Expressionsprofil der Nucleoside diphosphate kinase A, (Spot Nr.32)

Spot Nr.	Proteinname	Faktor (EFT/NB)	ANOVA	Power	q-Wert	pf-exp	MW-exp	pl-theor.	MW-theor.	Peptide	Score	Score C.I.%	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse
1	-	-1,3	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
2	-	+1,6	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
3	Sec1 family domain-containing protein 1	-5,8	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	6,0	75000	5,81	72371	14	189	100	Q8WVM8	-	
4	-	+6,5	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
5	-	-3,7	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
6	-	+1,6	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
7	-	-1,6	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
8	4-trimethylaminobutylaldehyde dehydrogenase	+1,5	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	5,6	52000	5,69	53802	10	176	100	P49189	Eo	
9	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	-1,6	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	5,9	58000	5,76	53159	12	161	100	P23381	Ei	
10	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	+1,8	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	6,6	55000	6,28	56643	6	82,2	99,91	O43175	Eo	
11	RuvB-like 1	-1,6	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	6,2	50000	6,02	50228	18	393	100	Q9Y265	Pp	
12	-	-1,7	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
13	-	+1,7	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
14	-	+2,0	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
15	Annexin A1	+3,1	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	6,5	38000	6,62	38709	16	394	100	P04083	Cb	Tc
16	-	-1,5	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
17	-	+1,8	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
18	Elongation factor 1-alpha 1	+1,5	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	9,9	46000	9,34	50135	6	172	100	P68104	Up	
19	-	+2,7	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
20	-	+3,3	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
21	Annexin A2	+2,5	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	8,3	38000	7,74	38599	18	348	100	P07355	Cb	Pp
22	-	-1,6	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
23	-	-1,5	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
24	-	+1,4	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
25	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	-1,8	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	3,8	30000	4,49	31358	4	127	100	Q07021	Cb	
26	14-3-3 protein epsilon	-2,0	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	4,2	29000	4,37	29170	8	131	100	P62258	Cb	
27	Chloride intracellular channel protein 1	+1,7	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	4,9	29000	4,86	26919	8	215	100	O00299	Cb	Tc
28	-	-2,3	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
29	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	-1,5	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	5,24	25000	5,16	24821	12	391	100	P09936	Eh	Pc
30	-	-1,3	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶										
31	Peroxiredoxin-2	-1,9	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	5,3	23000	5,53	21889	2	89	99,89	P32119	Cb	Eo
32	Nucleoside diphosphate kinase A	-1,8	< 1,1*10 ⁻¹⁶	≥0,995	< 1,1*10 ⁻¹⁶	5,7	19000	5,83	17149	8	278	100	P15531	Cb	Et

Tabelle 30: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien im pH-Bereich 3-12. Die Spalte Faktor gibt den durchschnittlichen Regulierungsfaktor des Proteins an, pI den isoelektrischen Punkt, MW das Molekulargewicht an. Die Spalte Power zeigt die Teststärke an, der q-Wert die zu erwartenden falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Ergebnisse. Die Abkürzungen exp. und theor. stehen für experimentell ermittelte bzw. theoretische Werte. Peptide gibt die Anzahl der durch peptide mass fingerprint zuordenbare Peptide des Proteins an, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Proteinidentifizierung in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.

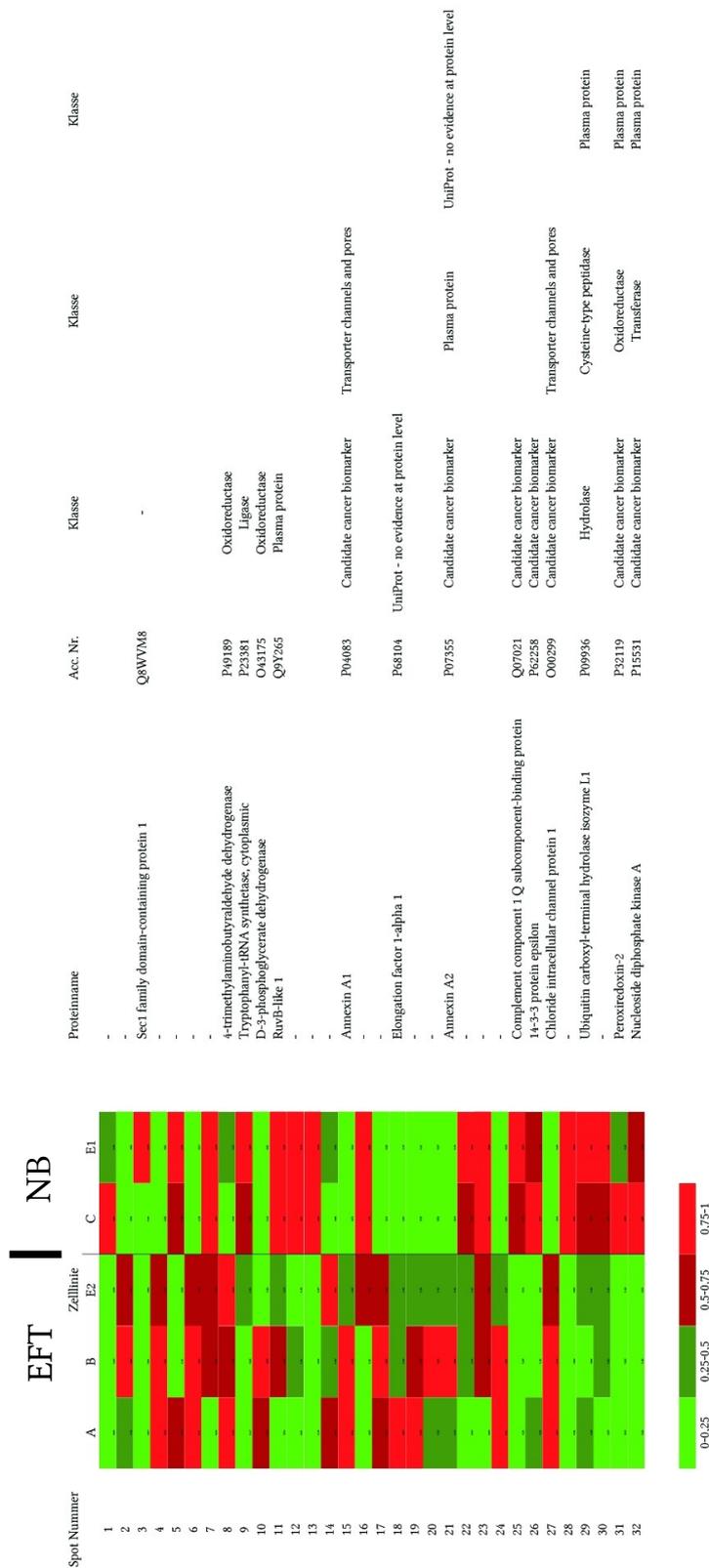


Abbildung 39: Heatmap der differentiell regulierten Proteine im pH-Bereich 3-12. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.

Diese 32 differentiell regulierten Proteine bildeten die Grundlage für das nächste DIGE-Experiment, bei dem die Anzahl der verwendeten Zelllinien auf sechs EFT und drei Neuroblastome erhöht wurde. Durch den Vergleich der Ergebnisse dieses Experiments mit denen des Kapitels 5.4 ist es möglich, den Anteil von falsch-positiv als differentiell reguliert angesehener Proteine bei kleiner Anzahl von verglichenen Zelllinien zu bestimmen. Dadurch lässt sich die Größenordnung von falsch-positiven Ergebnissen in anderen Versuchsaufbauten zumindest vermuten, bei denen die Anzahl der Zelllinien begrenzt ist. Dies ist somit auch ein Schritt in die Festlegung einer Mindestanzahl von Zelllinien/Proben für die differentielle Proteomanalyse von komplexen Systemen um Abseits von statistischen Ausschlussgrößen (q -Wert), falsch-positive Ergebnisse zu minimieren, ohne den Versuchsaufbau übermäßig aufzublähen.

5.5 Differentiell exprimierte Proteine von 6 EFT- und 3 NB- Zelllinien im pH-Bereich 3-12

In diesem DIGE-Experiment wurde die Anzahl der verwendeten EFT-Zelllinien auf sechs erhöht, die Anzahl der verwendeten NB-Zelllinien auf drei. Sämtliche Zelllinien wurden für diesen Versuch neu angezchtet um genügend Probenmaterial für alle Versuche, einschließlich der 2D-*Western-blot*s des Kapitels 5.10 zu haben. Dies geschah in Übereinstimmung mit der Arbeitsgruppe von Prof. Burdach, die die gleichen Zelllinien einer differentiellen mRNA-Analyse unterzogen. Dies sollte zusätzlich auch die Anzahl der falsch-positiv als differentiell reguliert angesehenen Proteine absenken, sowie die restlichen Ergebnisse der Kapitels 5.4 bestätigen.

Um die differentiell exprimierten Proteine zwischen den EFT- und Neuroblastom-Zelllinien zu detektieren wurden 27 DIGE-Gele angefertigt, eingescannt (Abbildungen 40-44) und ausgewertet (Abbildungen 46-50). Die Zusammenstellung des Labeling-Schemas ergab sich aus der Notwendigkeit nicht nur durch eine Dreifachbestimmung technische Varianzen einzudämmen, sondern auch durch die Herannahme von zwei biologischen Replikaten einer Zelllinie, biologische Varianzen zu nivellieren. Auf der technologischen Seite mussten die Abweichungen der Cy3 und Cy5 Farbstoffe durch einen sogenannten *dye-swap* ausgeglichen

werden. Beim *dye-swap* wird innerhalb einer Testgruppe sowohl Cy3 als auch Cy5 verwendet um die Signalvarianzen einzudämmen [174]. Dadurch lässt sich auch der kleinste Regulierungsfaktor, der noch als differentielle Regulierung erkannt wird, absenken [174]. Ein *dye-swap* innerhalb eines biologischen Replikats einer Zelllinie hätte jedoch die Anzahl der anzufertigenden 2D-Gele um ein Drittel erhöht, was die Versuchsdurchführung stark verkompliziert hätte. Somit wurde der *dye-swap* zwischen zwei biologischen Replikaten einer Zelllinie durchgeführt. Als weiteres wurde noch das Konzept des *internal pooled standards* (IPS) verwendet, in dem sämtliche verwendeten Zelllinien inklusive deren biologischen Replikate zu gleichen Proteinanteilen enthalten sind. Dies ermöglicht eine genaue Quantifizierung der Signalstärken der mit Cy3 und Cy5 *gelabelten* Proteine [141].

In Tabelle 32 ist das Probenauftragsschema der angefertigten 2D-Gele mit den jeweiligen Zelllinien und deren *CyDye-labeling* kurz dargestellt.

Die Trennung der Proteine erfolgte durch IPG 3-12 und SDS-Gelen mit T= 12%. Es wurden 50 µg der jeweiligen *Cy-Dye* gelabelten Probe (siehe Kapitel 4.7.1) durch anodales *cup-loading* auf den IPG-Streifen aufgetragen. Die Laufparameter sind in Tabelle 11 (Kapitel 4.4) dargestellt.

Zur Analyse wurden die 2D-DIGE-Gele mit einem Ettan DIGE Imager eingescannt (Parameter siehe Kapitel 4.8.1) und die Bilddateien in die Software „Progenesis“ geladen. Es wurden ausschließlich Proteine als differentiell exprimiert angesehen, die folgende Kriterien erfüllten: ANOVA <0,05; Power ≥ 0,80 und ein konsistentes Expressionsniveau innerhalb beider Tumorarten.

Zur Identifikation der differentiell exprimierten Proteinen wurden 3 2D-Gele (IPG 3-12, *anodales cup-loading*, SDS-Gele mit T=12%, Laufparameter siehe Kapitel 4.4) mit 500 µg Proteinbeladung hergestellt (Eingesetzte Zelllinien und deren Anteil an der Gesamtproteinbeladung siehe Kapitel 5.1.1). Anschließend wurden die Proteine auf den 2D-Gele mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt, die als differentiell exprimiert detektierten Proteine ausgestanzt und mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Die Abbildungen 40-44 zeigen die einzelnen angefertigten, eingescannten DIGE-Gele die für die Analyse mit der Software Progenesis verwendet wurden. Wie aus den Abbildungen 46-50 ersichtlich, konnten zehn zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien differentiell exprimierte Proteine im pH-Bereich 3-12 detektiert werden, deren Expressionsniveau in beiden Tumorarten konsistent ist. Von diesen zehn Proteinen konnten 8 durch MALDI-Massenspektrometrie identifiziert werden. Diese Proteine sind den Klassen der Enzyme, Plasmaproteine, Transporter und potentiellen Krebsbiomarkern zuzuordnen.

Somit konnte die Zahl der als differentiell reguliert detektierten Proteine im Vergleich zum Versuch in Kapitel 5.4 um 22 gesenkt werden. Von den zehn hier detektierten Proteinen, sind zwei bereits im DIGE-Experiment des Kapitels 5.4 detektiert worden. Auf diesen Sachverhalt wird auf Seite 149 näher eingegangen. Auf den Abbildungen 46-50 ist sowohl die Lage des Proteins auf den 2D-Gelen, die 3-dimensionale Darstellung des Proteinspots auf dem 2D-Gel, als auch das Profil der Signalsstärke des Proteins in den einzelnen Zelllinien ersichtlich. Die Kürzel entsprechen denen in Tabelle 31 angegebenen Zelllinien. Der durchschnittliche Regulierungsfaktor dieser Proteine bewegt sich zwischen 1,6 und 3,8. Zur besseren Übersicht wurde eine *Heatmap* der differentiell regulierten Proteine erstellt (Abbildung 51).

Die nachfolgende Tabelle 33 listet die differentiell exprimierten Proteine zwischen den EFT- und Neuroblastomzelllinien auf. Die Proteine mit der Bezeichnung „Spot Nr.1“ und „Spot Nr. 10“ konnten nicht identifiziert werden.

Zelllinie	Kürzel	Tumorart
A673	A	EFT
SBSR-AKS	B	EFT
SiMa	C	NB
SK-ES1	D	EFT
SH-SY5Y	E1	NB
SK-N-MC	E2	EFT
MHH-ES1	F	EFT
MHH-NB11	G	NB
TC-71	H	EFT

Tabelle 31: Verwendete Zelllinien und ihre jeweiligen Kürzel.

Gel Nummer	Cy3 gelabelte Probe	Cy5 gelabelte Probe	Cy2 gelabelte Probe
01	A-1 (EFT)	B-1 (EFT)	<i>IPS</i>
02	A-1 (EFT)	B-1 (EFT)	<i>IPS</i>
03	A-1 (EFT)	B-1 (EFT)	<i>IPS</i>
04	B-2 (EFT)	C-1 (NB)	<i>IPS</i>
05	B-2 (EFT)	C-1 (NB)	<i>IPS</i>
06	B-2 (EFT)	C-1 (NB)	<i>IPS</i>
07	C-2 (NB)	D-1 (EFT)	<i>IPS</i>
08	C-2 (NB)	D-1 (EFT)	<i>IPS</i>
09	C-2 (NB)	D-1 (EFT)	<i>IPS</i>
10	D-2 (EFT)	E1-1 (NB)	<i>IPS</i>
11	D-2 (EFT)	E1-1 (NB)	<i>IPS</i>
12	D-2 (EFT)	E1-1 (NB)	<i>IPS</i>
13	E1-2 (NB)	E2-1 (EFT)	<i>IPS</i>
14	E1-2 (NB)	E2-1 (EFT)	<i>IPS</i>
15	E1-2 (NB)	E2-1 (EFT)	<i>IPS</i>
16	E2-2 (EFT)	F-1 (EFT)	<i>IPS</i>
17	E2-2 (EFT)	F-1 (EFT)	<i>IPS</i>
18	E2-2 (EFT)	F-1 (EFT)	<i>IPS</i>
19	F-2 (EFT)	G-1 (NB)	<i>IPS</i>
20	F-2 (EFT)	G-1 (NB)	<i>IPS</i>
21	F-2 (EFT)	G-1 (NB)	<i>IPS</i>
22	G-3 (NB)	H-1 (EFT)	<i>IPS</i>
23	G-3 (NB)	H-1 (EFT)	<i>IPS</i>
24	G-3 (NB)	H-1 (EFT)	<i>IPS</i>
25	H-2 (EFT)	A-2 (EFT)	<i>IPS</i>
26	H-2 (EFT)	A-2 (EFT)	<i>IPS</i>
27	H-2 (EFT)	A-2 (EFT)	<i>IPS</i>

Tabelle 32: Für die jeweiligen 2D-DIGE-Gele verwendete Proben. Die Kürzel A-H stehen für die einzelnen Zelllinien, die Ziffern für das jeweilige biologische Replikat, dahinter die Tumorart. *IPS*= Internal pooled standard

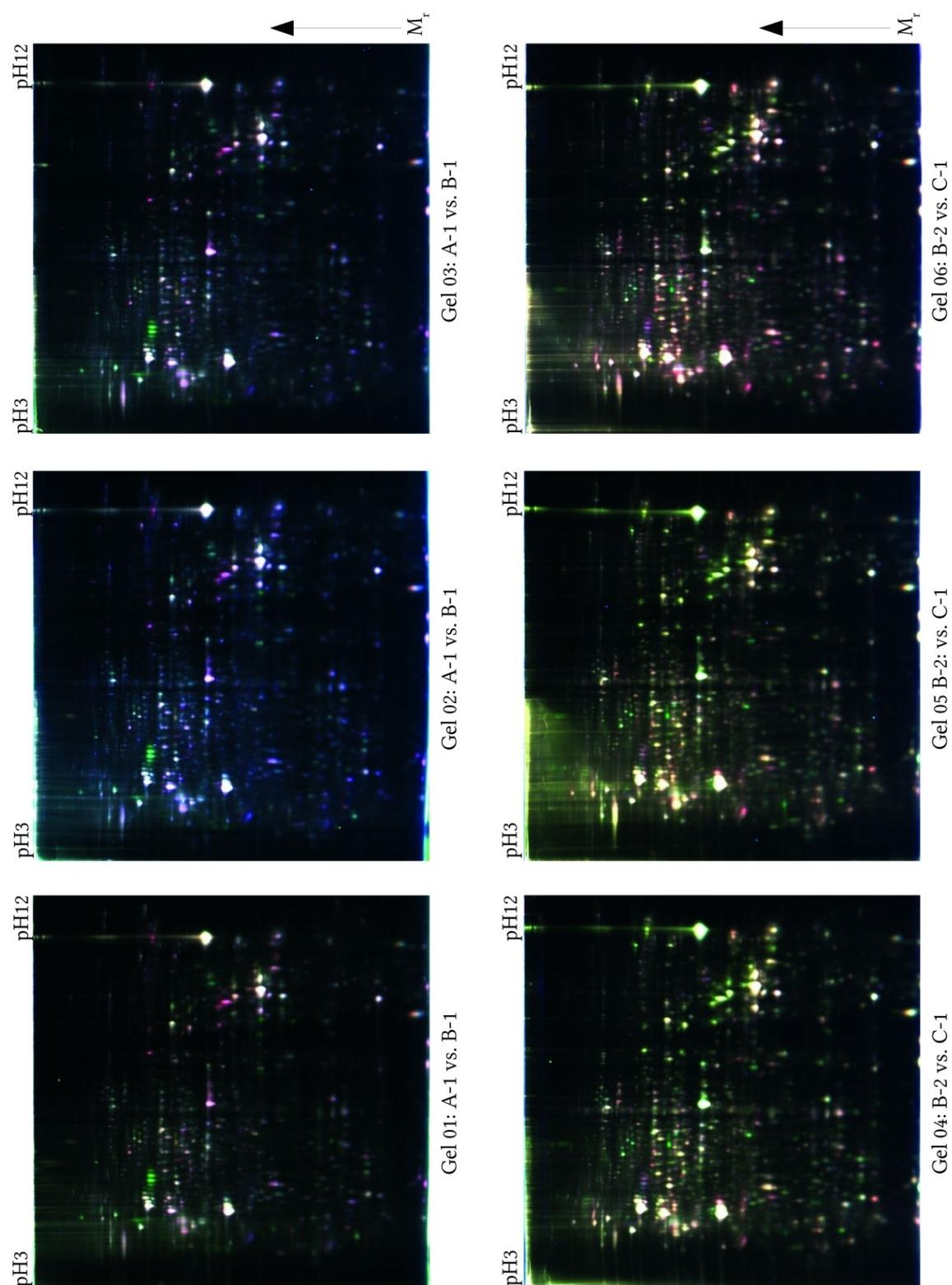


Abbildung 40: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel01-Gel03: A-1 (EFT) vs. B-1 (EFT)

Gel04-Gel06: B-2 (EFT) vs. C-1 (NB)

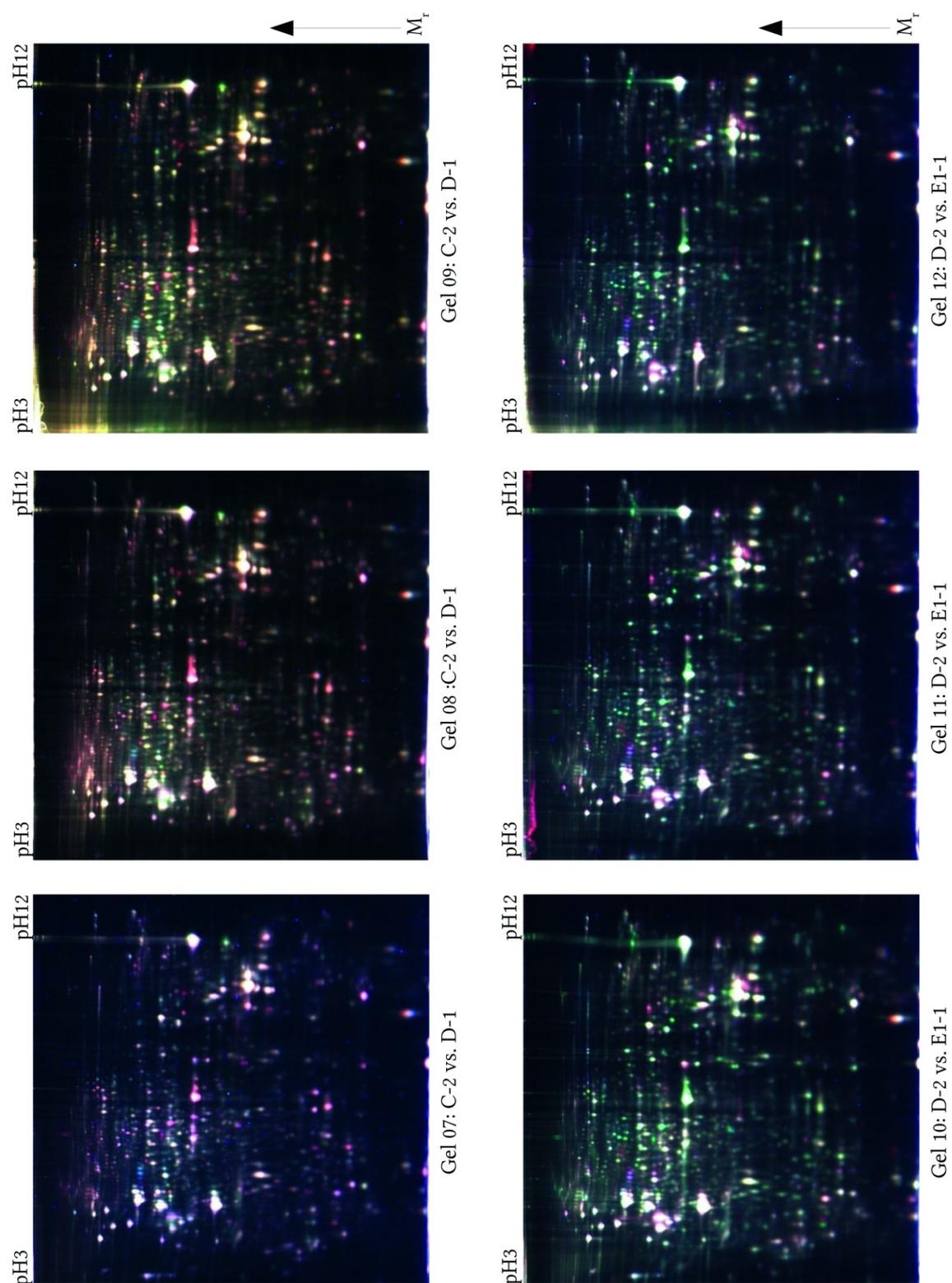


Abbildung 41: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des .internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel07-Gel09: C-2 (NB) vs. D-1 (EFT)

Gel10-Gel12: D-2 (EFT) vs. E1-1 (NB)

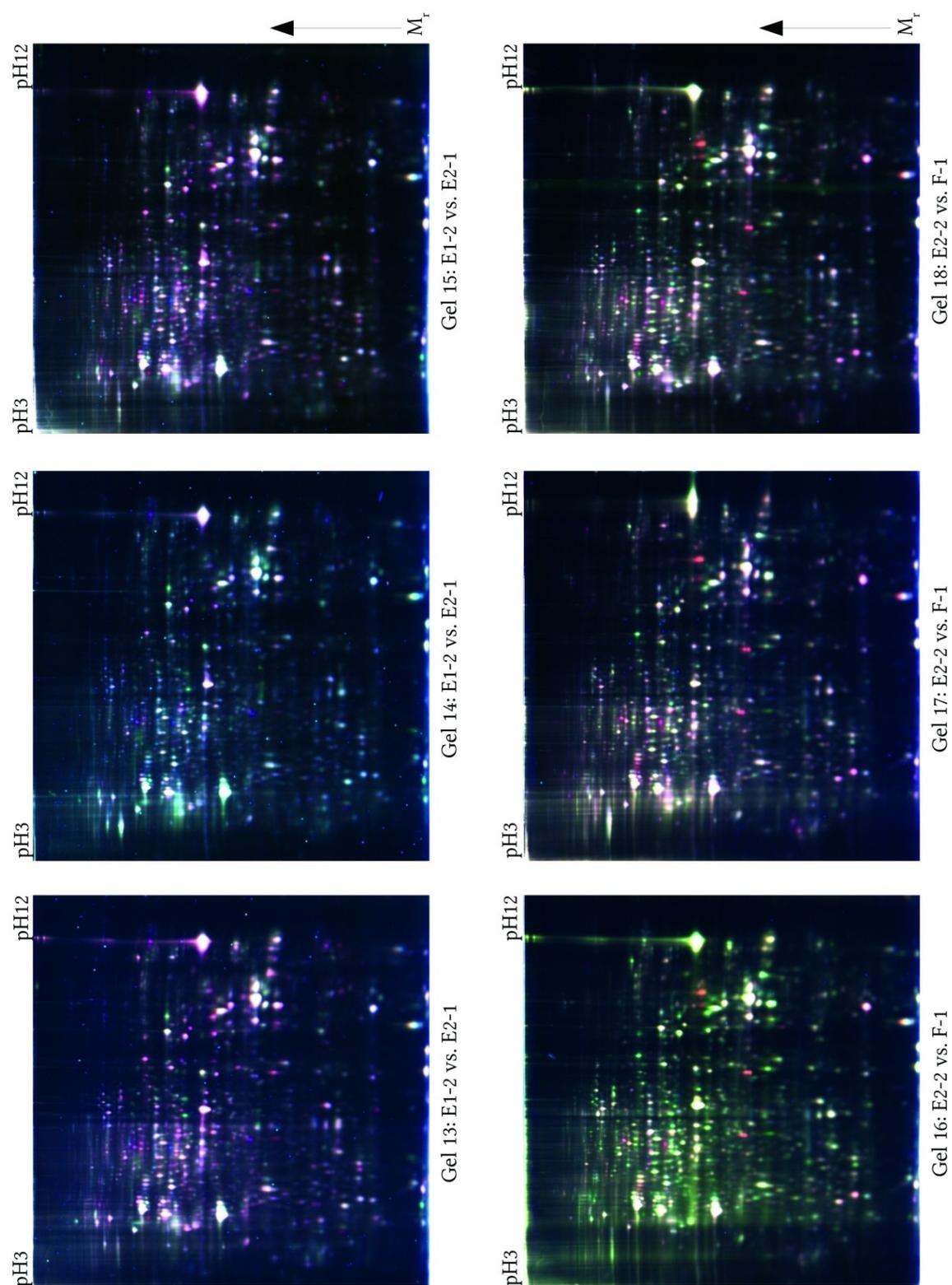


Abbildung 42: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des .internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel13-Gel15: E1-2 (NB) vs. E2-1 (EFT)

Gel16-Gel18: E2-2 (EFT) vs. F-1 (EFT)

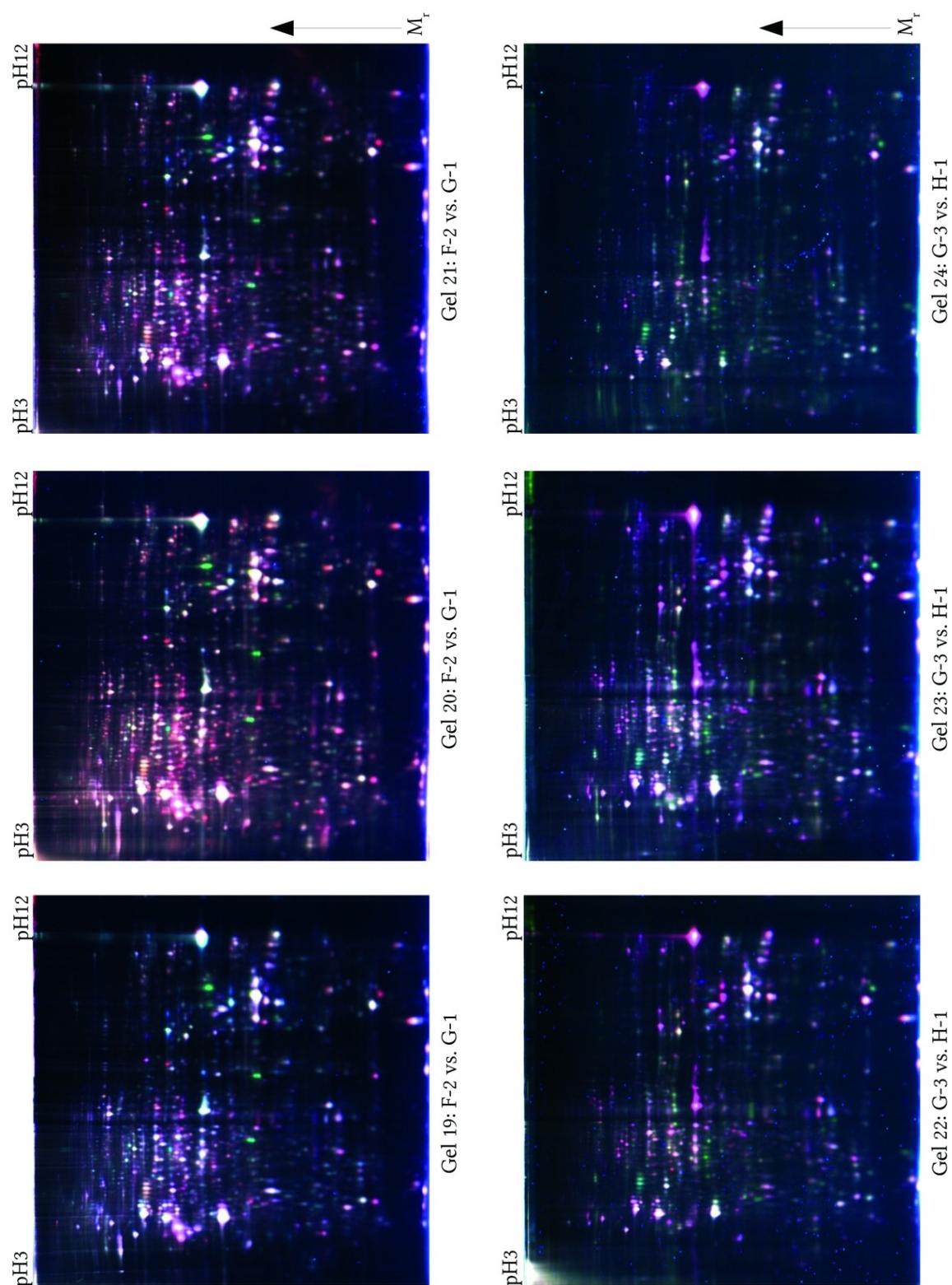


Abbildung 43: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des .internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel19-Gel21: F-2 (EFT) vs. G-1 (NB)

Gel22-Gel24: G-2 (NB) vs. H-1 (EFT)

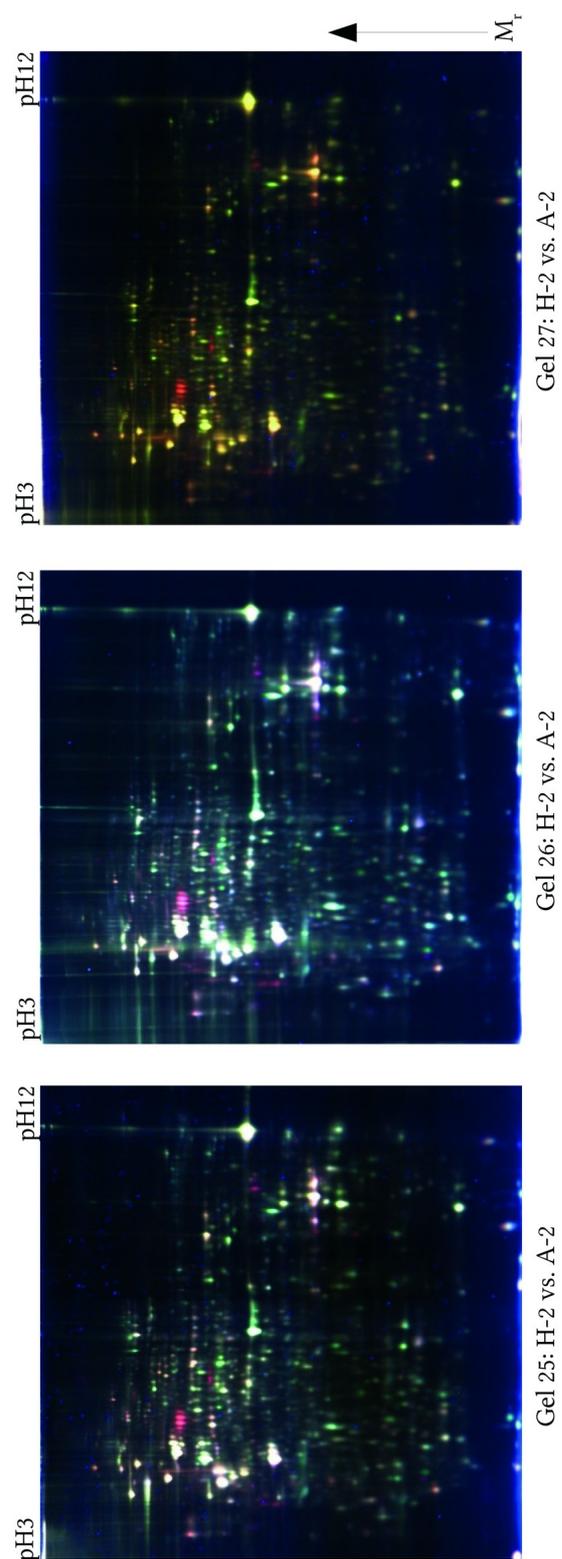


Abbildung 44: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 3-12 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des .internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel25-Gel27: H-2 (EFT) vs. A-2 (EFT)

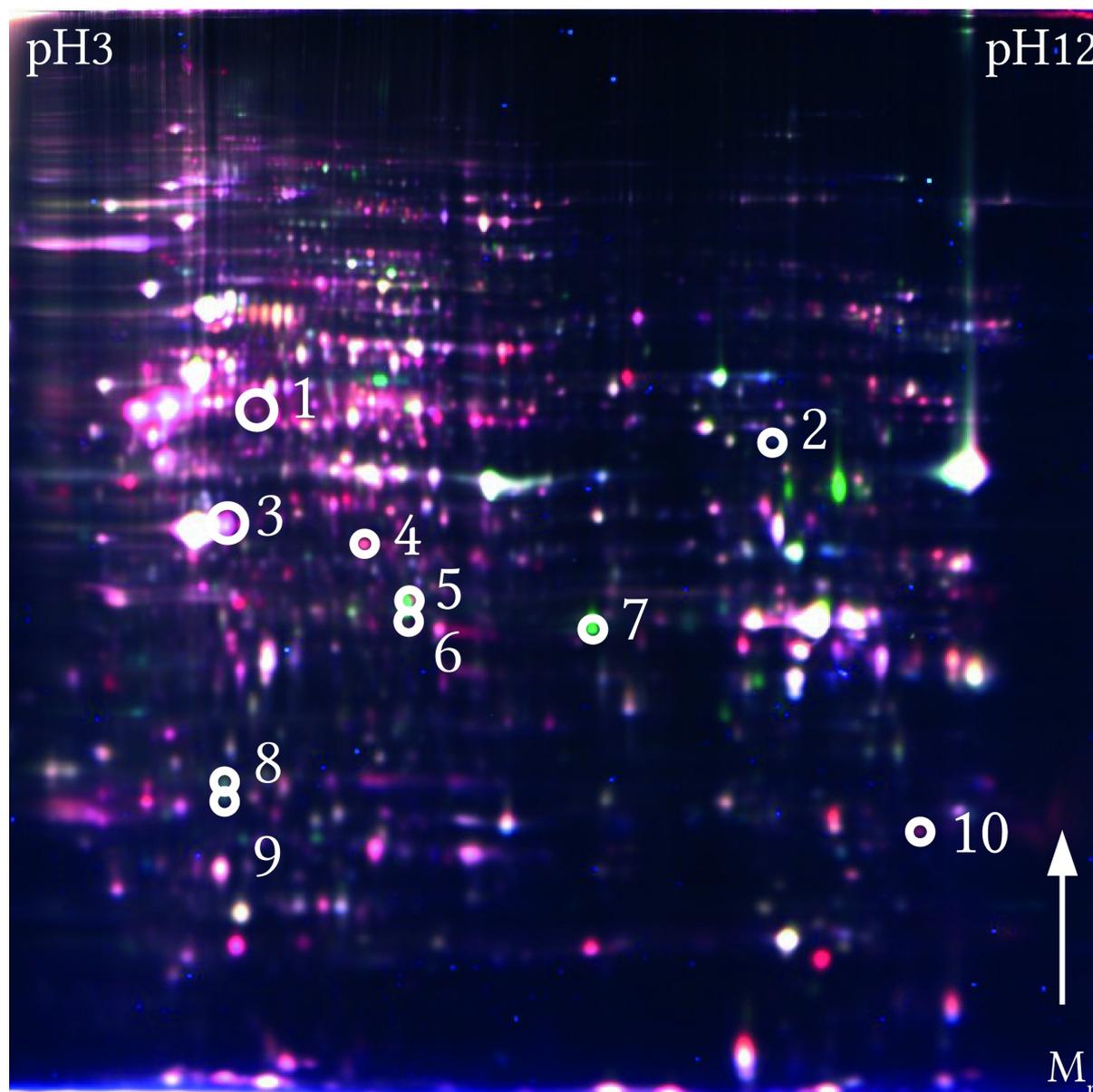


Abbildung 45: Übersicht der mit DIGE detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen den EFT- und NB-Zelllinien mit IPG 3-12. Nummern korrespondieren mit den in Tabelle 33 und Abbildung 51 angegebenen Proteinen.

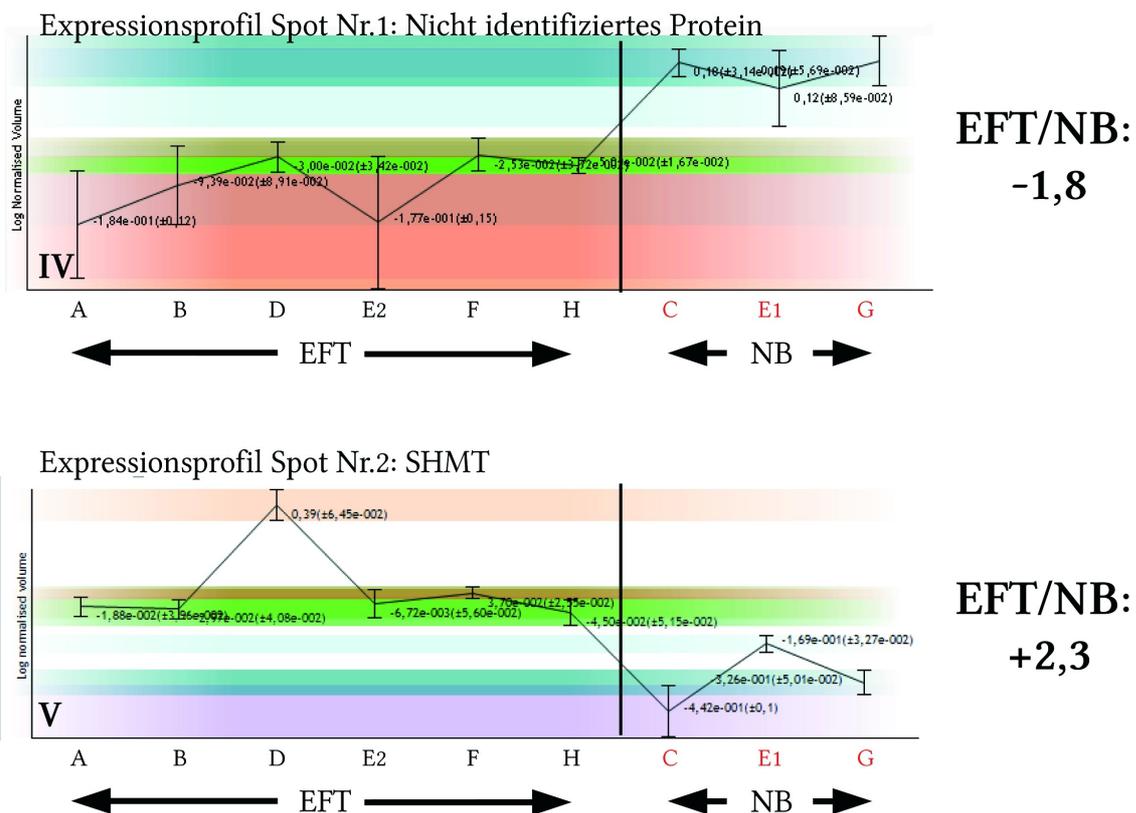
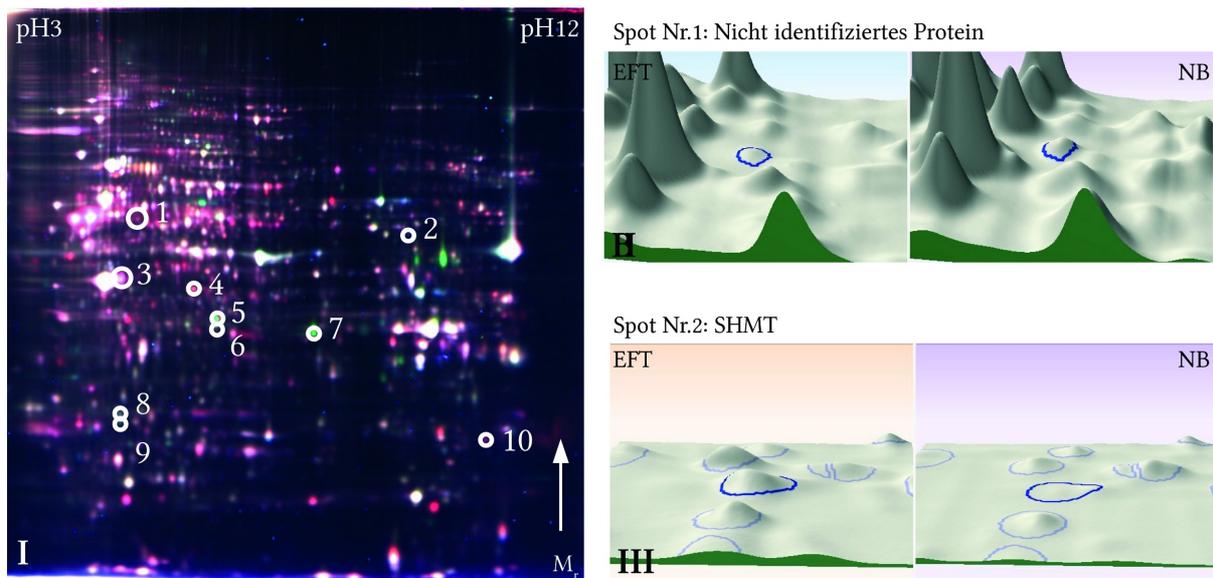


Abbildung 46: I: Repräsentatives DIGE Gel IPG 3-12, mit eingezeichneten, differenziell regulierten Spots. II und III: 3D-Darstellung der jeweiligen Proteinspots. IV+V: Expressionsprofil des jeweiligen Proteinspots, d.h. sein Expressionsniveau in den jeweiligen Zelllinien (biologische Replikate wurden in dieselbe Gruppe aufgenommen), NB-Zelllinien sind in roter Schrift dargestellt. Regulierungsfaktor des Proteins rechts neben dem Expressionsprofil. Die Abkürzungen der Zelllinien sind in Tabelle 31 aufgeführt.

II: Spot Nr.1: Nicht identifiziertes Protein

III: Spot Nr.2: SHMT, Regulierungsfaktor

IV: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins, (Spot Nr.1)

V: Expressionsprofil von SHMT (Spot Nr.2)

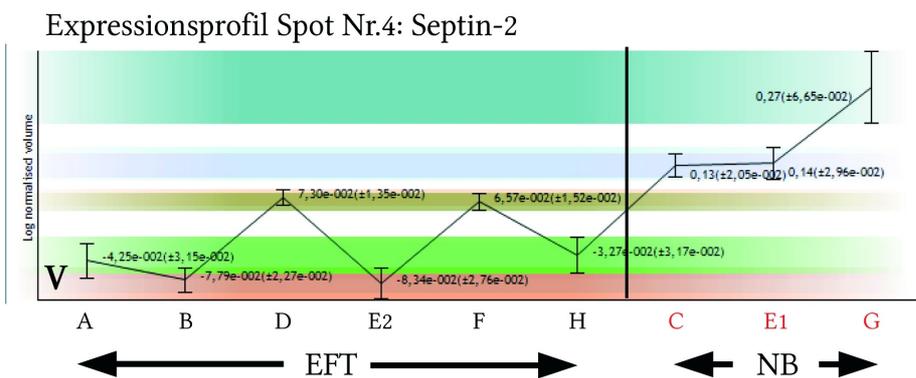
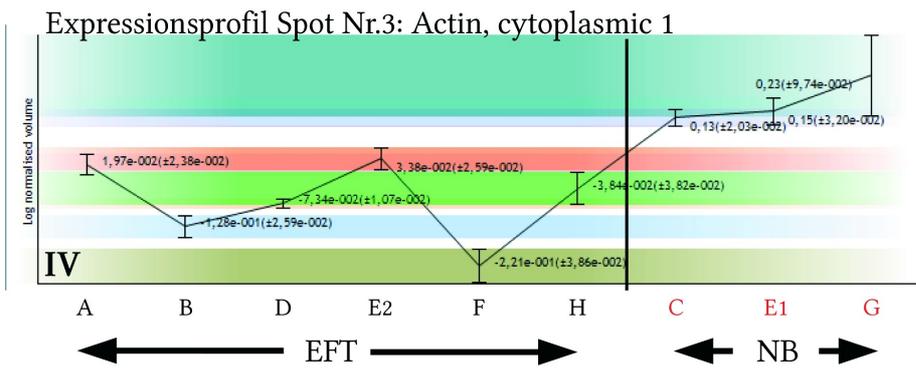
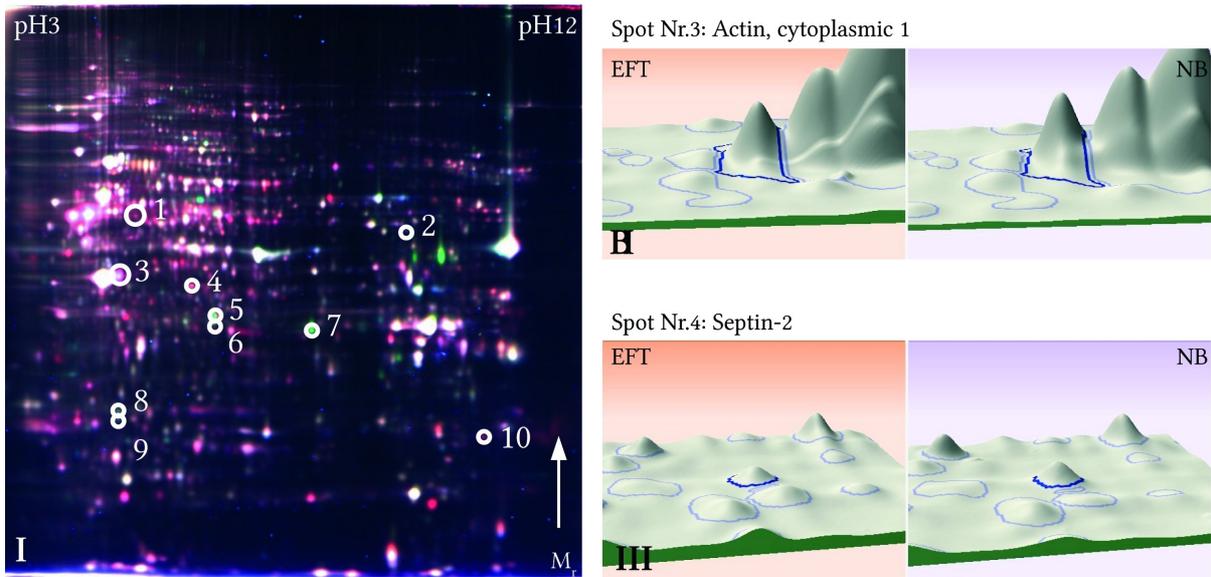


Abbildung 47: II: Spot Nr.3: Actin, cytoplasmic 1
 III: Spot Nr.4: Septin-2
 IV: Expressionsprofil von Actin, cytoplasmic 1, (Spot Nr.3)
 V: Expressionsprofil von Septin-2 (Spot Nr.4)

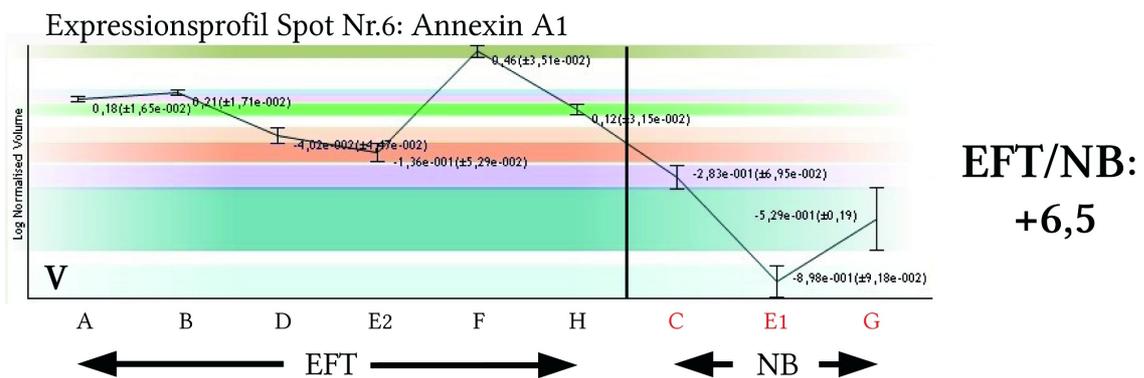
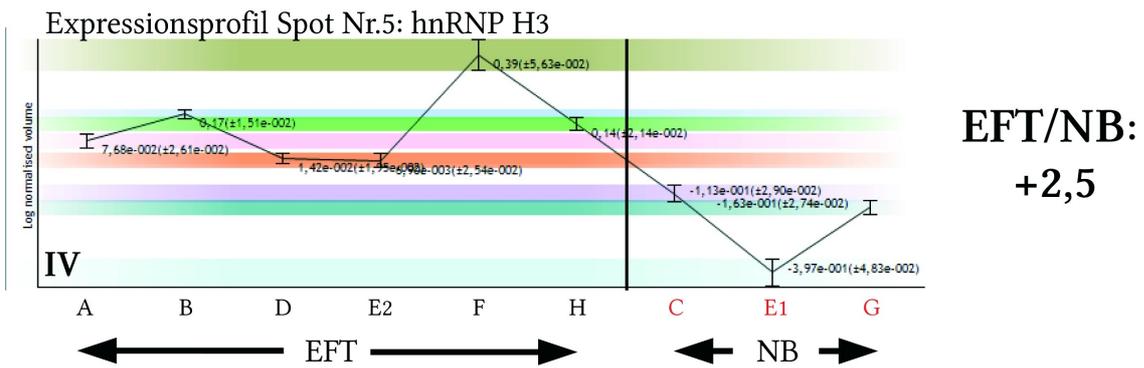
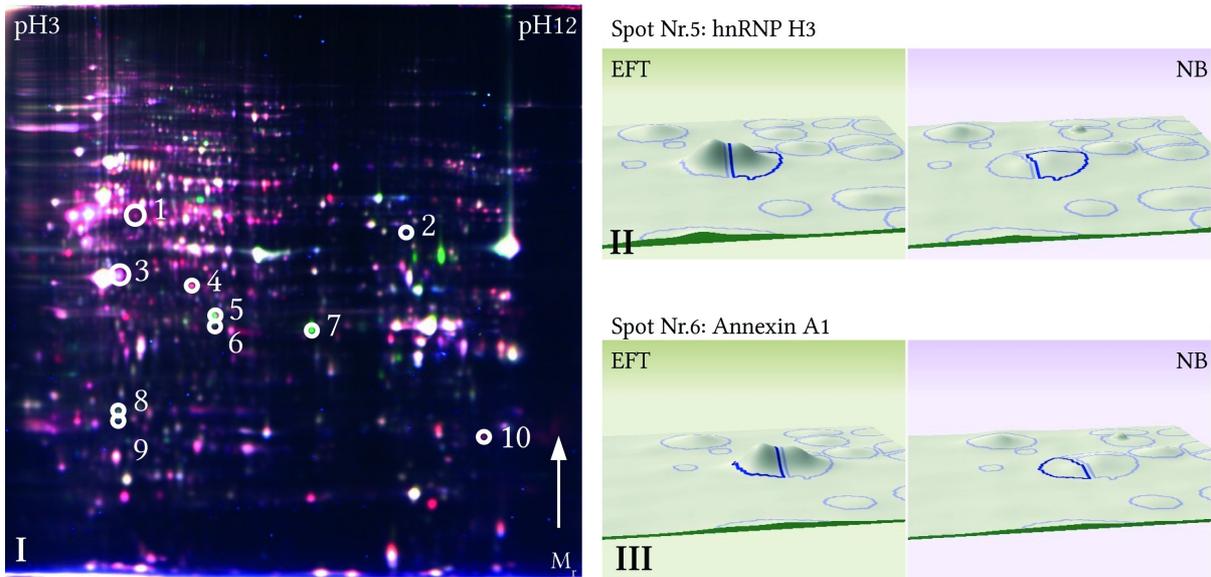


Abbildung 48: II: Spot Nr.5: hnRNP H3
 III: Spot Nr.6: Annexin A1
 IV: Expressionsprofil von hnRNP H3, (Spot Nr.5)
 V: Expressionsprofil von Annexin A1 (Spot Nr.6)

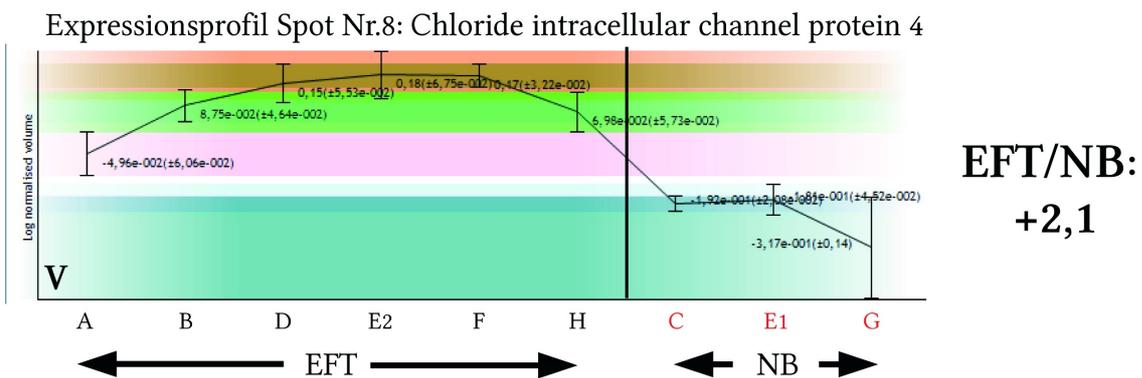
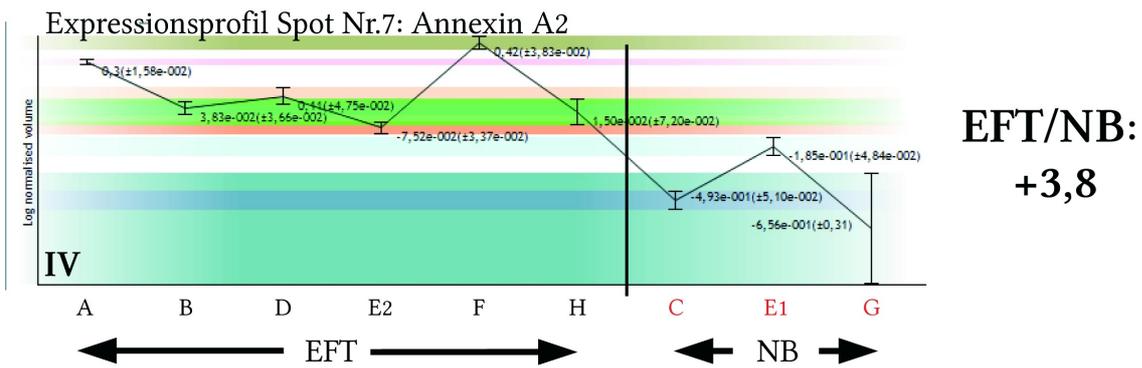
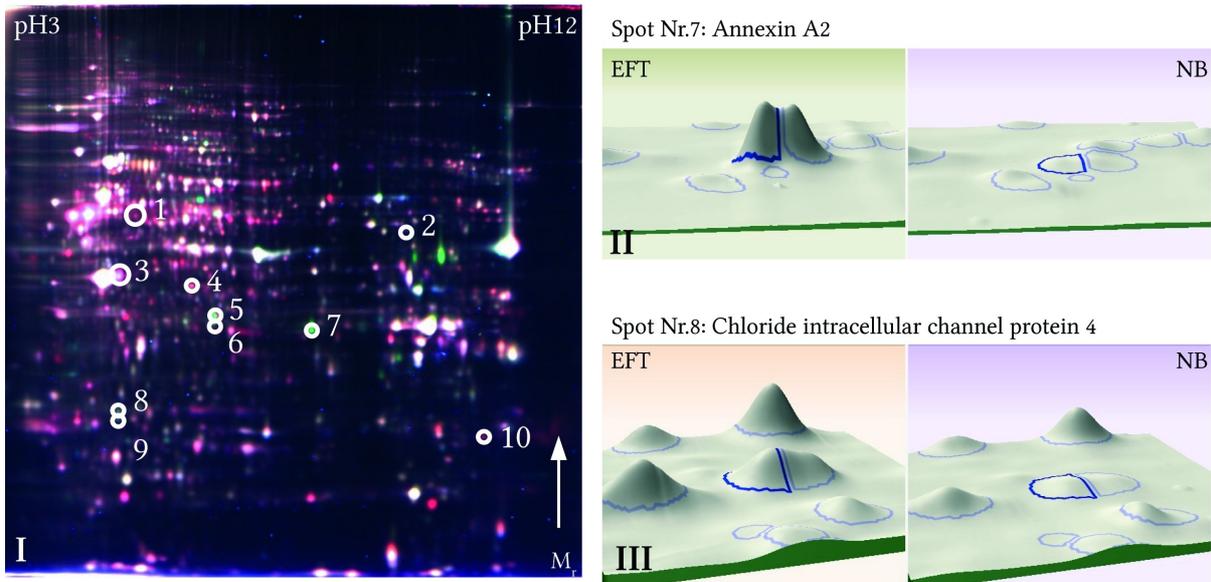


Abbildung 49: II: Spot Nr.7: Annexin A2
 III: Spot Nr.8: Chloride intracellular channel protein 4
 IV: Expressionsprofil von Annexin A2, (Spot Nr.7)
 V: Expressionsprofil von Chloride intracellular channel protein 4 (Spot Nr.8)

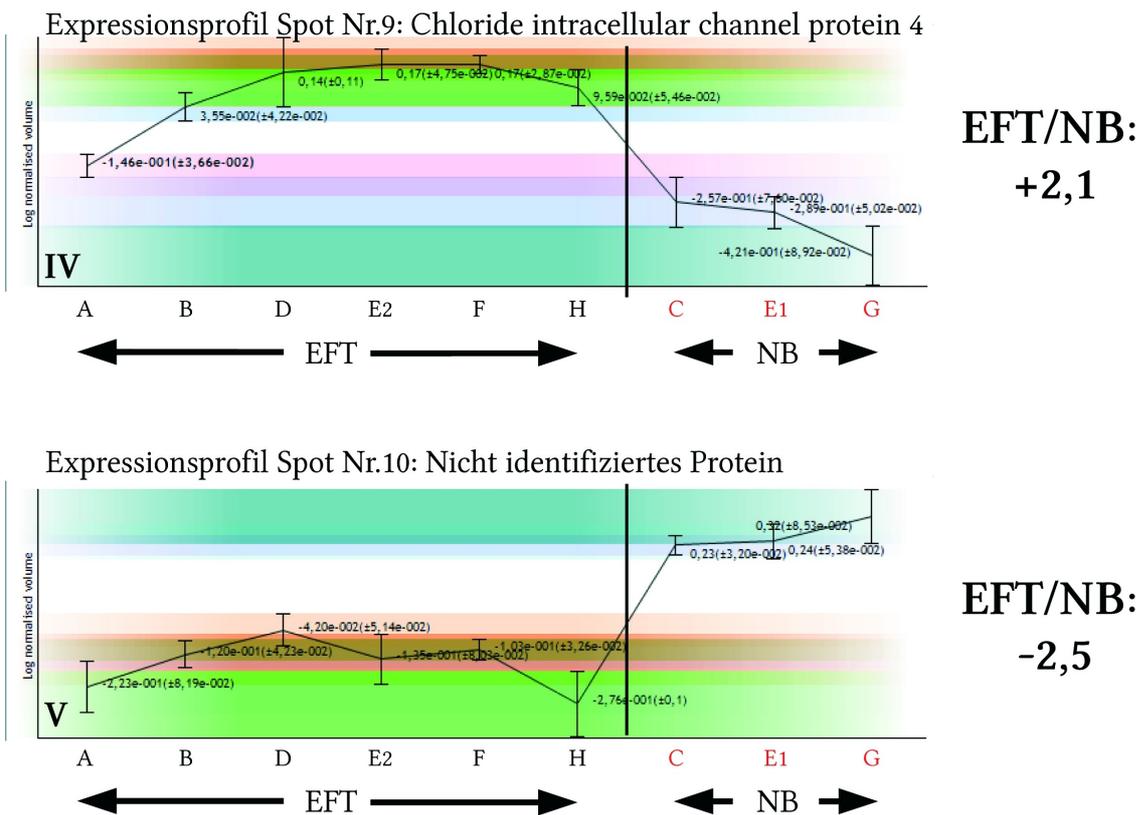
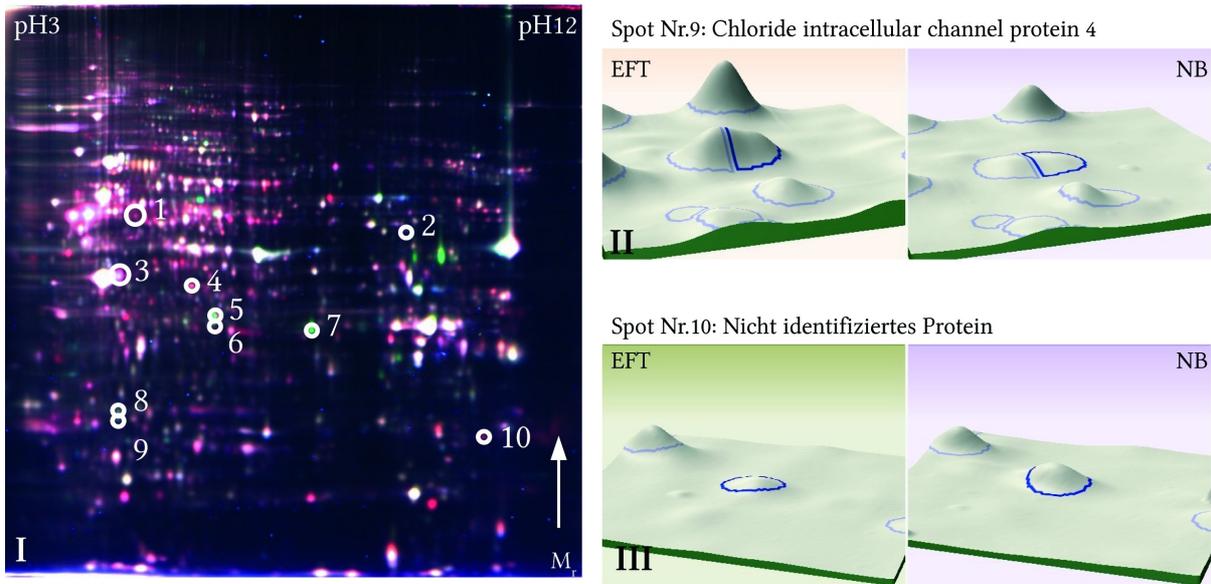


Abbildung 50: II: Spot Nr.9: Chloride intracellular channel protein 4
 III: Spot Nr.10: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil von Chloride intracellular channel protein 4, (Spot Nr.9)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.10)

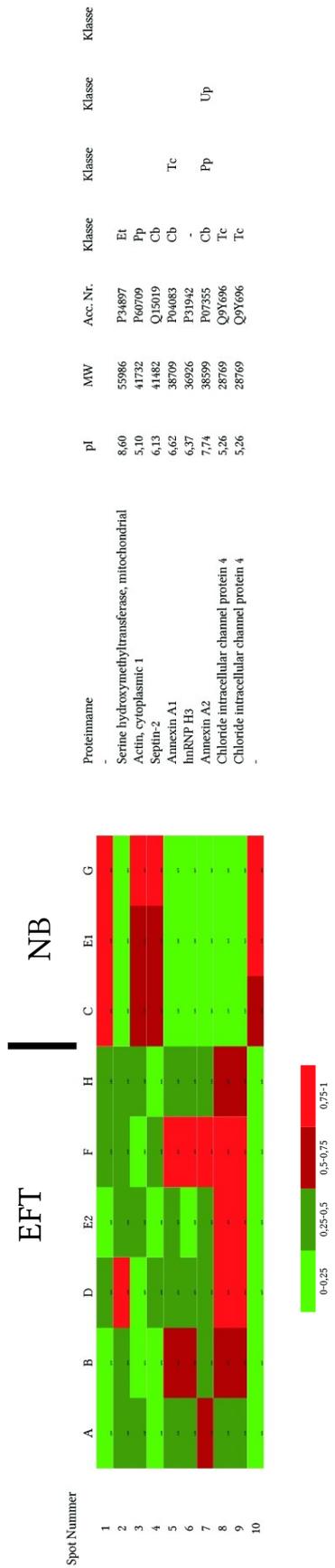


Abbildung 51: Heatmap der differentiell regulierten Proteine zwischen EFT- und NB-Zelllinien im pH-Bereich 3-12. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.

Spot-Nummer	Protein	Faktor (EFT/NB)	Anova	Power	q	pI-exp.	MW-exp.	pI-theor.	MW-theor.	Peptide	Score	Score C.I.%	Uniprot Acc. No.	Klasse	Klasse
1	Nicht identifiziertes Protein	-1,8	$1,3 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	SHMT	2,3	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	9,2	52000	8,76	55993	21	376	100	P34897	Et	
3	Actin, cytoplasmic 1	-1,8	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	5,2	43000	5,29	41737	12	359	100	P60709	Pp	
4	Septin-2	-1,6	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	6,2	42000	6,15	41487	10	311	100	Q15019	Cb	
5	hnRNP H3	2,5	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	6,8	38000	6,37	36926	9	196	100	P31942	-	
6	Annexin A1	6,5	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	6,5	38000	6,62	38709	16	394	100	P04083	Cb	
7	Annexin A2	3,8	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	8,3	38000	7,57	38604	18	348	100	P07355	Cb	
8	CLIC 4	2,1	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	5,28	27000	5,45	28772	6	202	100	Q9Y696	Tc	
9	CLIC 4	2,1	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	5,28	27000	5,45	28772	6	198	100	Q9Y696	Tc	
10	Nicht identifiziertes Protein	-2,5	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$< 1,1 \cdot 10^{-16}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Up

Tabelle 33: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3-12 zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die Spalte Faktor gibt den Regulierungsfaktor des Proteins an, pI den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.

Die Ergebnisse dieses DIGE-Versuchs mit 6 EFT- und 3 Neuroblastomzelllinien wurden mit den Ergebnissen des vorhergehenden DIGE-Versuchs mit 3 EFT- und 2 Neuroblastomzelllinien abgeglichen und die Expressionsprofile der zuvor als differentiell detektierten Spots mit ihren Expressionsprofilen unter Hinzunahme der weiteren Zelllinien verglichen. Die Darstellung ist als *Heatmap* konzipiert um eine größtmögliche Übersichtlichkeit zu gewährleisten.

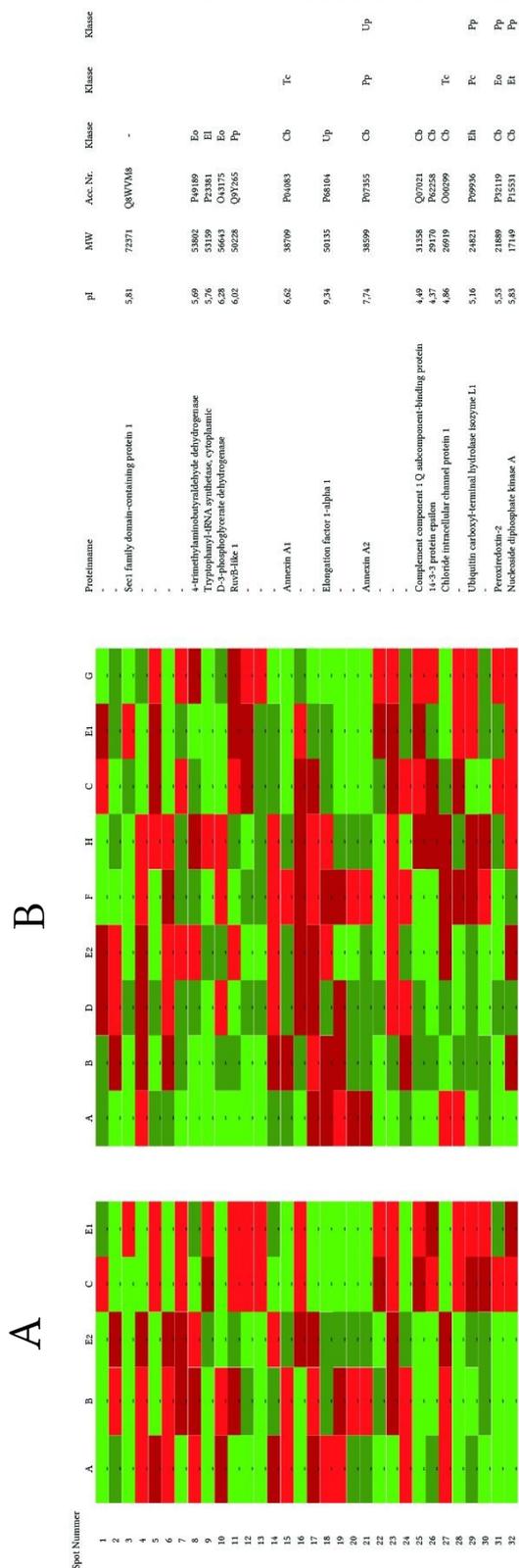


Abbildung 52: Heatmap der differentiell regulierten Proteine im pH-Bereich 3-12. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.

A: Heatmap der im DIGE-Versuch mit 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien als differentiell reguliert detektierter Proteinspots.

B: Heatmap der entsprechenden Proteinspots im DIGE-Versuch mit 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien.

Wie aus der vergleichenden *Heatmap* (Abbildung 52) ersichtlich, können von den in Kapitel 5.4 detektierten 32 Proteinen im nachfolgenden DIGE-Versuch mit 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien nur 2 Proteine (Annexin A1 und Annexin A2) weiter als differentiell reguliert betrachtet werden. Dieser hohe Anteil an falsch-positiven Proteinen im DIGE-Versuch des Kapitels 5.4 erschien zu hoch, als das er nur durch die geringe Anzahl an verwendeten Zelllinien zustande kommt. Dementsprechend wurden die im 6 EFT- vs. 3 NB-Zelllinien-Versuch zusätzlich detektierten Proteine gezielt auf den DIGE-Gelen des 3 EFT- vs. 2 NB-Zelllinien-Versuchs mithilfe der Software „Progenesis“ gesucht. Dies führte zum Ergebnis, dass die in Kapitel 5.4 zusätzlich gefundenen Proteine durch den der Software zugrundeliegenden Algorithmus nicht detektiert wurden und erst durch nachträgliches editieren der *Spotmap* (Lage aller detektierten Spots auf dem 2D-Gel) als differentiell reguliert detektiert wurden. So konnte hnRNP H3, eine Isoform von CLIC4 und das nicht identifizierte Protein (Spot Nr.10) zusätzlich als differentiell reguliertes Protein mit in die Liste der Ergebnisse des DIGE-Versuchs 3 EFT- vs. 2 NB-Zelllinien aufgenommen werden. Somit stieg die Zahl der Übereinstimmungen auf fünf von zehn Proteinen an (3vs2 vs. 6Vs3). Interessanterweise ist die CLIC4-Isoform mit dem höheren Molekulargewicht im Vergleich der 3 EFT- vs. 2NB-Zelllinien zwischen der Zelllinie A673 und SHSY-5Y nicht differentiell reguliert (siehe Abbildung 54). Die restlichen Proteine konnten auch durch gezieltes Suchen nicht entdeckt werden. Somit kann der Anteil an Spots, die sich durch Hinzunahme von weiteren Zelllinien zwischen EFT- und NB-Zelllinien als nicht differentiell reguliert herausstellten, mit 85% beziffert werden. Da dies ohne den Versuch mit der erhöhten Anzahl an Zelllinien nicht möglich gewesen wäre, werden die zugehörigen graphischen Darstellungen (Abbildungen 53 und 54) erst in diesem Kapitel besprochen.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass sich der Anteil von scheinbar zwischen EFT- und NB-Zelllinien differentiell regulierten Proteinen durch die Hinzunahme von drei weiteren EFT- und einer NB-Zelllinie dramatisch absenken lässt, ohne den Versuchsaufbau unverhältnismäßig aufzublähen. Aus diesem Grund wurde ein weiterer DIGE-Versuch mit IPG 4-7 durchgeführt um diesen pH-Bereich besser aufzutrennen und weitere differentiell regulierte Proteine auffindig zu machen.

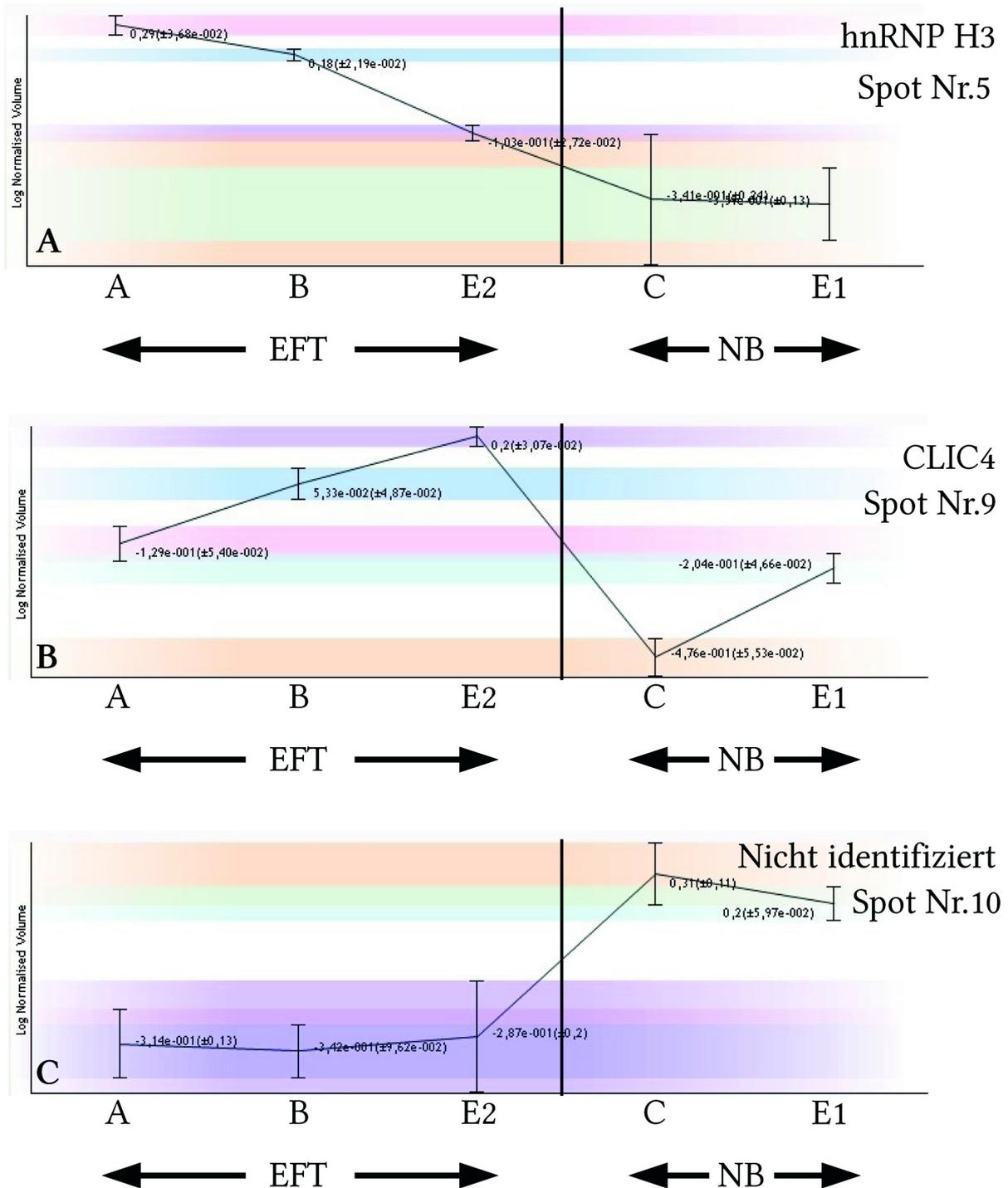


Abbildung 53: Expressionsprofile der nach gezielter Suche und Bearbeiten der Spotmap zusätzlich detektierten differenziell regulierten Proteine zwischen 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien

A: Expressionsprofil des Protein hnRNP H3 im DIGE-Versuch zwischen 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien (Spot Nr.5 im Vergleich zwischen 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien)

B: Expressionsprofil des Protein CLIC4 im DIGE-Versuch zwischen 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien (Spot Nr.9 im Vergleich zwischen 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien)

C: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins im DIGE-Versuch zwischen 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien (Spot Nr.10 im Vergleich zwischen 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien)

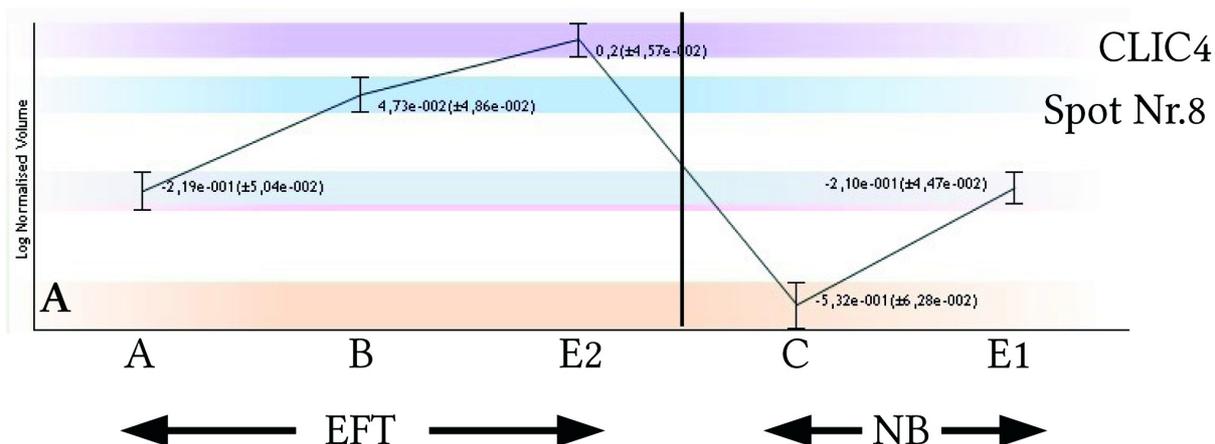


Abbildung 54: Expressionsprofil zwischen 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien des nach gezielter Suche und Bearbeiten der Spotmap zusätzlich detektiertem, im 6 EFT- vs. 3 NB-Zelllinien differenziell reguliertem Protein.

A: Expressionsprofil des Protein CLIC4 im DIGE-Versuch zwischen 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien (Spot Nr.8 im Vergleich zwischen 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien), keine differentielle Expression zwischen Zelllinie „A“ und Zelllinie „E1“ (ANOVA > 0,05).

Wie aus der Abbildungen 53 ersichtlich, sind die Spots mit den Nummern 5, 9 und 10 der Fraktion der differentiel exprimierten Proteine zuzurechnen. Spot Nr.8 ist beim DIGE-Versuch mit 6 EFT- vs. 3 NB-Zelllinien der Fraktion der differentiel exprimierten Proteine zuzurechnen, während er beim DIGE-Versuch mit 3 EFT- vs. 2NB-Zelllinien nicht als differentiel exprimiert zu werten ist (keine Konsistenz, siehe Abbildung 54), dies könnte durch die erneute Anzucht für das DIGE-Experiment mit der erhöhten Zelllinienzahl (oder der Vorgängeranzucht) erklärbar sein.

5.6 Differentiell exprimierte Proteine von 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien im pH-Bereich 4-7

Nachdem aufgrund der erhöhten Zelllinienzahl und kritischen Auswertung der differentiell exprimierten Proteine nur noch zehn Proteine übrig blieben, wurden zusätzlichen Experimente mit IPG 4-7 zur Verbesserung der Auflösung durchgeführt. Dies sollte zu weiteren differentiell exprimierten Proteinen führen. Es wurden 27 DIGE-Gele angefertigt (siehe 4.7.1), gescannt (siehe Abbildung 55-59). Aufgrund eines Software-Fehlers des Ettan-DIGE Imagers wurde das DIGE Gel Nummer 13 nicht korrekt eingescannt und konnte nicht in die Analyse mit eingehen. Ausgewertet wurden die restlichen 26 DIGE-Gele. Die Trennung der Proteine erfolgte durch IPG 4-7 und SDS-Gelen mit T= 12%. Das Probenauftragsschema der einzelnen 2D-Gele ist das selbe wie in Kapitel 5.5 zuvor beschrieben. Es wurden 50 µg der jeweiligen CyDye *gelabelten* Probe und 50 µg IPS durch anodales *cup-loading* auf den IPG-Streifen aufgetragen. Die Laufparameter sind in Kapitel 4.4 dargestellt. Die verwendeten Zelllinien und ihre jeweiligen Kürzel sind in Tabelle 34 nochmals kurz aufgezeigt. Nach der Analyse der Gele durch die Software Progenesis wurden 3 2D-Gele (IPG 4-7, *anodales cup-loading*, SDS-Gele mit T=12%, Parameter siehe Kapitel 4.4) hergestellt mit jeweils 500 µg Proteinbeladung (siehe Kapitel 5.1.1 für die eingesetzten Zelllinien und deren Anteil an der Gesamtproteinbeladung). Anschließend wurden die Proteine auf den 2D-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt und die als differentiell exprimiert detektierten Proteine ausgestanzt und mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Die Abbildungen 55-59 zeigen die für dieses DIGE-Experiment hergestellten und eingescannten 2D-Gele auf, die für die anschließende Analyse mithilfe der Software „Progenesis“ verwendet wurden. Als differentiell exprimiert wurde ein Proteinspot angesehen, wenn es folgende Kriterien erfüllte: Anova < 0,05; Power ≥ 0,80 und ein konsistentes Expressionsniveau in beiden Tumorarten. Die Abbildung 60 zeigt die differentiell exprimierten Proteine als Übersichtsgel. Die Abbildungen 61-64 zeigen die als differentiell exprimiert detektierten Proteine mit ihrer jeweiligen Lage auf dem 2D-Gel, die dreidimensionale Darstellung der Spots und das Profil ihrer Signalstärke in den einzelnen Zelllinien. Es konnten mit IPG 4-7 acht differentiell exprimierte Proteine detektiert werden, davon konnten sieben durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Diese Proteine lassen sich in die Klassen der

Transporter und der potentiellen Krebsbiomarker einordnen. Die durchschnittlichen Regulierungsfaktoren liegen hier zwischen 1,6 und 13. Die zwischen den EFT- und Neuroblastomzelllinien differentiell exprimierten Proteine sind in Tabelle 35 aufgelistet, das Protein mit der Bezeichnung Spot Nr. 8 konnte nicht durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde zusätzlich eine *Heatmap* der differentiell experimentierten Proteine erstellt (Abbildung 65).

Von diesen acht differentiell exprimierten Proteinen sind bereits vier durch das DIGE-Experiment mit IPG 3-12 detektiert worden (hnRNP H3, Annexin A1, 2 Isoformen von CLIC4). Das Hinzukommen von neuen Proteinen, als auch der Wegfall von mit IPG 3-12 als differentiell reguliert detektierten Proteinen, kann auch durch die verbesserte Auflösung erklärt werden.

Zelllinie	Kürzel	Tumorart
A673	A	EFT
SBSR-AKS	B	EFT
SiMa	C	NB
SK-ES1	D	EFT
SH-SY5Y	E1	NB
SK-N-MC	E2	EFT
MHH-ES1	F	EFT
MHH-NB11	G	NB
TC-71	H	EFT

Tabelle 34: Verwendete Zelllinien und ihre jeweiligen Kürzel.

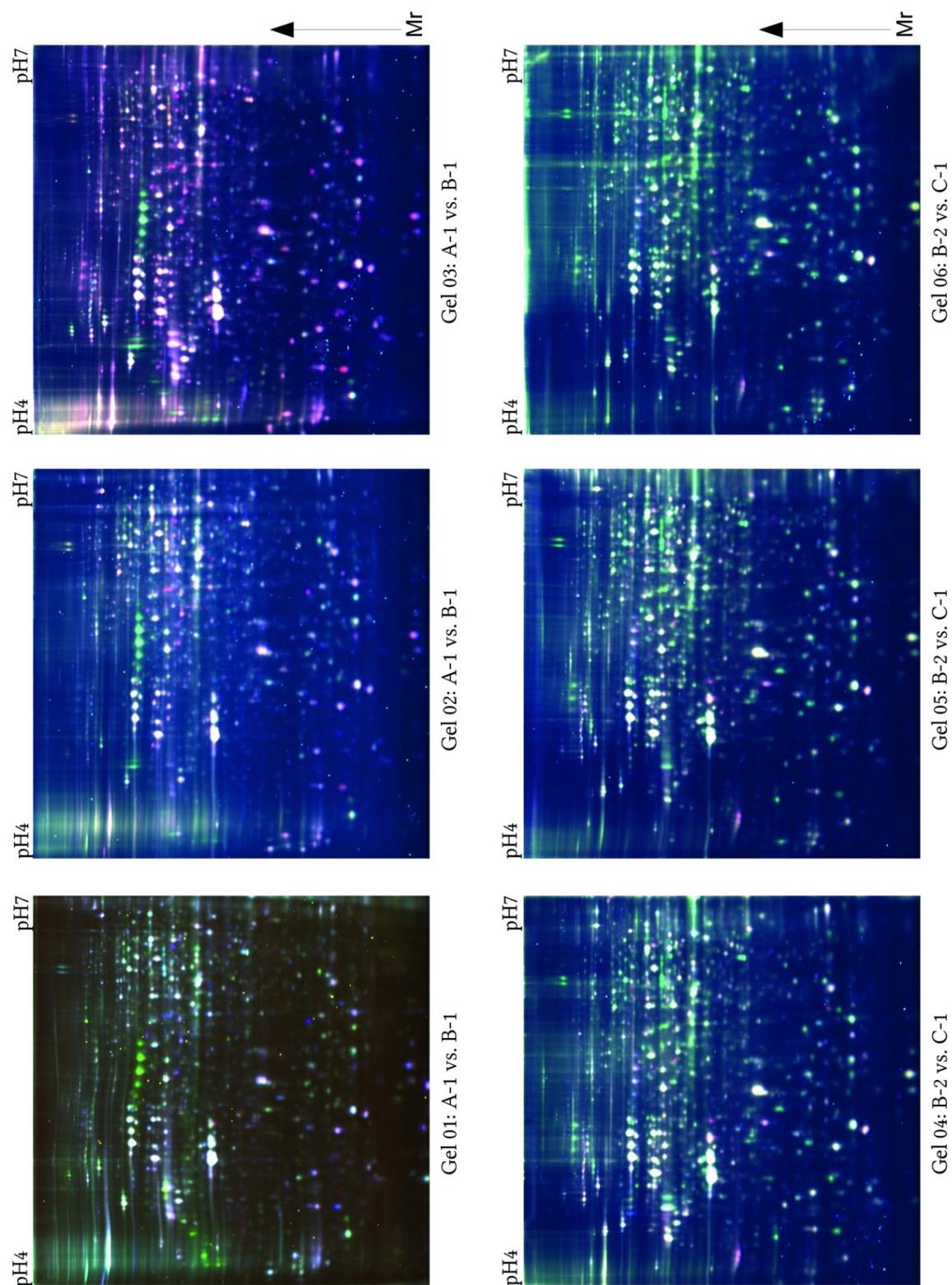


Abbildung 55: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel01-Gel03: A-1 (EFT) vs. B-1 (EFT)

Gel04-Gel06: B-2 (EFT) vs. C-1 (NB)

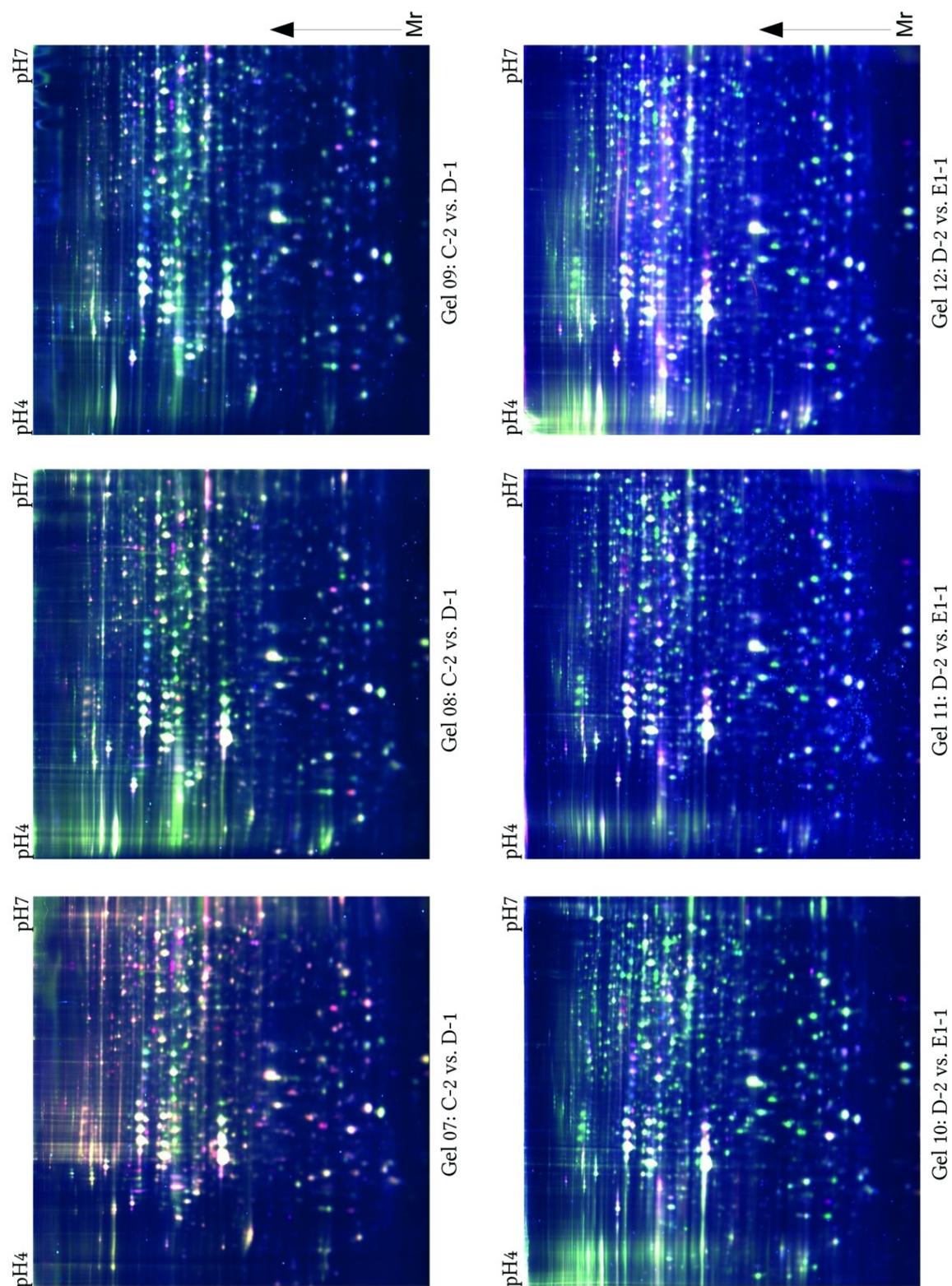


Abbildung 56: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel07-Gel09: C-2 (NB) vs. D-1 (EFT)

Gel10-Gel12: D-2 (EFT) vs. E1-1 (NB)

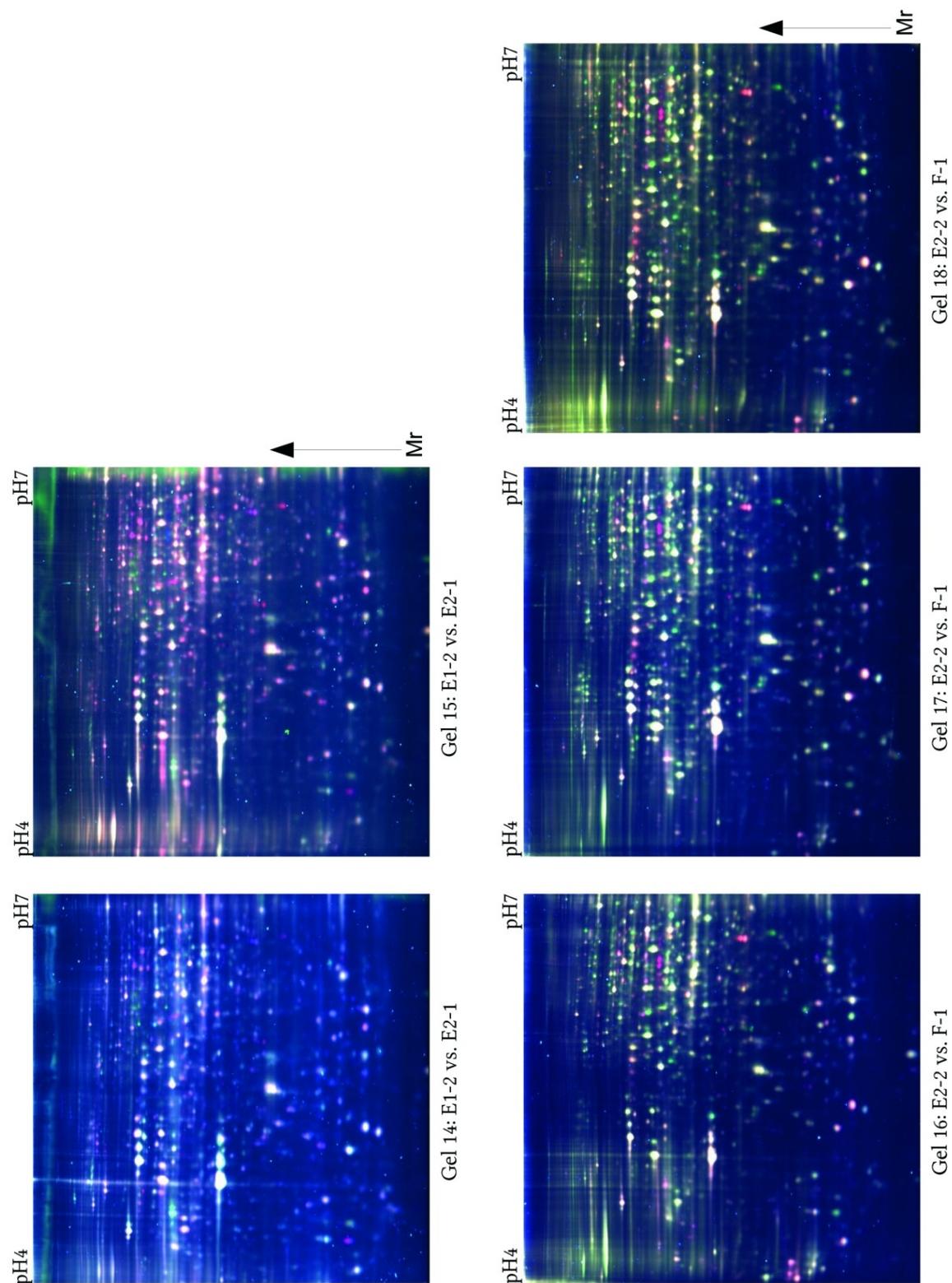


Abbildung 57: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt. Gel13 ist aufgrund eines Softwarefehlers während des Scanvorgangs nicht verwendbar.

Gel14-Gel15: E1-2 (NB) vs. E2-1 (EFT)

Gel16-Gel18: E2-2 (EFT) vs. F-1 (EFT)

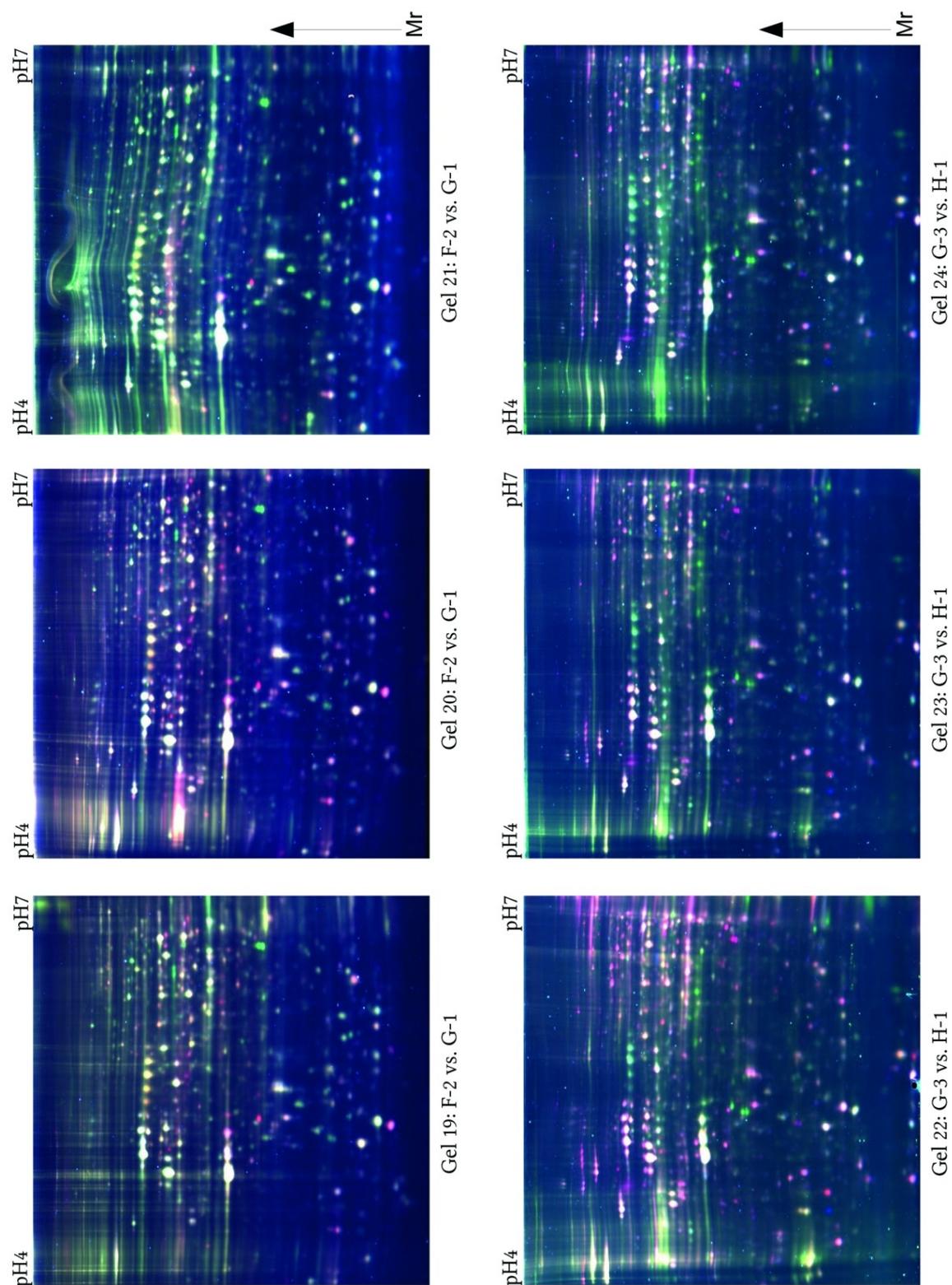


Abbildung 58: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel19-Gel21: F-2 (EFT) vs. G-1 (NB)

Gel22-Gel24: G-2 (NB) vs. H-1 (EFT)

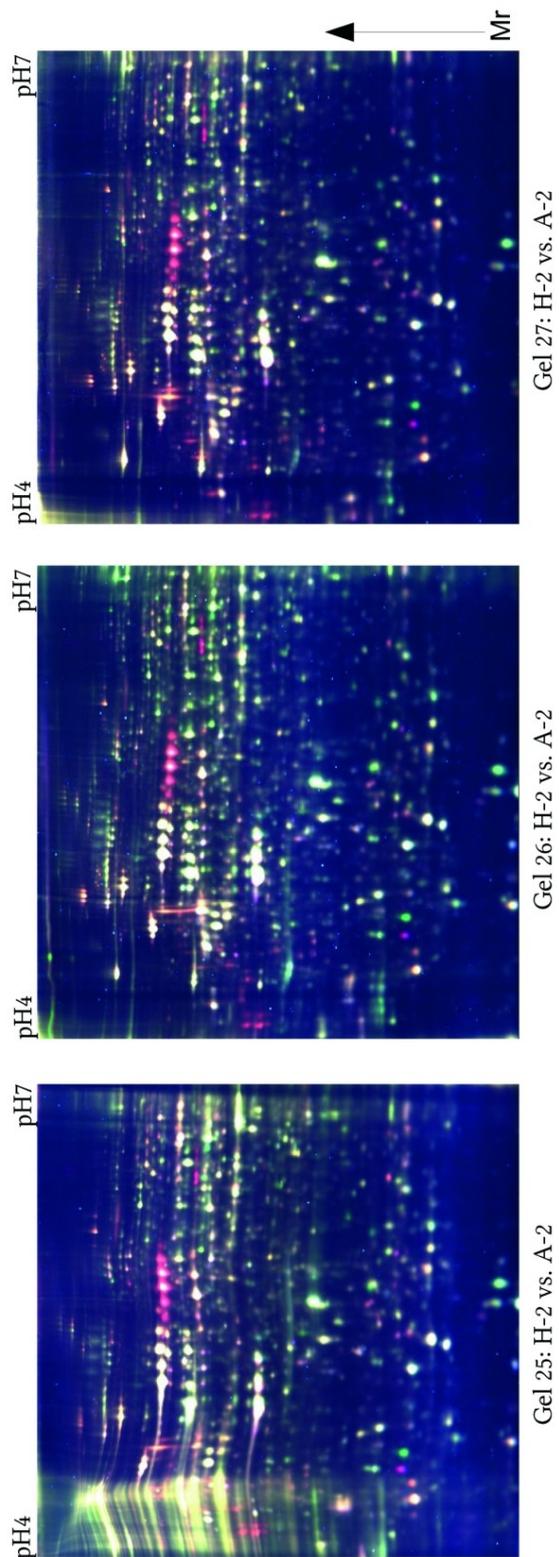


Abbildung 59: DIGE-Gele (Image-overlay) IPG 4-7 der gemeinsam aufgetragenen Proben und des internen Standards. Erstgenannte Zelllinie mit Cy3 (grüner Kanal), letztgenannte Zelllinie mit Cy5 (roter Kanal), internal pooled standard (IPS) mit Cy2 gelabelt. Nicht regulierte Proteine sind gelb dargestellt.

Gel25-Gel27: H-2 (EFT) vs. A-2 (EFT)

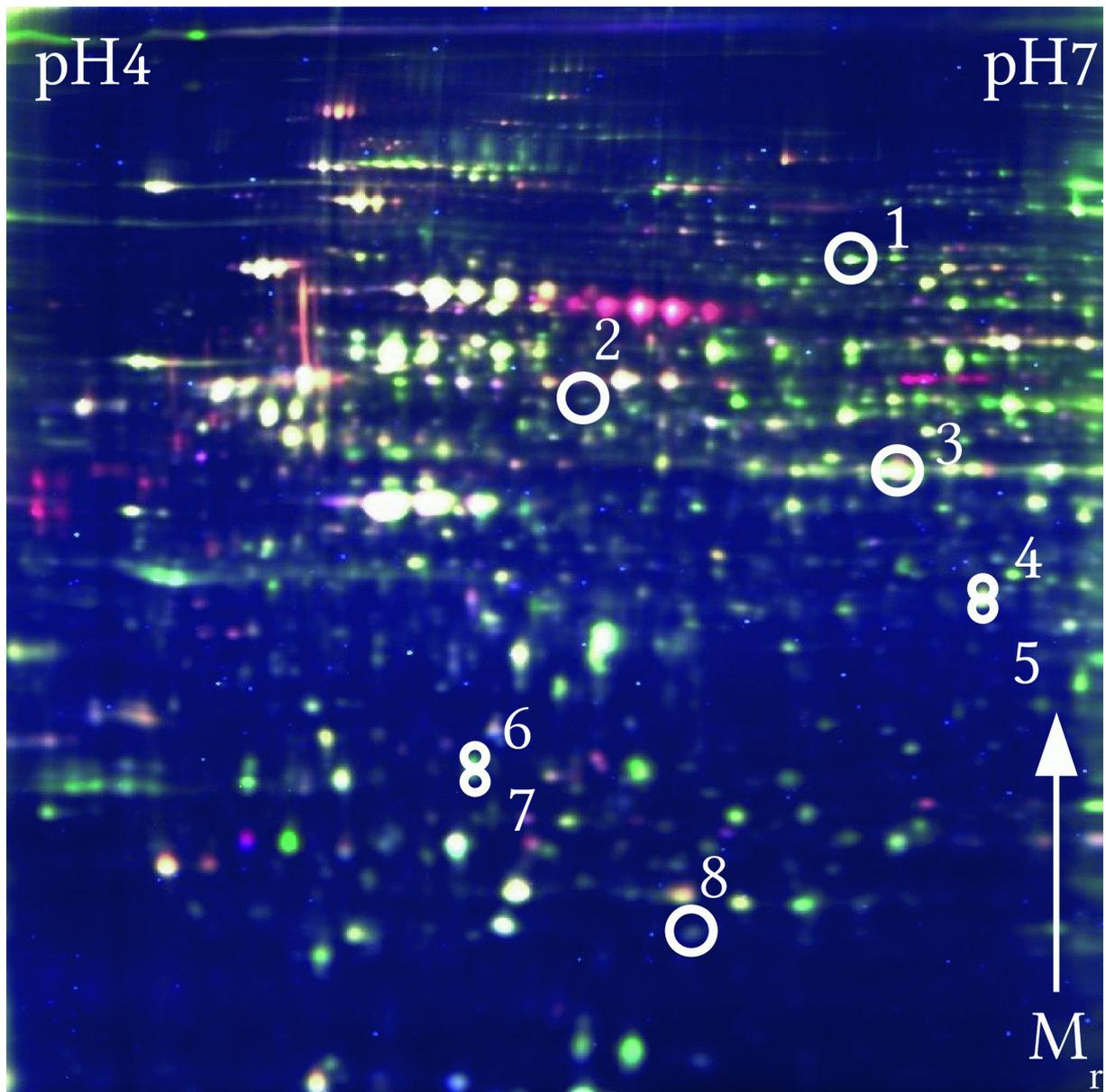
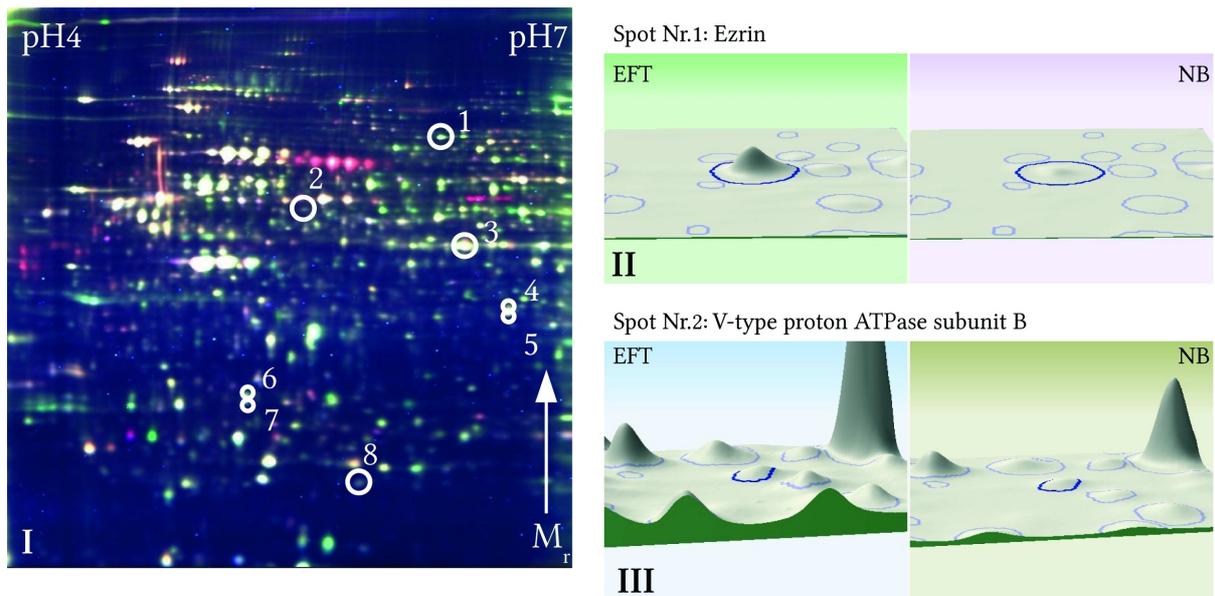
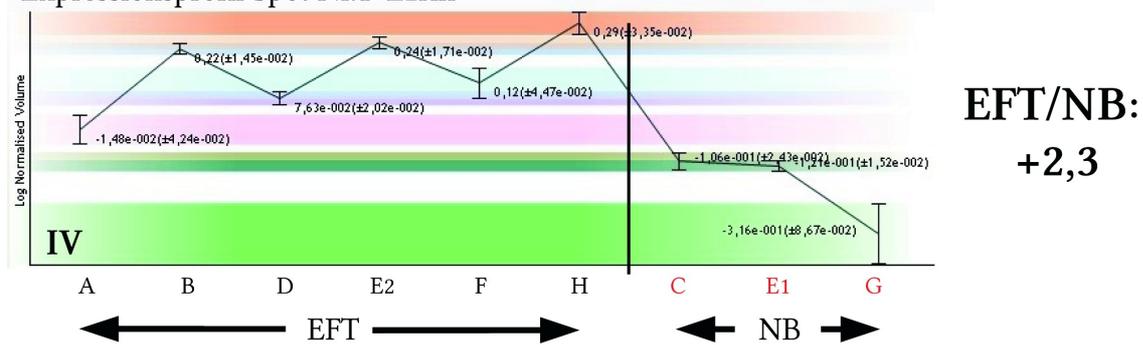


Abbildung 60: Übersicht der mit DIGE detektierten, differentiell regulierten Proteinspots zwischen EFT- und NB-Zelllinien im pH-Bereich 4-7. Die Nummern korrespondieren zu den in Tabelle 35 und Abbildung 65 angegebenen.



Expressionsprofil Spot Nr.1: Ezrin



Expressionsprofil Spot Nr.2: V-type proton ATPase subunit B

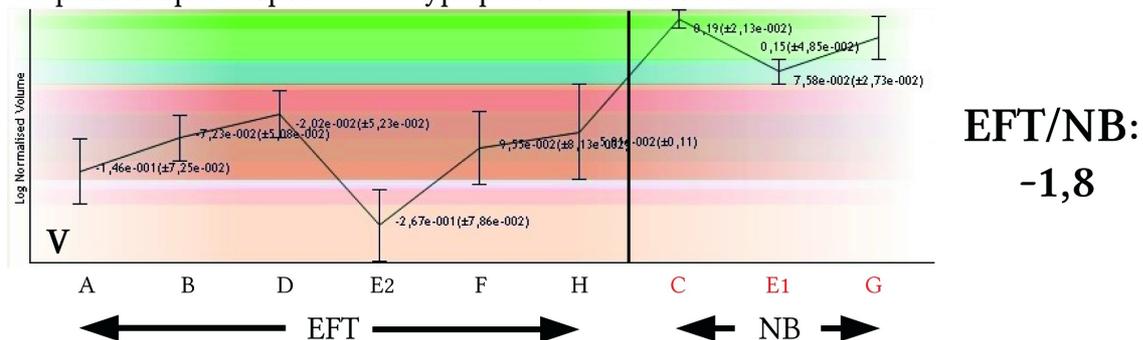


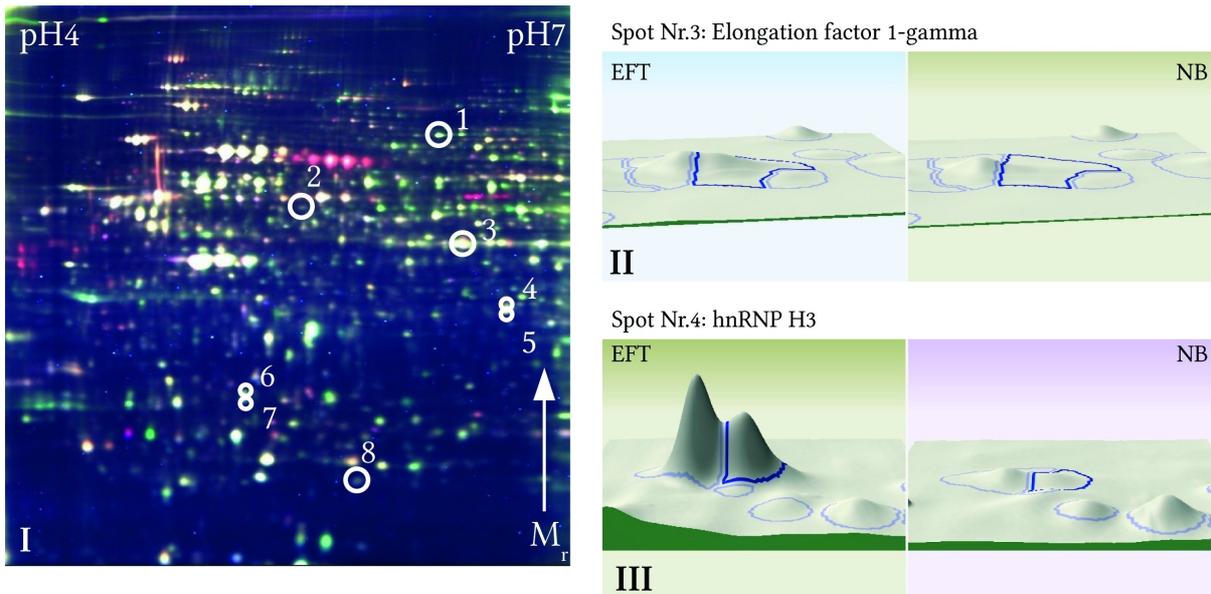
Abbildung 61: I: Repräsentatives DIGE Gel IPG 4-7, mit eingezeichneten, differentiell regulierten Spots. II und III: 3D-Darstellung der jeweiligen Proteinspots. IV+V: Expressionsprofil des jeweiligen Proteinspots, d.h. sein Expressionsniveau in den jeweiligen Zelllinien (biologische Replikate wurden in dieselbe Gruppe aufgenommen), NB-Zelllinien sind in roter Schrift dargestellt. Regulierungsfaktor des Proteins rechts neben dem Expressionsprofil. Die Abkürzungen der Zelllinien sind in Tabelle 34 aufgeführt.

II: Spot Nr.1: Ezrin

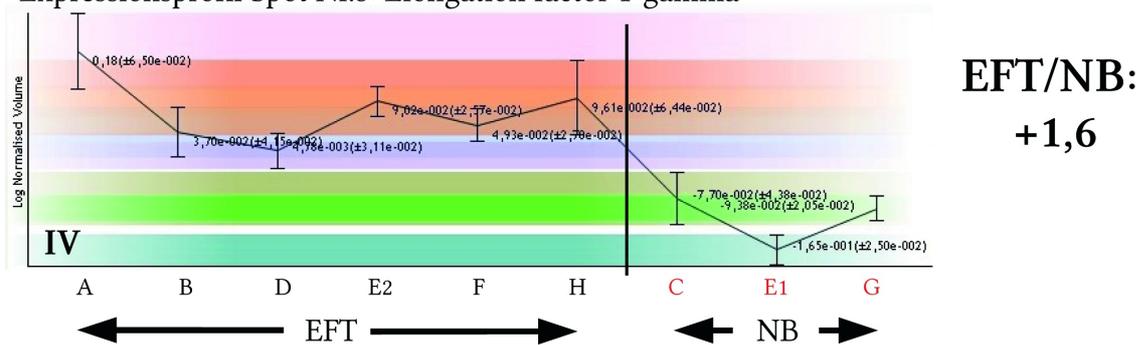
III: Spot Nr.2: V-type proton ATPase subunit B

IV: Expressionsprofil von Ezrin, (Spot Nr.1)

V: Expressionsprofil der V-type proton ATPase subunit B (Spot Nr.2)



Expressionsprofil Spot Nr.3: Elongation factor 1-gamma



Expressionsprofil Spot Nr.4: hnRNP H3

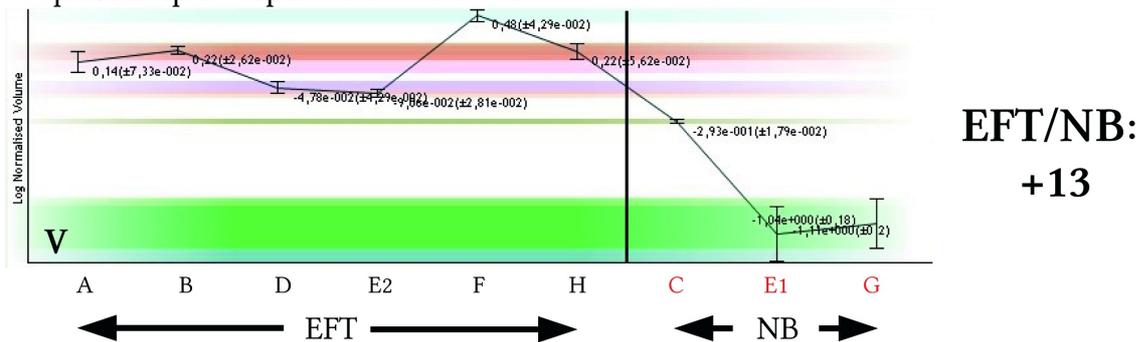
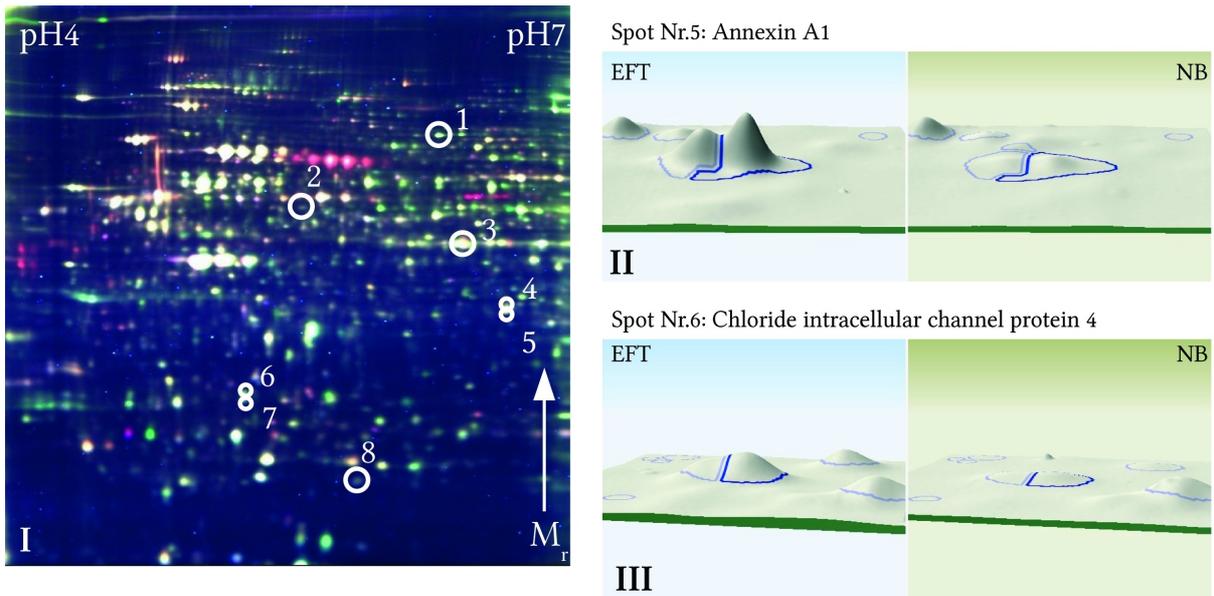
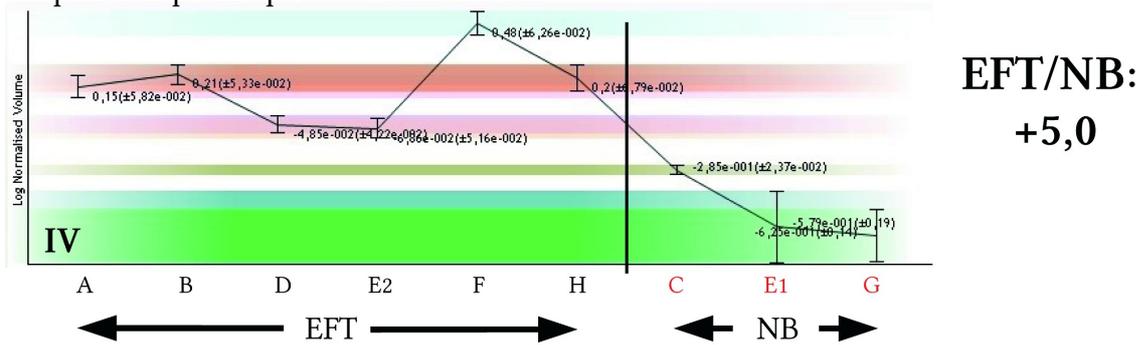


Abbildung 62: II: Spot Nr.3: Elongation factor 1-gamma
 III: Spot Nr.4: hnRNP H3
 IV: Expressionsprofil des Elongation factor 1-gamma, (Spot Nr.3)
 V: Expressionsprofil von hnRNP H3 (Spot Nr.4)



Expressionsprofil Spot Nr.5: Annexin A1



Expressionsprofil Spot Nr.6: Chloride intracellular channel protein 4

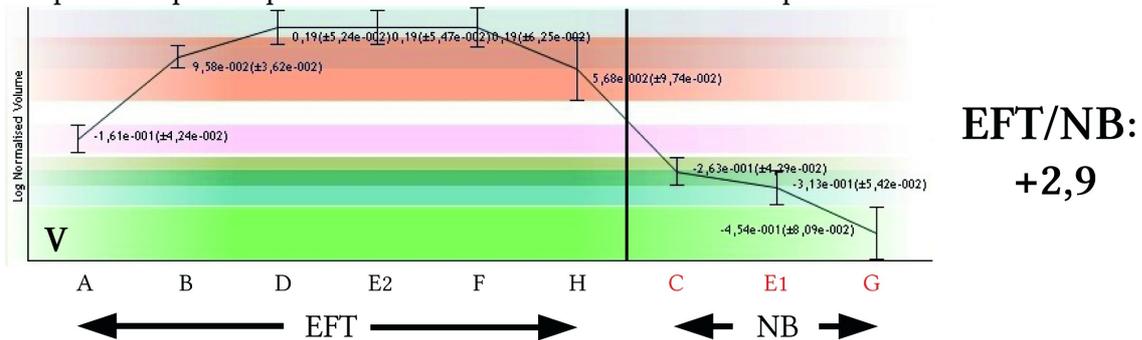
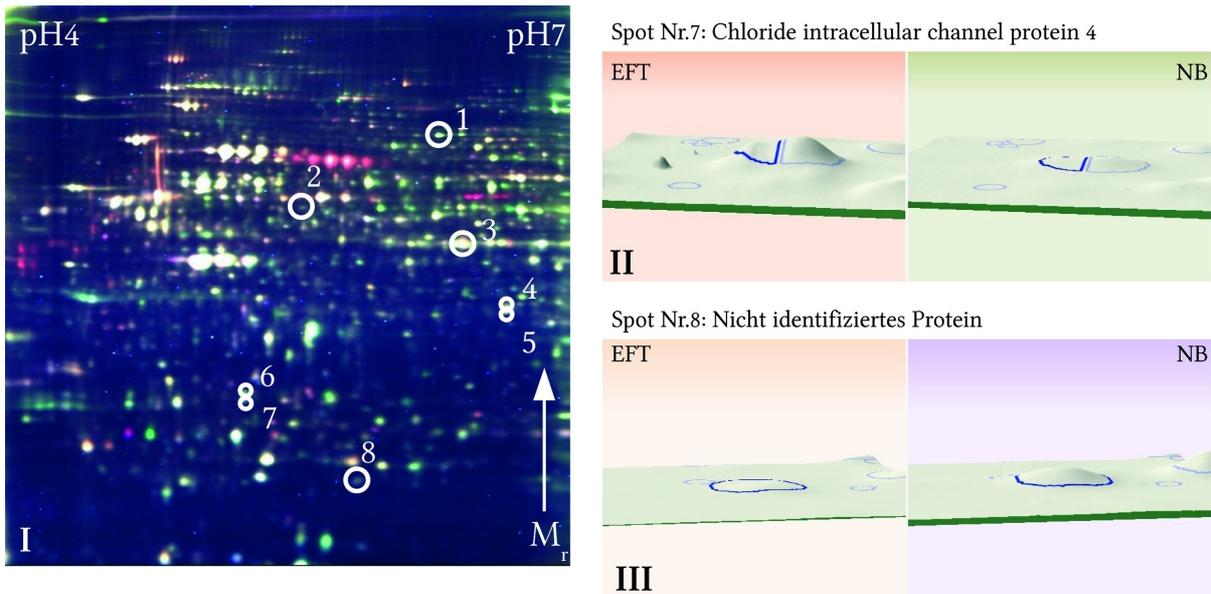


Abbildung 63: II: Spot Nr.5: Annexin A1

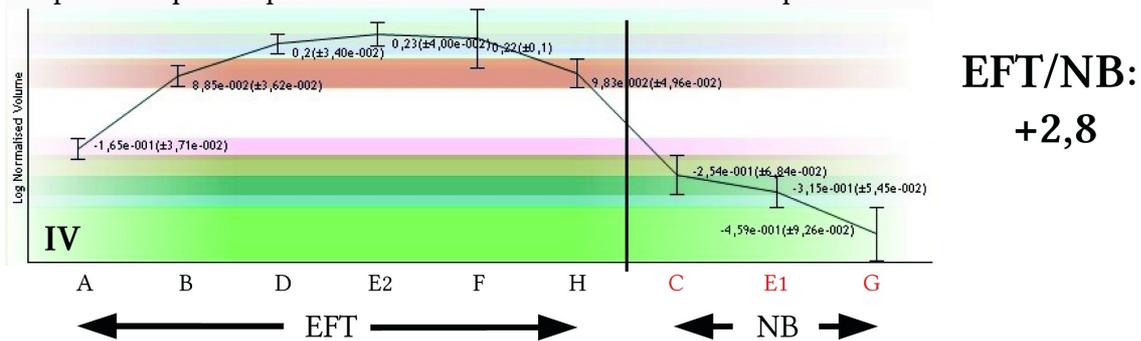
III: Spot Nr.6: Chloride intracellular channel protein 4

IV: Expressionsprofil von Annexin A1, (Spot Nr.5)

V: Expressionsprofil des Chloride intracellular channel protein 4 (Spot Nr.6)



Expressionsprofil Spot Nr.7: Chloride intracellular channel protein 4



Expressionsprofil Spot Nr.8: Nicht identifiziertes Protein

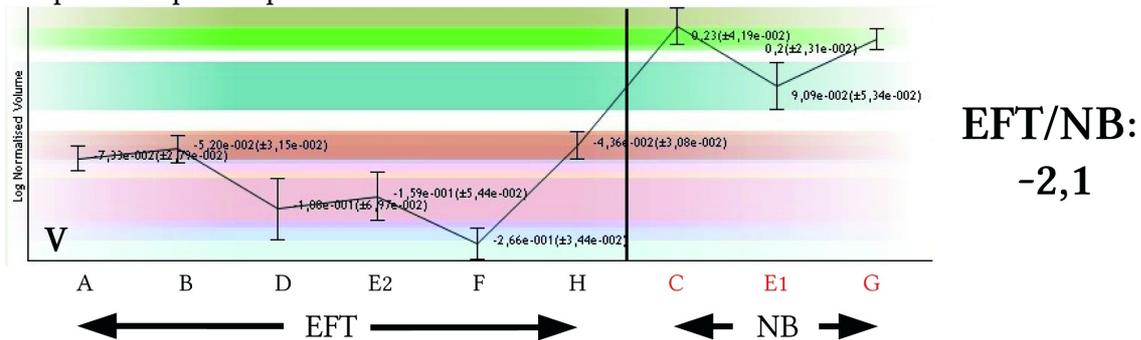


Abbildung 64: II: Spot Nr.7: Chloride intracellular channel protein 4
 III: Spot Nr.8: Nicht identifiziertes Protein
 IV: Expressionsprofil des Chloride intracellular channel protein 4 (Spot Nr.7)
 V: Expressionsprofil des nicht identifizierten Proteins (Spot Nr.8)

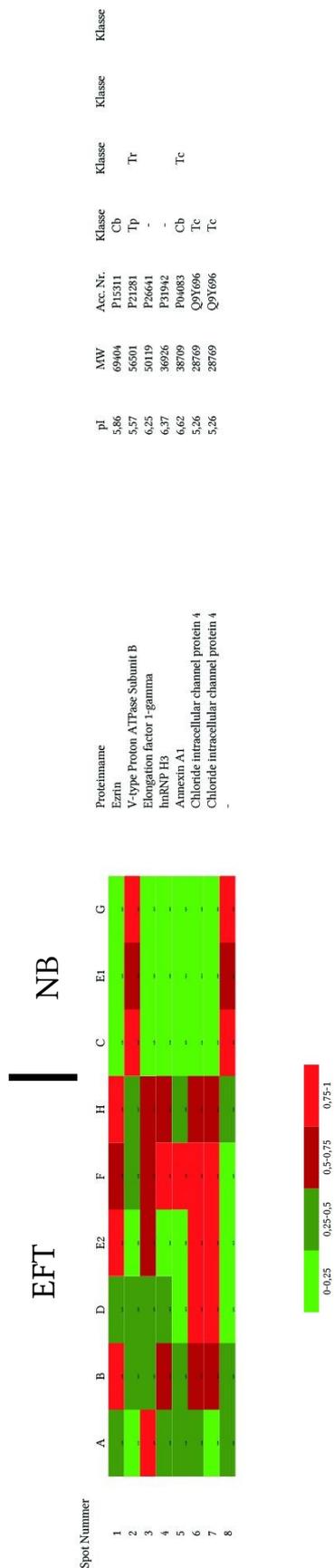


Abbildung 65: Heatmap der differentiell regulierten Proteine zwischen EFT- und NB-Zelllinien im pH-Bereich 4-7. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.

Spot Nr.	Proteinname	Faktor (EFT/NB)	Anova	Power	q	pI-exp.	MW-exp.	pI-theor.	MW-theor.	Peptide	Score	Score C.I.%	Uniprot Acc. No.	Klasse	Klasse
1	Ezrin	+2,3	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	6,28	80000	5,94	69413	4	150	100	P15311	Cb	Tr
2	V-type proton ATPase subunit B	-1,8	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	5,65	55000	5,57	56501	5	148	100	P21281	Tp	-
3	Elongation factor 1-gamma	+1,6	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	6,10	45000	6,25	50119	15	224	100	P26641	-	-
4	hnRNP H3	+1,3	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	6,80	38000	6,37	36926	9	212	100	P31942	-	-
5	Annexin A1	+5,0	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	6,76	37000	6,57	38714	15	307	100	P04083	Cb	Tc
6	CLIC 4	+2,9	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	5,28	27000	5,45	28772	6	202	100	Q9Y696	Tc	-
7	CLIC 4	+2,8	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	5,28	27000	5,45	28772	6	198	100	Q9Y696	Tc	-
8	Nicht identifiziert	-2,1	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	$\geq 0,995$	$<1,1 \cdot 10^{-16}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 35: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 4-7 zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die Spalte Faktor gibt den Regulierungsfaktor des Proteins an, pI den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.

5.7 Differentielle Proteomanalyse der EWS/FLI1 Typ 1/ Typ 2 EFT-Zelllinien

Die EFT vereinende Eigenschaft ist die Expression des Fusionsproteins EWS/FLI-1 [38], von dem mehrere Typen bekannt sind. Der Typ 1 und der Typ 2 dieses Fusionsprotein kommt am häufigsten vor [34]. Eine differentielle Proteomanalyse dieser beiden Untergruppen wurde durchgeführt um nicht nur potentielle Biomarker zur Unterscheidung dieser beiden Untergruppen der Ewing Familie von Tumoren zu identifizieren, sondern auch um eventuelle Regulierungen in den Stoffwechselwegen zwischen beiden Tumorunterarten aufzuspüren, was zu einem besseren Verständnis der Tumorbilogie führen würde. Der Einfluss der beiden EWS/FLI-1 Typen auf spiegelt sich vor allem in der größeren Aggressivität (schnelleres Tumorwachstum, schnellere Verbreitung von Metastasen, schnelleres Metastasenwachstum) von Tumoren der Ewing Familie wieder, die den Typ2 des Fusionsproteins EWS/FLI-1 exprimieren [175]. Vor diesem Hintergrund sollten sich differentiell regulierte Proteine zwischen beiden Tumorunterarten detektieren lassen, die für eine Unterart spezifisch sind.

5.7.1 Differentiell exprimierte Proteine im pH-Bereich 3-12

Um differentiell exprimierte Proteine zwischen EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 exprimierender Tumore der Ewing Familie zu finden, wurden die in Kapitel 5.5 hergestellten DIGE-Gele IPG 3-12 unter neuer Gruppeneinteilung erneut ausgewertet. Die einzelnen EFT-Zelllinien (siehe Tabelle 36) wurden dazu nach ihrem exprimierten EWS/FLI1-Typ eingeteilt, Neuroblastomzelllinien wurden nicht berücksichtigt. Es wurden dieselben Kriterien zur Bestimmung von differentiell exprimierten Proteinen angewandt, wie zuvor beim Vergleich der EFT- und Neuroblastomzelllinien.

Die Abbildungen 67-71 zeigen die Expressionsprofile der detektierten, differentiell exprimierten Proteine, Abbildung 66 zeigt als Übersichtsgel die Lage der Proteine auf. Die Abbildungen mit 3-dimensionaler Darstellung und zusätzlich der Lage des Spots auf dem 2D-Gel sind in Anhang III. Die Analyse erfolgte mithilfe der Software „Progenesis“, es wurden die selben Kriterien wie schon in Kapitel 5.4 beschrieben angewandt. Mit IPG 3-12 konnten 39 differentiell exprimierte Proteine detektiert werden, davon konnten 20 durch

Massenspektrometrie identifiziert werden. Die Proteine lassen sich in die Klassen der Enzyme, der Transporter, Plasmaproteine und potentieller Krebsbiomarker einordnen. Von diesen hier detektierten Proteine ist eines auch zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien differentiell reguliert: Septin-2. Die durchschnittlichen Regulierungsfaktoren liegen zwischen 1,3- und 2,3-fach. Die Tabelle 37 listet die identifizierten Proteine auf. Zur besseren Übersicht sind alle differentiell regulierten Proteine zusätzlich als *Heatmap* (Abbildung 72) dargestellt.

Zelllinie	Kürzel	EWS/FLI-1
A673	A	Typ 1
SBSR-AKS	B	Typ 1
SK-ES1	D	Typ 2
SK-N-MC	E2	Typ 1
MHH-ES1	F	Typ 2
TC-71	H	Typ 1

Tabelle 36: Für den Vergleich der EWS/FLI-1 Typ 1 und Typ 2 exprimierender EFT verwendete Zelllinien.

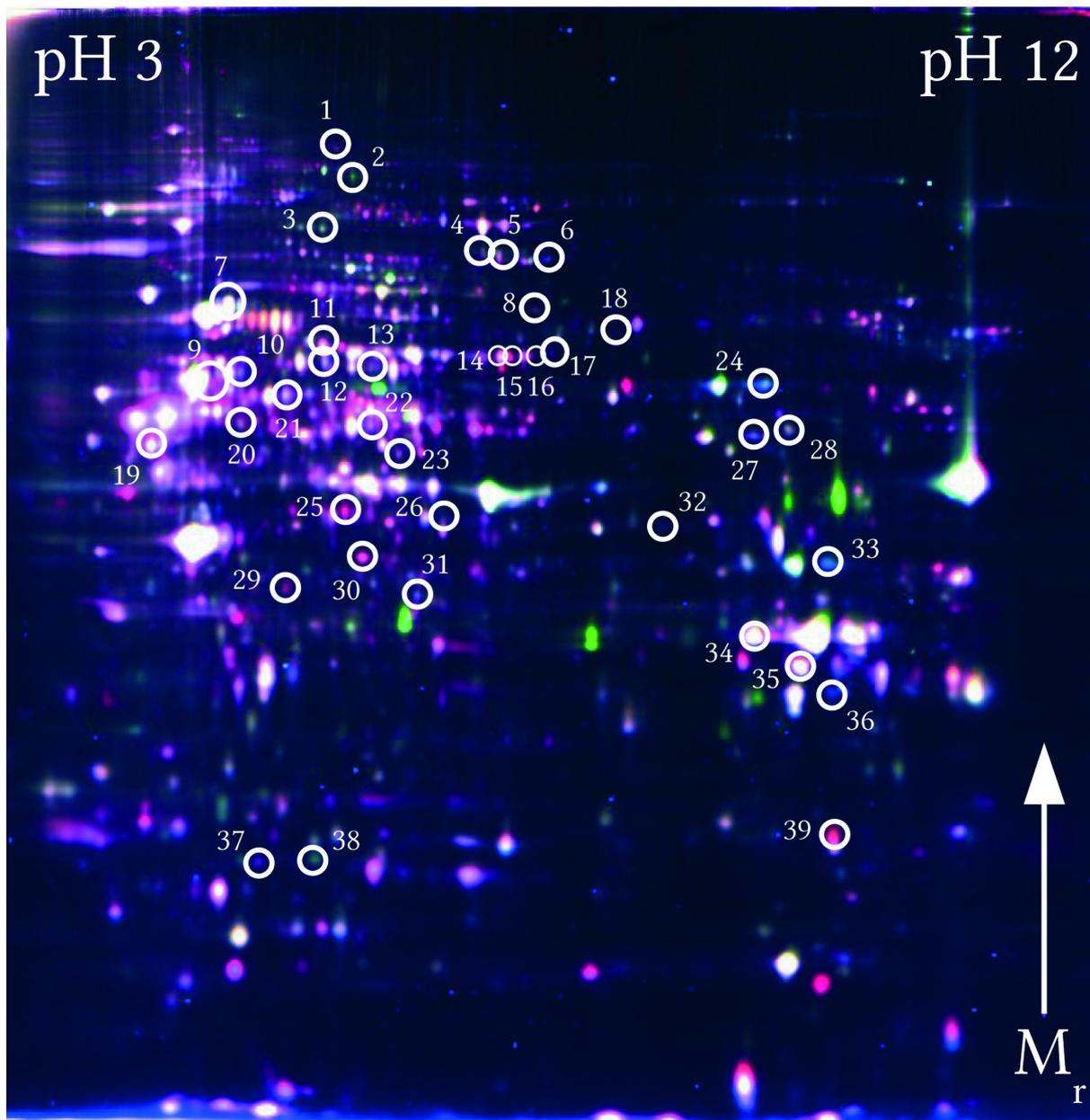
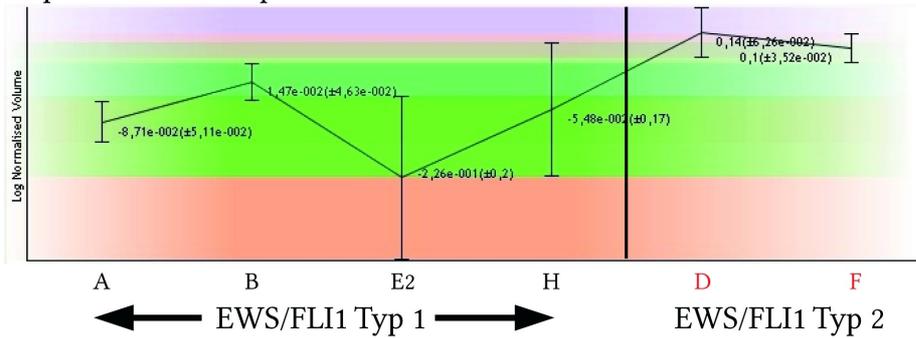


Abbildung 66: Übersicht der durch DIGE detektierten, differentiell regulierten Proteinspots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 exprimierenden EFT-Zelllinien im pH-Bereich 3-12.

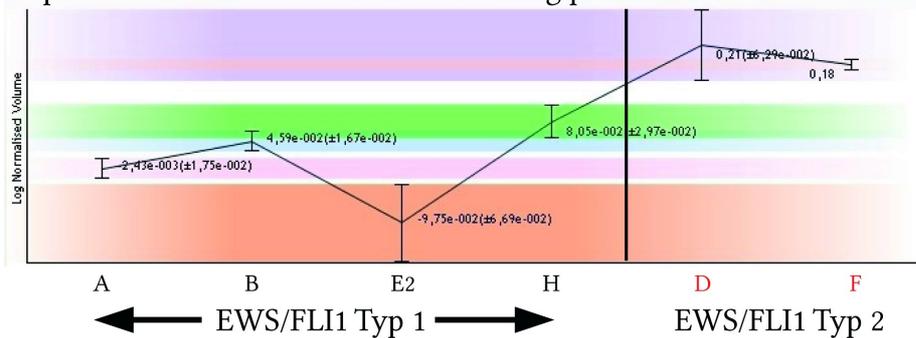
Spot Nr.1: ATP-dependent RNA helicase A



Regulierungsfaktor

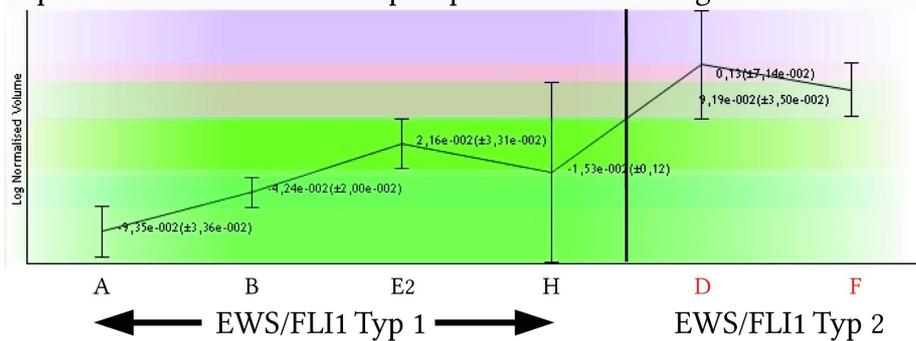
Typ1/Typ2 :
-1,6

Spot Nr.3: Cold shock domain-containing protein E1



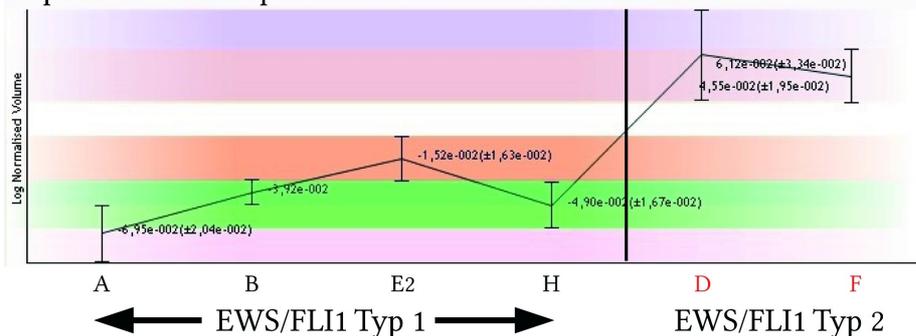
Typ1/Typ2 :
-1,6

Spot Nr.4: Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit



Typ1/Typ2 :
-1,4

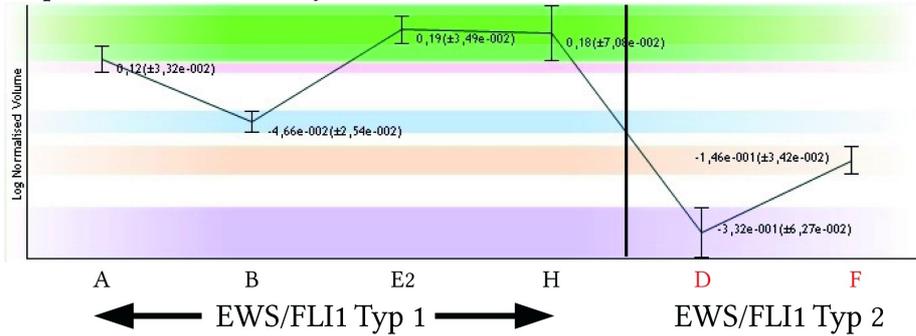
Spot Nr.5: ATP-dependent RNA helicase DDX1



Typ1/Typ2 :
-1,3

Abbildung 67: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.

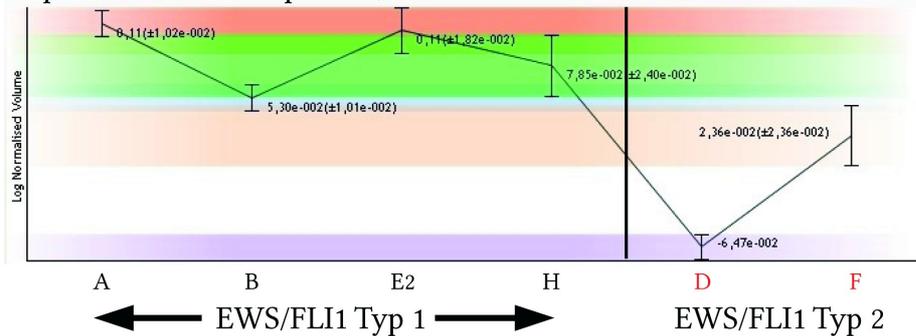
Spot Nr.6: Aconitate hydratase, mitochondrial



Regulierungsfaktor

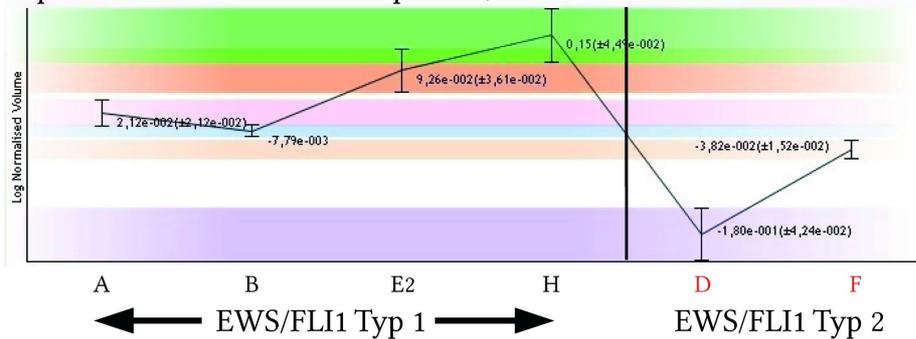
Typ1/Typ2 :
+2,3

Spot Nr.7: Stress-70 protein, mitochondrial



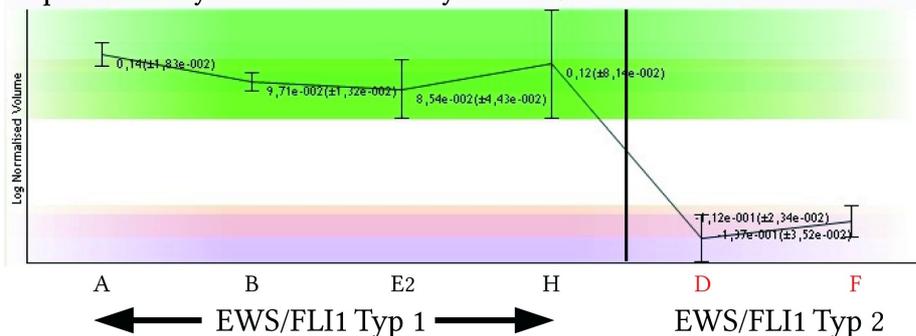
Typ1/Typ2 :
+1,3

Spot Nr.9: 60 kDa heat shock protein, mitochondrial



Typ1/Typ2 :
+1,5

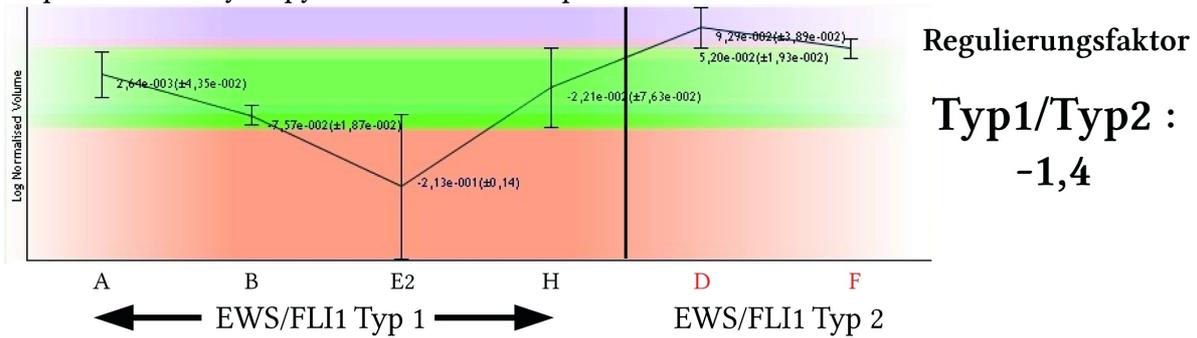
Spot Nr.10: Pyruvate kinase isozymes M1/M2



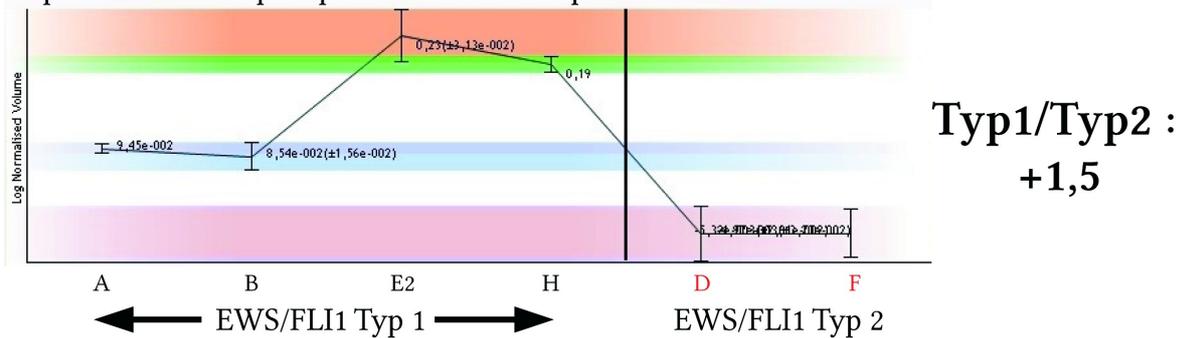
Typ1/Typ2 :
+1,7

Abbildung 68: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.

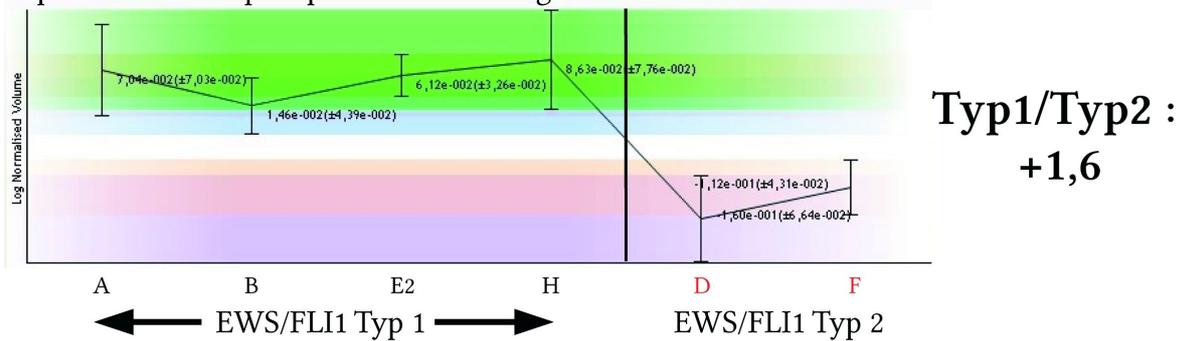
Spot Nr.11: Dihydropyrimidinase-related protein 2



Spot Nr.12: T-complex protein 1 subunit alpha



Spot Nr.13: T-complex protein 1 subunit gamma



Spot Nr.16: hnRNP L

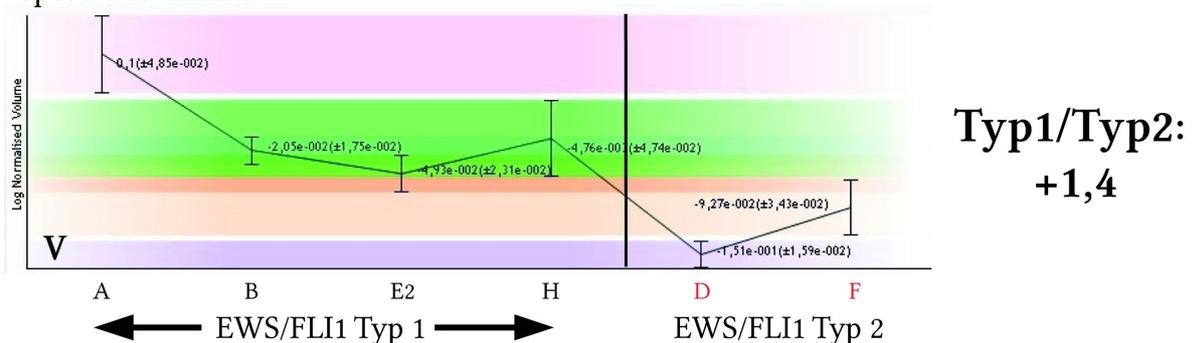
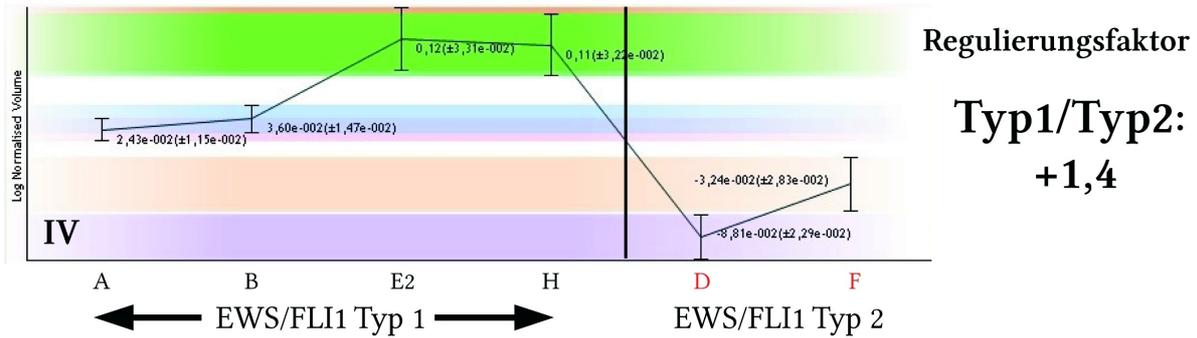
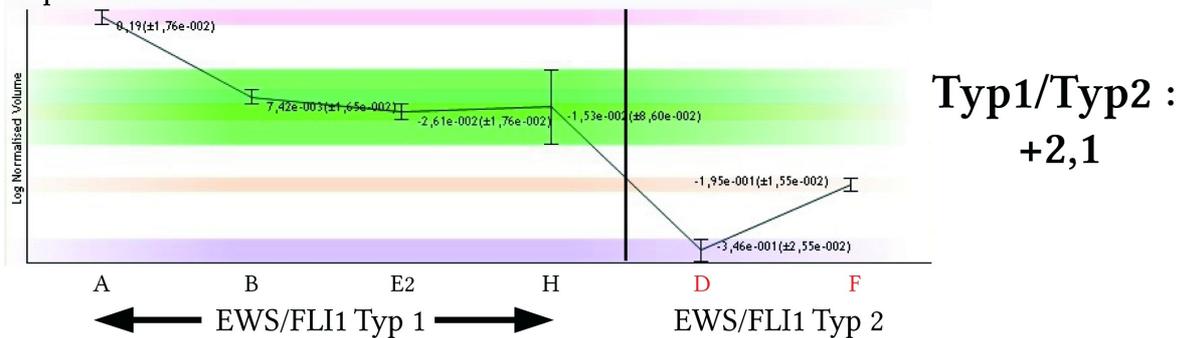


Abbildung 69: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.

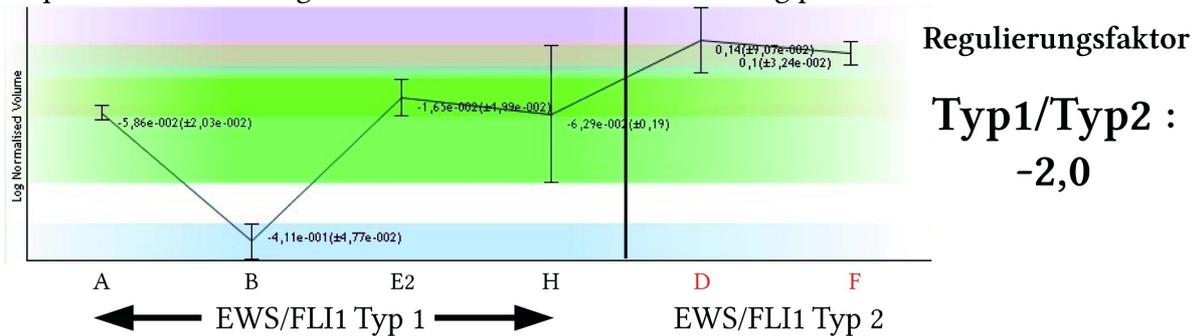
Expressionsprofil Spot Nr.19: ATP synthase subunit beta



Spot Nr.21: Protein disulfide-isomerase A3



Spot Nr.28: Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein



Spot Nr.29 Uroporphyrinogen decarboxylase

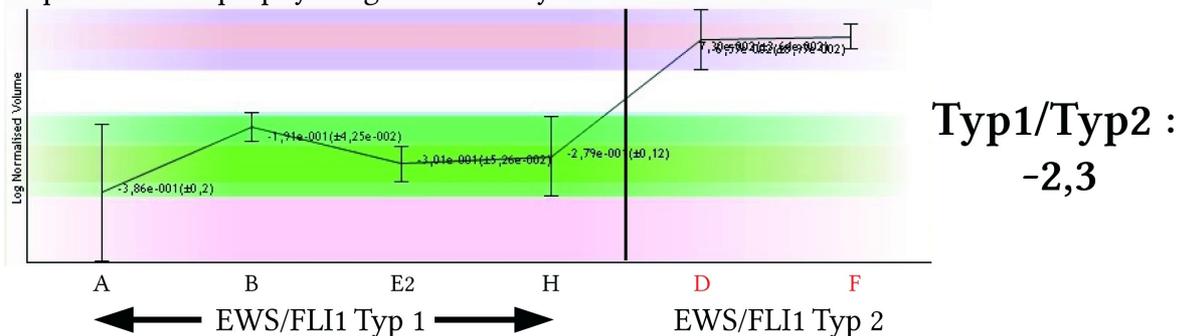
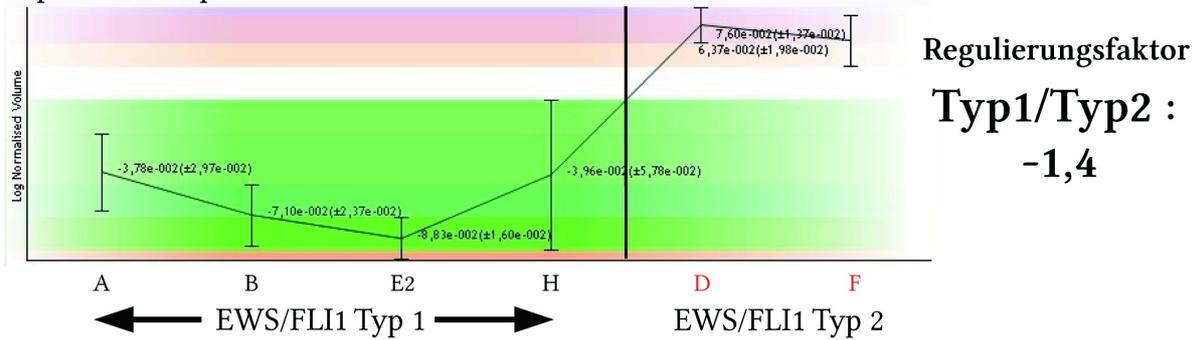
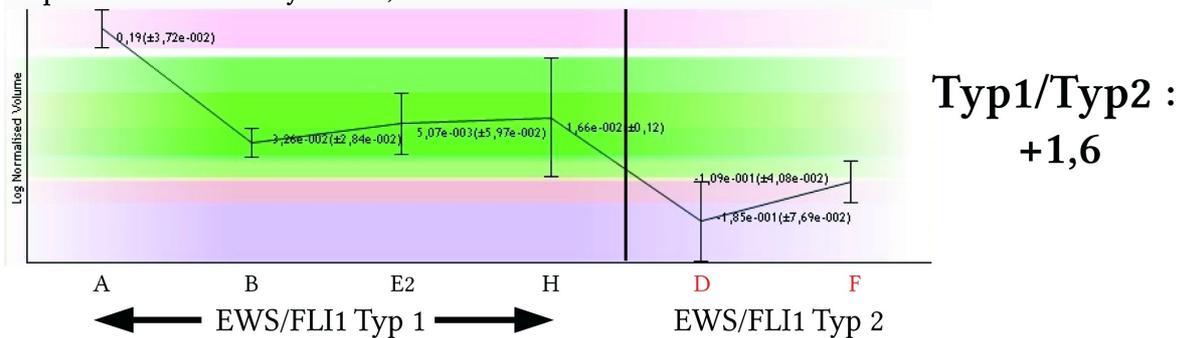


Abbildung 70: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.

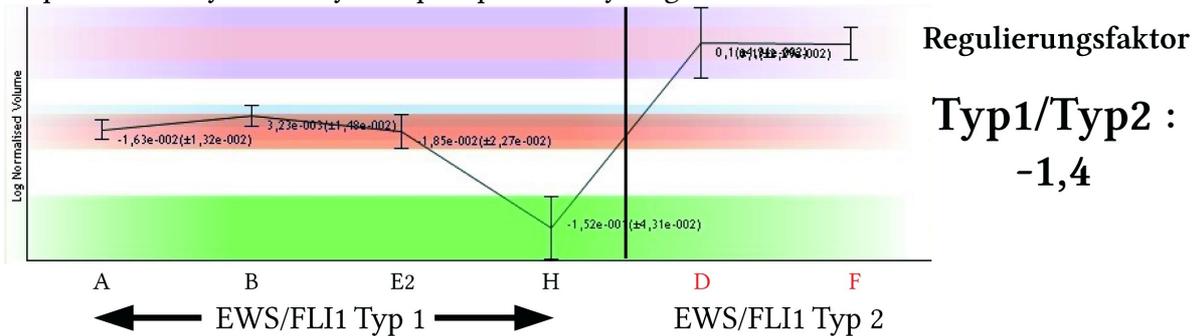
Spot Nr.30: Septin-2



Spot Nr.32: Citrate synthase, mitochondrial



Spot Nr.34: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



Spot Nr.36: L-lactate dehydrogenase A chain

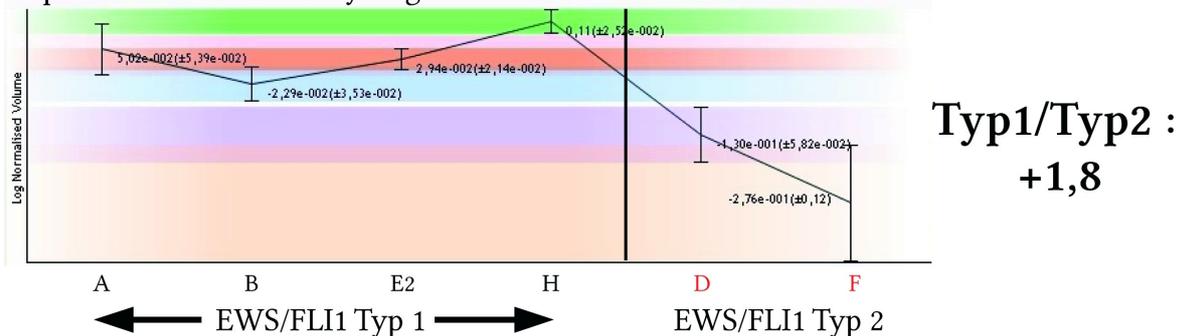


Abbildung 71: Expressionsprofile der mit IPG 3-12 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 66 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang III.

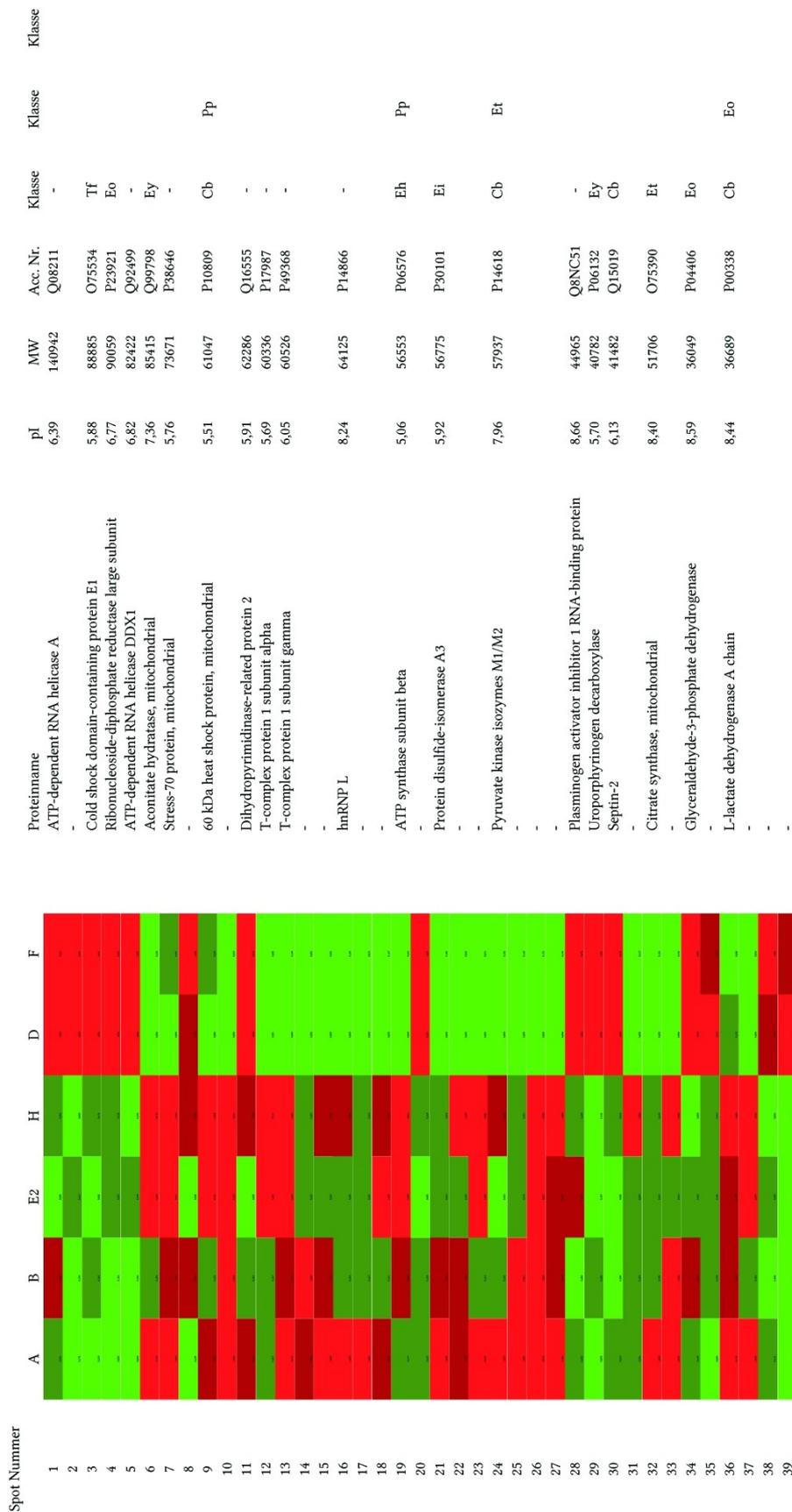


Abbildung 72: Heatmap der differentiell regulierten Proteine zwischen den EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 exprimierenden Zelllinien im pH-Bereich 3-12. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.

Spot Nr.	Proteinname	Faktor	ANOVA	Power	q-Wert	pI-exp.	MW-exp.	pI-theor.	MW-theor.	Peptide	Score	Score C.I.%	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse
1	ATP-dependent RNA helicase A	-1,6	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,9	125000	6,39	140942	25	298	100	Q08211	-	-
2	-	-2,2	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,9	90000	5,88	88885	13	108	100	O75554	Tf	Tf
3	Cold shock domain-containing protein E1	-1,6	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,0	89000	6,77	90059	19	156	100	P23921	Eo	Eo
4	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	-1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,1	88000	6,82	82422	12	216	100	Q92499	-	-
5	ATP-dependent RNA helicase DDX1	-1,3	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,4	87000	7,36	85415	21	337	100	Q99798	Ey	Ey
6	Aconitate hydratase, mitochondrial	+2,3	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,4	75000	5,76	73671	11	210	100	P38646	-	-
7	Stress-70 protein, mitochondrial	+1,3	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,1	61000	5,51	61047	17	440	100	P10809	Cb	Cb
8	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	-1,7	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,1	61000	5,51	61047	17	440	100	P10809	Cb	Cb
9	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	+1,5	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,1	61000	5,51	61047	17	440	100	P10809	Cb	Cb
10	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	+1,7	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,1	61000	5,51	61047	17	440	100	P10809	Cb	Cb
11	Dihydropyrimidinase-related protein 2	-1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,8	75000	5,91	62286	13	169	100	Q16555	-	-
12	T-complex protein 1 subunit alpha	+1,5	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,8	66000	5,69	60336	17	257	100	P17987	-	-
13	T-complex protein 1 subunit gamma	+1,6	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	6,3	66000	6,05	60526	14	243	100	P49368	-	-
14	T-complex protein 1 subunit gamma	+1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	6,3	66000	6,05	60526	14	243	100	P49368	-	-
15	T-complex protein 1 subunit gamma	+1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	6,3	66000	6,05	60526	14	243	100	P49368	-	-
16	hnRNP L	+1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,4	70000	8,24	64125	12	104	100	P14866	-	-
17	hnRNP L	+1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,4	70000	8,24	64125	12	104	100	P14866	-	-
18	hnRNP L	+2,2	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,4	70000	8,24	64125	12	104	100	P14866	-	-
19	ATP synthase subunit beta	+1,9	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	4,7	53000	5,06	56553	21	481	100	P06576	Eh	Eh
20	ATP synthase subunit beta	+1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	4,7	53000	5,06	56553	21	481	100	P06576	Eh	Eh
21	Protein disulfide-isomerase A3	-2,1	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,4	58000	5,92	56775	14	293	100	P30101	Ei	Ei
22	Protein disulfide-isomerase A3	+2,1	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,4	58000	5,92	56775	14	293	100	P30101	Ei	Ei
23	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	+1,8	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,9	61000	7,96	57937	13	271	100	P14618	Cb	Cb
24	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	+2,0	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,9	61000	7,96	57937	13	271	100	P14618	Cb	Cb
25	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	+2,2	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,9	61000	7,96	57937	13	271	100	P14618	Cb	Cb
26	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	+1,3	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,9	61000	7,96	57937	13	271	100	P14618	Cb	Cb
27	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	+2,3	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	7,9	61000	7,96	57937	13	271	100	P14618	Cb	Cb
28	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	-2,0	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	8,0	55000	8,66	44965	5	113	100	Q8NC51	-	-
29	Uroporphyrinogen decarboxylase	-2,3	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	5,6	39000	5,70	40782	12	178	100	P06132	Ey	Ey
30	Septin-2	-1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	6,2	42000	6,13	41482	10	311	100	Q15019	Cb	Cb
31	Septin-2	+1,9	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	8,1	44000	8,40	51706	9	279	100	O75390	Et	Et
32	Citrate synthase, mitochondrial	+1,6	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	8,1	44000	8,40	51706	9	279	100	O75390	Et	Et
33	Citrate synthase, mitochondrial	+2,3	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	8,1	44000	8,40	51706	9	279	100	O75390	Et	Et
34	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1,4	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	8,1	38000	8,59	36049	5	270	100	P04406	Eo	Eo
35	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1,2	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	8,1	38000	8,59	36049	5	270	100	P04406	Eo	Eo
36	L-lactate dehydrogenase A chain	+1,8	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	9,5	35000	8,44	36689	10	284	100	P00338	Cb	Cb
37	L-lactate dehydrogenase A chain	+1,5	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	9,5	35000	8,44	36689	10	284	100	P00338	Cb	Cb
38	L-lactate dehydrogenase A chain	-2,1	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	9,5	35000	8,44	36689	10	284	100	P00338	Cb	Cb
39	L-lactate dehydrogenase A chain	-1,9	<1,1*10 ⁻³⁶	≥0,995	<1,1*10 ⁻³⁶	9,5	35000	8,44	36689	10	284	100	P00338	Cb	Cb

Tabelle 37: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3-12 zwischen EWS/FLI-1 Typ1 und Typ 2 Zelllinien.. Die Spalte pI gibt den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.

5.7.2 Differentiell exprimierte Protein im pH-Bereich 4-7

Um die Vorteile der besseren Auflösung im sauren pH-Bereich durch IPG 4-7 auch für den Vergleich der EFT-Zelllinien mit EWS/FLI-1 Typ1 und Typ 2 zu nutzen, wurden die Bilddateien der in Kapitel 5.6 angefertigten 2D-Gele in die Software „Progenesis“ geladen und analysiert. Die EFT-Zelllinien (siehe Tabelle 38) wurden nach ihrem exprimierten EWS/FLI-1 Typ eingeteilt, Neuroblastomzelllinien wurden nicht berücksichtigt. Die Kriterien, die die detektierten Spots zu erfüllen hatten, sind die selben wie in Kapitel 5.4 dargestellt.

Die Abbildungen 74-76 zeigen die Expressionsprofile der Proteinspots, die mithilfe der Software „Progenesis“ als differentiell exprimiert detektiert wurden. Eine ausführliche Darstellung ist in Anhang IV ersichtlich. Es konnten mit IPG 4-7 19 für eine Tumorunterart spezifische differentiell exprimierte Proteine detektiert und davon elf identifiziert werden (siehe Tabelle 40). Die Protein gehören den Klassen der Enzyme, Plasmaproteine, potentiellen Biomarker für kardiovaskuläre Krankheiten, sowie potentiellen Krebsbiomarkern an. Septin-2 konnte in diesem DIGE-Experiment als sowohl zwischen EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 als auch zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien differentiell reguliert detektiert werden. Der durchschnittliche Regulierungsfaktor der hier detektierten Proteinspots liegt zwischen 1,3- und 2,5-fach. Zur besseren Übersicht sind sämtliche als differentiell exprimiert detektierten Spots in Tabelle 39 zusätzlich als *Heatmap* aufgelistet.

Zelllinie	Kürzel	EWS/FLI-1
A673	A	Typ 1
SBSR-AKS	B	Typ 1
SK-ES1	D	Typ 2
SK-N-MC	E2	Typ 1
MHH-ES1	F	Typ 2
TC-71	H	Typ 1

Tabelle 38: Für den Vergleich der EWS/FLI-1 Typ 1 und Typ 2 exprimierender EFT verwendete Zelllinien.

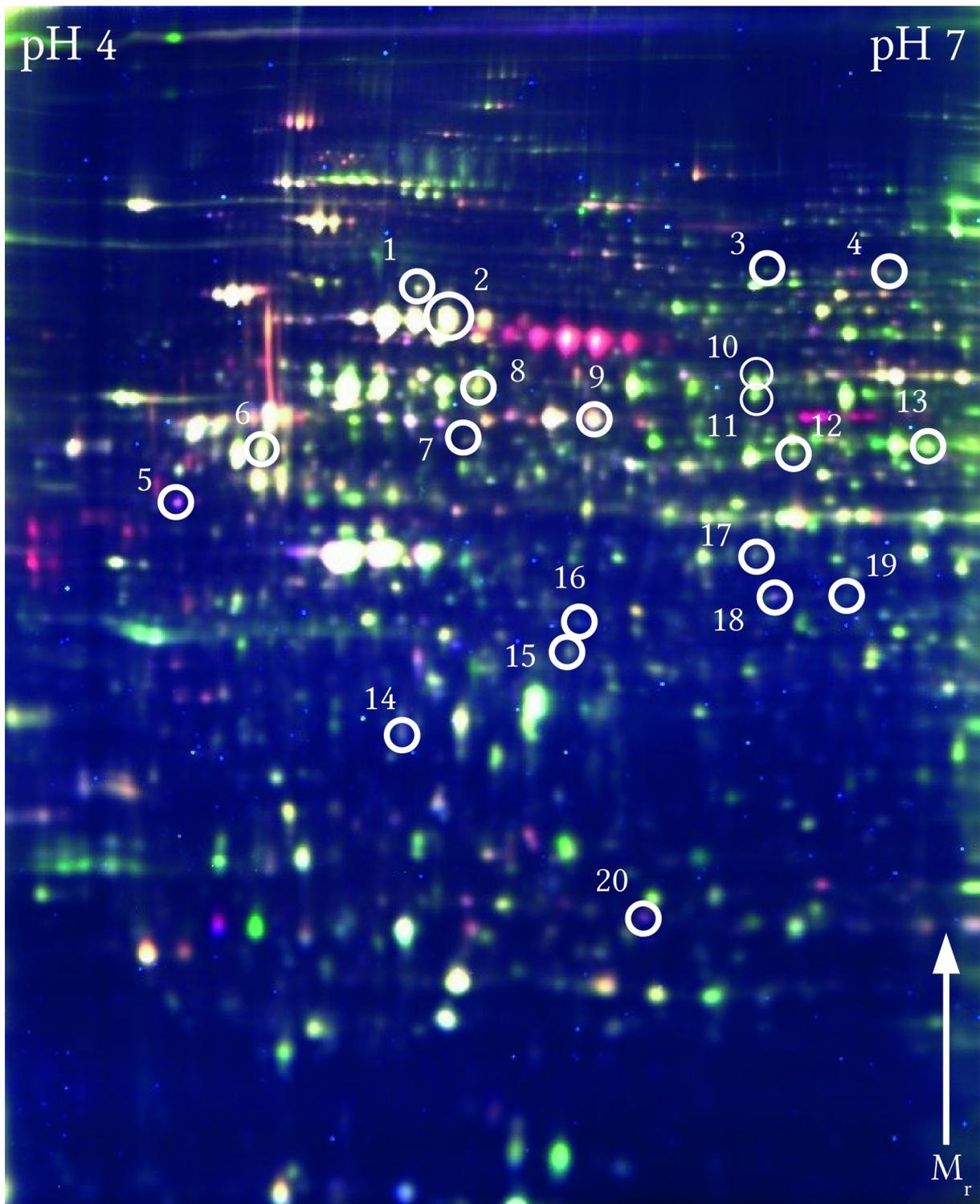
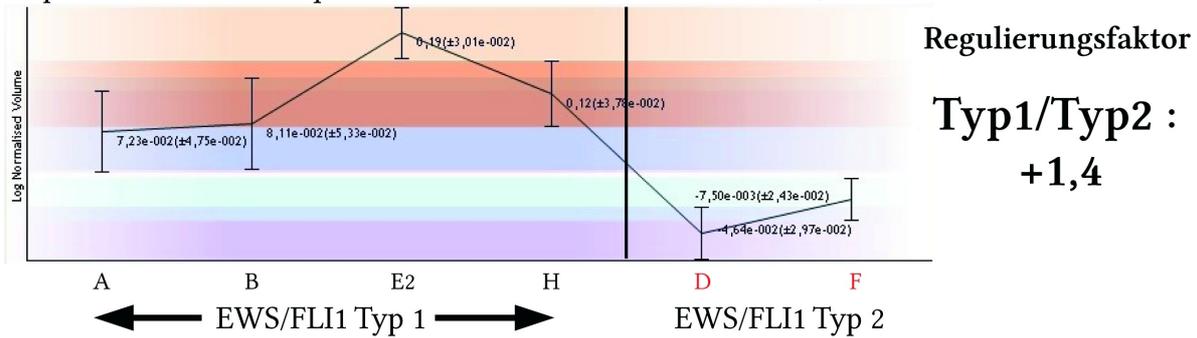
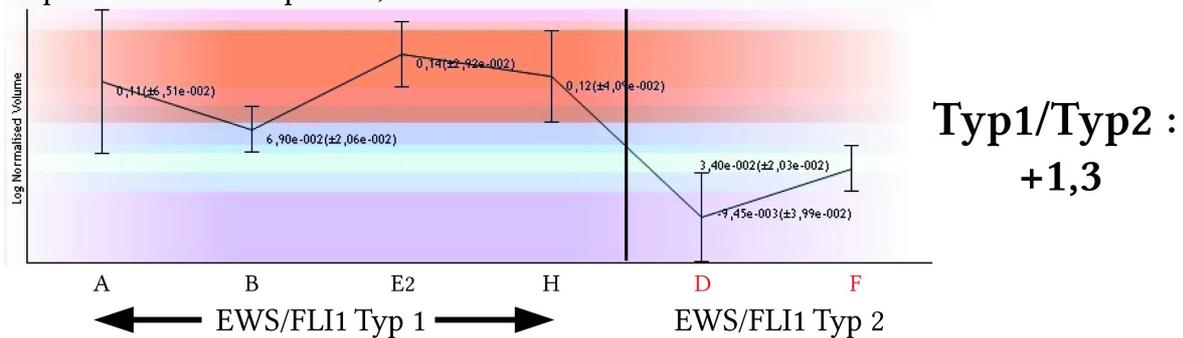


Abbildung 73: Übersicht der durch DIGE detektierten, differentiell regulierten Proteinspots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 exprimierenden EFT-Zelllinien im pH-Bereich 4-7.

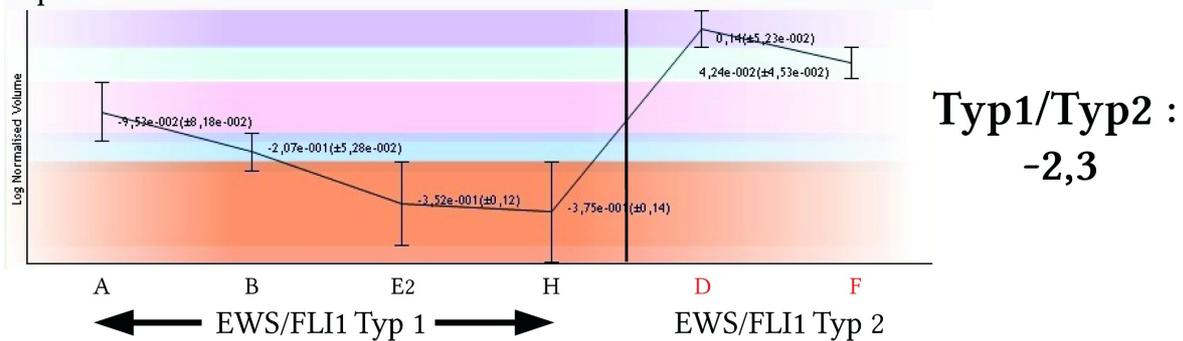
Spot Nr.1: NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial



Spot Nr.2: Stress-70 protein, mitochondrial



Spot Nr.5: Gamma-enolase



Spot Nr.6: ATP synthase subunit beta, mitochondrial

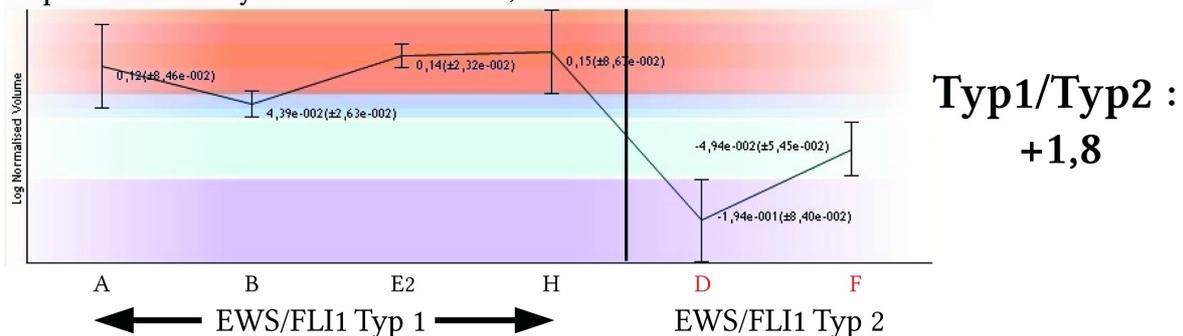
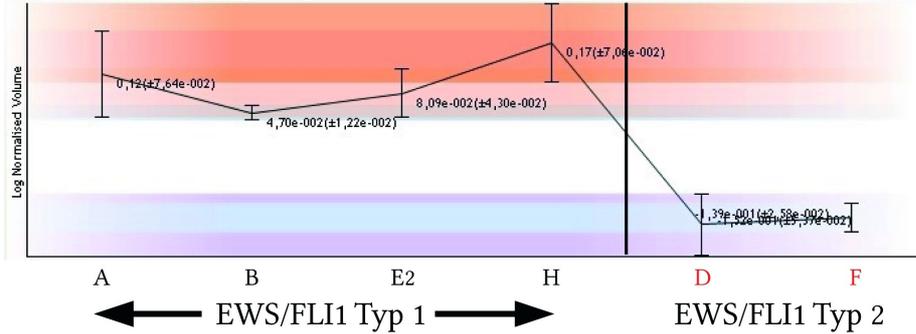


Abbildung 74: Expressionsprofile der mit IPG 4-7 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 73 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang IV.

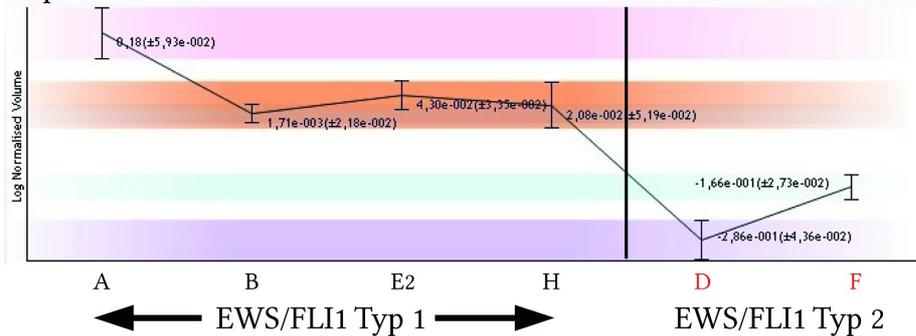
Spot Nr.7: T-complex protein 1 subunit epsilon



Regulierungsfaktor

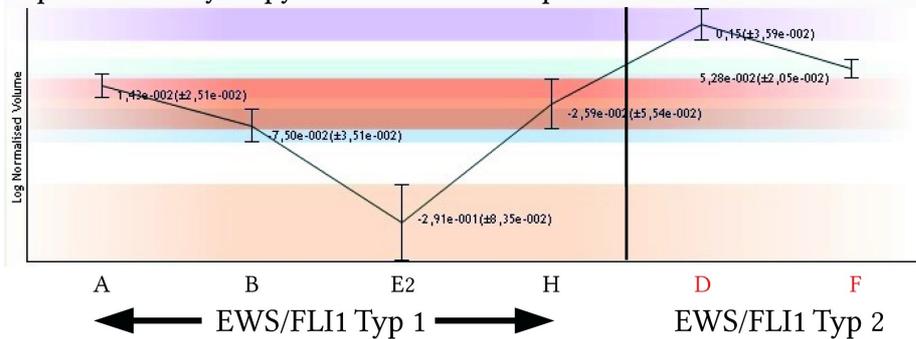
Typ1/Typ2 :
+1,8

Spot Nr.8: Protein disulfide-isomerase A3



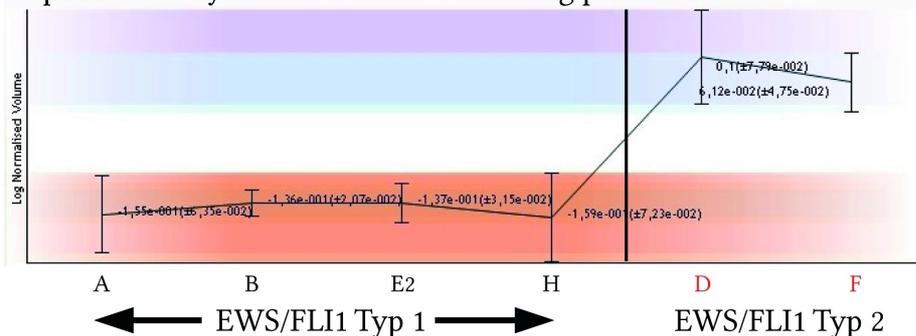
Typ1/Typ2 :
+2,0

Spot Nr.9: Dihydropyrimidinase-related protein 2



Typ1/Typ2 :
-1,7

Spot Nr.13: Glyoxalase domain-containing protein 4



Typ1/Typ2 :
-1,7

Abbildung 75: Expressionsprofile der mit IPG 4-7 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 73 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang IV.

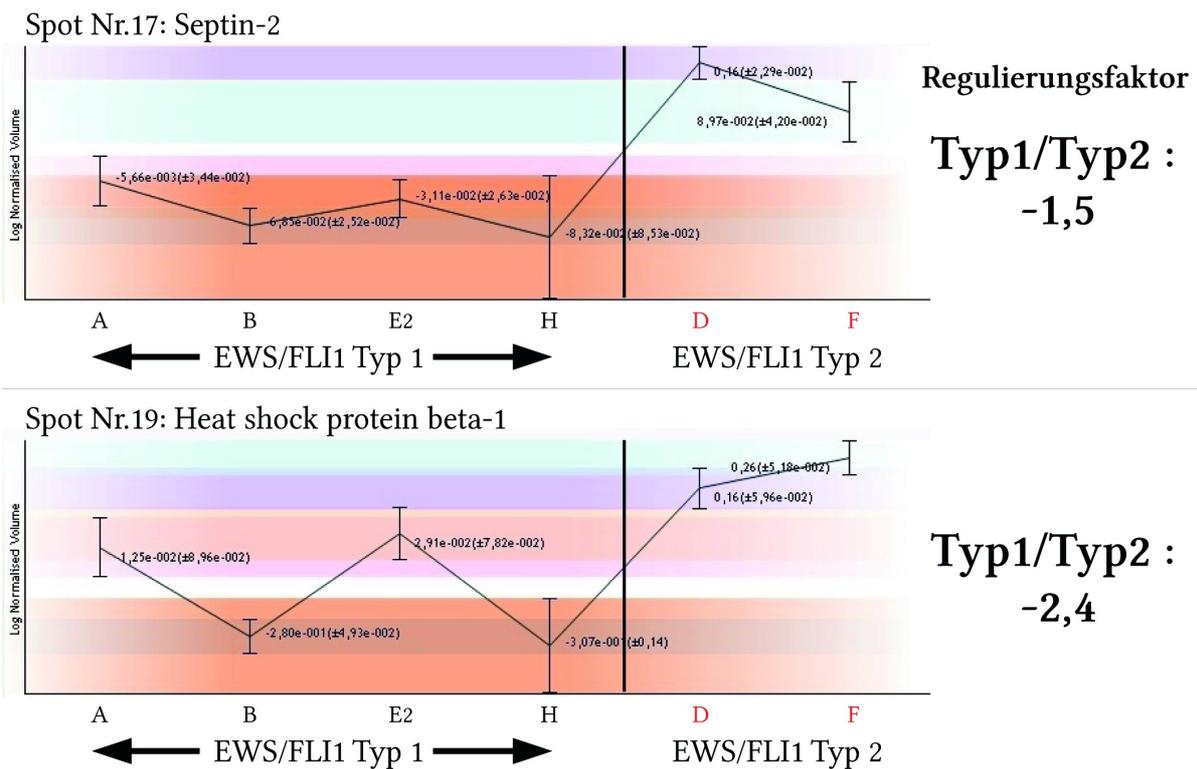


Abbildung 76: Expressionsprofile der mit IPG 4-7 detektierten, differentiell regulierten Spots zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 EFT-Zelllinien. Spotnummer korrespondiert zu den auf Abbildung 73 dargestellten Spotnummern. Rechts daneben ist der Regulierungsfaktor abgebildet. Es sind ausschließlich die Profile der identifizierten Proteine aufgeführt, ausführliche Darstellung aller Proteinspots in Anhang IV.

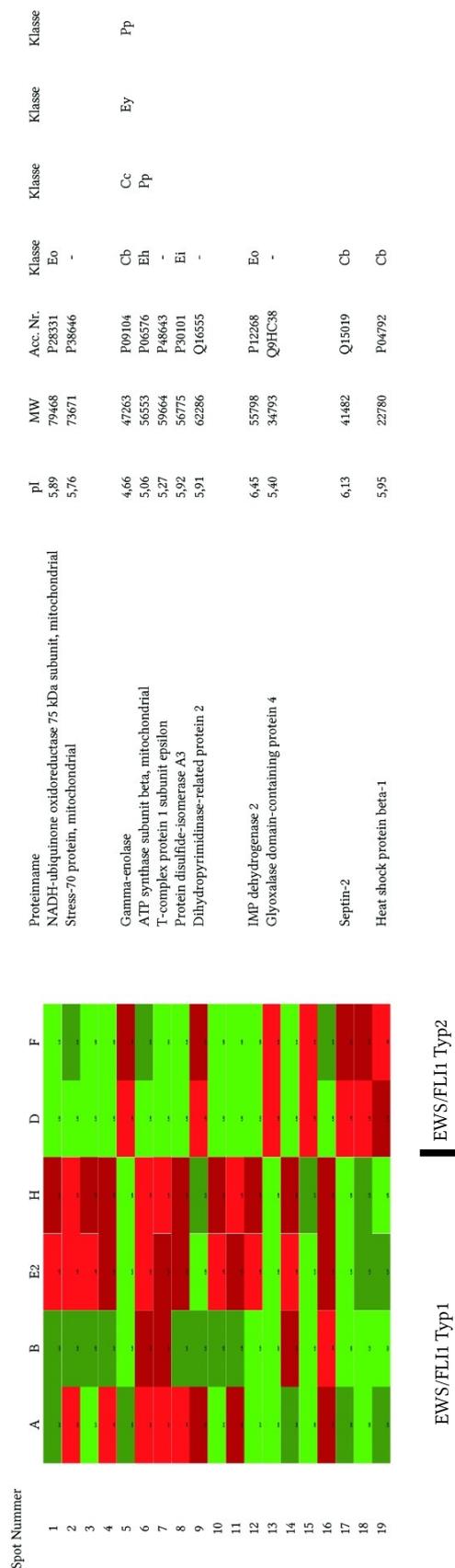


Tabelle 39: Heatmap der differentiell regulierten Proteine zwischen den EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 exprimierenden Zelllinien im pH-Bereich 4-7. Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteinspots wurde auf das Intervall 0,0-1,0 renormiert, in 4 Klassen eingeteilt und eine Farbe zugeordnet.

Proteinname	MW	Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	79468	P28331	Eo		
Stress-70 protein, mitochondrial	73671	P38646	-		
Gamma-enolase	47263	P09104	Cb	Cc	Pp
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56553	P06576	Eh		Ey
T-complex protein 1 subunit epsilon	59664	P48643	-		
Protein disulfide-isomerase A3	56775	P30101	Ei		
Dihydropyrimidinase-related protein 2	62286	Q16555	-		
IMP dehydrogenase 2	55798	P12268	Eo		
Glyoxalase domain-containing protein 4	34793	Q9HC38	-		
Septin-2	41482	Q15019	Cb		
Heat shock protein beta-1	22780	P04792	Cb		

Spot-Nr.	Proteinname	Faktor	ANOVA	Power	q-Wert	pI-exp.	MW-exp.	pI-theor.	MW-theor.	Peptide	Score	Score C.I.%	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse
1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	+1,4	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	5,25	77000	5,89	79468	19	141	100	P28331	Eo		
2	Stress-70 protein, mitochondrial	+1,3	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	5,36	76000	5,76	73671	24	603	100	P38646	-		
3	-	+1,9	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸											
4	-	+1,7	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸											
5	Gamma-enolase	-2,3	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	4,56	49000	4,66	47263	19	291	100	P09104	Cb	Cc	Pp
6	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	+1,8	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	5,82	56000	5,06	56553	20	493	100	P06576	Eh		
7	T-complex protein 1 subunit epsilon	+1,8	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	5,36	64000	5,27	59664	19	289	100	P48943	-		
8	Protein disulfide-isomerase A3	+2,0	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	5,60	59000	5,92	56775	5	283	100	P30101	Ei		
9	Dihydropyrimidinase-related protein 2	-1,7	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	5,98	72000	5,91	62286	13	192	100	Q16555	-		
10	-	+1,6	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸											
11	IMP dehydrogenase 2	+1,6	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	6,6	58000	6,45	55798	11	287	100	P12288	Eo		
12	-	-2,2	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	5,25	35000	5,40	34793	4	174	100	Q9HC38	-		
13	Glyoxalase domain-containing protein 4	-1,7	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸											
14	-	+1,8	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸											
15	-	-2,4	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸											
16	-	+2,1	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸											
17	Septin-2	-1,5	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	6,45	40000	6,13	41482	14	118	100	Q15019	Cb		
18	-	-2,5	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸											
19	Heat shock protein beta-1	-2,4	< 1,1*10 ⁻⁸	>0,995	< 1,1*10 ⁻⁸	6,08	26000	5,95	22780	5	233	100	P04792	Cb		

Tabelle 40: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3-12 zwischen EWS/FLI-1 Typ1 und Typ 2 Zelllinien.. Die Spalte pI gibt den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.

5.8 Differentielle Proteomanalyse mit DIG Glycan Differentiation Kit

Um differentiell glykosylierte Proteine zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien zu detektieren wurden von sämtlichen Zelllinien und deren biologischen Replikate pro Lektin jeweils ein 2D-Gele angefertigt (Doppelbestimmung) und die Proteine durch Western-Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend erfolgte eine Detektion der Glykoproteine durch das *DIG-Glycan Differentiation Kit* (Roche). Die Durchführung und Auswertung erfolgte wie in Kapitel 4.9 beschrieben. Die Proteinbeladung betrug 200 µg, die Auftragung auf den IPG-Streifen erfolgte durch anodales *cup-loading*. Die Auftrennung erfolgte durch IPG 3-12 und SDS-Gelen mit T= 12%. Die Laufparameter für die IEF und SDS-PAGE sind in Kapitel 4.4 beschrieben. Es wurden 5 für jeweils eine bestimmte Art der Glykosylierung spezifische Lektine verwendet (Tabelle 41). Durch diesen Ansatz ist es möglich unterschiedliche Zuckerreste an einer Proteinart zu unterscheiden und z.B. bei Mehrfach-Glykosylierung eines Proteins die fehlende /zusätzliche oder durch einen anderen Zucker ersetzte Glykosylierung zu detektieren. Die Western-Blots wurden danach mit dem Scanner Epson Pro 9600 eingescannt. Die Bilddateien wurden anschließend mithilfe der Software „Progenesis“ auf Deckungsgleichheit *gewarpt*. Die anschließende Überlagerung der einzelnen gewarpten Bilddateien zu den jeweiligen „Masterblots“ fand durch das Programm „Photofiltre“ statt. Die Analyse der Masterblots wurde durch augenscheinlichen Vergleich durchgeführt. Als differentiell reguliertes Glykoproteine wurden nur total regulierte Proteine berücksichtigt, die in allen Zelllinien einer Tumorart vorhanden bzw. nicht vorhanden waren. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 77-80 dargestellt, die identifizierten Proteine in Tabelle 42 zusammengefasst.

Lektin	Reagiert mit Glykosylierungstyp	Kürzel
GNA	Endständige Mannose 1,3; 1,6 oder 1,2 mit weiterer Mannose verknüpft. Zur Erkennung von hoch-mannosehaltigen N-Glycanketten.	DIG-Label 1
SNA	Sialinsäure 2,6 mit Galaktose verknüpft. Zur Erkennung von sialysierten N-Glycanketten.	DIG-Label 2
MAA	Sialinsäure 2,3 mit Galaktose verknüpft. Zur Erkennung von sialysierten O-Glycanketten.	DIG-Label 3
PNA	Disaccharid Galaktose 1,3 mit N-acetylgalaktosamin verknüpft. Zur Erkennung von O-glykosidisch verknüpften Kohlenhydratketten.	DIG-Label 4
DSA	Galaktose 1,4 mit N-Acetylglucosamin verknüpft in N- und O- Glykanen.	DIG-Label 5

Tabelle 41: Auflistung der verwendeten Lektine, deren Beschreibung und Kürzel.

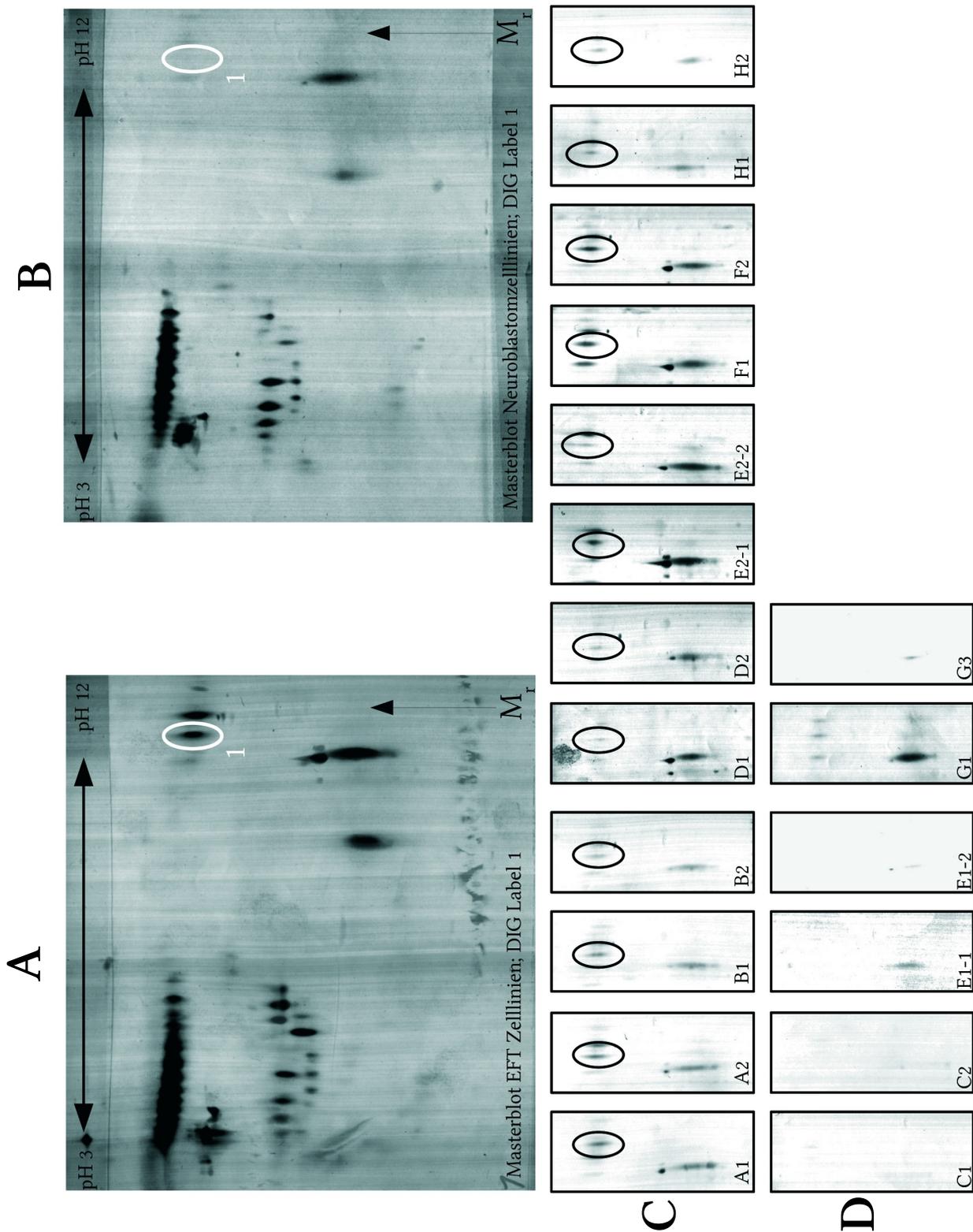


Abbildung 77: Western-Blots der mit DIG-Label 1 gefärbten, differentiellen Glykoproteomanalyse von EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die vereinigten Western-Blots der EFT- und Neuroblastomzelllinien sind in (A) bzw. (B) dargestellt. (C) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen EFT-Zelllinien (D) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen Neuroblastomzelllinien. Buchstaben kennzeichnen die jeweilige Zelllinie, Zahlen das jeweilige biologische Replikat. Kennzeichnung des differentiell regulierten Proteins durch Ellipse (A-D) und Nummer (A,B).

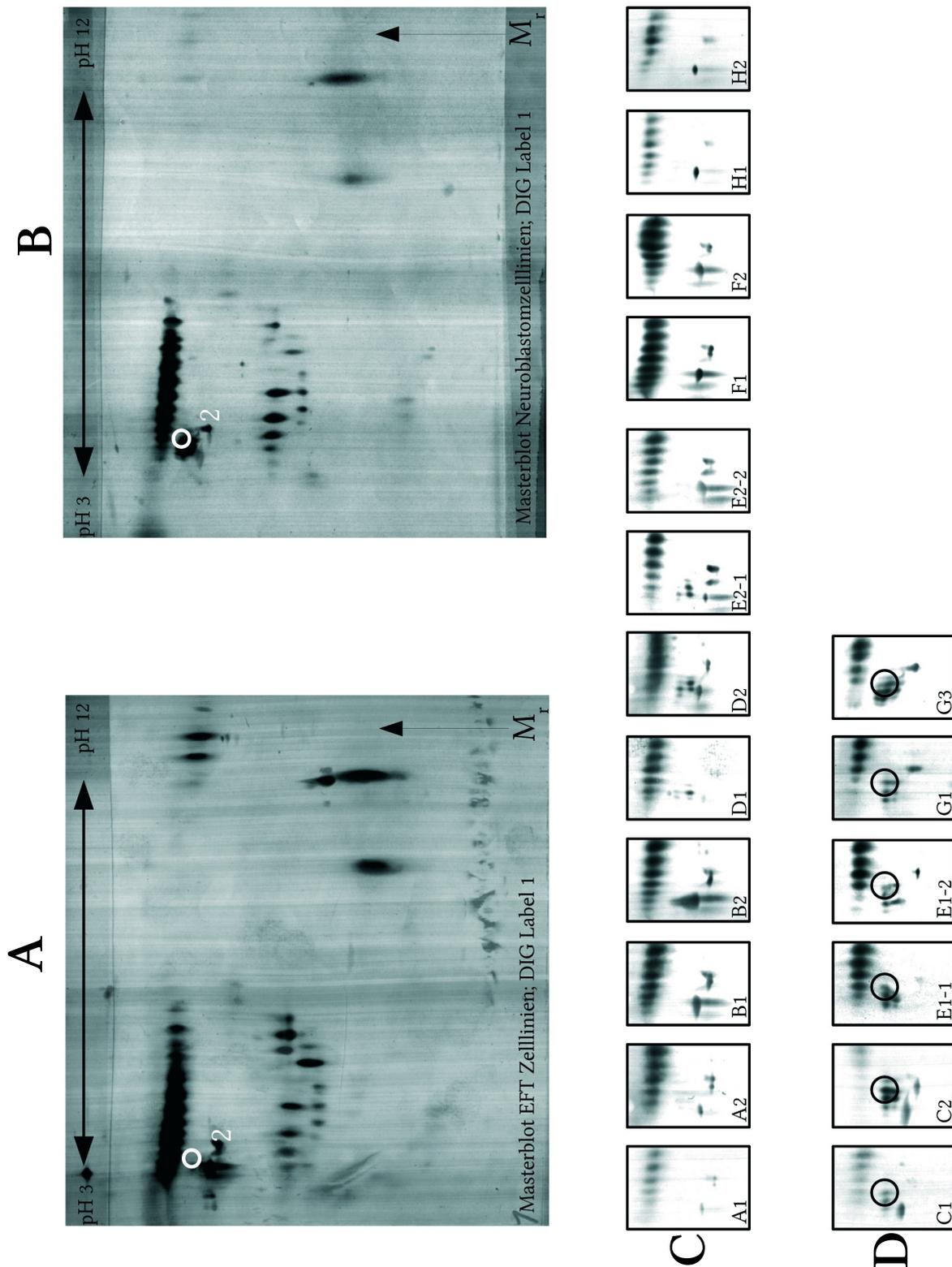


Abbildung 78: Western-Blots der mit DIG-Label 1 gefärbten, differentiellen Glykoproteomanalyse von EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die vereinigten Western-Blots der EFT- und Neuroblastomzelllinien sind in (A) bzw. (B) dargestellt. (C) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen EFT-Zelllinien (D) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen Neuroblastomzelllinien. Buchstaben kennzeichnen die jeweilige Zelllinie, Zahlen das jeweilige biologische Replikat. Kennzeichnung des differentiell regulierten Proteins durch Kreis (A-D) und Nummer (A,B). Geblottete 2D-Gele wurden mit IPG 3-12 und SDS-Gelen mit T=12% angefertigt.

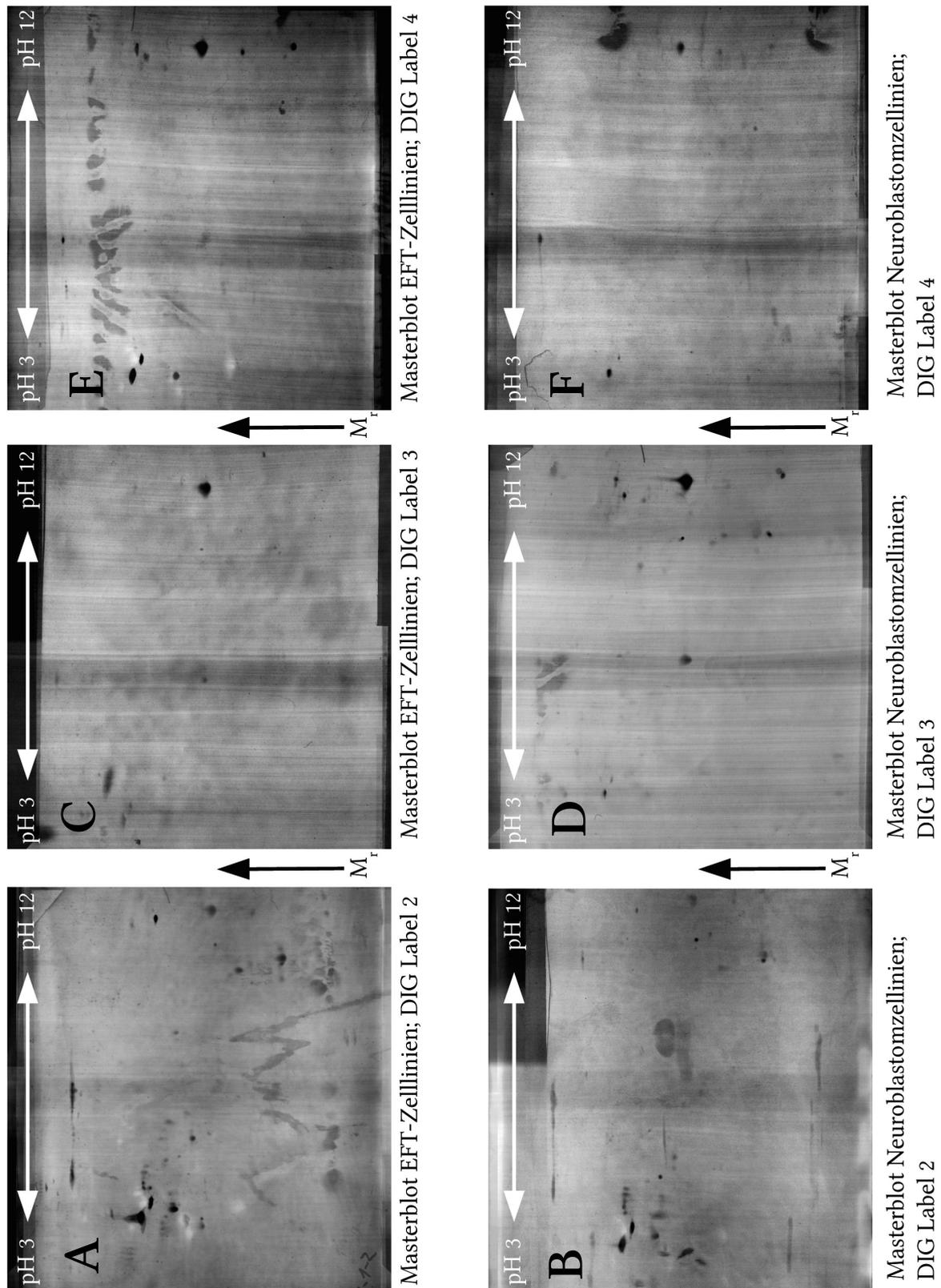


Abbildung 79: Vereinigte Western-Blots der jeweiligen Tumorarten und DIG-Label. (A) EFT-Zelllinien und DIG-Label 2. (B) Neuroblastomzelllinien und DIG-Label 2. (C) EFT-Zelllinien und DIG-Label 3. (D) Neuroblastomzelllinien und DIG-Label 3. (E) EFT-Zelllinien und DIG-Label 4. (F) Neuroblastomzelllinien und DIG-Label 4. Es konnte keine für eine Tumorart spezifische differentielle Glykosylierung gefunden werden, die in allen Zelllinien der jeweiligen Tumorart vorhanden bzw. nicht vorhanden war. Geblottete 2D-Gele wurden mit IPG 3-12 und SDS-Gele mit T=12% angefertigt.

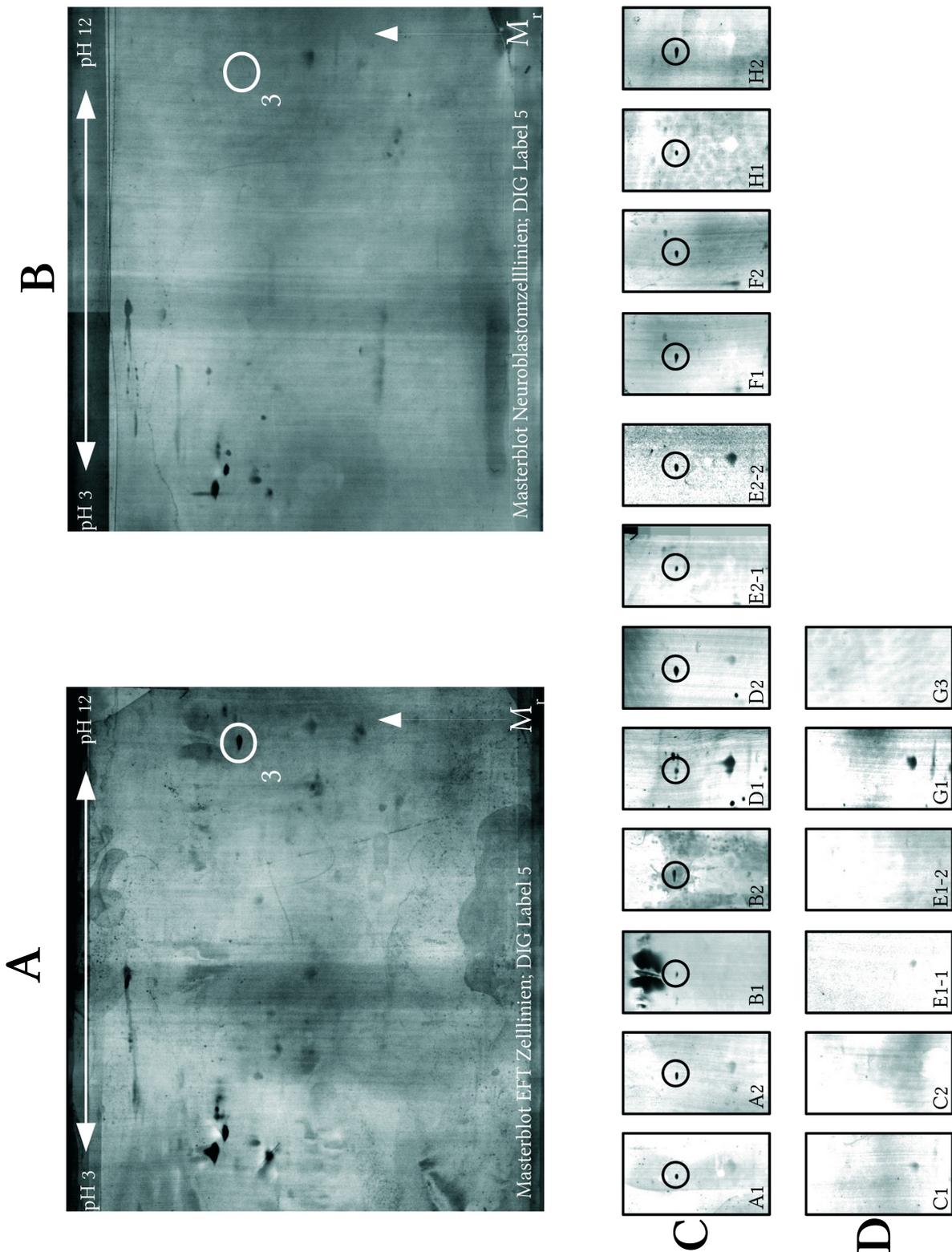


Abbildung 80: Western-Blots der mit DIG-Label 5 gefärbten, differentiellen Glykoproteomanalyse von EFT- und Neuroblastomzelllinien. Die vereinigten Western-Blots der EFT- und Neuroblastomzelllinien sind in (A) bzw. (B) dargestellt. (C) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen EFT-Zelllinien (D) zeigt Ausschnitte der Western-Blots der einzelnen Neuroblastomzelllinien. Buchstaben kennzeichnen die jeweilige Zelllinie, Zahlen das jeweilige biologische Replikat. Kennzeichnung des differentiell regulierten Proteins durch Kreis (A-D) und Nummer (A,B). Geblottete 2D-Gele wurden mit IPG 3-12 und SDS-Gelen mit T=12% angefertigt.

Spot Nummer	Protein	DIG Label	Uniprot Acc. Nummer
1	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	1	P40939
2	Lamin B1	1	P20700
3	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	5	Q9NVI7

Tabelle 42: Liste der identifizierten Glykoproteine des Vergleichs zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien.

Auf den Abbildungen 77-80 sind die angefertigten Western-Blots der jeweiligen DIG-Label und Tumorart in einem „Masterblot“ vereint. Dieser Masterblot ist eine Überlagerung aller 2D-Western-Blots einer Tumorart und DIG-Label. Dadurch sind die Intensitäten der angefärbten Glykoproteine auf den einzelnen, darunter ausschnittsweise gezeigten, Western-Blots geringer. Eine Überlagerung des in Abbildung 77 gezeigten Western-Blot Ausschnittes der Neuroblastom-Zelllinie G-1 mit den Ausschnitten der Western-Blots der EFT-Zelllinien zeigt, dass das als differentiell reguliertes / glykosyliertes detektierte Protein mit der Spot Nr.1 nicht auf dem Western-Blot der Zelllinie G-1 vorhanden ist (Abbildung 81).

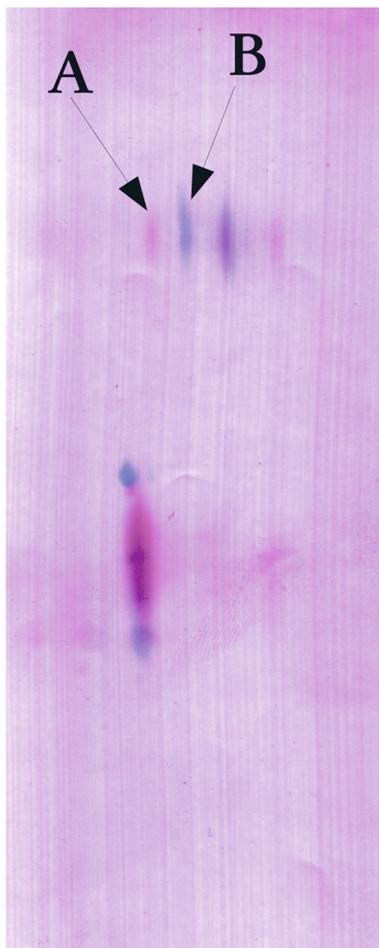


Abbildung 81:

Ausschnitt der mit DIG-Label 1 gefärbten Western-Blots der Zelllinien A-1 und G-1. Glykoproteine der Zelllinie A-1 sind blau, Glykoproteine der Zelllinie G-1 rot dargestellt. A zeigt, dass die Lage des vermeintlich in der Neuroblastom-Zelllinie G-1 vorkommende als differentiell reguliert angesehenen Glykoproteins Nr.1 nicht mit dem in den EFT-Zelllinien vorkommenden Protein Nr.1 übereinstimmt. B zeigt das als differentiell reguliertes Glykoprotein identifizierte Protein Nr. 1 an (siehe Abbildung 77)

Bei den Lektinen DIG-Label 2-4 konnten keine für eine Tumorart spezifische differentielle Glykosylierung detektiert werden. Ein Vergleich mit den Daten aus den DIGE-Experimenten zeigte, dass keines der hier gefundenen differentiel glykosylierten Proteine in die Analyse miteinbezogen wurde, da diese Glykoproteine insgesamt zu gering exprimiert sind und aufgrund des zu schwachen Signals vom Detektionsalgorithmus nicht erkannt wurden. Somit lässt sich die Frage ob diese Glykoproteine zwischen den EFT- und NB-Zelllinien differentiel exprimiert oder differentiel glykosyliert sind nicht beantworten.

5.9 Differentielle Glykoproteomanalyse der EWS/FLI1 Typ 1/ Typ 2 EFT-Zelllinien

Die in 5.5.2 angefertigten Western-Blots wurden herangezogen, um die EFT-Zelllinien, die den Typ 1 bzw. Typ 2 des EWS/FLI1-Fusionsproteins exprimieren, miteinander zu vergleichen. Bei keinem der verwendeten DIG-Label konnte ein für den jeweiligen Typ charakteristisches Glykosylierungsmuster festgestellt werden, das sich vom anderen Typ unterschied.

5.10 Methodenentwicklung zur Vorfraktionierung von Proteinen mit $pI > 7$

In diesem Teil der Arbeit wird die Methodenentwicklung zur Vorfraktionierung von Proteinen mit $pI > 7$ mittels Trägerampholyt-IEF-Gelen aus granuliertem Sephadex aufgezeigt.

Durchführungsprotokoll „Klassische Sephadexvorfraktionierung“ (KSV) [12]:

Reagenzien:

- Quellpuffer „S“ (6M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 1% CHAPS, 200 mM HED):
18,02 g Harnstoff und 7,612 g Thioharnstoff in 30,8 ml *Aqua bidest.* lösen.
Mit einer Spatelspitze (500 mg) Mischbettionenaustauscher versetzen, 45 Minuten rühren. Danach filtrieren und 0,4 g CHAPS und 960 μ l HED zu 40 ml des Filtrats zugeben. Der Quellpuffer wird in Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.
- Lysepuffer „S“ (7M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4% CHAPS; 2% DTT)
Zu 21 g Harnstoff und 7,62 g Thioharnstoff werden in 28,5 ml *Aqua bidest.* gelöst. Zugabe von 500 mg Mischbettionenaustauscher Serolit MB-1 und 45 Minuten bei Raumtemperatur rühren lassen. Lösung über Faltenfilter filtrieren. Zu 40 ml Lösung werden 1,6 g CHAPS und 0,8 g DTT zugegeben. Aliquotieren und bei -80°C lagern.
- pI-Marker 4,0; 5,2; 5,3; 6,3; 7,1; 8,5; 8,9; 10,1; 10,2; 10,5
1 mg des pI-Markers wird in 1 ml *Aqua bidest* gelöst. Lagerung bei 4°C . Die pI-Marker müssen aufgrund ihrer unterschiedlichen Farbintensität vor ihrem Einsatz im Sephadexgel getestet werden um die erforderliche Verdünnung festzulegen.
- Sephadex G-200 SF
- Trägerampholyte „Pharmalyte 3-10“ (GE Healthcare)
- Trägerampholyte „Pharmalyte 8-10,5“ (GE Healthcare)

- Trägerampholyte „Servalyte 2-11“ (Serva)
- Trägerampholyte „Servalyte 9-11“ (Serva)

Durchführung:

Zur Herstellung von 3 ml Quellpuffer „S-TA“ werden 2880 µl Quellpuffer „S“ mit 120 µl Trägerampholyten gemischt. Anschließend werden 145mg Sephadex G-200 in einem kleinen Rollrandglas mit 3 ml Quellpuffer „S-TA“ vorsichtig durch umrühren gelöst. Luftblasen sind dabei zu vermeiden. Die Mischung wird 24-36 Stunden bei Raumtemperatur gequollen. Danach erfolgt die Zugabe der pI-Marker, der Probe und Lysepuffer „S“ auf ein Gesamtvolumen von 4,5 ml. Das Sephadexgel wird so lange vermischt, bis die pI-Marker homogen verteilt sind. Luftblasen vermeiden. Zur Vorbereitung der Sephadextrennapparatur wird zunächst auf eine Kühlplatte eine kleine Menge Kerosin zur bessern Wärmeleitung vorgelegt. Anschließend wird der Sephadex-Tray luftblasenfrei aufgelegt. Die Elektroden, unter denen sich zwei Lagen in 1-fach destilliertem Wasser getränkte Elektrodenpapier befinden, werden angebracht. Anschließend wird das Sephadexgel in eine Laufbahn pipettiert und mit Silikonöl zum Schutz vor Austrocknung überschichtet.

5.10.1 Klassische Sephadexvorfraktionierung

Bei der klassischen Sephadexvorfraktionierung wird die Probe über die gesamte Trenndistanz mit dem Sephadexgel gemischt und verteilt.

Zunächst wurde versucht den „Zusammenbruch“ des basischen Teils des Trägerampholytgradienten durch die Konzentrationserhöhung der Trägerampholyte auf 3,67% im Sephadexgel zu verzögern. Dieser Versuch führte nicht zum Erfolg, da der basische Bereich über pH 10,1 zusammenbrach bevor die pI-Marker und somit die Proteine fokussiert waren. Außerdem wurde der gesamte basische Bereich stark gespreizt, was eine Probenahme erschwert, da nur eine begrenzte Menge Sephadex (etwa 3 Markierungsstriche auf dem

Sephadex-Tray, siehe Abbildung 82), für die anschließende erste Dimension mittels IPG-IEF, auf die IPG-Streifen aufgetragen werden kann. Die Laufparameter sind in Tabelle 43 dargestellt.

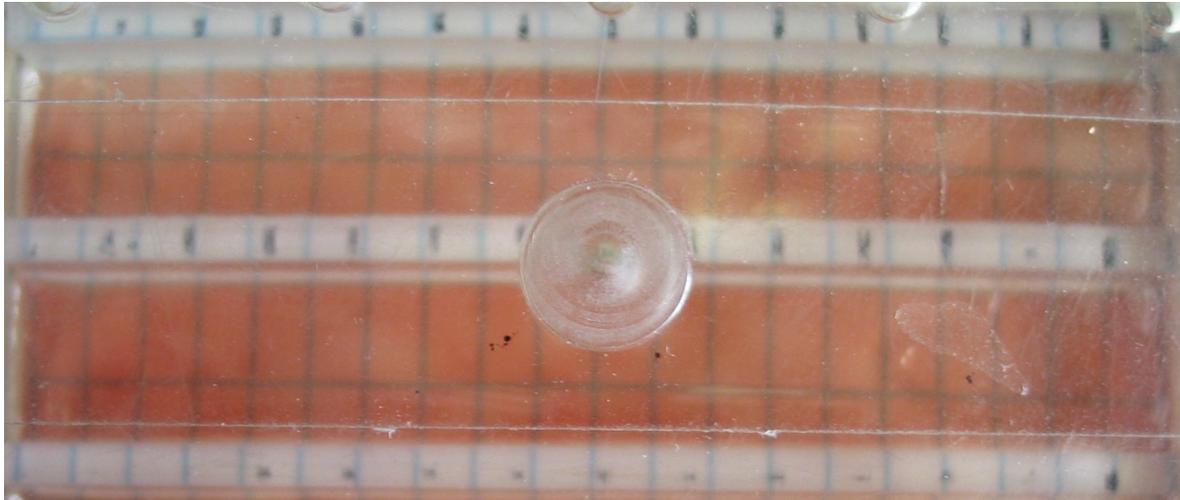


Abbildung 82: KSV, Start der Fokussierung

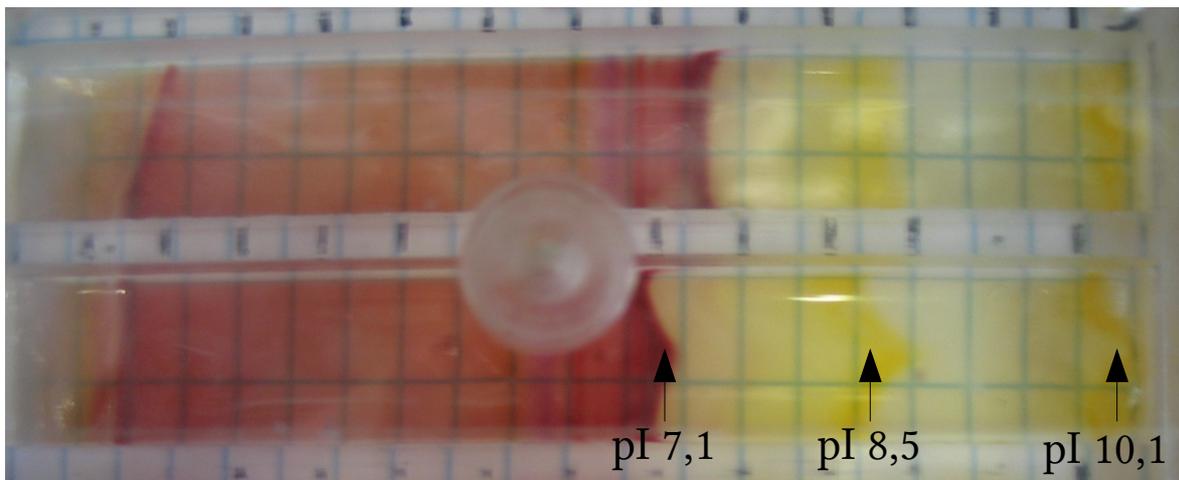


Abbildung 83: KSV, 450 Vh: Die pI-Marker beginnen zu fokussieren, pH-Bereich über 10,1 ist nicht mehr vorhanden.

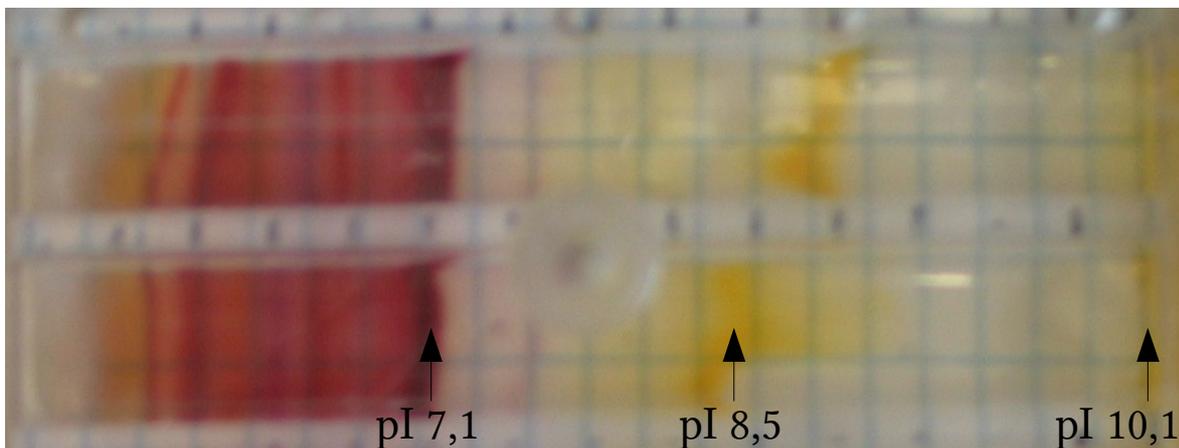


Abbildung 84: KSV, 1500 Vh: Basischer Bereich über pH 10,1 ist nicht vorhanden, noch keine abgeschlossene Fokussierung der sauren pI-Marker

Spannung	Dauer	Stromstärke pro Bahn
150 V	60 Minuten	1,5 mA
300 V	60 Minuten	1,5 mA
1000 V	120 Minuten	1,5 mA

Tabelle 43: Laufparameter für klassische Sephadexvorfraktionierung

Um den basischen Bereich einzuengen wurde der Anteil der Trägerampholyte mit saurem pI erhöht. Die getesteten Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 44 dargestellt.

Pharmalyte 3-10	Pharmalyte 8-10,5
11 Teile	1 Teil
10 Teile	2 Teile
9 Teile	3 Teile

Tabelle 44: Getestete Mischungsverhältnisse von Trägerampholyten

Dieser Versuch führte nicht zum Erfolg, da der Bereich ab pH 10,1 des Trägerampholytgradienten wieder schneller zusammenbrach als die pI-Marker fokussierten und der basische Bereich immer noch stark gespreizt war.

5.10.2 Sephadexvorfraktionierung mit anodalem Probenauftrag

Da eine Stabilisierung des basischen Teils des Trägerampholytgradienten nicht erzielt werden konnte wurde eine Sephadexvorfraktionierung mit anodalem Probenauftrag (ASV) getestet. Das Prinzip hierbei ist das selbe wie bei der NEPHGE. Durch die farbigen pI-Marker sollte pH-Gradientenverlauf beobachtet und die Vorfraktionierung rechtzeitig vor dem Auswandern der pI-Marker, und somit auch der Proteine, in das kathodale Elektrodenpapier beendet werden.

Für die Reagenzien siehe Kapitel 5.10

Durchführung:

Zur Herstellung von 3 ml Quellpuffer „S-TA“ werden 2880 μl Quellpuffer „S“ mit 90 μl Trägerampholyten 3-10 und 30 μl Trägerampholyte 8-10,5 gemischt. Anschließend werden 145mg Sephadex G-200 SF in einem kleinen Rollrandglas (A) mit 3 ml Quellpuffer „S-TA“ vorsichtig mit einem Spatel gelöst. Luftblasen sind dabei zu vermeiden. Ein zweites Rollrandglas (B) mit Sephadexgel wird angesetzt. Dazu werden 49 mg Sephadex-G-200 SF mit 1010 μl Quellpuffer „S-TA“ unter Vermeidung von Luftblasen gemischt. Beide Gläser mit Sephadexgel werden 24-36 Stunden bei Raumtemperatur gequollen. Das Rollrandglas (A) wird mit 1,5 ml Lysepuffer „S“ aufgefüllt und gemischt. Das Rollrandglas (B) wird mit den pI-Markern, der Probe und Lysepuffer „S“ auf 1515 μl aufgefüllt und gemischt bis die pI-Marker homogen verteilt sind. In beiden Fällen Luftblasen vermeiden. Zunächst erfolgt die Auftragung des Sephadexgels aus Rollrandglas (B) an der anodalen Seite des Sephadex-Trays. Das Sephadexgel aus Rollrandglas (A) wird dahinter pipettiert (Abbildung 85). Luftblasen vermeiden. Mit Silikonöl überschichten.

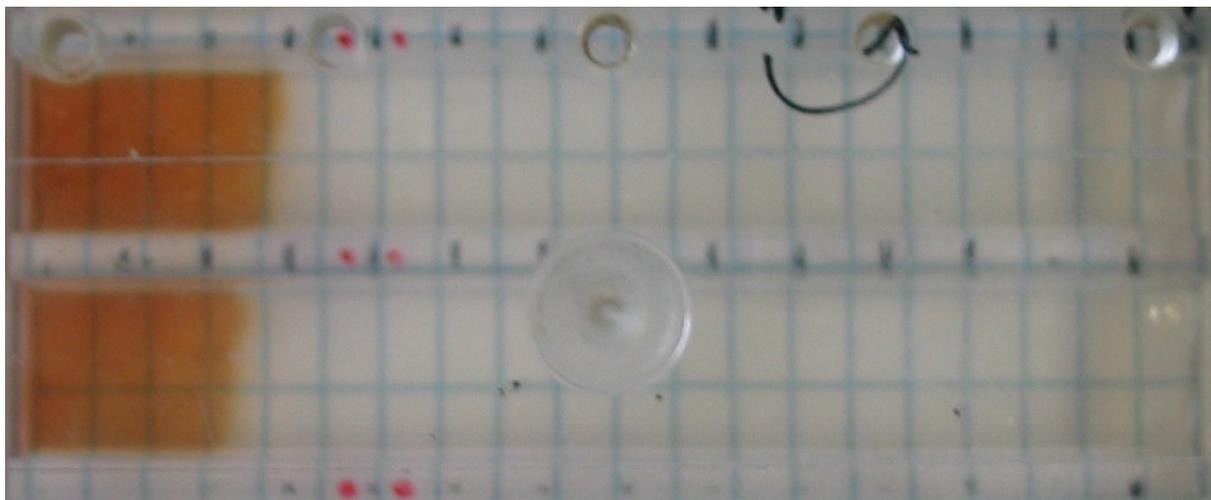


Abbildung 85: ASV, Start der Vorfraktionierung.

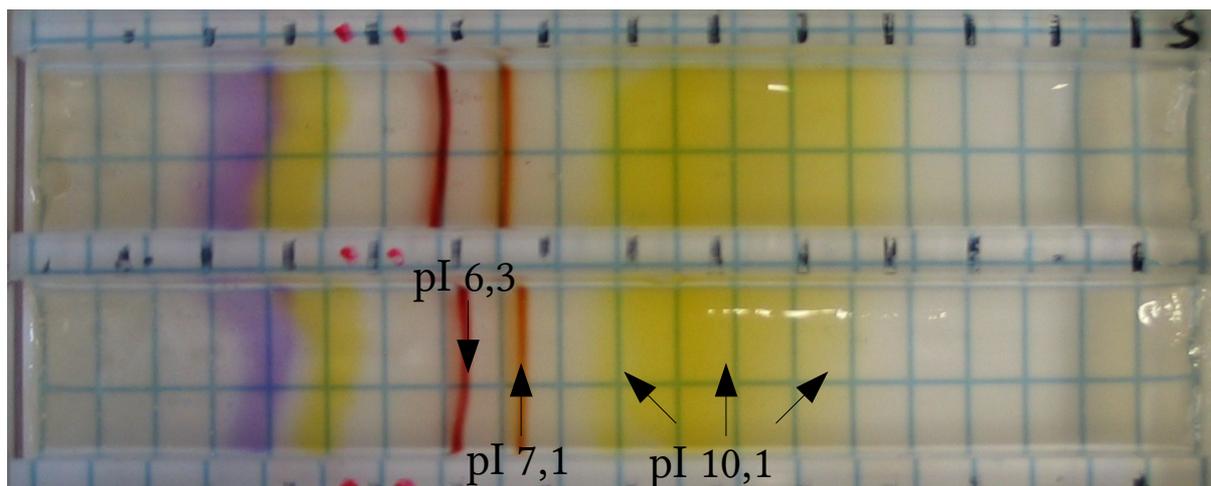


Abbildung 86: ASV, 300 Vh, der pI-Marker 10,1 fokussiert nicht in einer scharfen Bande und wurde in nachfolgenden Versuchen durch pI-Marker 10,2 ersetzt.

Die Laufparameter sind in Tabelle 45 dargestellt.

Spannung	Dauer	Max. Stromstärke pro Bahn
150 V	60 Minuten	1,5 mA
300 V	30 Minuten	1,5 mA

Tabelle 45: Laufparameter für Sephadex mit anodalem Probenauftrag.

Der pI-Marker 10,1 musste in den nachfolgenden Versuchen durch den pI-Marker 10,2 ersetzt werden, da der Marker 10,1, im Gegensatz zu Marker 10,2, nicht in einer scharfen Bande fokussiert (Abbildung 86). Durch den anodalen Probenauftrag konnte erstmals eine Möglichkeit der Vorfraktionierung ohne vorzeitigen Verlust des basischen Bereichs realisiert werden.

5.10.3 Optimierungsschritte

5.10.3.1 Optimierung für höhere Spannung bei nachfolgender IEF mit IPG

Die bis zu diesem Zeitpunkt noch bestehenden Probleme mit der zu geringen Spannung bei der nachfolgenden IEF mit IPG konnten durch 3 Schritte gelöst werden:

- Absenkung der TA-Konzentration im Sephadex-Gel auf 1%
- Keine Zugabe von TA im Quellpuffer der IPG-Streifen
- Erhöhung der maximalen Stromstärke auf 100 μ A pro IPG-Streifen im pH-Bereich 6-12

Durch die ersten beiden Schritte konnte die Leitfähigkeit des IPG-Streifens so weit gesenkt werden, dass eine genügend hohe Spannung für die IEF mit IPG erreicht werden konnte. Die Erhöhung der maximalen Stromstärke steigert die maximal erreichbare Spannung nochmals. Allerdings muss hier der Wechsel der Elektrodenpapiere des IPG-Streifens jede Stunde (bis zum Ende der Fokussierung) durchgeführt werden, da ansonsten der IPG-Streifen aufgrund der starken Wärmeentwicklung „durchbrennt“.

5.10.3.2 Verwendung anderer Trägerampholyte

Um einen pH-Gradienten zu erzeugen, der möglichst weit in den basischen Bereich hineinreicht, wurden statt den Pharmalyten 3-10 und 8-10,5 nun Servalyte 2-11 und 9-11 eingesetzt. Dadurch konnte mit der klassischen Sephadex-Vorfraktionierung eine Fokussierung des pI-Markers 10,1 weiter der Kathode entfernt erzielt werden, allerdings immer noch unter Verlust der Proteine mit pI > 10,1 (nicht gezeigt).

5.10.3.3 Weitere pI-Marker

Durch die Verwendung eines pI-Markers mit dem isoelektrischen Punkt 10,2 konnte eine bessere Abschätzung des Fokussierungsstands erreicht werden, da dieser pI-Marker in einer scharfen Bande, im Gegensatz zum pI-Marker 10,1, fokussiert.

5.10.4 Fazit

Die Verwendung von Trägerampholyten in 1%-iger Konzentration ermöglicht eine genügend hohe Spannung bei der der Vorfraktionierung nachfolgenden IEF mit IPG 3-12 und 6-12.

Durch anodalen Probenauftrag sind die Voraussetzungen für eine Vorfraktionierung von basischen Proteinen mit einem $pI > 10,1$ mittels eines Trägerampholyt pH-Gradienten in einem Gel aus granuliertem Sephadex geschaffen, da der Verlauf des pH-Gradienten abschätzbar ist und die Vorfraktionierung beendet werden kann, bevor Proteine in das kathodale Elektrodenpapier einwandern,.

5.10.5 Vorfraktionierung von Proteinen mit $pI > 7$ aus *Bacillus subtilis*

5.10.5.1 Proteinextrakt aus *Bacillus subtilis* mit ribosomalen Proteinen

Nach der Schaffung von Bedingungen, die die Vorfraktionierung von Proteinen mit einem $pI > 7$ ermöglichen sollten, wurde das System am Modell-Mikroorganismus *Bacillus subtilis* getestet. Als IPG wurde der pH-Bereich 3-12 gewählt um die Trennschärfe und Kreuzkontaminationen mit Proteinen anderer Fraktionen beurteilen zu können.

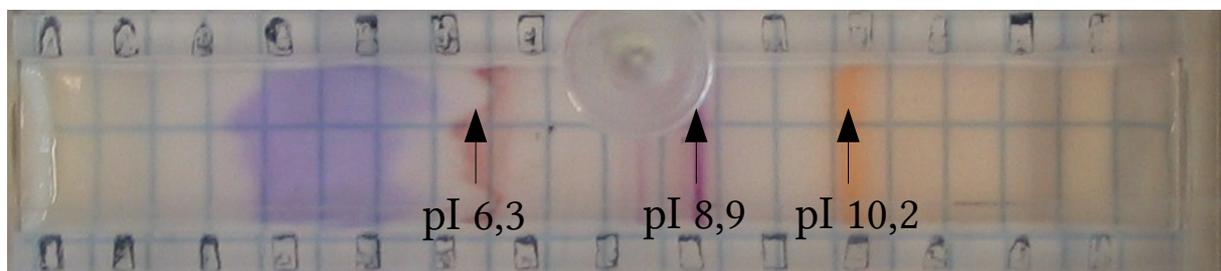


Abbildung 87: Ende der Fokussierung, 500 Vh. Sephadexgel mit 3mg Proteinextrakt aus *Bacillus subtilis*.

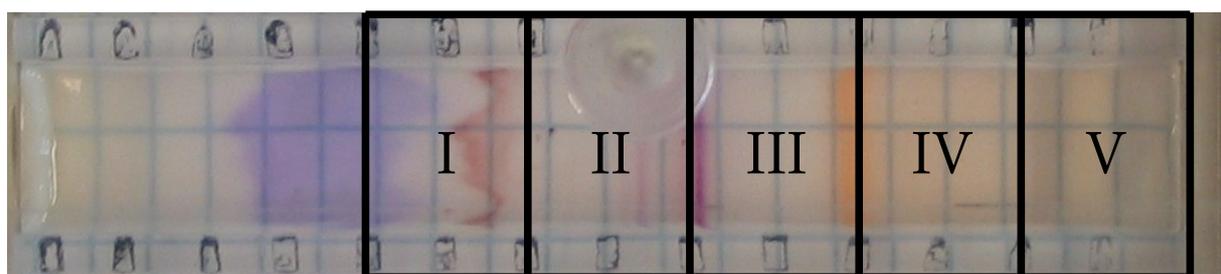


Abbildung 88: Probenahme, die römischen Ziffern stehen für die einzelnen Fraktionen

Zeit	Spannung	Max. Stromstärke
1 h	150 V	Max. 2,5 mA
10 Minuten	230 V	Max. 2,5 mA
10 Minuten	400 V	Max. 2,5 mA
10 Minuten	600 V	Max. 2,5 mA
20 Minuten	1000 V	Max. 2,5 mA

Tabelle 46: Laufparameter für die Vorfraktionierung

Zeit	Spannung	Max. Stromstärke
2 h	150 V	100 μ A
2 h	300 V	100 μ A
3 h	600 V	100 μ A
2 h	Linearer Gradient auf 8000 V	100 μ A
3,5 h	8000 V	100 μ A

Tabelle 47: Fokussierungsparameter für die IEF mit IPG 3-12

Es wurde eine anodale Sephadex-Vorfraktionierung mit 3mg Proteinbeladungsmenge aus *Bacillus subtilis* durchgeführt, die Fokussierungsparameter der Vorfraktionierung sind in Tabelle 46 dargestellt. Die Fokussierung wurde nach 500 Vh beendet (Abbildung 87) und die Fraktionen I-V entnommen (Abbildung 88). Anschließend erfolgte eine 2DE mit IPG 3-12 und SDS-Gelen mit T=15%, die Proteine wurden danach mit Flamingo angefärbt (Abbildungen 89 und 90). Die Fokussierungsparameter sind in Tabelle 47 dargestellt, die maximale Stromstärke wurde auf 100 μ A erhöht, damit eine für in den basischen Bereich hineinreichende Gradienten genügend hohe Spannung erzielt werden konnte. Zur Überprüfung ob die vorfraktionierten Proteine des 2D-Gels, auf dem die Fraktion II aufgetrennt wurde, auch tatsächlich einen $pI > 7$ besitzen, wurden diese durch Massenspektrometrie identifiziert (Abbildung 91, Tabelle 48 und Tabelle 49).

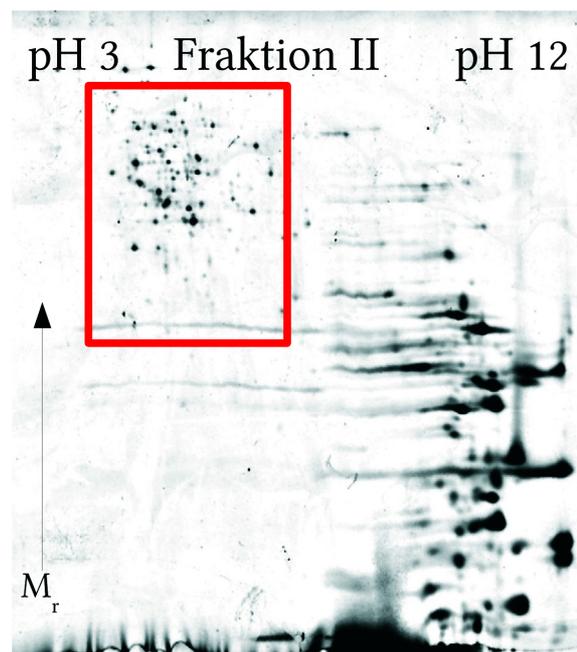
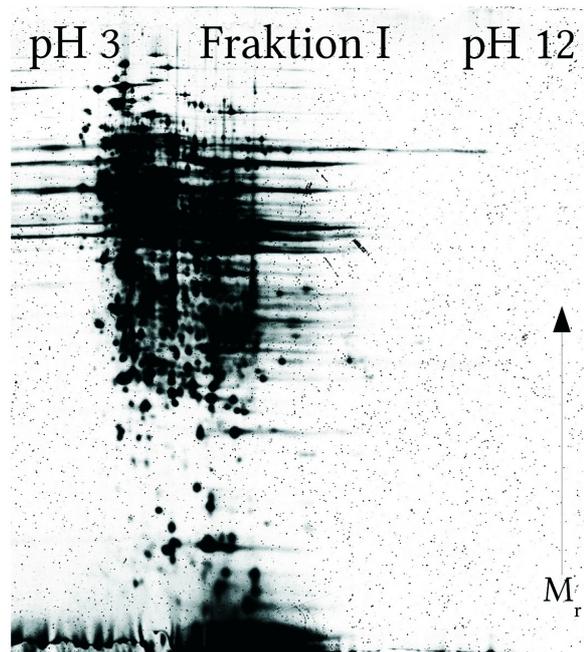


Abbildung 89: Fraktion I: Die zu Abbildung 88 korrespondierende entnommene Sephadex-Fraktion, 2DE mit IPG 3-12 und T=15% SDS-Gel, Flamingofärbung. Fraktion II: Die zu Abbildung 88 korrespondierende entnommene Sephadex-Fraktion, 2DE mit IPG 3-12 und T=15% SDS-Gel, Flamingofärbung. Leichte Kreuzkontaminationen mit Fraktion I sind zu sehen (Roter Rahmen).

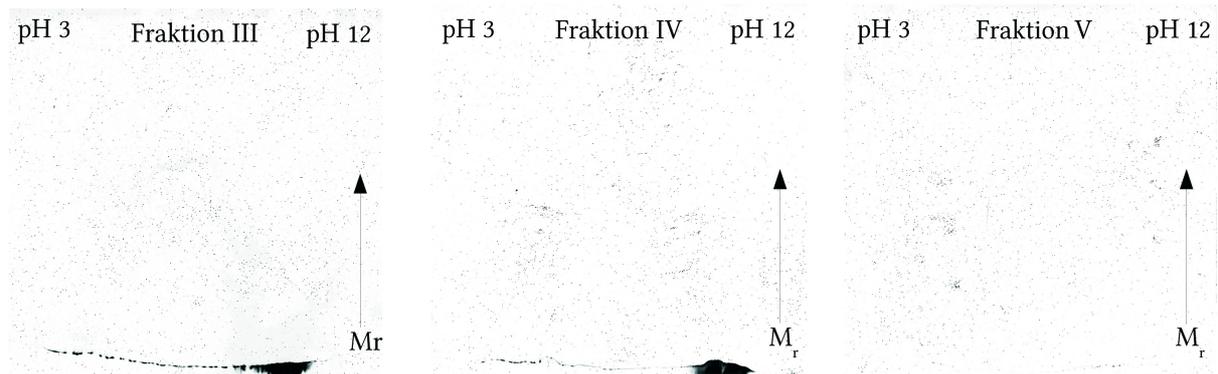


Abbildung 90: Fraktion III + IV+V: Die zu Abbildung 88 korrespondierende entnommene Sephadex-Fraktion aus *Bacillus subtilis* Proteinextrakt, 2DE mit IPG 3-12 und T=15% SDS-Gel, Flamingofärbung. Keine Proteine nachweisbar.

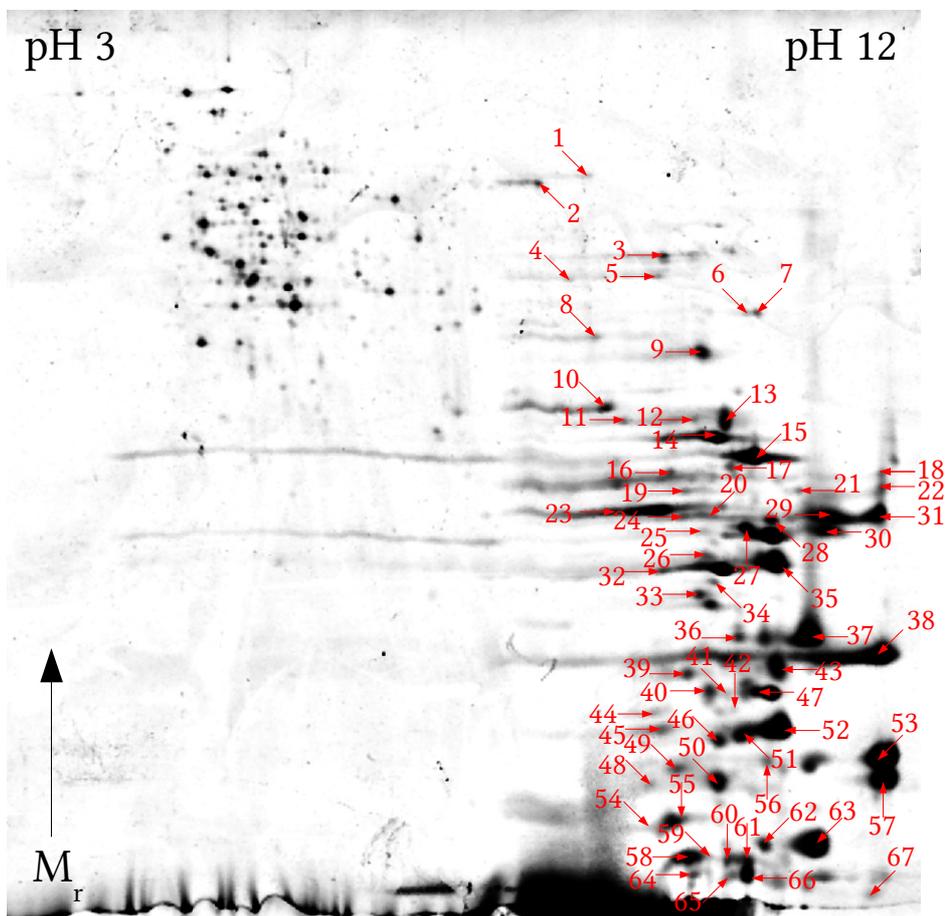


Abbildung 91: 2DE-Gel des vorfraktionierten Proteinextrakts aus *Bacillus subtilis*, Fraktion II, IPG 3-12, T=15% SDS-Gel, Flamingo-Färbung, Zahlen kennzeichnen identifizierte Proteine mit $pI \geq 7$. Auflistung der Proteine in Tabelle 48 und 49.

Spot Nr.	Protein	pI	MW	CAI	Acc. No.	Low Abundant
1	Ribonuclease J 2	8,47	61174,72	0,452619	O31760	
2	Glutamate synthase [NADPH] small chain	7,52	54862,48	0,453906	O34399	
3	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit	9,11	51047,64	0,356102	P54521	x
4	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit	9,11	51047,64	0,356102	P54521	x
12	Putative trmH family tRNA/rRNA methyltransferase yacO	8,48	27508,81	0,377826	Q06753	x
14	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	8,47	28417,77	0,438186	P08066	
15	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	8,47	28417,77	0,438186	P08066	
17	50S ribosomal protein L1	9,38	24988,87	0,775408	Q06797	
18	Arginine transport ATP-binding protein artM	8,79	26949,52	0,406423	P54537	
19	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase cshA	9,49	55330,28	0,553661	P96614	
20	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
21	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
22	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
23	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
24	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
25	Putative oxidoreductase (Nitroreductase family)	8,75	22454,62	0,408231	O31571	
27	50S ribosomal protein L6	9,49	19509,34	0,680761	P46898	
30	Probable GTP-binding protein engB	9,32	22026,40	0,440914	P38424	
31	50S ribosomal protein L6	9,49	19509,34	0,680761	P46898	
32	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
33	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
34	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
35	UPF0234 protein yitk	9,18	18201,86	0,413543	O06746	
37	ATP synthase subunit delta	9,15	19981,99	0,371215	P37811	x
38	50S ribosomal protein L5	9,54	20147,54	0,702625	P12877	
39	Acetolactate synthase small subunit	9,64	18924,79	0,376577	P37252	x
40	30S ribosomal protein S5	9,92	17622,61	0,699030	P21467	
43	50S ribosomal protein L9	9,48	16351,94	0,501799	P37437	
44	Acetolactate synthase small subunit	9,64	18924,79	0,376577	P37252	x
48	50S ribosomal protein L9	9,48	16351,94	0,501799	P37437	
52	50S ribosomal protein L11	9,30	14931,45	0,674323	Q06796	
53	50S ribosomal protein L11	9,30	14931,45	0,674323	Q06796	
54	30S ribosomal protein S8	9,86	14877,41	0,648096	P12879	
58	50S ribosomal protein L14	9,94	13154,27	0,719950	P12875	
61	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	
63	30S ribosomal protein S10	9,79	11665,63	0,666528	P21471	
64	DNA-binding protein HU 1	8,96	9884,28	0,725372	P08821	
65	30S ribosomal protein S3	9,76	24322,82	0,694791	P21465	

Tabelle 48: Liste der in der mit 2DE getrennten Fraktion II identifizierten Proteine, die bereits zuvor in der Protecs-Datenbank aufgelistet wurden.

Tabelle 48 listet die auf dem 2D-Gel der Fraktion II identifizierten Proteine auf, die zuvor schon in der Protecs-Datenbank [176], [177], [178], [179], [180], [181], [182], [183], [184], [185], [186] aufgeführt waren. Dies sind 38 von 65 insgesamt identifizierten Proteinen, davon sind 6 Proteine der Gruppe der *low-abundant* Proteine (CAI<0,378391 [176]) zuzuordnen.

Tabelle 49 listet die im Zusammenhang mit der 2DE noch nicht identifizierten Proteine aus *Bacillus subtilis* auf. Von 65 insgesamt identifizierten Proteinen sind 27 bisher nicht in der Protecs-Datenbank aufgeführt, davon sind 9 Proteine der Gruppe der *low-abundant* Proteine zuzuordnen. Zum Protein YacZ (Spot Nr. 45) konnte kein pI ermittelt werden, da das Protein

weder in in der Uniprot- noch in der NCBI-Datenbank aufgelistet ist. Die Angabe zum Molekulargewicht stammt aus der Arbeit von Aravind et al. [187].

Spot Nr.	Protein	pI	MW	CAI	Acc. No.	Low Abundant
5	Putative peroxidase ywbN	8,71	45692,81	0,411433	P39597	
6	Putative RNA methyltransferase ypsC	8,11	43506,83	0,441159	P50840	
7	Alanine racemase 1	8,60	43265,13	0,360212	P10725	x
8	Molybdenum cofactor biosynthesis protein A	9,15	38549,83	0,375269	P39757	x
9	Molybdenum cofactor biosynthesis protein A	9,15	38549,83	0,375269	P39757	x
10	Riboflavin biosynthesis protein ribC	8,26	35661,91	0,395176	P54575	
11	Lipoyl synthase	8,58	33921,04	0,403359	O32129	
13	Ribosome biogenesis GTPase A	9,14	31986,22	0,408047	O31743	
16	Chemotaxis protein methyltransferase	9,02	29952,47	0,409815	P31105	
26	Putative ATP-dependent RNA helicase yfmL	9,21	42189,15	0,359559	O34750	x
28	Putative enzyme with adenosyl binding site	8,89	20471,49	0,445834	O34331	
29	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	8,38	38664,08	0,600201	Q05522	
36	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase H	8,92	18073,08	0,336015	Q45601	x
41	Putative uncharacterized protein yjdl	8,73	17259,29	0,423373	O31650	
42	Uncharacterized protein yvyF	8,38	16231,59	0,378525	P39807	
45	YazC Protein of unknown function	?	ca. 16100	0,337747	?	x
46	Uncharacterized N-acetyltransferase yitI	8,51	16943,30	0,361282	O06744	x
47	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator ypoP	8,97	16866,63	0,423778	P54182	
49	30S ribosomal protein S9	10,60	14308,46	0,726448	P21470	
50	Ribosome-binding factor A	8,89	13387,43	0,421395	P32731	
51	Uncharacterized protein ybcI	8,85	13863,22	0,373506	O34380	x
55	Putative uncharacterized protein yozO	8,56	13138,37	0,421852	O31847	
56	Uncharacterized protein yabR	9,84	14195,15	0,509618	P37560	
57	Replication termination protein	9,41	14519,12	0,363497	P68732	x
59	Uncharacterized protein yabR	9,84	14195,15	0,509618	P37560	
60	Uncharacterized protein yabR	9,84	14195,15	0,509618	P37560	
62	50S ribosomal protein L31 type B	9,43	9530,63	0,482108	O34967	

Tabelle 49: Liste der im Rahmen dieser Dissertation erstmals identifizierten *Bacillus subtilis* Proteine mit $pI \geq 7$ aus Fraktion II der Vorfractionierung von 3mg Proteinmasse.

5.10.5.2 Fazit

Durch die anodale Sephadex-Vorfractionierung können Proteine mit einem pI bis 10,6 mit einer zufriedenstellenden Trennschärfe fraktioniert werden. Schon die Verwendung eines gering auflösenden pH-Gradienten (IPG 3-12) bei der nachfolgenden IEF ermöglicht das Auffinden bisher nicht im Zusammenhang mit der 2DE beschriebener Proteine. So waren 27 von 65 (41,5%) der identifizierten Proteine mit einem $pI \geq 7$ bisher nicht in der Protecs-Datenbank aufgeführt, davon 9 (33%) potentiell gering exprimierte Proteine.

5.10.5.3 Ribosomal abgereicherter Proteinextrakt von *Bacillus subtilis*

Eine Erhöhung der Proteinbeladungsmenge auf 2D-Gelen führt zu einer Verschlechterung der Auflösung im basischen Bereich, da die stark exprimierten ribosomalen Proteine einen Großteil des Platzes auf dem 2D-Gel einnehmen und somit andere Proteine überdeckt werden. Dadurch werden gering exprimierte Proteine, die sich an der gleichen Stelle auf dem 2D-Gel befinden überdeckt und sind nicht mehr nachweisbar. Um diese niedrig-abundanten Proteine dennoch zu detektieren wurde die Proteinextraktion von *Bacillus subtilis* so verändert, dass die Ribosomen und somit die ribosomalen Proteine in einer Ultrazentrifuge abzentrifugiert und aus dem verbleibenden Proteinextrakt entfernt werden konnten (Siehe 4.2.6). Mit 2 mg dieses verbleibenden Proteinextrakts wurde eine anodale Sephadex-Vorfractionierung mit anschließender IEF mit IPG 3-12 und SDS-PAGE mit T=15% Gelen durchgeführt. Die Proteine wurden mit Flamingo angefärbt und durch Massenspektrometrie identifiziert (Abbildung 92 und Tabelle 50 und 51).

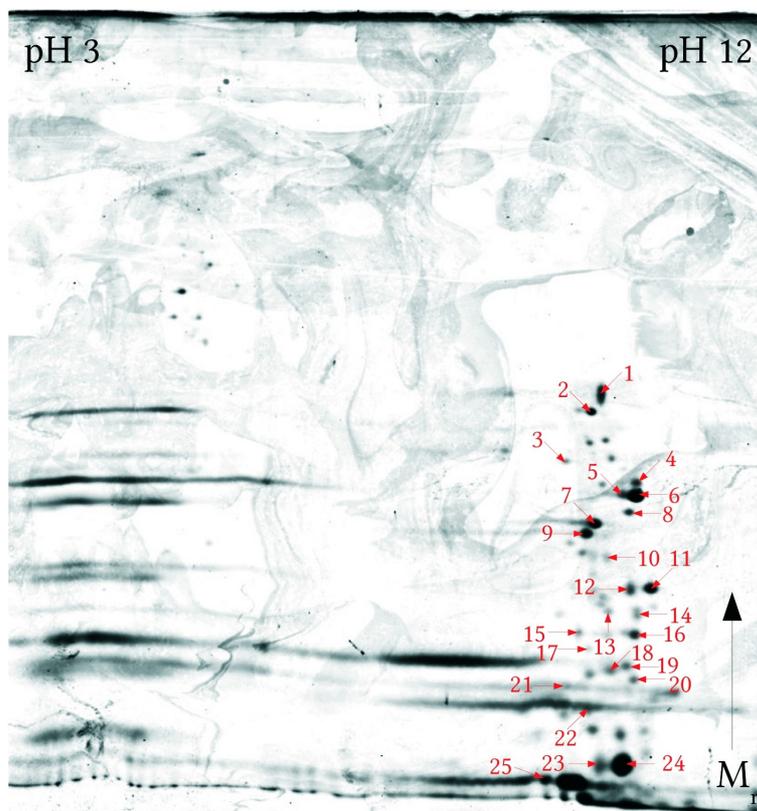


Abbildung 92: 2DE des vorfraktionierten, ribosomal abgereicherten Proteinextrakts aus *Bacillus subtilis*, Fraktion II, Flamingofärbung, Zahlen kennzeichnen die identifizierten Proteine mit $pI \geq 7$.

Spot Nr.	Protein	pI	MW	CAI	Acc. No.	Low-Abundant
1	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	8,47	28417,77	0,438186	P08066	
4	50S ribosomal protein L6	9,49	19509,34	0,680761	P46898	
5	50S ribosomal protein L6	9,49	19509,34	0,680761	P46898	
6	50S ribosomal protein L6	9,49	19509,34	0,680761	P46898	
7	UPF0234 protein yitk	9,18	18201,86	0,413543	O06746	
8	50S ribosomal protein L6	9,49	19509,34	0,680761	P46898	
9	ATP synthase subunit delta	9,15	19981,99	0,371215	P37811	x
11	Acetolactate synthase small subunit	9,64	18924,79	0,376577	P37252	x
13	Acetolactate synthase small subunit	9,64	18924,79	0,376577	P37252	x
14	Acetolactate synthase small subunit	9,64	18924,79	0,376577	P37252	x
16	50S ribosomal protein L9	9,48	16351,94	0,501799	P37437	
18	50S ribosomal protein L11	9,30	14931,45	0,674323	Q06796	
21	30S ribosomal protein S8	9,86	14877,41	0,648096	P12879	
25	DNA-binding protein HU 1	8,96	9884,28	0,725372	P08821	

Tabelle 50: Auflistung der in Fraktion II des ribosomal abgereicherten *Bacillus subtilis* Proteinextrakts identifizierten Proteine, die zuvor schon im Zusammenhang mit der 2DE beschrieben wurden.

In der Fraktion II des vorfraktionierten, ribosomal abgereicherten Proteinextrakts aus *Bacillus subtilis* konnten insgesamt 25 Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert werden. 14 dieser Proteine waren schon zuvor in der Protecs-Datenbank beschrieben, davon 4 *low-abundant* Proteine. Die restlichen 11 Proteine wurden im Rahmen dieser Dissertation erstmals im Zusammenhang mit der 2DE beschrieben, davon sind 2 Proteine der Gruppe der *low-abundant* Proteine zuzuordnen. Von den 11 erstmals identifizierten Proteinen aus dem ribosomal abgereicherten *Bacillus subtilis* Proteinextrakt sind 5 nicht im Normalextrakt aus *Bacillus subtilis* identifiziert worden (Siehe Tabelle 51).

Spot Nr.	Protein	pI	MW	CAI	Acc. No.	Low-Abundant	in Normalextrakt
2	Chemotaxis protein methyltransferase	9,02	29952,47	0,409815	P31105		x
3	Extracellular metalloprotease	9,00	33842,32	0,387533	P39790		
10	Lipase estA	9,72	22791,19	0,403359	P37957		
12	Chemoreceptor glutamine deamidase cheD	9,15	18008,06	0,469653	P40404		
15	Uncharacterized protein yvyF	8,38	16231,59	0,378525	P39807		x
17	Transcriptional regulator ctsR	9,01	17743,75	0,449613	P37568		
19	HTH-type transcriptional regulator glnR	9,30	15832,20	0,372446	P37582	x	
20	Ribosome-binding factor A	8,89	13387,43	0,421395	P32731		x
22	Uncharacterized protein ybcl	8,85	13863,22	0,373506	O34380	x	x
23	50S ribosomal protein L31 type B	9,43	9530,63	0,482108	O34967		x
24	50S ribosomal protein L31 type B	9,43	9530,63	0,482108	O34967		x

Tabelle 51: Auflistung der in Fraktion II des ribosomal abgereicherten *Bacillus subtilis* Proteinextrakts identifizierten Proteine, die im Zusammenhang mit der 2DE bisher nicht beschrieben wurden. Spalte „Im Normalextrakt“ bedeutet, dass dieses Protein in Fraktion II des vorfraktionierten Normalextrakts (Kapitel 5.10.5.1) von *Bacillus subtilis* bereits identifiziert wurde (siehe Tabelle 48 und 49).

5.10.5.4 Standardprotokoll zur Vorfraktionierung basischer Proteine

Das Sephadex-Gel wird wie in Kapitel 5.10.2. beschrieben hergestellt, nur das Volumen der zugegebenen Trägerampholyte wird wie in Tabelle 52 gezeigt angepasst. Die Trägerampholytvolumina in der zugegebenen Probe sind zu berücksichtigen und gegebenenfalls vom Trägerampholyt-Zugabevolumen zu subtrahieren.

Rollrandglas	Trägerampholyte 2-11	Trägerampholyte 9-11
A	30 µl	15 µl
B	10,1 µl	5 µl

Tabelle 52: Zugabevolumina der jeweiligen Trägerampholyte in das Sephadex-Gel

Die Fokussierungsparameter für die Vorfraktionierung sind in Tabelle 53 wiedergegeben.

Zeit	Spannung	Stromstärke	Leistung
Bis Stromstärke auf 1,5 mA gesunken ist	Stufenweise bis 1000 V	Max. 2,5 mA	Max. 3 W
Bis pI-Marker 10,2 fünf Markierungsstriche von der Kathode entfernt ist	1000 V	Max 2,5 mA	Max. 3 W

Tabelle 53: Laufparameter der Vorfraktionierung

Die Zeiten der jeweiligen Schritte der Vorfraktionierung sind probenabhängig, da die Proteine zusätzlich zu den Trägerampholyten auch puffernd wirken und der pI-Marker 10,2 im ribosomal abgereicherten Extrakt den Punkt zur Probenahme schneller erreicht, da hier die den basischen Bereich des pH-Gradienten unterstützende Wirkung der ribosomalen Proteine fehlt bzw. stark vermindert ist.

Die nachfolgende IEF mit IPG 3-12 wurde wie in Tabelle 54 beschrieben durchgeführt.

Zeit	Spannung	Maximale Stromstärke
2 h	150 V	75 μ A
2 h	300 V	75 μ A
3 h	600 V	75 μ A
2 h	Linearer Gradient auf 8000 V	75 μ A
3,5 h	8000 V	75 μ A

Tabelle 54: Durchführungsparameter der IEF mit IPG 3-12 der jeweiligen Fraktionen.

Die SDS-PAGE wurde wie in Kapitel 4.4 beschrieben durchgeführt.

5.10.6 Fazit der Vorfraktionierung von Proteinen mit $pI \geq 7$

Wie aus Tabelle 55 ersichtlich sind von insgesamt 29 erstmalig identifizierten Proteinen (detektierten Isoformen sind hier nicht mitgezählt) 9 Proteine der Klasse der niedrig-abundanten Proteine zuzuordnen, die einen pI bis 10,6 haben. Somit konnte mit vergleichsweise gering auflösenden, weiten pH-Gradienten (IPG 3-12) schon ein beträchtlicher Anteil erstmalig identifizierter Proteine (29 von 53 identifizierten Proteine (ohne Isoformen) mit einem $pI \geq 7$) gefunden werden. Zusätzlich konnte ein hoher Anteil niedrig-abundanter Proteine gefunden werden, der darauf schließen lässt, dass mit engeren pH-Gradienten, durch die höhere Auflösung, weitere niedrig-abundante Proteine zu finden sein werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da es hier primär um die erstmalige Schaffung einer Möglichkeit ging, Proteine mit einem $pI \geq 7$ mithilfe eines Trägerampholytgradienten vorzufractionieren. Die Abreicherung der ribosomalen Proteine hat im Vergleich zum unbehandelten Proteinextrakt nur wenige neue Proteine identifizierbar gemacht. Bei der alleinigen Betrachtung des ribosomal abgereicherten Extrakts sind allerdings von 11 erstmals identifizierten Proteinen 5 Proteine nicht im Normalextrakt nachweisbar gewesen.

Protein	pI	MW	CAI	Acc. No.	Low-Abundant	aus Normalextrakt
YazC Protein of unknown function	?	ca. 16100	0,337747	?	x	x
Putative RNA methyltransferase ypsC	8,11	43506,83	0,441159	P50840		x
Riboflavin biosynthesis protein ribC	8,26	35661,91	0,395176	P54575		x
Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	8,38	38664,08	0,600201	Q05522		x
Uncharacterized protein yvyF	8,38	16231,59	0,378525	P39807		x
Uncharacterized N-acetyltransferase yitI	8,51	16943,30	0,361282	O06744	x	x
Putative uncharacterized protein yozO	8,56	13138,37	0,421852	O31847		x
Lipoyl synthase	8,58	33921,04	0,403359	O32129		x
Alanine racemase 1	8,60	43265,13	0,360212	P10725	x	x
Putative peroxidase ywbN	8,71	45692,81	0,411433	P39597		x
Putative uncharacterized protein yjdl	8,73	17259,29	0,423373	O31650		x
Uncharacterized protein ybcl	8,85	13863,22	0,373506	O34380	x	x
Putative enzyme with adenosyl binding site	8,89	20471,49	0,445834	O34331		x
Ribosome-binding factor A	8,89	13387,43	0,421395	P32731		x
Ribosomal RNA large subunit methyltransferase H	8,92	18073,08	0,336015	Q45601	x	x
Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator ypoP	8,97	16866,63	0,423778	P54182		x
Extracellular metalloprotease	9,00	33842,32	0,387533	P39790		
Transcriptional regulator ctsR	9,01	17743,75	0,449613	P37568		
Chemotaxis protein methyltransferase	9,02	29952,47	0,409815	P31105		
Ribosome biogenesis GTPase A	9,14	31986,22	0,408047	O31743		x
Molybdenum cofactor biosynthesis protein A	9,15	38549,83	0,375269	P39757	x	x
Chemoreceptor glutamine deamidase cheD	9,15	18008,06	0,469653	P40404		
Putative ATP-dependent RNA helicase yfmL	9,21	42189,15	0,359559	O34750	x	x
HTH-type transcriptional regulator glnR	9,30	15832,20	0,372446	P37582	x	
Replication termination protein	9,41	14519,12	0,363497	P68732	x	x
50S ribosomal protein L31 type B	9,43	9530,63	0,482108	O34967		
Lipase estA	9,72	22791,19	0,403359	P37957		
Uncharacterized protein yabR	9,84	14195,15	0,509618	P37560		x
30S ribosomal protein S9	10,60	14308,46	0,726448	P21470		x

Tabelle 55: Im Rahmen dieser Dissertation erstmalig identifizierte Proteine mit pI ≥ 7 aus Bacillus subtilis im Zusammenhang mit der 2DE. Die Spalte "aus Normalextrakt" bedeutet, dass dieses Protein in der Fraktion II des nicht ribosomal abgereichertem Bacillus subtilis Proteinextrakt identifiziert wurde.

5.11 Methodenentwicklung zur Trennung von Membranproteinen durch 2DE

Dieser Teil der Arbeit widmet sich der Entwicklung einer Methode um integrale Membranproteine mithilfe der 2DE zu trennen.

5.11.1 2DE von Bacteriorhodopsin

Bisherige Studien zur Auftrennung von integralen Membranproteinen setzten hauptsächlich auf veränderte Detergenzien und / oder veränderte Äquillibrierungsbedingungen beim Wechsel von der IEF zur SDS-PAGE [177]. Trotz dieser Anstrengungen konnten nur sehr wenige Membranproteine aus dem IPG-Streifen auf das 2D-Gel transferiert werden [177]. Als Hauptursache wird die irreversible Präzipitation der Membranproteine an ihrem isoelektrischen Punkt angesehen [177].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz zum Transfer der Membranproteine aus dem IPG-Streifen auf das SDS-Gel getestet: Der Einsatz von Acetonitril in einer Konzentration von 50% (v/v), um die hydrophoben Wechselwirkungen der Transmembrandomänen der Proteine mit dem Polyacrylamidgerüst des IPG-Streifens aufzuheben.

Dieser Quellpuffer wurde mit dem Membranprotein Bacteriorhodopsin (BR) aus *Halobacterium salinarum* getestet (Abbildung 93), das zuvor nicht über 2DE mit IPG aufgetrennt werden konnte [177], [188].

Reagenzien:

- AcN-Quellpuffer (6M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 200 mM HED; 0,5% Pharmalyte 3-10, 50% Acetonitril):
18,02 g Harnstoff und 7,612 g Thioharnstoff in 15,4 ml *Aqua bidest.* und 15,4 ml Acetonitril (AcN) lösen. Mit einer Spatelspitze (500 mg) Mischbettionenaustauscher versetzen, 45 Minuten rühren. Danach filtrieren und 960 µl HED und 200µl Pharmalyte 3-10 zu 40 ml des Filtrats zugeben. Der Quellpuffer wird in

Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Aufgetauter Quellpuffer sollte nicht wieder eingefroren werden!

- AcN-Lysis-Puffer (7M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 4% DTT; 2% Pharmalyte 3-10, 50% Acetonitril):
Zu 21 g Harnstoff und 7,62 g Thioharnstoff 14,25 ml *Aqua bidest*, 14,25 ml AcN zugeben und lösen. Zugabe von 500 mg Mischbettionenaustauscher Serolit MB-1 und 45 Minuten rühren lassen. Durch Faltenfilter filtrieren, 40 ml in frisches Becherglas überführen. Zugabe von 1,6 g DTT und 800 μl Pharmalyte 3-10 und unter rühren lösen. Anschließend aliquotieren und bei -80°C lagern.
- Bacteriorhodopsin-Lösung (ca. $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$): Das lyophilisierte BR (Sigma-Aldrich) wurde in 1 ml AcN-Lysis-Puffer aufgenommen und durch 2 x 30 Pulsen mit dem Ultraschallstab (60 W) unter Kühlung gelöst.

Durchführung:

Der IPG 3-10 wurde über Nacht in 500 μl AcN-Quellpuffer rehydratisiert, genaue Vorgehensweise siehe Kapitel 4.4.1.2

20 μl der in BR-Lösung wurde zusammen mit 30 μl AcN-Lysis-Puffer durch anodales *cup-loading* auf einen IPG 3-10 aufgetragen. Die Fokussierungsbedingungen sind in Tabelle 56 aufgezeigt. Anschließend wurde die zweite Dimension mit T=13% SDS-Gelen durchgeführt. Zur Proteindetektion wurde die Silberfärbung nach Blum et al. eingesetzt.

Zeit	Spannung	Stromstärke
1 h	150 V	Max. 50 μA
1 h	300 V	Max. 50 μA
1,5 h	600 V	Max. 50 μA
1 h	Linearer Gradient auf 8000 V	Max. 50 μA
2,5 h	8000 V	Max. 50 μA

Tabelle 56: Fokussierungsparameter für IEF mit IPG 3-10

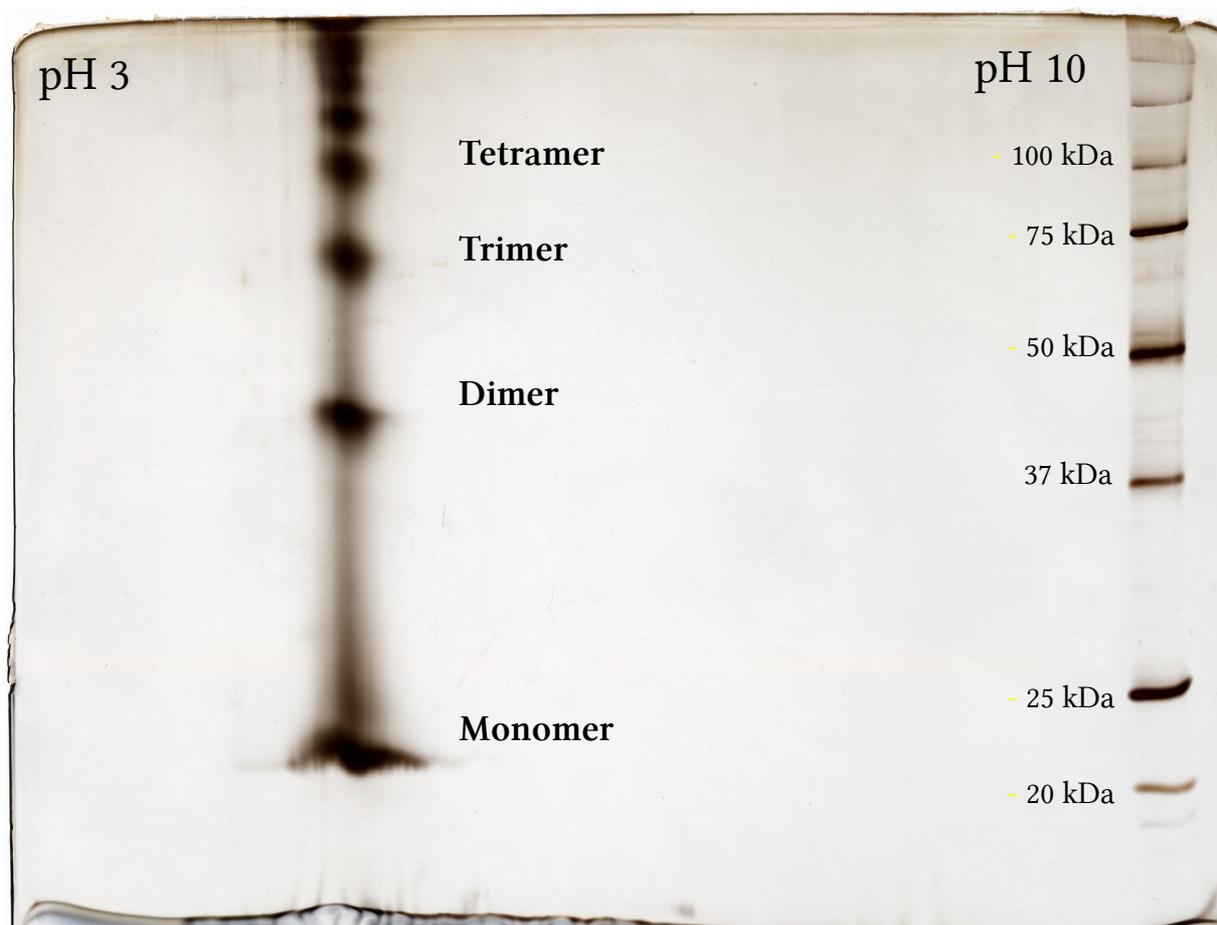


Abbildung 93: 2DE von Bacteriorhodopsin mit in AcN-Quellpuffer rehydratisiertem IPG 3-10, T=13%, Silberfärbung nach Blum (modifiziert).

Wie aus Abbildung 93 ersichtlich ermöglichte der Einsatz von 50% (v/v) AcN im Quellpuffer des IPG-Streifens eine Transferierung von BR auf das SDS-Gel. Zusätzlich wurde ein zweites Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und die Identität des angefärbten BR durch MALDI-Massenspektrometrie bestätigt.

5.11.2 2DE von integralen Membranproteinen aus Modell-Mikroorganismen

Um die Wirksamkeit des AcN-Quellpuffers nicht nur an einem einzelnen Membranprotein zu überprüfen, sondern auch unter den Bedingungen einer komplexen Probe, wurden zwei Modell-Mikroorganismen ausgewählt, deren integralen Membranproteine extrahiert und

durch 2DE aufgetrennt. Desweiteren wurden zwei Quellpuffer miteinander verglichen um die Fähigkeit der Quellpuffer zu testen, die Transferierung von integralen Membranproteinen in die zweite Dimension zu ermöglichen.

Reagenzien:

- Quellpuffer Y (6M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 10% (v/v) Glycerin; 1% n-Octyl- β -D-glucopyranosid; 1% Triton X-100; 1% NP-40; 200 mM HED; 0,5% Pharmalyte 3-10):
18,02 g Harnstoff und 7,612 g Thioharnstoff in 27,7 ml *Aqua bidest.* und 3,9 g Glycerin lösen. Mit einer Spatelspitze (500 mg) Mischbettionenaustauscher versetzen, 45 Minuten rühren. Danach filtrieren und 0,4 g n-Octyl- β -D-glucopyranosid; 400 μ l Triton X-100; 400 μ l NP-40, 960 μ l HED und 200 μ l Pharmalyte 3-10 zu 40 ml des Filtrats zugeben. Der Quellpuffer wird in Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Aufgetauter Quellpuffer sollte nicht wieder eingefroren werden!
- Lysepuffer Y (7M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 9% (v/v) Glycerin; 1% n-Octyl- β -D-glucopyranosid; 1% Triton X-100; 1% NP-40; 200 mM HED; 0,5% Pharmalyte 3-10):
21 g Harnstoff und 7,612 g Thioharnstoff in 25,7 ml *Aqua bidest.* und 3,6 g Glycerin lösen. Mit einer Spatelspitze (500 mg) Mischbettionenaustauscher versetzen, 45 Minuten rühren. Danach filtrieren und 0,4 g n-Octyl- β -D-glucopyranosid; 400 μ l Triton X-100; 400 μ l NP-40, 960 μ l HED und 200 μ l Pharmalyte 3-10 zu 40 ml des Filtrats zugeben. Der Quellpuffer wird in Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Aufgetauter Quellpuffer sollte nicht wieder eingefroren werden!
- Quellpuffer XY (6M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 50% AcN; 10% (v/v) Glycerin; 1% n-Octyl- β -D-glucopyranosid; 1% Triton X-100; 1% NP-40; 200 mM HED; 0,5% Pharmalyte 3-10):
18,02 g Harnstoff und 7,612 g Thioharnstoff in 13,9 ml *Aqua bidest.*; 13,9 ml AcN und 3,9 g Glycerin lösen. Mit einer Spatelspitze (500 mg) Mischbettionenaustauscher versetzen, 45 Minuten rühren. Danach filtrieren und 0,4 g n-Octyl- β -D-glucopyranosid; 400 μ l Triton X-100; 400 μ l NP-40, 960 μ l HED und 200 μ l Pharmalyte 3-10 zu 40 ml des

Filtrats zugeben. Der Quellpuffer wird in Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Aufgetauter Quellpuffer sollte nicht wieder eingefroren werden!

- Lysepuffer XY (7M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 50% AcN; 9% (v/v) Glycerin; 1% n-Octyl-β-D-glucopyranosid; 1% Triton X-100; 1% NP-40; 200 mM HED; 0,5% Pharmalyte 3-10):

21 g Harnstoff und 7,612 g Thioharnstoff in 12,8 ml *Aqua bidest.*; 12,8 ml AcN und 3,6 g Glycerin lösen. Mit einer Spatelspitze (500 mg) Mischbettionenaustauscher versetzen, 45 Minuten rühren. Danach filtrieren und 0,4 g n-Octyl-β-D-glucopyranosid; 400 µl Triton X-100; 400 µl NP-40, 960 µl HED und 200µl Pharmalyte 3-10 zu 40 ml des Filtrats zugeben. Der Quellpuffer wird in Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Aufgetauter Quellpuffer sollte nicht wieder eingefroren werden!

5.11.2.1 Membranproteinextrakt aus *Corynebacterium glutamicum*

Die Membranproteine aus *C. glutamicum* wurden wie in Kapitel 4.3.5.2 beschrieben extrahiert und entweder in Lysepuffer Y oder in Lysepuffer XY aufgenommen, die IPG-Streifen wurden entsprechend in Quellpuffer Y oder Quellpuffer XY rehydratisiert (Tabelle 57). Es wurde ein IPG 3,4-5,4 verwendet, da hier die meisten stark exprimierten Membranproteine zu erwarten sind (Abbildung 94). Als Proteinmenge wurden 400 µg aufgetragen. Die Fokussierung der Proteine erfolgte wie in Tabelle 11 beschrieben. Die zweite Dimension erfolgte in SDS-Gelen mit T=13%. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt (Abbildung 95) und durch MALDI-ToF-MS identifiziert. Die Detektion der Transmembrandomänen der identifizierten Proteine erfolgte durch 5 verschiedene Algorithmen: HMMTOP [189] [190], TMHMM [191], [192], DAS [193], [194], JvirGel [195] und TMPRED [196]. Ein Protein wurde als integrales Membranprotein angesehen, wenn mindestens 4 von 5 Algorithmen, um falsch negative Ergebnisse zu kompensieren, Transmembrandomänen erkannten.

IPG	Quellpuffer	Probe gelöst in	Proteinauftragsmenge
3,4-5,4	Y	Lysepuffer Y	400 µg
3,4-5,4	XY	Lysepuffer XY	400 µg

Tabelle 57: Übersicht der verwendeten IPG-Streifen, deren Rehydratisierungsbedingungen und Probenbeladung

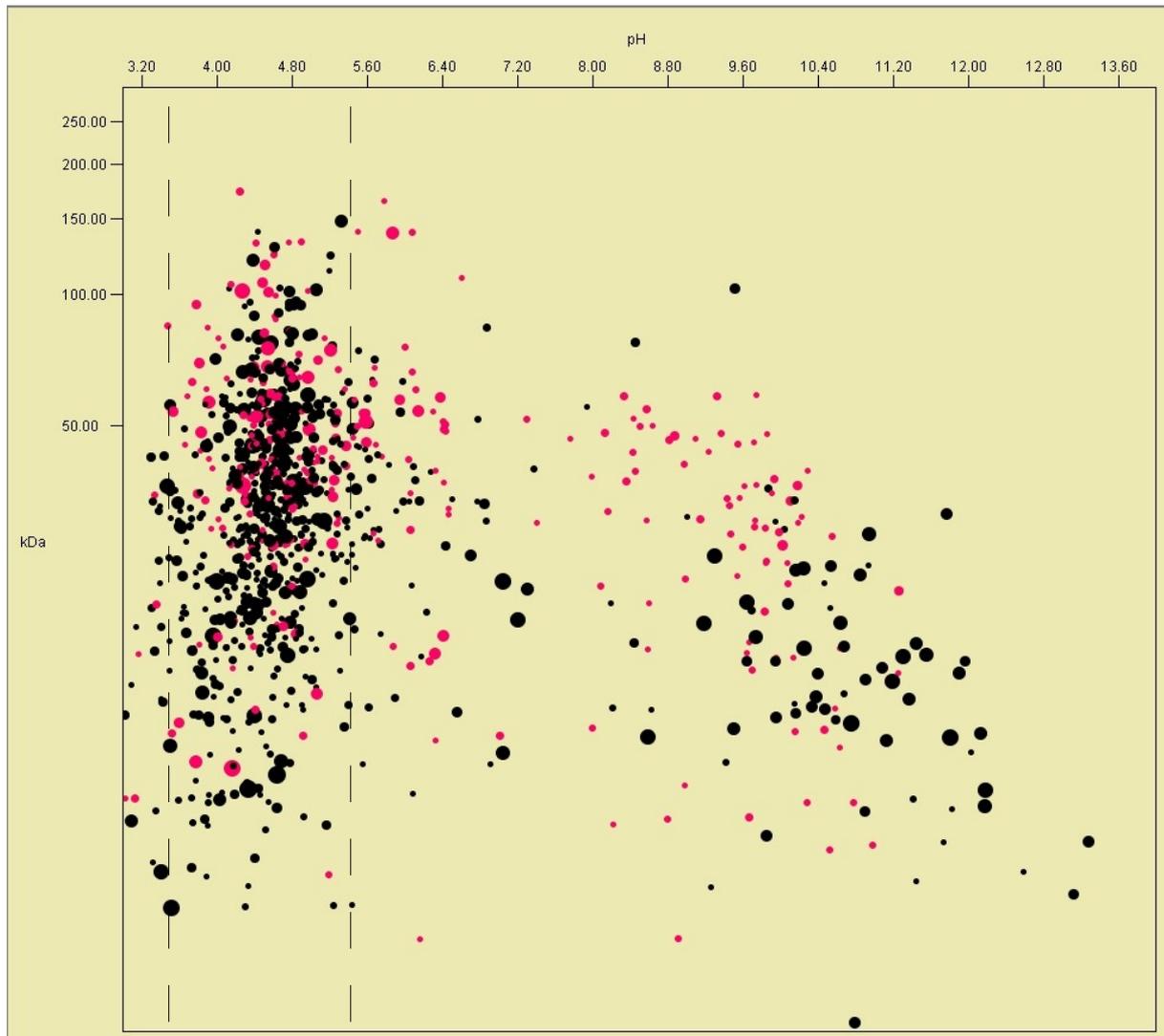


Abbildung 94: Theoretische Verteilung der hoch-abundanten Proteine von *C. glutamicum*, Membranproteine sind rot markiert, die gestrichelte Linie grenzt den zoom-in Bereich ein. Abundanz der Proteine linear proportional zu ihrer Größe auf der Abbildung.

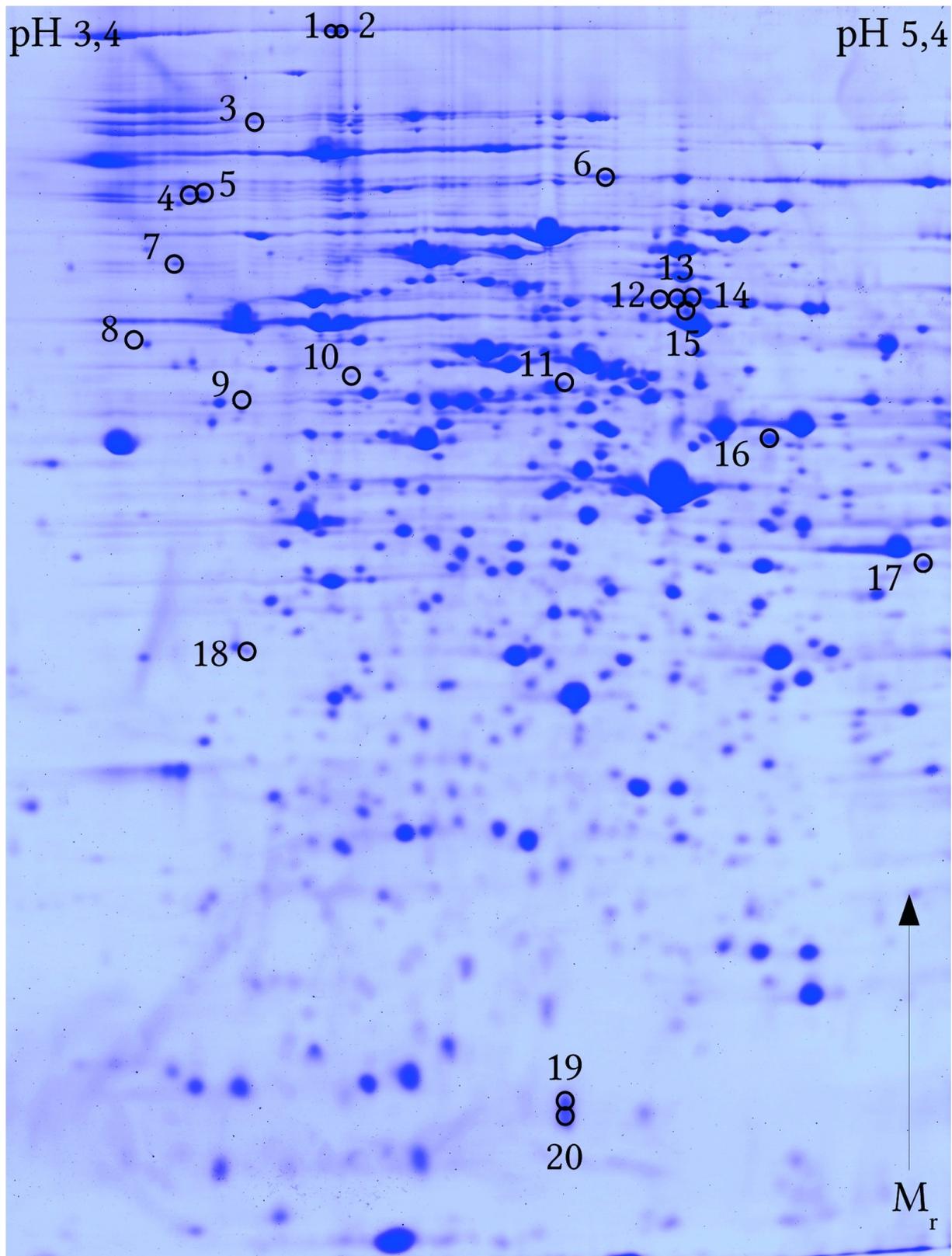


Abbildung 95: Identifizierte integrale Membranproteine aus *C. glutamicum*, 400 µg Proteinbeladung, Quellpuffer XY (mit Detergenzien und 50% AcN). IPG 3,4-5,4; T=13%; Coomassie Brilliant Blau Färbung.

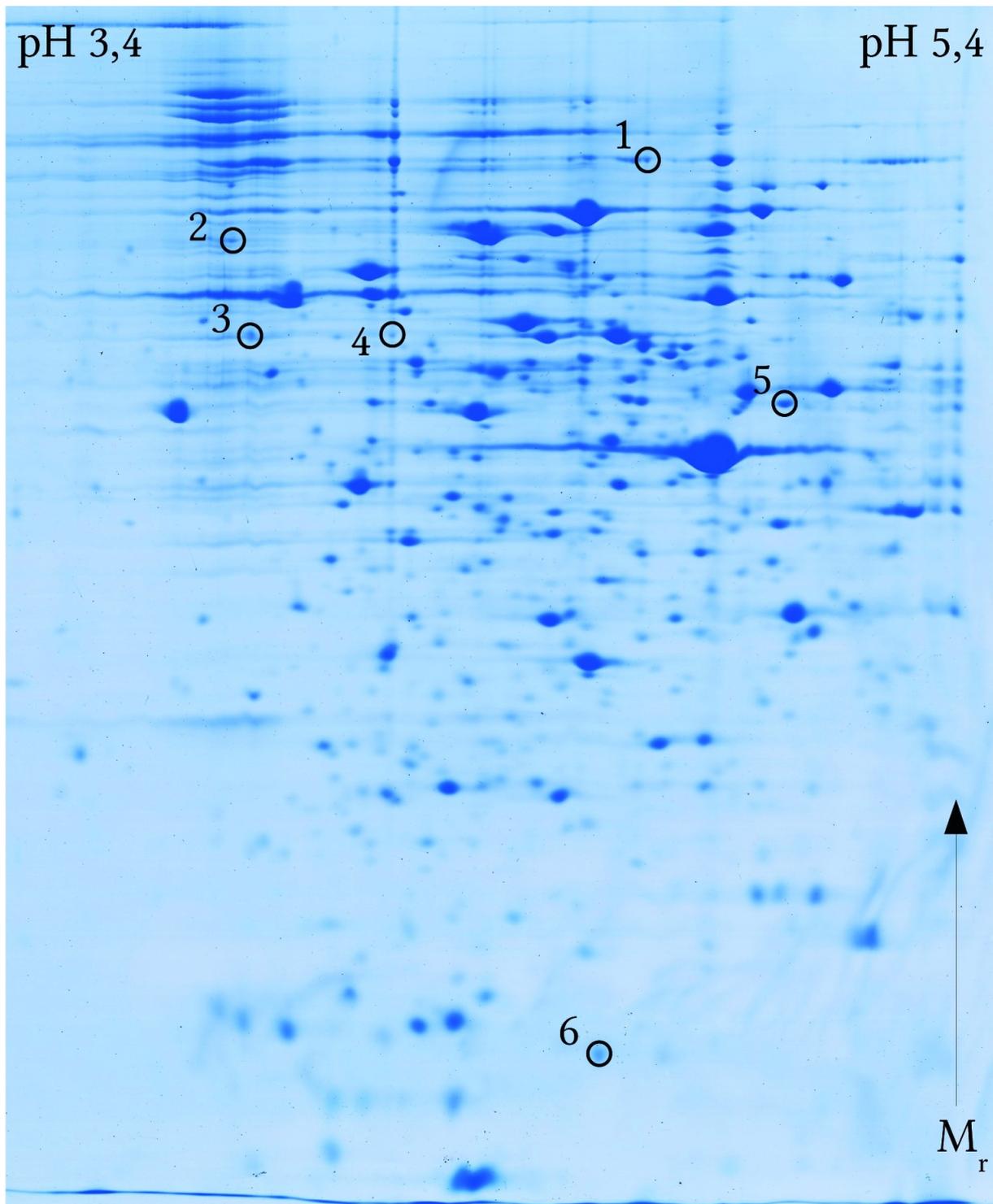


Abbildung 96: Identifizierte integrale Membranproteine aus *C. glutamicum*, 400 µg Proteinbeladung, Quellpuffer Y (mit Detergenzien, ohne AcN). PG 3,4-5,4; T=13%; Coomassie Brilliant Blau Färbung.

Der Vergleich der Abbildungen 95 und 96 zeigt, dass man durch die gleichzeitige Verwendung des Quellpuffer XY und Lysepuffer XY bedeutend mehr integralen Membranproteinen den Übergang in die zweite Dimension ermöglicht als mit Detergenzien allein. In Tabelle 58 sind sämtliche identifizierten integralen Membranproteine aufgelistet.

Die in der Tabelle aufgelisteten Proteine in grüner Schrift wurden bei der Verwendung von Quell- und Lysepuffer Y gefunden. Die Proteine in roter Schrift wurden ausschließlich bei der Verwendung von Quell- und Lysepuffer XY zusätzlich gefunden, sämtliche Proteine aus dieser Gruppe wurden zuvor noch nicht in der Literatur in Zusammenhang mit der Verwendung der 2DE mit IPG beschrieben. Die Arbeitsgruppe, die das Protokoll dieser hier verwendeten Membranproteinextraktion zuerst beschrieb [162] und mittels SDS-PAGE und MALDI-ToF MS diesen Membranproteinextrakt auftrennte konnte 24 integrale Membranproteine im pH-Bereich 3,4-5,4 identifizieren [162]. Dies ist allerdings noch weit von den Möglichkeiten der MudPIT entfernt, die mit diesem (allerdings weiter modifizierten) Membranproteinextrakt über 300 integrale Membranproteine im pH-Bereich 3-12 identifizieren konnte [197].

Spot Nr. auf Gel XY	Spot Nr. auf Gel Y	Cg Nummer	Proteininformation	HMMTOP	TMHMM	DAS	JvirGel	TMPred	GRAVY
11	-	Cg0131	Putative Oxidoreductase	1	0	2	3	3	-0,1
16	5	Cg0752	putative Secreted or Membrane Protein	1	1	1	1	1	-0,21
12,13,14,15	3	Cg0811	Acetyl/Propionyl CoA Carboxylase	2	1	0	2	2	-0,11
7	2	Cg0161	putative secreted or membrane protein	2	2	2	1	2	-0,1
10	4	Cg0414	cell surface polysaccharide biosynthesis	2	2	2	1	4	0,12
19,20	6	Cg1364	ATP synthase B chain	1	1	1	1	1	-0,38
6	1	Cg2984	Cell-Division Protein	2	2	2	2	2	-0,45
17	-	Cg0047	conserved hypothetical protein	0	1	1	1	1	-0,93
3	-	Cg0896	Membrane protein	7	7	7	5	7	-0,14
8	-	Cg1864	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel	1	0	1	1	2	-0,16
4,5	-	Cg2262	Signal recognition particle GTPase	1	1	1	1	1	-0,06
18	-	Cg2409	Cytochrome C Oxidase Chain II	3	3	3	3	3	-0,18
1,2	-	Cg2743	Fatty Acid Synthase	1	0	2	2	14	0,04
9	-	Cg3192	putative secreted or membrane protein	1	1	2	1	3	-0,33

Tabelle 58: Liste der identifizierten integralen Membranproteine. Schwarze Schrift: In Disseration von C. Lück [18] bereits identifiziert. Grüne Schrift: Zusätzliche identifizierte Membranproteine bei Verwendung von Lyse- bzw. Quellpuffer Y. Rote Schrift: Zusätzlich identifizierte integrale Membranproteine bei Verwendung von Lyse- bzw. Quellpuffer XY.

5.11.2.2 Membranproteinextrakt aus *Bacillus subtilis*

Der Membranproteinextrakt wurde wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben hergestellt, 600 µg wurden durch anodales *cup-loading* auf einen IPG 3-12 geladen. Der IPG 3-12 wurde zuvor über Nacht und bei Raumtemperatur durch Quellpuffer XY rehydratisiert. Die Fokussierungsbedingungen sind in Tabelle 11, Kapitel 4.4 dargestellt. Die zweite Dimension erfolgte in T=13% SDS-Gelen. Anschließend wurden die Proteine mit Flamingo angefärbt und durch MALDI-ToF MS/MS identifiziert. Abbildung 97 zeigt die identifizierten Membranproteine.

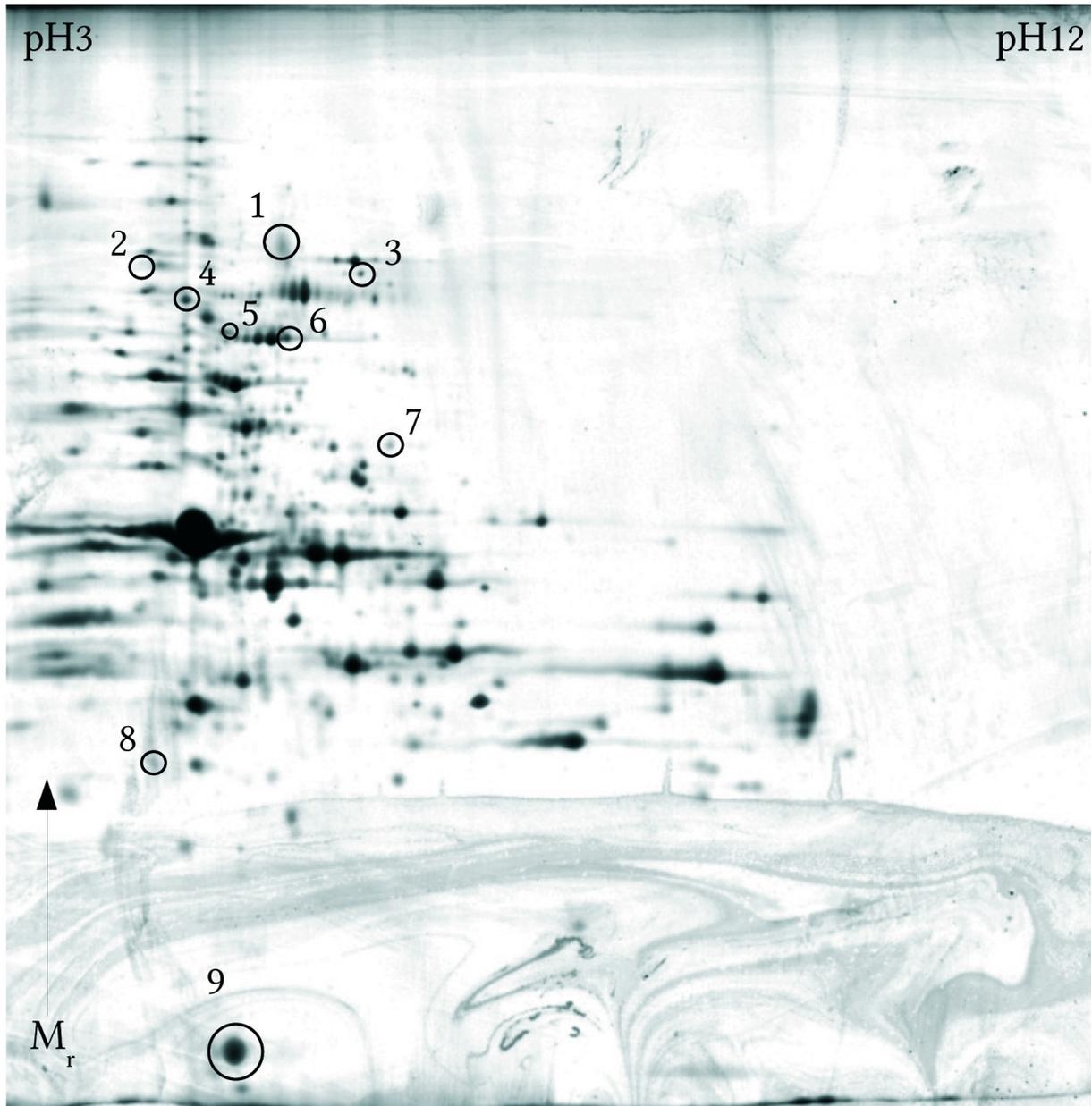


Abbildung 97: 2D-Gel mit den identifizierten integralen Membranproteinen. IPG 3-12; T=13%; Flamingofärbung. Auflistung der identifizierten Proteine in in Abbildung 98.

Spot Nr.	Proteinname	detektierte Transmembrandomänen					GRAVY
		HMMTOP	TMHMM	DAS	JvirGel	TMPred	
1	PtsG	13	10	10	11	9	0,380
2	YueB	6	6	6	6	6	-0,542
3	FtsH	3	2	2	2	3	-0,308
4	EzrA	1	1	0	1	1	-0,572
5	YuaG	1	1	1	1	1	-0,439
6	YmdA	1	1	2	1	2	-0,478
7	YhdL	1	1	1	1	1	-0,572
8	QoxA	3	3	3	2	3	-0,101
9	AtpF	1	1	1	1	1	-0,394

Abbildung 98: Liste der identifizierten integralen Membranproteine aus *Bacillus subtilis* mit in Quellpuffer XY rehydratisiertem IPG 3-12.

Die Proteine YmdA und AtpF wurde zuvor schon mittels des 2DE mit IPG Ansatz aufgetrennt [180], allerdings gab es auch Arbeitsgruppen denen die Auftrennung von AtpF nur durch 16-BAC gelang [196]. Die 2D-elektrophoretische Auftrennung von FtsH gelang zuvor nur durch 16-BAC [196]. Die restlichen Proteine der Tabelle 98 wurden zuvor noch nicht im Zusammenhang mit der 2DE mit IPG beschrieben.

5.11.3 Fazit

Durch die Verwendung von 50% Acetonitril sowohl im Lyse- als auch im Quellpuffer ermöglicht mehr integralen Membranproteinen den Übergang in die zweite Dimension, im Gegensatz zur reinen Verwendung von Detergenzien als Solubilisierungshilfe von Membranproteinen. Allerdings sind in den komplexen Proben fast ausschließlich Proteine mit einem negativen GRAVY gefunden worden, was jedoch auch bei der Trennung von Membranproteinen mittels SDS-PAGE und MALDI-ToF MS [162] beobachtet wurde. Auch die Zahl der Transmembrandomänen liegt hauptsächlich im Bereich von eins bis drei.

Zusammen mit dem Ergebnis der erstmalig ermöglichten Transferierung von Bacteriorhodopsin in die zweite Dimension lässt sich sagen, dass im Modellsystem integrale Membranproteine mit 6 TMDs und einem GRAVY von 0,72 durch die 2DE getrennt werden

können, in realen (komplexen) Proben die Trennleistung der in dieser Arbeit entwickelten Quell- und Lysepuffer leidet. Allerdings ist zu beachten, dass die größte Anzahl von hydrophoben Proteine mit hoher Anzahl an TMDs im pH-Bereich 6-12 liegt, aber hier eine Vorfraktionierung des Membranproteinextrakts vonnöten ist, da diese häufig niedrig-abundant sind.

6 Diskussion

Durch die Kartierung der exprimierten Proteine aller in dieser Dissertation verwendeten Zelllinien (siehe Kapitel 5.1.1 und 5.1.2) konnten vier Proteine identifiziert werden, für die es laut der Datenbank Proteinatlas [172] noch keinen Nachweis auf Proteinebene gibt. Ein Vergleich mit der Datenbank Uniprot [198] ergab jedoch, dass es für jedes dieser Proteine einen Nachweis auf Proteinebene gibt. Da sich die Datenbank Proteinatlas auf die Datenbank Uniprot bezieht, ist dies als eine falsch-Klassifizierung der Datenbank Proteinatlas anzusehen. Durch die Kartierung konnten somit nur auf Proteinlevel nachgewiesene Proteine identifiziert werden.

6.1 Differentiell exprimierte Proteine zwischen EFT- und Neuroblastom-Zelllinien

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.4 zeigen, dass sich durch ein kleines Zelllinien-Kontingent viele differentiell exprimierte Proteine nachweisen lassen. Diese differentiellen Regulierungen haben jedoch nicht alle für die jeweilige Tumorart eine Bedeutung. Um diese biologische Varianz, und damit die Zahl der falsch-positiv identifizierten Proteine zu senken, wurde im Rahmen dieser Dissertation das Zelllinien-Kontingent auf sechs EFT- und drei Neuroblastomzelllinien erhöht. Zusätzlich musste zu dem Kriterium der statistischen Signifikanz ($ANOVA < 0,05$ und $Power \geq 0,80$) das Kriterium einer konsistenten Expression erfüllt sein, wodurch ausschließlich Proteine, deren Expressionsniveau typisch für eine Tumorart ist, als differentiell exprimiert angesehen werden. Falls dieses zweite Kriterium nicht verwendet werden würde, wäre eine Erhöhung des Zelllinien-Kontingents sinnlos, da jede biologische Varianz wieder in das Endergebnis eingehen würde. Der Nachteil dieses Vorgehens ist jedoch, dass in den hier verwendeten EFT-Zelllinien unterschiedliche Subtypen des EWS/FLI1 Fusionsproteins (Typ 1 und Typ 2) exprimiert werden. Dieses Protein hätte im DIGE Vergleich der EFT-Zelllinien, die EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 exprimieren, identifiziert werden müssen. Das Fehlen könnte durch Ungenauigkeiten im *warping* (Erreichen der Deckungsgleichheit der verglichenen Gele durch die Software „Progenesis“) der DIGE-Gele erklärt werden (was eventuell zum Abschluss des detektierten Spots aufgrund der Statistik führen kann). Weitere solcher Proteine, die nur von einem EWS/FLI1 Subtyp der EFT-Zelllinien konsistent exprimiert werden, wurden

demnach ebenfalls aus dem Endergebnis ausgeschlossen. Dadurch verliert man zwar z.B. für die Erklärung der Stoffwechselfvorgänge innerhalb des Tumors wichtige differentiell regulierte Proteine, hat allerdings den Vorteil, dass ausschließlich differentiell regulierte Proteine in das Endergebnis mit einfließen, die unabhängig des exprimierten EWS/FLI1 Subtyps, für die Gruppe der EFT signifikant sind, was für potentielle Biomarker für diesen Tumor von Vorteil ist, da die klinische Evaluierung dieser Marker einen hohen Zeitaufwand bedeutet.

Die detektierten, differentiell regulierten Proteine sind im nachfolgenden beschrieben:

6.1.1 Serin Hydroxymethyltransferase, mitochondrial (SHMT2)

Das in den 6 EFT-Zelllinien um den Faktor 2,3 hochregulierte Protein SHMT2 (siehe Kapitel 5.5, Abbildung 46) ist ein Protein, das die reversible Umwandlung von Serin und Tetrahydrofolat in Glycin und 5,10-Methylen tetrahydrofolat im Mitochondrion katalysiert. Diese beiden Produkte sind direkt und indirekt an der Purin- und Pyrimidin-Nukleotidsynthese beteiligt [199]. Somit ist die Stärke der SHMT Expression (und damit die enzymatische Aktivität) positiv mit der Geschwindigkeit des Zellwachstum gekoppelt [200]. Es wird vermutete, dass das Gen für SHMT2 zwei Transkripte kodiert. Das Transkript mit fehlendem Exon1 ist hauptsächlich im Cytoplasma und Zellkern lokalisiert [201].

Die Regulierung von SHMT erfolgt durch MYC (Myelocytomatose-Onkogen) und MYCC (zelluläres MYC), die jeweils mit MAX (MYC associated factor X) einen Heterodimer formen [202], [203] und die Transkription verschiedener Gene, die die Konsensussequenz CACGTC enthalten, aktivieren [204], [205], [206]. Auch das Gen MYCN, das in allen drei untersuchten Neuroblastomzelllinien amplifiziert ist, bildet mit MAX ein Heterodimer, dass allerdings bei anderen Genen, wie z.B. MRP1 und MCM7, die Transkription reguliert [207], [208]. Zu beachten ist jedoch, dass die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (Zelllinie E1) stärker das Protein MYCC exprimiert [113] [98] und die MYCN Expression im Vergleich zu den anderen verwendeten Neuroblastomzelllinien eher gering ist. Dies spiegelt sich auch in den DIGE-Ergebnissen wieder, da hier das Protein SHMT im Gegensatz zu den anderen Neuroblastomzelllinien stärker exprimiert wird (Abbildung 46).

Die geringere Expression von SHMT in Neuroblastom im Vergleich zu EFT-Zelllinien könnte dadurch erklärt werden, dass MYC und MYCN um MAX konkurrieren, MYCN aber aufgrund seiner größeren Kopienzahl in der Zelle mit höherer Wahrscheinlichkeit an MAX bindet. In der Zelllinie SH-SY5Y wird MYCC stärker als MYCN exprimiert, wodurch eine stärkere Expression von SHMT2 wahrscheinlicher wird.

Fehlende MYCC Expression führt zu langsamem Zellwachstum, allerdings führt die Expression von MYCN wieder zu normalem Zellwachstum [209].

Die Hochregulierung von SHMT2 in EFT-Zelllinien um den Faktor 1,5 sollte auf den ersten Blick auf ein schnelleres Zellwachstum von EFT-Zelllinien hindeuten, allerdings wird die geringe MYCC-Expression (erkennbar durch die im Vergleich zu den EFT-Zelllinien geringere Expression von SHMT2) in den Neuroblastomzelllinien durch MYCN kompensiert. Dies könnte eine Erklärung für die nicht stark unterschiedlichen Wachstumsraten der Zelllinien [210] sein.

Die Expression von MYCC ist gewebeabhängig und wird in den Nieren eher schwach exprimiert [201]. Dies spiegelt sich auch in den DIGE-Ergebnissen (Abb. 46) wieder, da die Zelllinie SH-SY5Y aus einer Metastase im Knochenmark etabliert, während die beiden anderen Neuroblastomzelllinien aus Nierengewebe etabliert wurden.

Eine Absenkung des MYCC Levels in der Zelle ist mit einer Differenzierung der Zelle verbunden [211]. Der höhere Gehalt in EFT-Zelllinien könnte dadurch erklärt werden, dass die Differenzierung der Zellen durch die erhöhte Expression von EZH2 [37] verhindert wird.

6.1.2 Actin, cytoplasmic 1 (ACTB)

ACTB (Abbildung 47, Kapitel 5.5) ist ein stark konserviertes Protein, dessen Gen sich auf Chromosom 7 von der Region p12-p15 erstreckt [212]. Actine sind eine der bedeutendsten

cytoskelettalen Proteine und spielen eine Rolle bei der Muskelkontraktion, Zellbewegung, Endocytose, Zellteilung, Vesikel- und Organellenbewegung, Zell-Zell-Kommunikation und der Zellform [213], [214], [215], [216], [217]. Es wird zudem vermutet, dass eine Fehlregulierung des Actin-Systems für die Bildung von Metastasen mitverantwortlich ist [217].

Die Hochregulierung des Proteins in den Neuroblastomzelllinien um den Faktor 1,8 könnte durch die Anwesenheit eines überzähligen Chromosom 7 in den Zelllinien SH-SY5Y (Zelllinie E1) und MHH-NB11 (Zelllinie G), sowie den annähernd tetraploiden Chromosomensatz der Zelllinie SiMa (Zelllinie C) erklärt werden.

Die Zunahme des Chromosomensatzes um ein komplettes Chromosom 7 wird sowohl in fortgeschrittenen Stadien als auch in frühen Stadien von Neuroblastomen gefunden [211]. 24% der in einer Studie von Plantaz et al. [218] untersuchten Stadium 4 Neuroblastome hatten ein zusätzliches Chromosom 7.

Eine weitere Erklärung für die höhere Expression von ACTB in Neuroblastomzelllinien könnte auch eine beginnende Differenzierung der neuroektodermalen Zellen in neuronales Gewebe sein, da Actine auch bei der Exocytose eine Rolle spielen [219] und über Myosin-II mit Septin-2 (siehe 6.1.3) interagieren [220], das an der Vesikelsekretion beteiligt ist [221]. Dies würde die Hypothese unterstützen wonach Tumore der Ewing Familie Zellen der embryonalen Neuralleiste sind, die in ihrer Differenzierung blockiert sind [37].

6.1.3 Septin-2

Septin-2 (Abbildung 47, Kapitel 5.5) ist Teil einer Gruppe von 14 GTPasen, die verschiedene Rollen bei der Zellteilung und der Exozytose spielen [221], [222]. Septin 2 ist für die Zellteilung essentiell [223] und bildet einen Komplex mit SEPT6, SEPT7 und SEPT9 [220]. Über Myosin-II interagiert Septin-2 mit ACTB [220] außerdem co-immunopräzipitieren SEPT5 und SEPT2 zusammen mit dem SNARE-Protein Syntaxin [224].

Die Hochregulierung von SEPT2 um den Faktor 1,6 in den Neuroblastomzelllinien könnte auf eine höhere Zellteilungsrate hindeuten, dies ist aber durch die Wachstumsgeschwindigkeiten

der Zelllinien nicht gedeckt [210]. Eine weitere Erklärung wäre die in Kapitel 6.1.2 angesprochene Möglichkeit der weiter fortgeschrittenen Differenzierung der Neuroblastomzelllinien in neuronales Gewebe, da dies eine im Gegensatz zu den in ihrer Differenzierung blockierten EFT-Zelllinien, eine erhöhte Vesikelsekretion mit sich bringen würde.

6.1.4 Heterogenous Ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3)

hnRNP H3 (Abbildung 48, Kapitel 5.5) ist ein Protein, das Teil des Spliceosoms ist [225] am frühen Splicing-Arrest bei Hitzestress eine Rolle spielt [226], sowie bei der Antwort auf oxidativem Stress mitwirkt [227]. Von diesem Protein sind sechs Splicing-Varianten bekannt [228].

Das Spliceosom katalysiert die Prozessierung der pre-mRNA, indem durch wechselnde Splicing-Faktoren die nicht-kodierenden Introns aus der pre-mRNA ausgeschnitten werden [229]. Während der Transkription binden verschiedene heterogene Ribonucleoproteine (hnRNPs) und Serin/ Arginin-reiche Proteine (SRPs) an die pre-mRNA, durch das Spliceosom wird die pre-mRNA prozessiert, dabei werden einige der vorher schon gebundenen hnRNPs und SRPs entfernt oder ausgetauscht. Somit ist der weitere Weg der pre-mRNA und der mRNA durch das beim Splicing vorhandene Proteinrepertoire abhängig [229].

Das Protein hnRNP H3 ist während der embryonalen Entwicklung sowohl zeitlich als auch in verschiedenen Gewebetypen differentiell exprimiert [228], [230].

Die differentielle Regulierung von hnRNP H3 zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien könnte auf die unterschiedlichen Gewebetypen, denen die Tumorzelllinien entstammen, zurückgeführt werden. Diese Hypothese wird durch das DIGE-Ergebnis unterstützt (Abbildung 48), da hier die Zelllinie SiMa und MHH-NB11, die aus dem gleichen Gewebe stammen, eine statistisch nicht unterscheidbares Expressionsniveau haben.

6.1.5 Annexin A2

Annexin A2 (Abbildung 49, Kapitel 5.5) gehört zur Familie der Annexine, die die gemeinsame Eigenschaft haben, durch Bindung von Ca^{2+} an negative geladene Phospholipide zu binden [231]. Durch Chelatierung von Ca^{2+} wird diese Bindung rückgängig gemacht [232]. Eine weitere gemeinsame Eigenschaft ist die sogenannte Annexin Domäne, die aus vier sogenannter Annexin-Repeats aufgebaut ist, und wahrscheinlich ein Membranbindemodul darstellt [231]. Eine Besonderheit von Annexin A2 ist seine Eigenschaft, schon bei Kalzium-Konzentrationen im μM -Bereich Membranvesikel zu aggregieren [231].

Eine erhöhte Annexin A2 Gehalt in den EFT-Zelllinien könnte, in Einklang mit Kapitel 6.1.2 und Kapitel 6.1.3 durch eine erhöhte Exozytose-Rate erklärt werden: Zwei Moleküle Annexin A2 binden durch Ca^{2+} an zwei verschiedene Phospholipiddoppelschichten, ein S100A10-Dimer (S100 calcium binding protein A10) verbindet danach beide Annexin A2-Moleküle [233]. Aufgrund ihrer Bindung an die Plasmamembran stehen diese Moleküle nicht mehr für die 2DE zur Verfügung, da gezeigt werden konnte, dass sich Annexin A2 nicht durch EGTA (Ethylenglykoltetraacetat, ein Ca^{2+} -Komplexbildner) allein, sondern nur im Verbund mit Triton X-100 von der Plasmamembran lösen und solubilisieren lässt [234]. Im Lyse-Puffer in dem die Proteine gelöst sind, ist weder ein Komplexbildner enthalten, noch Triton X-100 (als Detergenz wurde im Rahmen dieser Disseratation CHAPS verwendet).

6.1.6 Chloride intracellular channel protein 4 (CLIC4)

CLIC4 (Abbildung 49, Kapitel 5.5) ist ein Chloridkanal für intrazelluläre Organellen. Das für CLIC4 kodierende Gen liegt auf Chromsom 1p36.11. Es gehört zur CLIC Familie der Proteine, die sieben Mitglieder umfasst (CLIC1-5, p64, Parchorin) Die Proteine dieser Gruppe existieren in zwei verschiedenen Formen: Zum einen in der löslichen Form, die im Cytoplasma vorkommt, die dann durch molekulare Neuordnung mit Einbau in die Zell- bzw. Organellenmembran in die zweite Form übergeht [235]. Die Aufgabe dieser Proteine besteht in der Regulierung der Organellenvolumen, Regulierung der Ionen in der Zellmatrix und Elektroneutralität [236]. Die Expression von CLIC4 wird durch p53, $\text{TNF-}\alpha$ und MYCC

reguliert [237] bei der durch MYCC und p53 induzierten Apoptose wird CLIC4 verstärkt exprimiert und in den Zellkern verlagert [237]. In vielen Tumorarten ist CLIC4 im Vergleich zum Normalgewebe herunterreguliert, allerdings variiert die Anzahl der CLIC4 Transkripte zwischen und auch innerhalb der verschiedenen Tumortypen [237].

In Normalgewebe liegt CLIC4 hauptsächlich im Zellkern vor, während bei Tumoren CLIC4 hauptsächlich im Cytoplasma vorliegt, allerdings ein insgesamt viel niedrigeres Expressionsniveau hat [237]. Im Stroma von Normalgewebe ist CLIC4 eher gering exprimiert, im Stroma von Tumorgewebe allerdings stark [237]. Dies könnte auch die Unmöglichkeit von definierten CLIC4 Expressionsmustern bei Gesamt-Tumorlysaten (und somit die Schwankungen innerhalb von einer Tumorart) erklären [237]. Außerdem wird angenommen, dass CLIC4 an der Zell-Zell-Kommunikation zwischen dem Tumor und seinem ihm umgebenden Gewebe beteiligt ist, um eine wachstumsfreundliche Umgebung zu schaffen, da CLIC4 auch an der Angiogenese beteiligt ist [238], [239].

Mit zunehmender Malignität sinkt die Expression von CLIC4 in Tumorzellen [240]. Durch gezielte CLIC4 Anreicherung im Zellkern konnte in Zellen, die durch genetische Deletion keine Apoptosome formen können, trotzdem die Apoptose über den mitochondrialen Weg induziert werden. Dadurch ist CLIC4 ein mögliches molekulares Ziel für gezielte Krebszellabtötung [241].

Die im Gegensatz zu den EFT-Zelllinien geringere Expression von CLIC4 in Neuroblastomzelllinien ließe sich durch deren starke MYCN-Expression erklären. Wie schon in Kapitel 6.1.1 beschrieben konkurrieren MYCC und MYCN um MAX um mit diesem zu dimerisieren und die Transkription von bestimmten Genen zu aktivieren. Da MYCN in den Zelllinien SiMa und MHH-NB11 stark exprimiert sind, lässt dies eine Dimerisierung von MYCC und MAX um die Transkription von CLIC4 einzuleiten aufgrund der Stochastik unwahrscheinlich werden. Somit ist z.B. auch der über CLIC4 geregelte Apoptoseweg versperrt. Die Zelllinie SH-SY5Y exprimiert zwar das Protein MYCC im Gegensatz zu MYCN stark, allerdings enthält diese Zelllinie einen DNA-Verlust im Bereich 1p36 [242], allerdings wird aus den Ergebnissen in [242] nicht klar, ob es sich um einen kompletten Verlust dieser Region handelt, oder nur um einen LOH (Verlust der Heterozygotie) [243]. Da CLIC4 in SH-

SY5Y exprimiert wird, wenn auch nur schwach, legt den Schluss nahe, dass es sich um einen LOH handelt.

6.1.7 Ezrin

Ezrin (Abbildung 61, Kapitel 5.6) gehört zur Familie der ERM-Proteine (Ezrin-Radixin-Moesin), die eng miteinander verwandt sind, und für die reversible Anbindung von F-Actin an die Plasmamembran verantwortlich sind. Diese Funktion ist notwendig für die Erhaltung der Zellform, Zellanhaftung, Bewegung und Zellteilung [244], [245], [246], [247], [248].

In der Arbeit von Imoukhuede *et al.* [249] konnte gezeigt werden, dass der Neurotransmitter Transporter GAT1 durch F-Actin mithilfe von Ezrin fest in die Plasmamembran verankert wird. Dies sorgt dafür, dass dieser Transporter nicht mehr in der Plasmamembran wandern kann und somit eine hohe Dichte dieser Transporter an den Axonen und präsynaptischen Spalten erhalten werden kann. Diese Fixierung wurde an Neuroblastomzellen gezeigt.

Die Hochregulierung von Ezrin in EFT-Zelllinien um den Faktor 2,3 kann, in Bezug auf Imoukhuede *et al.* [249], dadurch erklärt werden, dass in Neuroblastomzelllinien ein größerer Teil des gesamten Ezrin fest an der Plasmamembran verankert ist als in EFT-Zelllinien und somit für die 2D nicht mehr zur Verfügung steht. Dadurch erscheint Ezrin in den EFT-Zelllinien hochreguliert.

6.1.8 V-Typ Proton ATPase Subunit B (V-ATPase B)

V-Typ ATPasen (Abbildung 61, Kapitel 5.6) sind zusammen mit Na⁺/K⁺-ATPasen für den Großteil der Energiebereitstellung im Neurotransmitter-Zyklus (Ausschüttung, Wiederaufnahme und Anreicherung /Lagerung) in den Vesikeln innerhalb der Zelle zuständig [250].

Die Hochregulierung in den Neuroblastomzelllinien um den Faktor 1,8 lässt sich dadurch erklären, dass diese sich im Stadium der Differenzierung zu neuronalen Zellen befinden und

dadurch der Exozytose vermehrt Vesikel bereitgestellt werden müssen. Auch bei diesem Protein kann keine Ein/ Aus Regulierung zwischen den EFT- und Neuroblastomzelllinien festgestellt werden, sondern nur eine geringe Regulierung. Dies spricht dafür, dass sowohl EFT und Neuroblastome aus einer neuroektodermalen Vorläuferzelle stammen, sich die EFT im Stadium der Differenzierung zur mesenchymalen Zelle befinden, aber blockiert sind [37] (somit sowohl neuronale als auch mesenchymale Marker tragen), während die Neuroblastomzellen sich weiter Richtung neuronalem Gewebe differenzieren.

6.1.9 Elongationsfaktor 1- γ (EF-1 γ)

Der Elongationsfaktor 1 (Abbildung 62, Kapitel 5.6) besteht aus vier Untereinheiten (α - δ) und ist am Transfer von Aminoacyl-tRNAs zu den Ribosomen beteiligt. [251]. Die vier Untereinheiten sind hoch-abundant und können zusammen bis zu 5% des Gesamtproteinanteils der Zelle ausmachen [251]. Es wird vermutet, dass EF-1 γ für die Kontrolle der Translation zuständig ist [252], desweiteren ist EF-1 γ in Darm- und Bauchspeicheldrüsenkarzinomen [252], Ösophaguskarzinomen [253], sowie weiteren Krebsarten [254].

Allerdings ist zu beachten, dass Zelllinien eine bis zu 20-fach höhere Expression von EF-1 α , β und γ im Vergleich zum Gewebe, dem sie entnommen wurden, haben [255]. Auch eine Umwandlung der Zelllinien in Krebszellen veränderte die Expression nicht stark [255]. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass die Expression von EF-1 γ in allen hier verwendeten Zelllinien stark erhöht ist (im Vergleich zum Ursprungsgewebe), und die differentielle Expression von EF-1 γ zwischen den EFT- und Neuroblastomzelllinien der biologischen Variabilität der Anzucht geschuldet sein könnte.

6.1.10 Annexin A1

Annexin A1 (Abbildung 63, Kapitel 5.6) gehört wie Annexin A2 (Kapitel 6.1.5) zur Familie der Annexine und bindet abhängig von Ca^{2+} an die Plasmamembran. Die Kalzium-Ion Anlagerung resultiert in einer Konformationsänderung, durch die das Protein S100A11 sich an Annexin A1

anlagern kann und ein zweites Annexin A1-S100A11 Dimer binden kann. Es wird vermutet, dass durch diese Konformationsänderung Annexin A1 auch direkt mit anderen Plasmamembranen interagieren kann [231]. Das Protein Annexin A1 ist somit auch für die Regulierung der Exocytose zuständig. Es konnte gezeigt werden, dass Annexin A1 ein Inhibitor der Hormon-Exocytose im neuroendokrinen System ist [256]. Desweiteren konnte eine inhibierende Wirkung von Annexin A1 auf die Histaminausschüttung von Mastzellen festgestellt werden [257], deshalb wird eine allgemein Rolle von Annexin A1 bei der Verhinderung der Exocytose angenommen [258].

Eine Hochregulierung von Annexin A1 um den Faktor 5,0 in EFT-Zelllinien könnte dadurch erklärt werden, dass sich Tumore der Ewing-Familie im Stadium der Differenzierung von neuroektodermalen Zellen zu mesenchymalen Zellen befinden [37] und deshalb die Exozytose neuronaler Hormone unterbunden /verringert wird.

6.1.11 Fazit

Durch die im Rahmen dieser Dissertation gefundenen differentiell regulierten Proteine, lässt sich die Hypothese stärken, nachdem sowohl Tumore der Ewing Familie als auch Neuroblastome eine neurale Vorgängerkelle haben, sich Tumore der Ewing Familie zu mesenchymalem Gewebe entwickeln, aber in dieser Differenzierung blockiert sind [37]. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass Neuroblastome verstärkt an der Exocytose beteiligte Proteine exprimieren. Tumore der Ewing Familie exprimieren auch scheinbar verstärkt an exozytotischen Vorgängen beteiligte Proteine, was sich allerdings dadurch erklären lässt, dass wenn diese Proteine frei im Cytoplasma vorhanden sind und nicht an der Exocytose von Vesikeln beteiligt sind, diese für die 2D zur Verfügung stehen. Daraus lässt sich schließen, dass die an der Exozytose beteiligten Proteine bei Neuroblastomen „im Einsatz“ sind. Dies steht im Einklang mit der bei Tumoren der Ewing Familie stärkeren Expression von Annexin A1, dass für eine Inhibierung der Exocytose von Neurohormonen [256], [258], zu denen auch Neurotransmitter zählen, beteiligt ist.

Das im Rahmen dieser Arbeit keine „Totalregulierung“ von zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien differentiell exprimierten Proteinen im Sinne einer Ein/Aus-Regulierung gefunden wurde stützt zusätzlich die Hypothese der neuralen Vorgängerzelle bei Tumoren der Ewing Familie.

6.2 Differentiell regulierte Proteine zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 Zelllinien

Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmals mit DIGE nach differentiell exprimierten Proteinen zwischen EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 Zelllinien geforscht, die unterschiedliche klinische Ausprägung und Prognosen haben. [259],[260]. Wie schon in Kapitel 6.1 angesprochen ist durch die strikte Auswahl von Proteinen, deren Expressionsniveau konsistent sich über eine Tumorart erstreckt, mit Nachteilen bezüglich von nur einem Subtyp (hier: EWS/FLI1 Typ 1 oder Typ 2) von Tumoren der Ewing Familie exprimierten Proteine verbunden. Um für einen EWS/FLI1 Subtyp spezifisch exprimierte Proteine, und somit potentielle Biomarker zur Unterscheidung dieser beiden, zu finden, wurden die DIGE-Ergebnisse mit einer neue Gruppeneinteilung nach den exprimierten EWS/FLI1 Typen (unter Weglassung der Neuroblastomzelllinien) erneut untersucht. Wie aus den Abbildungen 66-71 und der Tabelle 37 ersichtlich, konnten mit IPG 3-12 39 differentiell regulierte Proteine detektiert werden (davon 20 identifiziert) und mit IPG 4-7 19 differentiell regulierte Proteine (davon 11 identifiziert)(Abbildungen 73-76, Tabelle 40). Von diesen 27 Proteinen („unique“) sind nachfolgend eine Auswahl von zehn näher beschrieben und diskutiert.

6.2.1 60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)

HSPD1 (Abbildung 68, Kapitel 5.7) ist ein Protein der mitochondrialen Matrix und äußeren Mitochondrienmembran, dass durch Hitzestress, Schäden am Mitochondrion und Abbau der mitochondrialen DNA verstärkt exprimiert wird [261], [262]. Es wird vermutet, dass HSPD1 durch Aktivierung der Caspase-Kaskade, die Apoptose auslösen kann [263]. Eine Überexpression wurde in verschiedenen Krebsarten festgestellt [264] [265], [266], [267], [268], [269], [270], [271], allerdings ist die genaue molekulare Funktion von HSPD1 unbekannt [272].

Dieses Proteine ist in EWS/FLI1 Typ1 exprimierenden EFT-Zelllinien um den Faktor 1,5 hochreguliert. Aufgrund der unverständenen molekularen Funktion dieses Proteins ist keine Erklärung bezüglich der Regulierung zwischen den beiden EFT-Subtypen möglich.

6.2.2 Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKM2)

Die Pyruvat-Kinase PKM2 (Abbildung 68, Kapitel 5.7) katalysiert die Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und stellt somit ein Schlüsselenzym der ATP Produktion in der Glykolyse dar [273]. Die Isoform M2 kann als aktives Tetramer oder als inaktives Dimer vorliegen, wodurch die Rate des Glucoseabbaus in der Zelle reguliert wird [273], die Isoform M1 ausschließlich als aktives Tetramer [273]. Die Isoform M2 ist die embryonale Form des Proteins, diese wird mit fortschreitender Differenzierung von Muskel- und Gehirngewebe durch die Isoform M1 ersetzt. Die Isoform M1 ist eine Splicing-Variante, die sich in 23 Aminosäuren von M2 unterscheidet. In anderen Gewebetypen wird die Isoform M2 durch die jeweils gewebetypische Form ersetzt [273].

In vielen Tumorarten ist die Isoform M2 überexprimiert [273].

Das Protein PKM2 ist in Tumoren der Ewing Familie, die das Fusionsprotein EWS/FLI1 Typ1 exprimieren 2,0-fach hochreguliert. Diese Hochregulierung könnte dadurch erklärt werden, dass Zellen, die den Typ1 oder Typ2 exprimieren in unterschiedlichen Differenzierungsstadien blockiert sind. Es konnte durch die Massenspektrometrie nicht geklärt werden, ob es sich bei diesem Protein um die Isoform M1 oder M2 handelt, eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass diese Isoformen einen unterschiedlichen pI besitzen, wodurch eine Hochregulierung einer Isoform in einer Zelle mit einem Typ des Fusionsproteins automatisch eine verstärkte Expression der anderen Isoform in den Zellen des anderen Fusionsproteintyps bedeuten würde. Dies ließe sich durch unterschiedliche Differenzierungsstadien der jeweiligen Zelllinien mit entsprechendem Typ des Fusionsproteins erklären.

6.2.3 T-complex Protein 1 subunit alpha, gamma, epsilon

Das T-complex protein 1 (Abbildungen 69 und 75, Kapitel 5.6 und 5.7) ist ein Chaperon, das zur Gruppe II der Chaperonine gehört [274], und die Faltung von Actin und Tubulin unterstützt [275] [276] [277]. Weitere Interaktionspartner sind Luciferase [278], G α -Transducin [279], Cyclin E [280], Myosin [281], das Tumorsupressorprotein VHL (Von Hippel-Lindau) [282] und den Septin-Komplex [283]. Das zur Zeit bekannte Interaktom des T-complex protein 1 umfasst 136 Proteine und Gene [283]. Dieses Protein besteht aus 7-9 Hauptkomponenten, die zusammen einen doppelringförmigen Heterooligomer mit einem Molekulargewicht von ca. 900 kDa bilden [275] [276] [277].

Die Expression dieses Proteinkomplexes ist Zellwachstumsabhängig, so ist das Expressionslevel während der G1/S-Phase des Zellzyklus stark erhöht [284] [285], außerdem wurde eine Hochregulierung bei Darmkrebs gefunden [286].

Die einzelnen Untereinheiten dieses Proteinkomplexes sind um den Faktor 1,5 (Alpha); 1,6 (Gamma) und 1,8 (Epsilon) in EWS/FLI1 Typ1 exprimierenden Zelllinien (im Vergleich zu EWS/FLI1 Typ2-Zelllinien) hochreguliert. Aufgrund der Vielzahl der Interaktionspartner dieses Proteinkomplexes ist es nicht möglich eine Hypothese zu erstellen warum dieser Proteinkomplex in EWS/FLI1 Typ1 Zelllinien verstärkt exprimiert wird.

6.2.4 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L)

HnRNP L (Abbildung 69, Kapitel 5.7) ist ein im Zellkern stark exprimiertes Protein, das für die Entfernung von Introns aus der prä-mRNA oder das Überspringen von Exons (Exon *skipping*) zuständig ist [287], [288]. Die Erkennungssequenz sind sowohl Wiederholungen eines Cytosin/ Adenin (CA-repeats) Motivs als auch Cytosin /Adenin -reiche (CA-rich) Regionen der prä-mRNA [289]. Die Bindung von hnRNP L an die mRNA kann sowohl zu deren Stabilisierung [287] als auch deren Destabilisierung beitragen [290].

Dieses Protein ist in EFT-Zelllinien, die den Typ1 des Fusionsproteins EWS/FLI1 exprimieren, um den Faktor 1,4 hochreguliert. Aufgrund der Vielzahl der Funktionen von hnRNP L kann hier nicht auf eine spezifische biologische Bedeutung dieser differentiellen Regulierung zurückgeschlossen werden.

6.2.5 Stress-70 protein, mitochondrial (HSPA9)

HSPA9 (Abbildung 74, Kapitel 5.7) ist ein mitochondriales Chaperon, das für den Import von Proteinen in das Mitochondrion eine wichtige Rolle spielt [291]. Es gehört zur Familie der 70 kDa Heat Shock Proteine (HSP70) und ist die einzige ATPase im mitochondrialen Importkomplex [292], [293]. Das Protein nimmt Teil an der Faltung und dem Einbau von Fe-S-Clustern in mitochondriale Proteine [294]. Eine Überexpression von HSPA9 unterdrückt die pro-apoptische Eigenschaften verschiedener Substanzen [291].

Die Hochregulierung dieses Proteins um den Faktor 1,3 in den EFT-Zelllinien, die den Typ1 des EWS/FLI1-Fusionproteins exprimieren, könnte mit der Hochregulierung des Proteins Aconitate hydratase, mitochondrial zusammenhängen, da dieses Protein Fe-S-Cluster enthält [294].

6.2.6 Gamma-enolase (NSE)

Die Enolase (Abbildung 74, Kapitel 5.7) ist ein Enzym der Glykolyse und katalysiert Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat [295], [296]. Die Enolase existiert in drei Isoformen, wobei die γ -Enolase ausschließlich in neuronalem Gewebe gefunden wird [297]. Die γ -Enolase wird verstärkt in Neuroblastomen exprimiert [298].

Die γ -Enolase wird in EWS/FLI1 Typ2 exprimierenden Zellen um den Faktor 1,4 stärker exprimiert als in Zellen, die EWS/FLI1 Typ1 exprimieren. Die Hochregulierung in Typ2 Zellen könnte dadurch erklärt werden, dass diese Zellen in ihrer Differenzierung näher am neuronalen Zelltyp blockiert sind als Zellen, die den Typ1 exprimieren.

6.2.7 ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B)

Die β -Untereinheit der ATP-Synthase ist der katalytische Teil der F_1 -Domäne der mitochondrialen F_1F_0 -ATP Synthase [299], [300]. Durch diesen Komplex wird durch einen Protonenfluss ATP synthetisiert [300], [301].

Dieses Protein (Abbildung 74, Kapitel 5.7) ist in den EWS/FLI1 Typ1 exprimierenden Tumoren der Ewing Familie um den Faktor 1,4 hochreguliert. Dies könnte auf einen verstärkten Glucoseabbau in diesen Zellen, im Verbund mit der in Kapitel 6.2.2 beschriebenen Transformation der Isoformen der Pyruvatkinase PKM2 bei Zelldifferenzierung. Die Hochregulierung der ATP-Synthase könnte darauf hindeuten, dass in EWS/FLI1 Typ1 exprimierenden Zellen verstärkt die Isoform M1 der Pyruvatkinase vorliegt, da diese, im Gegensatz zur Isoform M2, keine inaktive Form hat. Die würde bedeuten, dass EWS/FLI1 Typ2 exprimierende Zellen weiter Richtung neuronaler Vorläuferzelle (=undifferenzierter) in ihrer Differenzierung blockiert wären.

6.2.8 Septin-2

Septin-2 (Abbildung 76, Kapitel 5.7) ist bereits in Kapitel 6.1.3 ausführlich dargestellt. Die Hochregulierung um den Faktor 1,5 in EWS/FLI1 Typ2 exprimierenden Zelllinien (im Vergleich zu EWS/FLI1 Typ1 exprimierenden Zelllinien) könnte ein Hinweis darauf sein, dass Zelllinien, die den Typ2 exprimieren, näher am neuronalen Gewebetyp sind.

6.2.9 Heat shock protein beta-1 (HSPB1)

HSPB1 (Abbildung 76, Kapitel 5.7) ist ein hoch konserviertes Chaperon, dass vorübergehend bei zellulärem Stress induziert wird. Seine Aufgaben umfasst die Erleichterung der Proteinfaltung, Transport und Konformationsänderungen von Proteinen [302]. Zusätzlich kann

HSPB1 apoptotische Stoffwechselwege blockieren, oxidativem Stress entgegenwirken und Veränderungen am Zytoskelett bewirken [303] [304], [305]. Neuere Untersuchungen deuten auf eine Rolle von HSPB1 beim Herauswachsen von Axonen und der Zelldifferenzierung hin [306].

Die höhere Expression dieses Proteins um den Faktor 2,4 in EWS/FLI1 Typ2 exprimierenden Zelllinien ließe sich durch verschiedene Differenzierungsstadien der zwei Subtypen erklären, wobei EWS/FLI1 Typ2 näher am neuronalen Zelltyp wäre, als EWS/FLI1 Typ1.

6.2.10 Fazit

Die Ergebnisse der DIGE-Experimente legen nahe, dass Zellen, die das Fusionsprotein EWS/FLI1 Typ 2 exprimieren mehr dem neuronalen Zelltyp entsprechen und damit früher in ihrer Differenzierung blockiert sind als Zellen, die den Typ 1 exprimieren. Eine größere Nähe zum neuronalen Zelltyp sollte auch eine verstärkte Exozytose bedingen, was eine Erklärung für die stärkere Metastasierungsneigung der Typ2 exprimierenden Zellen wäre [175].

6.3 Differentielle Glykoproteomanalyse von EFT- und NB-Zelllinien

Wie schon in der Einleitung erwähnt, spielen Glykosylierungen bei der Entstehung von Krankheiten eine wichtige Rolle [7][8][9][10][11]. Dies gab den Ausschlag im Rahmen dieser Dissertation nach differentiell glykosylierten Proteinen zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien zu suchen. Folgend sind die Proteine beschrieben, die als entweder differentiell glykosyliert oder als differentiell exprimiert betrachtet werden können, da diese Proteine nicht in den DIGE-Experimenten auffindbar waren und sich somit keine Aussage betreffend differentielle Glykosylierung und/oder differentieller Expression treffen lässt. Die in Kapitel 5.8 identifizierten Proteine (Tabelle 42) werden im folgenden ausführlich diskutiert:

6.3.1 Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (HADHA)

Das Protein HADHA (Abbildung 77, Kapitel 5.8) ist an der mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt und hat drei verschiedene katalytische Aktivitäten: Langkettige Enoyl-CoA Hydratase, langkettige 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und langkettige 3-Ketothiolase [307]. Ein Defekt dieses Proteins führt zur *long-chain 3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase (LCHAD) deficiency* [308]. Es wird zusätzlich vermutet, dass eine Fehlregulierung von HADAHA ein begünstigender Faktor bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie ist [309].

Dieses Protein ist in den Zelllinien der Ewing Familie von Tumoren im Vergleich zu den Neuroblastomzelllinien entweder differentiell reguliert oder neo-glykosyliert. Es könnte auch eine Deglykosylierung dieses Proteins in den Neuroblastomzelllinien vorliegen.

In der Literatur gibt es keine Hinweise, die den Unterschied in der Regulierung und/ oder Glykosylierung zwischen den beiden Tumorarten erklären könnte.

6.3.2 Lamin-B1 (LMNB1)

Lamin-B1 (Abbildung 78, Kapitel 5.8) ist die Hauptkomponente des Laminas des Zellkerns und ist an der Kontrolle der Genexpression beteiligt, sowie an der DNA-Replikation, -Reparatur und -Transkription [310], [311], [312]. Durch den Transkriptionsfaktor Oct-1 ist LMNB1 an der Kontrolle von oxidativem Stress beteiligt [313]. Durch Phosphorylierung von LMNB1 tritt die Zelle, durch den Fortschritt des G2/M Zellzyklus, in den Teilungsphase ein [314]. Es wird angenommen, dass eine Fehlregulierung dieses Proteins einige Schlüsselprozesse bei der Krebsentstehung in Gang setzt [315]. Eine Überexpression von Lamin-B1 führt zur Leukodystrophie, einer degenerativen Erkrankung des zentralen Nervensystems [316].

Die Veränderungen im Glykoproteinmuster zwischen den EFT- und Neuroblastomzelllinien deuten auf eine „fehlende“ Isoform von Lamin B1 hin. Ob das Fehlen auf eine differentielle Glykosylierung und/ oder auf eine differentielle Regulierung zurückzuführen ist, kann nicht bestimmt werden, da dieses Protein in den DIGE-Versuchen nicht detektiert wurde. Eine weitere Möglichkeit die ein verändertes Glykoproteinmuster ergeben würde, wäre z.B. eine weitere posttranslationale Modifikation, die den pI des Proteins beeinflussen würde.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden keine Daten bezüglich der Expression der Proteine im Vergleich zu Normalgewebe erhoben, deshalb lässt sich keine Aussage ob des Expressionsniveaus dieses Proteins in EFT-Zelllinien treffen. Die Auswirkungen einer im Vergleich zu Normalgewebe geringeren Expression dieses Proteins sind in der Literatur nicht beschrieben.

6.3.3 ATPase family AAA domain-containing protein 3A (ATAD3A)

Über das Protein ATAD3A (Abbildung 80, Kapitel 5.8) ist nur sehr wenig bekannt. Es trägt eine Phosphorylierungsstelle [317] und ist ein für Blasten der akuten myeloische Leukämie spezifisches Zelloberflächenantigen [318].

Ein Fehlen dieses Proteins auf den Western-Blots könnte dadurch erklärt werden, wenn ATAD3A in Neuroblastomzelllinien ein Zelloberflächenantigen ist.

6.3.4 Fazit

Durch die Analyse des Glykoproteoms konnten Proteine detektiert werden, die aufgrund ihrer differentiellen Glykosylierung bzw. Regulierung, als potentielle Biomarker zur Unterscheidung der beiden verwendeten Tumorarten herangezogen werden könnten. Dies erfordert jedoch Verifizierung durch die Untersuchung mit weiteren Zelllinien und klinischen Tumorproben. Der Vorteil der Western-Blots ist durch das Fehlen eines *internal pooled standards* gegeben, so können die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse leicht mit darauf aufbauenden Experimenten anderer Arbeitsgruppen verglichen werden. Einen Einblick in die Stoffwechselforgänge der beiden Tumorarten konnte durch diese Glykoproteomanalyse nicht gewonnen werden.

6.4 Differentiell regulierte Proteine zwischen EFT- und NB-Zelllinien in der Literatur

Im nachfolgenden wird auf die Arbeit von Zanini et al. [3] aus dem Jahr 2008 eingegangen, bei der drei EFT- gegen drei Neuroblastomzelllinien verglichen wurden. Dies ist die einzige Arbeit bis dato, die sich mit differentiell exprimierten Proteinen zwischen diesen beiden Tumorarten beschäftigt. Die von Zanini et al. detektierten, zwischen EFT- und NB-Zelllinien differentiell regulierten Proteine (siehe Tabelle 59) konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Interessanterweise sind drei der fünf von Zanini et al. detektierten Proteine in dieser Arbeit zwischen verschiedenen EFT-Subtypen (EWS/FLI1 Typ1 bzw. Typ2) als differentiell exprimiert detektiert worden (siehe Tabelle 59).

Proteinname	Regulierungsfaktor (NB/EFT)	Acc. Nr. Uniprot
Heat shock cognate 71 kDa protein	+2,9	P11142
Heat shock 70 kDa protein 1	+4,5	P08107
Stress-70 protein, mitochondrial	+2,3	P38646
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	+2,7	P10809
Heat shock protein beta-1	+32	P04792

Tabelle 59: In der Arbeit von Zanini et al. detektierte, zwischen EFT- und NB-Zelllinien differentiell regulierte Proteine. Fett geschriebene Proteine wurden im Rahmen dieser Dissertation zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 exprimierenden Zelllinien als differentiell reguliert detektiert.

Die Abweichungen zwischen der Arbeit von Zanini et al. und dieser Dissertation liegen wahrscheinlich in der hier höheren Anzahl von Zelllinien begründet. Außerdem ist zu beachten, dass die in [3] verwendete Silberfärbung sich nicht gut zur Quantifizierung von Expressionsunterschieden von Proteinen eignet [141].

6.5 Methodenentwicklung zur Vorfraktionierung von Proteinen mit $pI > 7$

Wie aus Tabelle 55 ersichtlich sind von insgesamt 29 erstmalig identifizierten Proteinen (detektierten Isoformen sind hier nicht mitgezählt) 9 Proteine der Klasse der niedrig-abundanten Proteine zuzuordnen, die einen pI bis 10,6 haben. Somit konnte mit vergleichsweise gering auflösenden, weiten pH-Gradienten (IPG 3-12) schon ein beträchtlicher Anteil erstmalig (d.h. bisher nicht in der Protecs-Datenbank [176], [177], [178], [179], [180], [181], [182], [183], [184], [185], [186] aufgeführt) identifizierter Proteine (29 von 53 identifizierten Proteine (ohne Isoformen) mit einem $pI \geq 7$) gefunden werden. Zusätzlich konnte ein hoher Anteil niedrig-abundanter Proteine gefunden werden, der darauf schließen lässt, dass mit engeren pH-Gradienten, durch die höhere Auflösung, weitere niedrig-abundante Proteine zu finden sein werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da es hier primär um die erstmalige Schaffung einer Möglichkeit ging, Proteine mit einem $pI \geq 7$ mithilfe eines Trägerampholytgradienten vorzufractionieren. Die Abreicherung der ribosomalen Proteine hat im Vergleich zum unbehandelten Proteinextrakt nur wenige neue Proteine identifizierbar gemacht. Bei der alleinigen Betrachtung des ribosomal abgereicherten Extrakts sind allerdings von 11 erstmals identifizierten Proteinen 5 Proteine nicht im Normalextrakt nachweisbar gewesen.

6.6 Methodenentwicklung zur 2D-elektrophoretischen Trennung von integralen Membranproteinen

Bisherige Versuche zur 2D-elektrophoretischen Trennung von integralen Membranproteinen waren eher von bescheidenen Erfolgen gekrönt und stellt die 2D-Elektrophorese vor große Herausforderungen [14]. In dieser Arbeit wurde versucht diese Probleme zu überwinden.

Durch die Verwendung von 50% Acetonitril sowohl im Lyse- als auch im Quellpuffer ermöglicht mehr integralen Membranproteinen den Übergang in die zweite Dimension, im Gegensatz zur reinen Verwendung von Detergenzien als Solubilisierungshilfe von Membranproteinen. Allerdings sind in den komplexen Proben fast ausschließlich Proteine mit einem negativen GRAVY gefunden worden, was jedoch auch bei der Trennung von

Membranproteinen mittels SDS-PAGE und MALDI-ToF MS [162] beobachtet wurde. Auch die Zahl der Transmembranomänen liegt hauptsächlich im Bereich von eins bis drei.

Zusammen mit dem Ergebnis der erstmalig ermöglichten Transferierung von Bacteriorhodopsin in die zweite Dimension (bisherige Versuche waren erfolglos [177], [188]) lässt sich sagen, dass im Modellsystem integrale Membranproteine mit 6 TMDs und einem GRAVY von 0,72 durch die 2DE getrennt werden können, in realen (komplexen) Proben die Trennleistung der in dieser Arbeit entwickelten Quell- und Lysepuffer leidet. Allerdings ist zu beachten, dass die größte Anzahl von hydrophoben Proteine mit hoher Anzahl an TMDs im pH-Bereich 6-12 liegt, aber hier eine Vorfraktionierung des Membranproteinextrakts vonnöten ist, da diese häufig niedrig-abundant sind [15],[16]..

7 Zusammenfassung

7.1 Differentielle Proteomanalyse von EFT- und NB-Zelllinien

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine differentielle Proteomanalyse von Zelllinien der Ewing Familie von Tumoren (EFT) und Neuroblastomzelllinien durchgeführt um einen Einblick in die unterschiedlichen Stoffwechselfvorgänge in beiden Tumorarten zu erhalten und potentielle Tumormaker aufzuzeigen.

Durch die Verwendung der Difference Gel Electrophoresis (DIGE)-Technologie konnte nicht nur Einblick in die Stoffwechselfvorgänge der EFT- und Neuroblastomzelllinien gewonnen werden, es ließen sich auch die differentieell exprimierten Proteine quantitativ erfassen. Zunächst wurden die differentielle Proteomanalyse mit einem Zelllinienkontingent bestehend aus 3 EFT- und 2 NB-Zelllinien durchgeführt. Dies ergab 32 differentieell regulierte Proteine im pH-Bereich 3-12, die hauptsächlich den Gruppen der Enzyme, Transporter, Plasmaproteine und potentiellen Krebsbiomarker angehören. Durch die Aufstockung der Zahl der Zelllinien auf 6 EFT- und 3 NB-Zelllinien ließ sich die Zahl der als differentieell exprimiert detektierten Proteine auf zehn senken. Dies bedeutet, dass der Anteil an falsch-positiven (die der zunächst geringeren Zelllinien-Anzahl geschuldet ist) um knapp zwei Drittel senken ließ, indem die Anzahl der Zelllinien erhöht wurde. Diese moderate Erhöhung der Anzahl der Zelllinien hat den Vorteil, dass der Versuchsaufbau nicht allzu vergrößert wird und somit im Rahmen des Machbaren bleibt, und trotzdem die Zahl der falsch-positiv als differentieell exprimiert detektierten Proteine stark absenkt. Von diesen zehn Proteinen gehören Septin-2, Annexin A1, Annexin A2 und Ezrin zur Klasse der protentiellen Krebsbiomarker. und es lies sich die Hypothese stärken, nachdem sowohl Tumore der Ewing Familie als auch Neuroblastome sich aus einer neuronalen Vorläuferzelle entwickeln, aber in verschiedenen Stadien ihrer Differenzierung blockiert sind (z.B die differentielle Regulierung von Septin-2 und der V-Typ Proton ATPase Subunit B). Die verstärkte Expression von an der Exocytose beteiligten Proteinen (z.B. V-tpye Proton ATPase Subunit B, Septin-2) bei Neuroblastomen könnte ein Hinweis auf das Metastasierungspotential der Neuroblastomzelllinien sein, hierzu sind aber aufgrund fehlender Metastasierungsversuche keine Daten verfügbar.

7.2 Differentiell regulierte Proteine zwischen EFT- und NB-Zelllinien in der Literatur

Bisherige Proteomdaten der zwischen EFT- und Neuroblastomzelllinien differentiell exprimierten Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Interessanterweise sind drei der fünf in der Arbeit von Zanini et al. (2008) angegebenen Proteine innerhalb der EFT-Subtypen EWS/FLI1 Typ1 bzw. Typ2 differentiell exprimiert (Stress-70 protein, 60 kDa heat shock protein und Heat shock protein beta-1). Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich auf die in dieser Dissertation höhere Anzahl der verwendeten Zelllinien und auf die Quantifizierungsprobleme der in der Arbeit von Zanini et al. (2008) verwendeten Silberfärbung zurückführen.

7.3 Differentielle Proteomanalyse von EWS/FLI1 Typ1/Typ2 Zelllinien

Um das unterschiedliche klinische Verhalten der verschiedenen EFT-Subtypen, die sich hinsichtlich der Aggressivität (Tumorstadium, Verbreitung von Metastasen, Metastasenwachstum) unterscheiden, näher zu beleuchten wurden 3 EWS/FLI1 Typ1 Zelllinien mit 2 EWS/FLI1 Typ2 Zelllinien mithilfe der DIGE Technologie miteinander verglichen. Durch diesen Vergleich konnten 27 „unique“ (ohne deren Isoformen und doppelten Detektionen in den unterschiedlichen IPGs) Proteine als differentiell exprimiert detektiert werden, die hauptsächlich den Proteinklassen der Enzyme, potentiellen Krebsbiomarker, Transporter und Plasmaproteine zugeordnet werden können.

Durch die zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 Zelllinien differentiell exprimierten Proteine (z.B. 60 kDa heat shock protein, Pyruvate kinase isozymes M1/M2, T-complex protein, hnRNP L, Stress-70 Protein, gamma-Enolase, ATP-synthase subunit beta, Septin-2 und heat shock protein beta-1) wird der Schluss nahe gelegt, dass die Tumorarten mit unterschiedlichen Fusionsproteinen in verschiedenen Differenzierungsstadien blockiert sind (z.B. die Hochregulierung von Heat shock protein beta-1, Septin-2 und gamma-Enolase in EWS/FLI1 Typ2 Zelllinien). Die stärkere Nähe von Zelllinien, die EWS/FLI1 Typ2 exprimieren, zum neuronalen Zelltyp könnte eine Erklärung für deren höhere Metastasierungstendenz sein.

7.4 Differentielle Glykoproteomanalyse von EFT- und NB-Zelllinien

Die differentielle Glykoproteomanalyse brachte drei für eine Tumorart spezifische Glykosylierungen von Proteinen hervor, diese Proteine (Trifunctional protein subunit alpha, Lamin B-1 und ATPase family AAA containing protein 3A) gaben jedoch keinen erweiterten Einblick in die Stoffwechselfvorgänge der einzelnen Tumorarten. Die Glykoproteine stellen dennoch eine interessante Klasse dar, da dieses, für eine Tumorart typische 2D-Muster, schon mit dem bloßen Auge unterschieden werden kann. Allerdings sind weitere Studien mit weiteren Zelllinien und klinischen Tumorproben nötig um diese Ergebnisse abzusichern, jedoch stellen die identifizierten Glykoproteine jetzt schon potentielle Biomarker zur Differentialdiagnostik dar.

7.5 Methodenentwicklung zur 2D-elektrophoretischen Vorfraktionierung von niedrig abundanten Proteinen mit einem pI > 7

Die Vorfraktionierung von Proteinen mit einem pI > 7 in Gelen aus granuliertem Sephadex wurde soweit entwickelt, dass diese Klasse von Proteinen zufriedenstellend in Bezug auf Trennschärfe und Reproduzierbarkeit getrennt werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass schon mit vergleichsweise geringer Proteinbeladungsmenge von 3 mg aus *Bacillus subtilis* und einem in seinem Auflösungsvermögen begrenzten weiten pH-Gradienten (IPG 3-12) eine Vielzahl an bisher nicht durch 2D-Elektrophorese identifizierter Proteine getrennt und sichtbar gemacht werden konnte, darunter auch ein hoher Anteil von sogenannten *low-abundance* Proteinen. Die im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Methode stellt somit eine brauchbares Grundgerüst für weitere Optimierungen der Trennung von Proteinen mit einem pI > 7 mithilfe eines Trägerampholytgradienten in Gelen aus granuliertem Sephadex dar.

7.6 Methodenentwicklung zur 2D-elektrophoretischen Trennung von integralen Membranproteinen

Die Methodenentwicklung zur 2D-elektrophoretischen Trennung von integralen Membranproteinen zeigt zumindest im Modellversuch mit Bacteriorhodopsin erste Erfolge, in

komplexen Proben aus Zellextrakten von *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium glutamicum* ist ihre Leistungsfähigkeit noch eingeschränkt. Diese Methode stellt aber dennoch einen verbesserten Ansatz zur Auftrennung von integralen Membranproteinen mithilfe der 2DE dar, da schon die alleinige Zugabe von 50% Acetonitril in den Rehydratisierungspuffer der IPG-Streifen, die Zahl der auf den 2D-Gelen aufzufindenden integralen Membranproteine mehr als verdoppelt wurde, allerdings nur eine relativ geringe Anzahl gemessen an der Zahl der zu erwartenden Membranproteinen.

8 Abstract

8.1 Differential proteome analysis of Ewing Family of Tumors and Neuroblastoma cell lines

In this work a differential proteome analysis of Ewing Family of Tumors (EFT) and Neuroblastoma (NB) cell lines was performed to get a deepened insight into the different metabolic processes of both tumor types and to identify candidate cancer biomarkers.

By applying the DIGE Technology not only insight into those metabolic processes was gained, the differentially expressed proteins could also be quantitated.

First, a differential proteome analysis of 3 EFT- and 2 NB cell lines was performed and a total of 32 differentially regulated Proteins was detected. These proteins belong mostly to the classes of enzymes, transporter, plasma proteins and candidate cancer biomarkers. This experiment was repeated with more cell lines (6 EFT and 3 NB), which significantly reduced the amount of differentially regulated proteins to a total of ten. By this approach I was able to reduce the amount of false-positive detected proteins by about two third just by increasing the amount of cell lines. This moderate increase of cell lines has the advantage not only to reduce the amount of false-positives, it also doesn't expand the experimental setup to too big sizes, so it remains inside the bounds of possibility. Those ten proteins include Septin-2, Annexin A1, Annexin A2 and Ezrin as candidate cancer biomarkers. The hypothesis could be strengthened that tumors of the Ewing Family and Neuroblastomas arise both from the same precursor cell but are blocked in different states of their differentiation (for example: differential regulation of Septin-2 and V-Type protein ATPase subunit B). The increased expression of proteins of the exocytosis complex in Neuroblastoma cell lines could be a hint to their metastasis potential, but due to missing metastasis experiments no data is available.

8.2 Differentially expressed proteins in EFT- and NB cell lines in literature

The differentially expressed proteins between EFT- and NB cell lines from literature could not be confirmed. Interestingly, three out of this five proteins are detected as differentially expressed between EFT Subtypes EWS/FLI1 Type1 and EWS/FLI1 Type2 (Stress-70 protein, 60 kDa heat shock protein and Heat shock protein beta-1). These diverse results could be due to the higher amount of cell lines used in this work or the problems of protein-quantification of the silver staining method used in the work of Zanini et al. (2008).

8.3 Differential proteome analysis of EWS/FLI1 Type1/ Type2 cell lines

To get a better insight into the different clinical behaviour of the different EFT-subtypes, which differ in their aggressiveness (growth of tumor, spreading of metastases and growth of metastases) three EWS/FLI1 Type1 and two EWS/FLI1 Type2 tumor cell lines were compared. By this comparison 27 „unique“ (viz. without also detected isoforms or doubled detections in the different IPGs) Proteins could be detected to be differentially expressed. These proteins belong to the classes of enzymes, transporter, plasma proteins and candidate cancer biomarkers.

By those differentially expressed proteins (60 kDa heat shock protein, Pyruvate kinase isozymes M1/M2, T-complex protein, hnRNP L, Stress-70 Protein, gamma-Enolase, ATP-synthase subunit beta, Septin-2 und heat shock protein beta-1) the conclusion could be made, that EWS/FLI1 Type1/ Type2 tumors are blocked in different states of their differentiation (for example the up-regulation of heat-shock protein beta-1, Septin-2 and gamma-enolase in EWS/FLI1 Type2 cell lines). The proximity of EWS/FLI1 Type2 cell lines to the neuronal cell type could be an explanation for their increased potential to form metastases.

8.4 Differential glycoproteome analysis of EFT- and NB cell lines

The differential glycoproteome analysis showed three for a tumor type specific pattern of glycosylation of proteins, but these three proteins (Trifunctional protein subunit alpha, Lamin B-1 and ATPase family AAA containing protein 3A) gave no deeper insight into the metabolic processes of the different tumor types. However, these glycoproteins are an interesting class, because the 2D glycosylation pattern, which is specific for a tumor type, can be discriminated by the naked eye. More studies are needed to ensure these results, but the identified glycoproteins are by now potential biomarkers for differential diagnosis.

8.5 Method development for 2D-electrophoretical separation of low-abundant proteins with a pI > 7

Prefractionation of proteins with a pI > 7 in gels of granulated Sephadex was developed to a point at which this protein class can be separated satisfying pertaining to selectivity and reproducibility. The results show that even with a small sample loading of 3 mg from *Bacillus subtilis* and a IPG 3-12 (wide pH-range and therefore a small resolution) a multitude of proteins, prior not available for 2DE, can be identified. Also a high rate of low abundant proteins could have been identified for the first time. The method developed in this work is therefore a useful basic framework for further optimization steps for the separation of proteins with a pI > 7 in carrier ampholyte gradients in gels made of granulated Sephadex.

8.6 Method development for separation of integral membrane proteins by 2DE

The development of a method to separate integral membrane proteins by 2DE is successful in model experiment with Bacteriorhodopsin, but the capability in complex samples made of cell extracts from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum* is still limited. However, this method is still an improved attempt for separating integral membrane proteins by 2DE, because the addition of 50% acetonitrile into the IPG strip rehydration buffer of the IPG strips double the amount of integral membrane proteins found on a 2D gel, but still in low numbers.

Anhang I Identifizierte Proteine IPG 3-12

In nachfolgenden Anhang sind sämtliche mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine im pH-Bereich 3-12 aufgelistet. Die Aufzählungsnummern korrespondieren mit den in der Abbildung 14 in Kapitel 5.1.1 angegebenen Nummern. Die Spalte pI gibt den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.

Spot Nr.	Protein Name	exp. pl	exp. MW	theor. pl	theor. MW	Anzahl Peptide	Protein-Score	Score C.I. %	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
Candidate cancer biomarkers (Cb)													
11	Heat shock protein beta-1	5,0	27000	5,95	22780	5	97,6	100	P04792	Cb			
16	Insulin-like growth factor-binding protein 2	7,3	36000	7,36	35133	3	194	100	P18065	Cb	Pp		
108	Heat shock cognate 71 kDa protein	4,6	78000	5,37	70898	19	343	100	P11142	Cb			
130	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	5,4	80000	5,41	82694	21	149	100	P13010	Cb			
137	Heat shock 70 kDa protein 1	5,4	74000	5,27	70043	21	287	100	P08107	Cb	Tc		
139	DNA replication licensing factor MCM7	6,2	85000	6,08	81308	13	85,3	99,96	P33993	Cb			
198	Chloride intracellular channel protein 1	4,9	29000	4,86	26919	8	215	100	O00299	Cb	Tc		
203	Fructose-bisphosphate aldolase A	8,4	40000	8,10	39415	9	93,8	99,99	P04075	Cb	Ey	Pp	
205	Integrin-linked protein kinase	9,4	49000	8,07	51413	7	89,5	99,98	Q13418	Cb	Et	Ki	KI
217	Endoplasmic	4,4	100000	4,51	92457	16	198	100	P14625	Cb	Pp		
225	Glucose-6-phosphate isomerase	9,4	59000	8,41	63140	11	113	100	P06744	Cb	Ei		
238	Eukaryotic translation initiation factor 4H	5,8	28000	6,67	27385	5	170	100	Q15056	Cb			
240	Gamma-enolase	4,5	47000	4,66	47263	11	349	100	P09104	Cb	Cc	Ey	Pp
243	Ezrin	6,0	85000	5,86	69404	13	219	100	P15311	Cb			
247	ATP-citrate synthase	7,0	115000	6,97	120825	11	159	100	P53396	Cb	Et		
249	Creatine kinase B-type	5,3	41000	5,17	42639	10	149	100	P12277	Cb	Cc	Et	Pp
259	Alpha-enolase	5,8	47000	7,01	47169	7	116	100	P06733	Cb	Ey		
263	L-lactate dehydrogenase A chain	9,3	31000	8,44	36689	12	147	100	P00338	Cb	Eo		
266	Flap endonuclease 1	9,8	44000	8,81	42588	14	237	100	P39748	Cb			
267	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	7,1	55000	6,69	55521	9	101	100	P43490	Cb	Et		
269	Fascin	7,2	59000	6,89	54523	6	105	100	Q16658	Cb			
309	Flap endonuclease 1	9,5	44000	8,81	42588	12	206	100	P39748	Cb			
326	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	6,1	61000	7,16	70756	10	93,2	99,99	Q16881	Cb	Eo		
354	Replication protein A 32 kDa subunit	5,7	30000	5,75	29247	4	177	100	P15927	Cb			
364	Interleukin enhancer-binding factor 3	9,3	110000	8,86	95338	10	78,7	99,8	Q12906	Cb			
365	DNA replication licensing factor MCM5	9,8	89000	8,44	82276	17	158	100	P33992	Cb			
375	Endoplasmic	5,0	100000	4,51	92457	13	167	100	P14625	Cb	Pp		
397	Eukaryotic translation initiation factor 4H	6,2	29000	6,67	27385	7	240	100	Q15056	Cb			
417	Glutathione S-transferase P	5,6	24000	5,23	23353	2	81,7	99,9	P09211	Cb	Et		
434	Interleukin enhancer-binding factor 3	9,6	108000	8,86	95338	14	94,5	99,99	Q12906	Cb			
439	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	3,8	30000	4,49	31358	4	127	100	Q07021	Cb			
442	Glucose-6-phosphate isomerase	9,2	59000	8,41	63140	11	112	100	P06744	Cb	Ei		
459	Thymidylate synthase	6,8	35000	6,55	35712	12	191	100	P04818	Cb	Et		
463	Catalase	7,1	62000	6,96	59749	17	382	100	P04040	Cb	Eo	Pp	
468	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	5,3	102000	5,34	117835	21	200	100	P22314	Cb			
477	Cellular nucleic acid-binding protein	5,7	26000	8,00	19463	8	210	100	P62993	Cb	Sd	Sh	
479	Fructose-bisphosphate aldolase A	8,1	41000	8,10	39415	11	135	100	P04075	Cb	Ey	Pp	
524	Leukotriene A-4 hydrolase	5,8	70000	5,80	69285	21	391	100	P09960	Cb	Eh	Pm	
534	Heat shock 70 kDa protein 1	5,3	70000	5,27	70043	13	224	100	P08107	Cb	Tc		
542	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,1	61000	5,51	61047	17	440	100	P10809	Cb	Pp		
558	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	6,9	75000	6,19	69835	21	351	100	P12956	Cb			
559	Fructose-bisphosphate aldolase A	7,8	40000	8,10	39415	12	268	100	P04075	Cb	Ey	Pp	
562	Casein kinase II subunit alpha	7,5	41000	7,50	45138	19	375	100	P68400	Cb	Et	Ki	
571	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	7,9	61000	7,96	57937	13	271	100	P14618	Cb	Et		
581	Cell division control protein 2 homolog	8,8	30000	8,38	34095	8	229	100	P06493	Cb	Et	Ki	Km
589	Interleukin enhancer-binding factor 3	9,4	105000	8,86	95338	16	114	100	Q12906	Cb			
602	Peroxiredoxin-2	5,3	23000	5,53	21889	2	81	99,89	P32119	Cb	Eo	Pp	
612	Annexin A2	8,3	38000	7,74	38599	18	348	100	P07355	Cb	Pp	Up	
630	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	8,0	62000	7,96	57937	14	85	99,95	P14618	Cb	Et		
631	Septin-2	6,2	42000	6,13	41482	10	311	100	Q15019	Cb			
645	Heat shock cognate 71 kDa protein	5,2	75000	5,37	70898	19	355	100	P11142	Cb			
677	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	6,6	76000	6,19	69835	6	122	100	P12956	Cb			
685	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6,9	36000	7,13	36422	4	101	100	P40925	Cb	Eo		
686	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	10,0	110000	9,20	113070	5	148	100	P09874	Cb	Et		
709	14-3-3 protein epsilon	4,2	29000	4,37	29170	8	131	100	P62258	Cb			
717	Glutathione S-transferase P	5,8	24000	5,23	23353	7	234	100	P09211	Cb	Et		
723	L-lactate dehydrogenase A chain	9,5	35000	8,44	36689	10	284	100	P00338	Cb	Eo		
727	DNA replication licensing factor MCM7	6,3	87000	6,08	81308	20	463	100	P33993	Cb			
740	Glutathione reductase, mitochondrial	7,9	55000	8,74	56257	6	129	100	P00390	Cb	Eo		
764	Nucleoside diphosphate kinase A	5,7	19000	5,83	17149	9	278	100	P15531	Cb	Et	Pp	
768	Calreticulin	3,8	68000	3,99	48135	6	212	100	P27797	Cb	Pp		
778	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	9,2	62000	7,96	57937	11	91,9	99,99	P14618	Cb	Et		
787	Alpha-enolase	7,2	50000	7,01	47169	13	235	100	P06733	Cb	Ey		
815	Annexin A1	6,5	38000	6,62	38709	16	394	100	P04083	Cb	Tc		
823	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,0	60000	5,51	61047	15	585	100	P10809	Cb	Pp		
830	Heat shock cognate 71 kDa protein	5,1	71000	5,37	70898	17	329	100	P11142	Cb			
838	Alpha-enolase	6,8	47000	7,01	47169	14	387	100	P06733	Cb	Ey		
843	L-lactate dehydrogenase A chain	9,2	36000	8,44	36689	14	249	100	P00338	Cb	Eo		
845	Triosephosphate isomerase	6,8	26000	6,45	26669	16	504	100	P60174	Cb	Ei		
850	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	8,5	60000	7,96	57937	14	95,3	100	P14618	Cb	Et		
Candidate cardiovascular disease genes (Cc)													
240	Gamma-enolase	4,5	47000	4,66	47263	11	349	100	P09104	Cb	Cc	Ey	Pp
249	Creatine kinase B-type	5,3	41000	5,17	42639	10	149	100	P12277	Cb	Cc	Et	Pp
380	Phosphoglycerate mutase 1	6,3	28000	6,77	28800	9	201	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
543	Phosphoglycerate mutase 1	7,1	28000	6,77	28800	7	140	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
700	Beta-enolase	7,7	47000	7,58	46932	3	91,9	99,99	P13929	Cc	Ey		
824	Phosphoglycerate mutase 1	6,7	28000	6,77	28800	9	180	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
Mutated genes in cancer (Cm)													
97	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	9,4	60000	9,31	54225	13	94,5	99,99	Q15233	Cm			
306	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	9,8	38000	8,97	37430	14	377	100	P22626	Cm			
387	Ribosome maturation protein SBDS	9,9	27000	9,01	28760	8	75,5	99,59	Q9Y3A5	Cm			
392	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	5,5	28000	5,48	25566	4	242	100	P68402	Cm	Eh	Pp	
403	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	10,1	60000	9,31	54225	10	99,9	100	Q15233	Cm			
404	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	10,1	100000	9,45	76149	11	97,1	100	P23246	Cm			
432	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	6,7	76000	6,42	76706	14	228	100	P49915	Cm	El		
532	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	6,7	70000	6,26	64608	19	512	100	P31939	Cm	Eh	Et	
551	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	6,7	75000	6,42	76706	25	445	100	P49915	Cm	El		
574	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	10,2	38000	8,97	37430	15	405	100	P22626	Cm			
610	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	9,8	60000	9,31	54225	13	93,4	99,99	Q15233	Cm			
614	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	8,0	37000	8,97	37430	10	376	100	P22626	Cm			
675	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	9,3	38000	8,97	37430	15	431	100	P22626	Cm			
783	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	6,4	70000	6,26	64608	18	439	100	P31939	Cm	Eh	Et	

Spot Nr.	Protein Name	exp. pl	exp. MW	theor. pl	theor. MW	Anzahl Peptide	Protein-Score	Score C.I. %	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
799	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	8,8	36000	8,97	37430	8	136	100	P22626	Cm			
819	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	8,8	38000	8,97	37430	8	164	100	P22626	Cm			
826	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	10,0	60000	9,31	54225	10	99,4	100	Q15233	Cm			
Enzymes													
Hydrolases (Eh)													
23	Proteasome subunit beta type-1	8,9	26000	8,16	26486	3	144	100	P20618	Eh	Pt		
29	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	5,6	38000	5,75	37182	14	389	100	P62140	Eh			
36	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	6,1	38000	6,12	36984	9	151	100	P36873	Eh			
112	Thimet oligopeptidase	5,8	80000	5,63	78830	17	229	100	P52888	Eh	Pm		
123	Proteasome subunit alpha type-5	4,2	27000	4,51	26408	11	160	100	P28066	Eh	Pt		
125	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	5,7	39000	5,75	37182	6	111	100	P62140	Eh			
164	Neutral alpha-glucosidase AB	5,9	105000	5,74	106874	16	254	100	Q14697	Eh			
184	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	7,2	100000	6,92	101547	29	464	100	P11586	Eh	El	Eo	
186	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	6,0	37000	6,05	34573	10	228	100	O00487	Eh	Pm		
233	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	6,6	23000	6,29	20506	7	153	100	Q9UBQ0	Eh			
260	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	5,8	38000	5,88	37508	19	471	100	P62136	Eh			
295	Methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase	7,6	37000	8,96	37890	13	292	100	P13995	Eh	Eo		
315	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	5,8	38000	5,75	37182	7	116	100	P62140	Eh			
319	Serine/threonine-protein phosphatase 5	5,9	60000	5,83	56872	13	195	100	P53041	Eh			
380	Phosphoglycerate mutase 1	6,3	28000	6,77	28800	9	201	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
392	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	5,5	28000	5,48	25566	4	242	100	P68402	Cm	Eh	Pp	
429	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	6,5	28000	6,35	25731	8	190	100	Q15102	Eh	Pp		
447	Neutral alpha-glucosidase AB	5,7	98000	5,74	106874	16	282	100	Q14697	Eh			
449	Proteasome subunit beta type-4	5,4	26000	5,57	29201	19	132	100	P28070	Eh	Pt		
456	Inorganic pyrophosphatase	5,4	36000	5,40	32656	8	147	100	Q15181	Eh			
462	Neutral alpha-glucosidase AB	5,8	100000	5,74	106874	19	317	100	Q14697	Eh			
506	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4,7	53000	5,06	56553	21	481	100	P06576	Eh	Pp		
514	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	7,4	100000	6,92	101547	24	382	100	P11586	Eh	El	Eo	
524	Leukotriene A-4 hydrolase	5,8	70000	5,80	69285	21	391	100	O99960	Cb	Eh	Pm	
532	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	6,7	70000	6,26	64608	19	512	100	P31939	Cm	Eh	Et	
543	Phosphoglycerate mutase 1	7,1	28000	6,77	28800	7	140	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
584	Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	6,8	44000	6,73	42901	3	87,2	99,97	Q9H0C8	Eh			
588	Liver carboxylesterase 1	6,2	62000	6,15	62521	10	98,5	100	P23141	Eh			
593	Neutral alpha-glucosidase AB	5,7	100000	5,74	106874	25	329	100	Q14697	Eh			
636	Proteasome subunit alpha type-1	6,3	29000	6,15	29556	4	212	100	P25786	Eh	Pt		
642	Proteasome subunit alpha type-6	6,4	27000	6,36	27396	9	249	100	P60900	Eh	Pp	Pt	
667	Liver carboxylesterase 1	6,3	62000	6,15	62521	10	108	100	P23141	Eh			
710	Proteasome subunit beta type-2	6,6	23000	6,39	22834	6	460	100	P49721	Eh	Pt		
750	Proteasome subunit alpha type-4	7,7	28000	7,69	29480	6	185	100	P25789	Eh	Pt		
783	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	6,4	70000	6,26	64608	18	439	100	P31939	Cm	Eh	Et	
808	Proteasome subunit alpha type-7	9,5	27000	8,60	27887	9	173	100	O14818	Eh	Pt		
824	Phosphoglycerate mutase 1	6,7	28000	6,77	28800	9	180	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
Isomerase (Ei)													
55	Protein disulfide-isomerase A3	5,4	58000	5,92	56775	14	293	100	P30101	Ei			
213	Inositol-3-phosphate synthase 1	5,4	69000	5,52	61068	9	161	100	Q9NPH2	Ei			
225	Glucose-6-phosphate isomerase	9,4	59000	8,41	63140	11	113	100	P06744	Cb	Ei		
229	FK506-binding protein 4	5,2	59000	5,16	51798	17	225	100	Q02790	Ei			
236	Protein disulfide-isomerase A6	4,8	49000	4,95	48121	5	150	100	Q15084	Ei			
334	Protein disulfide-isomerase A3	5,6	60000	5,92	56775	18	248	100	P30101	Ei			
380	Phosphoglycerate mutase 1	6,3	28000	6,77	28800	9	201	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
442	Glucose-6-phosphate isomerase	9,2	59000	8,41	63140	11	112	100	P06744	Cb	Ei		
543	Phosphoglycerate mutase 1	7,1	28000	6,77	28800	7	140	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
570	FK506-binding protein 4	5,3	58000	5,16	51798	20	275	100	Q02790	Ei			
604	40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	7,0	42000	6,84	40759	9	162	100	Q08752	Ei			
724	Protein disulfide-isomerase A3	5,6	59000	5,92	56775	17	390	100	P30101	Ei			
728	Aldose 1-epimerase	6,3	39000	6,18	37761	7	233	100	Q96C23	Ei			
781	FK506-binding protein 3	10,2	28000	9,73	25174	10	148	100	Q00688	Ei			
824	Phosphoglycerate mutase 1	6,7	28000	6,77	28800	9	180	100	P18669	Cc	Eh	Ei	
827	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	10,1	19000	9,85	23740	11	274	100	P23284	Ei			
845	Triosephosphate isomerase	6,8	26000	6,45	26669	16	504	100	P60174	Cb	Ei		
Ligase (Ei)													
61	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	6,4	110000	6,26	107767	7	72,3	99,15	P22102	Ei	Et		
113	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	6,3	110000	6,26	107767	16	278	100	P22102	Ei	Et		
162	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	5,8	80000	6,26	107767	12	169	100	P22102	Ei	Et		
163	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T	7,8	25000	7,99	22518	9	195	100	Q9NPD8	Ei			
184	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	7,2	100000	6,92	101547	29	464	100	P11586	Eh	El	Eo	
200	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	6,5	105000	6,26	107767	16	276	100	P22102	Ei	Et		
201	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	6,6	105000	6,26	107767	22	384	100	P22102	Ei	Et		
210	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	6,7	62000	7,58	61333	7	168	100	Q9HCC0	Ei			
227	Glutathione synthetase	5,4	50000	5,55	52378	13	483	100	P48637	Ei	Pp		
359	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	6,0	80000	6,26	107767	16	250	100	P22102	Ei	Et		
390	Lysyl-tRNA synthetase	6,0	79000	5,90	68040	13	177	100	Q15046	Ei			
409	Aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial	7,3	75000	8,00	73554	15	196	100	Q6PI48	Ei			
416	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	5,9	58000	5,76	53159	12	161	100	P23381	Ei			
431	Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic	5,9	62000	5,99	58770	9	145	100	P49591	Ei			
432	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	6,7	76000	6,42	76706	14	228	100	P49915	Cm	Ei		
466	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	6,9	64000	6,63	59136	12	144	100	P54577	Ei			
483	Multifunctional protein ADE2	6,9	44000	7,01	47073	8	97,6	100	P22234	Ei	Ey		
514	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	7,4	100000	6,92	101547	24	382	100	P11586	Eh	El	Eo	
515	Aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial	6,4	58000	8,00	73554	19	375	100	Q6PI48	Ei			
551	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	6,7	75000	6,42	76706	25	445	100	P49915	Cm	Ei		
567	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	6,9	74000	6,39	66122	7	220	100	Q9NSD9	Ei			
672	Glycyl-tRNA synthetase	5,9	80000	6,61	83130	17	379	100	P41250	Ei			
716	Multifunctional protein ADE2	7,0	44000	7,01	47073	13	231	100	P22234	Ei	Ey		
733	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	6,8	130000	7,01	170584	21	123	100	P07814	Ei			
Oxidoreductases (Eo)													
88	Flavin reductase	7,5	24000	7,39	22117	4	244	100	P30043	Eo			
102	UDP-glucose 6-dehydrogenase	7,2	60000	6,77	55017	14	202	100	O60701	Eo			
122	Flavoprotein subunit of complex II	6,2	75000	7,06	72692	20	447	100	P31040	Eo			

Spot Nr.	Protein Name	exp. pI	exp. MW	theor. pI	theor. MW	Anzahl Peptide	Protein-Score	Score C.I. %	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
153	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	6,5	105000	6,39	115922	15	81,6	99,9	Q02218	Eo			
160	Iso citrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	8,1	39000	8,64	42184	13	102	100	O43837	Eo			
161	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	9,9	80000	9,09	79677	8	114	100	P51659	Eo	Ey		
184	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	7,2	100000	6,92	101547	29	464	100	P11586	Eh	El		Eo
263	L-lactate dehydrogenase A chain	9,3	31000	8,44	36689	12	147	100	P00338	Cb	Eo		Eo
295	Methylen tetrahydrofolate cyclohydrolase	7,6	37000	8,96	37890	13	292	100	P13995	Eh	Eo		
326	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	6,1	61000	7,16	70756	10	93,2	99,99	Q16881	Cb	Eo		
345	Biliverdin reductase A	6,1	38000	6,02	33424	15	377	100	P53004	Eo			
349	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	5,7	52000	5,69	53802	5	141	100	P49189	Eo			
358	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	6,4	100000	6,39	115922	24	243	100	Q02218	Eo			
367	Flavoprotein subunit of complex II	6,5	74000	7,06	72692	10	223	100	P31040	Eo			
388	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	7,9	50000	8,51	50817	17	173	100	P49821	Eo			
414	Flavoprotein subunit of complex II	6,3	74000	7,06	72692	20	446	100	P31040	Eo			
453	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	5,6	52000	5,69	53802	10	176	100	P49189	Eo			
463	Catalase	7,1	62000	6,96	59749	17	382	100	P04040	Cb	Eo		Pp
474	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	9,8	32000	9,65	36063	12	303	100	Q16698	Eo			
482	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	7,7	24000	8,17	22108	12	309	100	Q06830	Eo			
490	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	7,0	89000	6,77	90059	19	156	100	P23921	Eo			
501	L-lactate dehydrogenase B chain	5,5	35000	5,62	36634	9	225	100	P07195	Eo	Pp		
514	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	7,4	100000	6,92	101547	24	382	100	P11586	Eh	El		Eo
526	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	6,7	53000	6,44	55360	11	153	100	P10410	Eo			
Spot Nr.	Protein Name	exp. pI	exp. MW	theor. pI	theor. MW	Anzahl Peptide	Protein-Score	Score C.I. %	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
828	Elongation factor 2 kinase	6,7	95000	4,95	82134	26	409	100	O00418	Et	Ka		Ki
844	Phosphoglycerate kinase 2	9,2	42000	8,71	44791	4	169	100	P07205	Et			
850	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	8,5	60000	7,96	57937	14	95,3	100	P14618	Cb	Et		
Lyases (Ey)													
161	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	9,9	80000	9,09	79677	8	114	100	P51659	Eo	Ey		
203	Fructose-bisphosphate aldolase A	8,4	40000	8,10	39415	9	93,8	99,99	P04075	Cb	Ey		Pp
214	Uroporphyrinogen decarboxylase	5,6	39000	5,70	40782	12	178	100	P06132	Ey			Pp
240	Gamma-enolase	4,5	47000	4,66	47263	11	349	100	P09104	Cb	Cc	Ey	Pp
259	Alpha-enolase	5,8	47000	7,01	47169	7	116	100	P06733	Cb	Ey		
419	Aconitate hydratase, mitochondrial	7,4	87000	7,36	85415	21	337	100	Q99798	Ey			
479	Fructose-bisphosphate aldolase A	8,1	41000	8,10	39415	11	135	100	P04075	Cb	Ey		Pp
483	Multifunctional protein ADE2	6,9	44000	7,01	47073	8	97,6	100	P22234	El	Ey		
508	Uridine 5'-monophosphate synthase	6,9	51000	6,81	52222	15	265	100	P11172	Et	Ey		
530	Cystathionine beta-synthase	6,5	67000	6,20	60587	16	267	100	P35520	Ey			
559	Fructose-bisphosphate aldolase A	7,8	40000	8,10	39415	12	268	100	P04075	Cb	Ey		Pp
700	Beta-enolase	7,7	47000	7,58	46932	3	91,9	99,99	P13929	Cc	Ey		
716	Multifunctional protein ADE2	7,0	44000	7,01	47073	13	231	100	P22234	El	Ey		
780	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	10,0	77000	9,37	82990	18	392	100	P40939	Eo	Ey		Pp
787	Alpha-enolase	7,2	50000	7,01	47169	13	235	100	P06733	Cb	Ey		
838	Alpha-enolase	6,8	47000	7,01	47169	14	387	100	P06733	Cb	Ey		
Kinases (Ki)													
562	Casein kinase II subunit alpha	7,5	41000	7,50	45138	19	375	100	P68400	Cb	Et		Ki
Atypical kinases (Ka)													
756	Elongation factor 2 kinase	6,9	96000	4,95	82134	9	134	100	O00418	Et	Ka		Ki
776	Elongation factor 2 kinase	7,2	92000	4,95	82134	21	331	100	O00418	Et	Ka		Ki
816	Elongation factor 2 kinase	7,0	92000	4,95	82134	17	330	100	O00418	Et	Ka		Ki
828	Elongation factor 2 kinase	6,7	95000	4,95	82134	26	409	100	O00418	Et	Ka		Ki
TKL Ser/Thr protein kinases (Kl)													
205	Integrin-linked protein kinase	9,4	49000	8,07	51413	7	89,5	99,98	Q13418	Cb	Et		Ki Kl
CMGC Ser/Thr protein kinases (Km)													
581	Cell division control protein 2 homolog	8,8	30000	8,38	34095	8	229	100	P06493	Cb	Et		Ki Km
Peptidases													
Cysteine-type peptidases (Pc)													
731	Protein DJ-1	6,0	24000	6,36	19889	9	419	100	Q99497	Pc			
Metallopeptidases (Pm)													
112	Thimet oligopeptidase	5,8	80000	5,63	78830	17	229	100	P52888	Eh			Pm
186	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	6,0	37000	6,05	34573	10	228	100	O00487	Eh			Pm
400	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	6,8	39000	6,29	37021	14	251	100	P51665	Pm			
407	Presequence protease, mitochondrial	6,5	112000	6,50	117455	16	266	100	Q5JRX3	Pm			
524	Leukotriene A-4 hydrolase	5,8	70000	5,80	69285	21	391	100	P09960	Cb	Eh		Pm
524	Leukotriene A-4 hydrolase	5,8	70000	5,80	69285	21	391	100	P09960	Cb	Eh		Pm
656	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	7,9	44000	8,80	48437	12	456	100	P22695	Pm			
Threonine-type peptidases (Pt)													
23	Proteasome subunit beta type-1	8,9	26000	8,16	26486	3	144	100	P20618	Eh			Pt
123	Proteasome subunit alpha type-5	4,2	27000	4,51	26408	11	160	100	P28066	Eh			Pt
449	Proteasome subunit beta type-4	5,4	26000	5,57	29201	9	132	100	P28070	Eh			Pt
636	Proteasome subunit alpha type-1	6,3	29000	6,15	29556	4	212	100	P25786	Eh			Pt
642	Proteasome subunit alpha type-6	6,4	27000	6,36	27396	9	249	100	P60900	Eh			Pt
710	Proteasome subunit beta type-2	6,6	23000	6,39	22834	6	460	100	P49721	Eh			Pt
750	Proteasome subunit alpha type-4	7,7	28000	7,69	29480	6	185	100	P25789	Eh			Pt
808	Proteasome subunit alpha type-7	9,5	27000	8,60	27887	9	173	100	O14818	Eh			Pt
Plasma proteins (Pp)													
16	Insulin-like growth factor-binding protein 2	7,3	36000	7,36	35133	3	194	100	P18065	Cb			Pp
51	Vimentin	4,2	48000	4,83	53645	11	219	100	P08670	Pp			
203	Fructose-bisphosphate aldolase A	8,4	40000	8,10	39415	9	93,8	99,99	P04075	Cb	Ey		Pp
217	Endoplasmic	4,4	100000	4,51	92457	16	198	100	P14625	Cb	Pp		
227	Glutathione synthetase	5,4	50000	5,55	52378	13	483	100	P48637	El	Pp		
240	Gamma-enolase	4,5	47000	4,66	47263	11	349	100	P09104	Cb	Cc	Ey	Pp
245	Vinculin	6,0	115000	5,50	123799	11	132	100	P18206	Pp			
249	Creatine kinase B-type	5,3	41000	5,17	42639	10	149	100	P12277	Cb	Cc	Et	Pp
281	Vinculin	5,9	105000	5,50	123799	17	249	100	P18206	Pp			
327	14-3-3 protein zeta/delta	4,2	28000	4,48	27742	12	241	100	P63104	Pp			
375	Endoplasmic	5,0	100000	4,51	92457	13	167	100	P14625	Cb	Pp		
392	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	5,5	28000	5,48	25566	4	242	100	P68402	Cm	Eh		Pp
396	Protein transport protein Sec23A	6,9	81000	6,65	86151	6	84,5	99,95	Q15436	Pp			
429	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	6,5	28000	6,35	25731	8	190	100	Q15102	Eh	Pp		
463	Catalase	7,1	62000	6,96	59749	17	382	100	P04040	Cb	Eo		Pp
472	T-complex protein 1 subunit theta	5,3	61000	5,24	59613	23	374	100	P50990	Pp			
479	Fructose-bisphosphate aldolase A	8,1	41000	8,10	39415	11	135	100	P04075	Cb	Ey		Pp
494	Elongation factor Tu, mitochondrial	6,7	45000	7,37	49536	10	240	100	P49411	Eo			
501	L-lactate dehydrogenase B chain	5,5	35000	5,62	36634	9	225	100	P07195	Eo	Pp		
506	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4,7	53000	5,06	56553	21	481	100	P06576	Eh	Pp		
538	26S protease regulatory subunit 7	5,7	46000	5,54	48628	23	303	100	P35998	Pp			
542	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,1	61000	5,51	61047	17	440	100	P10809	Cb	Pp		
559	Fructose-bisphosphate aldolase A	7,8	40000	8,10	39415	12	268	100	P04075	Cb	Ey		Pp
560	78 kDa glucose-regulated protein	4,7	78000	5,07	72333	23	454	100	P11021	Pp			
590	Vinculin	5,9	110000	5,50	123799	18	251	100	P18206	Pp			
602	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	5,3	23000	5,53	21889	2	81	99,89	P32119	Cb	Eo		Pp
612	Annexin A2	8,3	38000	7,74	38599	18	348	100	P07355	Cb	Pp		Up

Spot Nr.	Protein Name	exp. pI	exp. MW	theor. pI	theor. MW	Anzahl Peptide	Protein-Score	Score C.I. %	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
642	Proteasome subunit alpha type-6	6,4	27000	6,36	27396	9	249	100	P60900	Eh	Pp	Pt	
701	RuvB-like 1	6,2	50000	6,02	50228	18	393	100	Q9Y265	Pp			
764	Nucleoside diphosphate kinase A	5,7	19000	5,83	17149	9	278	100	P15531	Cb	Et	Pp	
767	Actin, cytoplasmic 1	5,2	43000	5,10	41732	12	359	100	P60709	Pp			
768	Calreticulin	3,8	68000	3,99	48135	6	212	100	P27797	Cb	Pp		
780	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	10,0	77000	9,37	82990	18	392	100	P40939	Eo	Ey	Pp	
792	Elongation factor Tu, mitochondrial	6,6	44000	7,37	49536	8	126	100	P49411	Pp			
814	L-lactate dehydrogenase B chain	5,6	36000	5,62	36634	10	151	100	P07195	Eo	Pp		
823	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,0	60000	5,51	61047	15	585	100	P10809	Cb	Pp		
842	Actin, cytoplasmic 1	5,0	42000	5,10	41732	9	331	100	P60709	Pp			
SH3-domain containing proteins (Sd)													
477	Cellular nucleic acid-binding protein	5,7	26000	8,00	19463	8	210	100	P62993	Cb	Sd	Sh	
SH2-domain containing proteins (Sh)													
477	Cellular nucleic acid-binding protein	5,7	26000	8,00	19463	8	210	100	P62993	Cb	Sd	Sh	
Transcription factors (Tf)													
28	Cold shock domain-containing protein E1	5,9	90000	5,88	88885	13	108	100	O75534	Tf			
116	Cold shock domain-containing protein E1	5,8	90000	5,88	88885	12	96,6	100	O75534	Tf			
228	Cold shock domain-containing protein E1	5,9	92000	5,88	88885	11	92,6	99,99	O75534	Tf			
Transporters													
Transporter channels and pores (Tc)													
137	Heat shock 70 kDa protein 1	5,4	74000	5,27	70043	21	287	100	P08107	Cb	Tc		
198	Chloride intracellular channel protein 1	4,9	29000	4,86	26919	8	215	100	O00299	Cb	Tc		
534	Heat shock 70 kDa protein 1	5,3	70000	5,27	70043	13	224	100	P08107	Cb	Tc		
815	Annexin A1	6,5	38000	6,62	38709	16	394	100	P04083	Cb	Tc		
Primary Active Transporters (Tp)													
46	Nuclear protein localization protein 4 homolog	6,1	75000	5,94	68120	13	231	100	Q8TAT6	Tp			
83	V-type proton ATPase subunit E 1	7,4	33000	8,11	26142	8	79,7	99,85	P36543	Tp			
406	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	5,0	95000	4,90	89311	23	283	100	P55072	Tp			
527	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	6,5	39000	6,27	34500	8	161	100	Q92890	Tp			
UniProt - no evidence at protein level (Up)													
299	Elongation factor 1-alpha 1	9,9	46000	9,34	50135	6	172	100	P68104	Up			
452	High mobility group protein B1	6,2	28000	5,42	24891	11	186	100	P09429	Up			
612	Annexin A2	8,3	38000	7,74	38599	18	348	100	P07355	Cb	Pp	Up	
856	Elongation factor 1-alpha 1	10,3	47000	9,34	50135	4	113	100	P68104	Up			
Keine Klasse in Proteinatlas													
32	EH domain-containing protein 1	6,6	65000	6,35	60620	8	99,2	100	Q9H4M9	-			
33	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	7,4	110000	5,76	90584	4	99,5	100	Q00839	-			
42	TAR DNA-binding protein 43	5,5	45000	5,85	44740	2	165	100	Q13148	-			
63	Radixin	6,2	78000	5,96	68556	9	179	100	P35241	-			
77	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	8,4	48000	8,07	45395	10	208	100	Q6YN16	-			
78	Endoplasmic reticulum protein ERp29	5,6	28000	7,11	28990	10	74,4	99,47	P30040	-			
101	Mitochondrial inner membrane protein	5,8	90000	6,08	83678	14	140	100	Q16891	-			
104	EBNA-2 co-activator variant	7,5	110000	7,36	107433	13	118	100	Q59FF0	-			
106	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	7,5	110000	5,76	90584	4	144	100	Q00839	-			
111	Far upstream element-binding protein 3	9,8	68000	8,60	61640	15	189	100	Q96124	-			
120	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	7,4	70000	8,24	64125	12	104	100	P14866	-			
121	EH domain-containing protein 1	6,7	72000	6,35	60620	12	266	100	Q9H4M9	-			
127	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	7,2	108000	6,75	101985	13	124	100	Q7KZF4	-			
128	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	8,4	40000	4,95	33670	4	71,6	99	P07910	-			
131	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	8,8	82000	8,21	70934	18	188	100	O43390	-			
133	Nucleoporin p54	6,7	63000	6,53	55435	14	167	100	Q7Z3B4	-			
143	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	7,9	72000	8,68	69603	14	147	100	O60506	-			
146	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	8,0	115000	5,76	90584	9	207	100	Q00839	-			
147	DnaJ homolog subfamily C member 7	6,5	62000	6,56	56434	11	183	100	Q99615	-			
151	Serpin H1	9,1	45000	8,96	46435	7	134	100	P50454	-			
166	Electron transfer flavoprotein subunit beta	8,9	28000	8,25	27844	8	101	100	P38117	-			
178	DnaJ homolog subfamily C member 11	9,4	68000	8,54	63278	14	226	100	Q9NVH1	-			
179	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	8,3	44000	7,61	38434	10	105	100	Q14103	-			
183	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	6,1	80000	6,77	73234	17	295	100	O00571	-			
185	Far upstream element-binding protein 1	7,8	76000	7,18	67560	12	123	100	Q96AE4	-			
187	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	9,4	77000	8,84	77516	20	296	100	P52272	-			
188	Exosome complex exonuclease RRP4	7,2	32000	7,26	32785	13	99,7	100	Q13868	-			
196	Putative deoxyribonuclease TARDN1	6,6	33000	6,51	33602	15	135	100	Q6P1N9	-			
199	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	6,2	36000	6,41	31540	10	130	100	P48739	-			
202	Proteasome activator complex subunit 3	5,5	32000	5,69	29506	12	143	100	P61289	-			
206	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	8,9	28000	8,84	28412	6	233	100	P09661	-			
207	Protein NipSnap homolog 3A	9,2	25000	9,43	28463	7	289	100	Q9UFN0	-			
209	ES1 protein homolog, mitochondrial	7,0	25000	8,50	28170	7	299	100	P30042	-			
212	Elongation factor 1-beta	4,1	28000	4,21	24761	4	170	100	P24534	-			
218	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	9,5	75000	8,82	72371	13	84,2	99,95	Q92841	-			
220	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9,2	29000	9,26	38846	8	151	100	P09651	-			
221	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,0	69000	5,39	50976	15	190	100	P61978	-			
224	ATP-dependent RNA helicase A	6,6	120000	6,39	140942	11	95,5	100	Q08211	-			
226	Vigilin	7,9	130000	6,42	141439	11	82,1	99,91	Q00341	-			
230	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	8,2	87000	8,21	70934	17	193	100	O43390	-			
232	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	7,9	74000	8,68	69603	14	164	100	O60506	-			
235	Far upstream element-binding protein 1	7,0	76000	7,18	67560	16	191	100	Q96AE4	-			
237	ATP-binding cassette sub-family E member 1	9,8	68000	8,40	67306	16	259	100	P61221	-			
239	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	6,7	110000	5,76	90584	4	98,7	100	Q00839	-			
242	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	9,4	78000	8,68	69603	14	160	100	O60506	-			
246	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5,1	47000	5,84	49223	6	138	100	P31943	-			
251	Structural maintenance of chromosomes protein 2	9,2	125000	8,54	135656	20	78,7	99,8	O95347	-			

Spot Nr.	Protein Name	exp. pl	exp. MW	theor. pl	theor. MW	Anzahl Peptide	Protein-Score	Score C.I. %	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
252	MACRO domain-containing protein 1	9,7	26000	9,85	35501	8	133	100	Q9BQ69	-	-	-	-
254	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	7,7	100000	5,76	90584	9	400	100	Q00839	-	-	-	-
258	Stress-70 protein, mitochondrial	5,4	75000	5,76	73671	11	210	100	P38646	-	-	-	-
261	ATP synthase subunit b, mitochondrial	9,8	24000	9,66	28905	8	166	100	P24539	-	-	-	-
264	Protein RCC2	7,6	60000	8,92	56078	14	336	100	Q9P258	-	-	-	-
268	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	7,5	74000	6,99	68130	15	257	100	P27694	-	-	-	-
270	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	7,7	75000	8,24	64125	14	216	100	P14866	-	-	-	-
271	Poly(rC)-binding protein 2	6,4	29000	6,34	38575	7	115	100	Q15366	-	-	-	-
272	Vigilin	8,0	130000	6,42	141439	17	166	100	Q00341	-	-	-	-
275	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	8,1	110000	5,76	90584	9	332	100	Q00839	-	-	-	-
277	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B'	5,9	39000	5,63	40668	10	160	100	Q15257	-	-	-	-
282	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	9,7	79000	8,82	72371	17	153	100	Q92841	-	-	-	-
283	Eukaryotic translation initiation factor 6	4,1	27000	4,30	26596	9	196	100	P56537	-	-	-	-
284	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	7,6	53000	7,60	52898	11	113	100	O00232	-	-	-	-
285	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	7,7	36000	7,50	31567	7	249	100	P45880	-	-	-	-
286	Erlin-2	5,4	40000	5,47	37840	11	123	100	O94905	-	-	-	-
289	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	6,9	31000	8,47	35075	9	192	100	P13804	-	-	-	-
293	Translationally-controlled tumor protein	4,5	24000	4,60	19593	12	169	100	P13693	-	-	-	-
297	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	7,0	31000	6,95	34329	12	332	100	O15144	-	-	-	-
300	Nitrilase homolog 2	6,6	31000	6,99	30604	11	413	100	Q9NQR4	-	-	-	-
301	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	8,4	88000	8,21	70934	15	166	100	O43390	-	-	-	-
302	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	6,8	83000	7,56	75492	16	315	100	P42166	-	-	-	-
303	T-complex protein 1 subunit alpha	6,0	68000	5,69	60336	16	171	100	P17987	-	-	-	-
305	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	8,2	110000	5,76	90584	9	403	100	Q00839	-	-	-	-
308	Nuclear receptor coactivator 5	9,9	69000	9,62	65536	7	84,2	99,95	Q9HCD5	-	-	-	-
310	Far upstream element-binding protein 1	6,8	78000	7,18	67560	16	148	100	Q96AE4	-	-	-	-
311	4'-phosphopantetheinyl transferase	5,9	38000	6,36	35772	7	155	100	Q9NRR7	-	-	-	-
313	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,1	69000	5,39	50976	17	210	100	P61978	-	-	-	-
316	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	5,5	40000	5,53	42918	12	307	100	Q9UNM6	-	-	-	-
318	Serp1 H1	9,4	45000	8,96	46435	14	464	100	P50454	-	-	-	-
321	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	9,6	80000	8,82	72371	15	136	100	Q92841	-	-	-	-
323	Polypyrimidine tract-binding protein 1	10,1	55000	9,22	57221	14	373	100	P26599	-	-	-	-
328	Structural maintenance of chromosomes protein 2	9,3	115000	8,54	135656	14	212	100	O95347	-	-	-	-
331	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	9,7	40000	9,10	39595	12	347	100	P51991	-	-	-	-
332	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	10,1	74000	8,99	63705	9	156	100	O00425	-	-	-	-
333	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5,6	53000	5,84	49223	9	329	100	P31943	-	-	-	-
336	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	5,3	38000	5,23	36497	12	293	100	Q13347	-	-	-	-
337	Far upstream element-binding protein 2	6,7	90000	6,84	73146	12	142	100	Q92945	-	-	-	-
338	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	7,8	74000	9,04	66901	15	384	100	O95831	-	-	-	-
339	Structural maintenance of chromosomes protein 4	6,4	130000	6,37	147182	14	76,6	99,68	Q9NTJ3	-	-	-	-
341	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3	6,2	36000	5,88	34835	4	72,3	99,15	P21108	-	-	-	-
342	Transcription intermediary factor 1-beta	5,4	108000	5,52	88550	12	273	100	Q13263	-	-	-	-
343	Proteasome activator complex subunit 1	5,5	29000	5,66	28720	14	95	100	Q06323	-	-	-	-
351	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Pp4	7,4	63000	7,05	58449	16	113	100	O43172	-	-	-	-
352	Radixin	6,4	85000	5,96	68556	15	350	100	P35241	-	-	-	-
361	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	8,0	69000	8,92	70390	24	559	100	P49748	-	-	-	-
366	Programmed cell death 6-interacting protein	6,3	98000	6,13	96023	17	327	100	Q8WUM4	-	-	-	-
368	Sec1 family domain-containing protein 1	6,0	75000	5,81	72371	14	189	100	Q8WVM8	-	-	-	-
373	Rab GDP dissociation inhibitor beta	6,4	59000	6,11	50663	23	324	100	P50395	-	-	-	-
378	Vigilin	8,2	130000	6,42	141439	15	157	100	Q00341	-	-	-	-
379	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5,9	49000	5,84	49223	10	292	100	P31943	-	-	-	-
381	Cytochrome oxidase assembly factor PE112 homolog	7,6	59000	8,77	61856	11	197	100	O75879	-	-	-	-
383	Proline synthetase co-transcribed bacterial homolog protein	7,0	29000	7,26	30340	9	158	100	O94903	-	-	-	-
389	Kinesin-1 heavy chain	6,2	115000	6,07	109671	20	189	100	P33176	-	-	-	-
402	Vigilin	8,1	120000	6,42	141439	17	193	100	Q00341	-	-	-	-
405	Mitochondrial inner membrane protein	5,8	88000	6,08	83678	15	177	100	Q16891	-	-	-	-
408	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	7,1	105000	6,75	101985	20	217	100	Q7KZF4	-	-	-	-
411	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	4,8	28000	4,77	23204	7	181	100	P52565	-	-	-	-
412	GTP-binding protein SAR1a	6,2	24000	6,23	22364	12	395	100	Q9NRR3	-	-	-	-
415	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	7,7	34000	7,50	31567	10	284	100	P45880	-	-	-	-
427	Nucleosome assembly protein 1-like 1	3,8	62000	4,09	45368	7	87,7	99,98	P55209	-	-	-	-
428	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	9,5	75000	8,84	77516	21	357	100	P52272	-	-	-	-
430	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9,8	39000	9,26	38846	13	351	100	P09651	-	-	-	-
437	ATP-dependent RNA helicase A	5,9	125000	6,39	140942	25	298	100	Q08211	-	-	-	-
438	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	6,5	38000	6,75	39584	10	236	100	O43488	-	-	-	-
440	Eukaryotic initiation factor 4A-I	5,2	45000	5,10	46148	13	217	100	P60842	-	-	-	-
446	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	5,5	122000	5,71	157886	20	252	100	P42704	-	-	-	-
454	High mobility group protein B2	9,1	27000	7,84	24031	7	74,1	99,44	P26583	-	-	-	-
455	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	6,8	38000	6,37	36926	9	196	100	P31942	-	-	-	-
458	BAG family molecular chaperone regulator 2	6,3	24000	6,25	23769	10	77,6	99,75	O95816	-	-	-	-
471	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	6,9	38000	8,21	36225	10	85,8	99,96	Q99729	-	-	-	-
473	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	9,3	21000	8,66	20463	6	152	100	Q9Y221	-	-	-	-
478	Nuclear migration protein nudC	5,2	44000	5,06	38238	7	187	100	Q9Y266	-	-	-	-
484	F-actin-capping protein subunit beta	5,4	32000	5,36	31350	9	80,8	99,88	P47756	-	-	-	-
486	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	7,2	44000	7,61	38434	12	74,5	99,49	Q14103	-	-	-	-
491	DNA replication licensing factor MCM4	6,2	100000	6,27	96546	8	91,6	99,99	P33991	-	-	-	-
492	U2 small nuclear ribonucleoprotein A''	9,4	28000	8,84	28412	8	84	99,94	P09661	-	-	-	-
496	Cellular nucleic acid-binding protein	9,8	21000	8,00	19463	6	205	100	P62633	-	-	-	-
498	DnaJ homolog subfamily B member 1	9,6	39000	8,84	38039	13	254	100	P25685	-	-	-	-
509	Radixin	6,3	82000	5,96	68556	8	175	100	P35241	-	-	-	-
511	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	6,5	40000	8,21	36225	9	95,2	100	Q99729	-	-	-	-
512	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	9,6	25000	9,04	26224	17	346	100	O43809	-	-	-	-
517	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	7,1	30000	6,95	34329	16	551	100	O15144	-	-	-	-
520	Dihydropyrimidinase-related protein 2	5,8	75000	5,91	62286	13	169	100	Q16555	-	-	-	-
522	Far upstream element-binding protein 2	6,8	86000	6,84	73146	16	372	100	Q92945	-	-	-	-
536	Adenylyl cyclase-associated protein 1	7,3	55000	8,27	51855	10	347	100	Q01518	-	-	-	-
539	60S acidic ribosomal protein P0-like	5,4	37000	5,20	34360	7	140	100	Q8NHW5	-	-	-	-
540	DNA replication licensing factor MCM4	6,4	98000	6,27	96546	22	290	100	P33991	-	-	-	-
544	Alpha-centractin	6,4	44000	6,18	42609	14	286	100	P61163	-	-	-	-
546	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	7,5	70000	8,68	69603	17	189	100	O60506	-	-	-	-
548	ATP-dependent RNA helicase A	6,0	120000	6,39	140942	20	303	100	Q08211	-	-	-	-
549	28S ribosomal protein S23, mitochondrial	9,7	23000	9,18	21768	7	104	100	Q9Y3D9	-	-	-	-
552	T-complex protein 1 subunit beta	6,3	55000	5,98	57481	16	152	100	P78371	-	-	-	-
555	Structural maintenance of chromosomes protein 2	9,4	120000	8,54	135656	20	232	100	O95347	-	-	-	-
556	GTP-binding nuclear protein Ran	7,8	27000	7,25	24420	6	202	100	P62826	-	-	-	-
563	Tubulin beta chain	6,0	56000	4,53	49665	7	74	99,42	P07437	-	-	-	-
564	T-complex protein 1 subunit gamma	6,3	66000	6,05	60526	14	243	100	P49368	-	-	-	-
580	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,3	67000	5,39	50976	11	252	100	P61978	-	-	-	-

Spot Nr.	Protein Name	exp. pl	exp. MW	theor. pl	theor. MW	Anzahl Peptide	Protein-Score	Score C.I. %	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
582	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	6,4	58000	6,83	49296	9	145	100	O75351	-	-	-	-
583	Poly(rC)-binding protein 2	6,4	41000	6,34	38575	8	206	100	Q15366	-	-	-	-
586	Endoplasmic reticulum protein ERp29	6,0	28000	7,11	28990	6	80,5	99,87	P30040	-	-	-	-
587	Radixin	6,1	78000	5,96	68556	12	165	100	P35241	-	-	-	-
592	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	6,4	75000	8,27	80100	19	394	100	Q12931	-	-	-	-
595	UPF0027 protein C22orf28	7,1	57000	6,81	55203	18	356	100	Q9Y310	-	-	-	-
598	Protein RCC2	8,0	60000	8,92	56078	12	173	100	Q9P258	-	-	-	-
603	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	6,8	80000	6,77	73234	14	174	100	O00571	-	-	-	-
615	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	8,0	55000	8,66	44965	5	113	100	Q8NCS1	-	-	-	-
620	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	10,1	38000	9,10	39595	8	145	100	P51991	-	-	-	-
621	T-complex protein 1 subunit gamma	6,2	65000	6,05	60526	13	296	100	P49368	-	-	-	-
626	Radixin	6,8	80000	5,96	68556	12	278	100	P35241	-	-	-	-
627	T-complex protein 1 subunit delta	8,2	60000	7,83	57917	14	198	100	P50991	-	-	-	-
628	TAR DNA-binding protein 43	5,8	43000	5,85	44740	11	289	100	Q13148	-	-	-	-
634	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	9,8	74000	8,84	77516	14	254	100	P52272	-	-	-	-
635	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	10,2	70000	9,12	69140	12	73	99,28	P17844	-	-	-	-
637	Serp1n H1	9,3	46000	8,96	46435	11	316	100	P50454	-	-	-	-
638	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	9,8	71000	9,12	69140	18	208	100	P17844	-	-	-	-
639	ATP-dependent RNA helicase A	6,3	120000	6,39	140942	17	105	100	Q08211	-	-	-	-
640	Dihydropyrimidinase-related protein 2	5,9	69000	5,91	62286	13	152	100	Q16555	-	-	-	-
644	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	9,9	70000	9,12	69140	18	233	100	P17844	-	-	-	-
646	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	7,1	40000	6,79	37893	5	383	100	O96008	-	-	-	-
648	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	7,0	80000	6,77	73234	22	484	100	O00571	-	-	-	-
650	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	10,1	70000	9,12	69140	15	129	100	P17844	-	-	-	-
654	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	7,8	38000	8,21	36225	9	72,2	99,13	Q99729	-	-	-	-
661	DAZ-associated protein 1	9,7	44000	8,73	43383	8	264	100	Q96EP5	-	-	-	-
668	Coronin-1C	6,9	60000	6,65	53249	4	197	100	Q9ULV4	-	-	-	-
669	T-complex protein 1 subunit gamma	6,1	68000	6,05	60526	11	161	100	P49368	-	-	-	-
670	Septin-7	9,7	46000	8,76	50680	5	216	100	Q16181	-	-	-	-
674	DNA replication licensing factor MCM4	6,4	87000	6,27	96546	21	289	100	P33991	-	-	-	-
676	Leucine-rich repeat-containing protein 47	9,2	75000	8,33	63465	8	233	100	Q8N1G4	-	-	-	-
679	Polypyrimidine tract-binding protein 1	10,2	55000	9,22	57221	8	424	100	P26599	-	-	-	-
684	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	6,7	80000	6,77	73234	16	330	100	O00571	-	-	-	-
698	Polypyrimidine tract-binding protein 1	10,2	58000	9,22	57221	8	345	100	P26599	-	-	-	-
699	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9,9	39000	9,26	38846	9	259	100	P09651	-	-	-	-
703	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	9,7	75000	8,84	77516	21	323	100	P52272	-	-	-	-
706	26S protease regulatory subunit S10B	7,3	41000	7,26	44168	14	313	100	P62333	-	-	-	-
707	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	9,2	38000	9,10	39595	12	377	100	P51991	-	-	-	-
712	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5,9	54000	5,84	49223	13	223	100	P31943	-	-	-	-
718	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	10,2	68000	9,08	71369	11	191	100	Q9NVI7	-	-	-	-
732	Rab GDP dissociation inhibitor beta	6,1	48000	6,11	50663	20	378	100	P50395	-	-	-	-
738	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	10,1	40000	9,10	39595	8	356	100	P51991	-	-	-	-
747	Splicing factor 3B subunit 4	9,3	46000	8,68	44380	5	179	100	Q15427	-	-	-	-
748	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	9,9	29000	8,84	30659	6	205	100	Q9Y277	-	-	-	-
751	ATP-dependent RNA helicase DDX1	7,1	88000	6,82	82422	12	216	100	Q92499	-	-	-	-
754	Dihydropyrimidinase-related protein 2	6,3	68000	5,91	62286	11	193	100	Q16555	-	-	-	-
755	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	7,7	35000	7,50	31567	11	285	100	P45880	-	-	-	-
762	Tubulin alpha-8 chain	4,8	58000	4,71	50087	7	169	100	Q9NY65	-	-	-	-
763	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	6,5	75000	8,27	80100	14	242	100	Q12931	-	-	-	-
766	Stress-70 protein, mitochondrial	5,3	76000	5,76	73671	12	219	100	P38646	-	-	-	-
770	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	9,8	75000	8,84	77516	17	391	100	P52272	-	-	-	-
779	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	10,3	72000	9,57	63449	8	170	100	Q9NZ18	-	-	-	-
784	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	9,3	54000	8,66	44965	2	119	100	Q8NCS1	-	-	-	-
795	T-complex protein 1 subunit delta	8,8	60000	7,83	57917	14	262	100	P50991	-	-	-	-
803	T-complex protein 1 subunit alpha	5,8	66000	5,69	60336	17	257	100	P17987	-	-	-	-
804	Pre-mRNA-processing factor 19	6,3	58000	6,14	55174	9	384	100	Q9UMS4	-	-	-	-
810	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	9,4	33000	8,74	30769	10	408	100	P21796	-	-	-	-
811	T-complex protein 1 subunit beta	6,2	54000	5,98	57481	18	549	100	P78371	-	-	-	-
813	T-complex protein 1 subunit zeta-2	6,4	66000	6,65	57758	5	164	100	Q92526	-	-	-	-
818	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5,8	52000	5,84	49223	12	324	100	P31943	-	-	-	-
820	T-complex protein 1 subunit eta	7,6	58000	7,56	59359	9	244	100	Q99832	-	-	-	-
821	Poly(rC)-binding protein 1	6,9	40000	6,72	37493	9	277	100	Q15365	-	-	-	-
831	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9,9	35000	9,26	38846	12	255	100	P09651	-	-	-	-
832	Stress-induced-phosphoprotein 1	6,5	70000	6,38	62632	13	149	100	P31948	-	-	-	-
834	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	10,1	36000	9,26	38846	13	245	100	P09651	-	-	-	-
835	GTP-binding nuclear protein Ran	7,0	26000	7,25	24420	11	247	100	P62826	-	-	-	-
836	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	7,8	32000	7,59	35072	14	295	100	P63244	-	-	-	-
837	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	10,2	36000	9,26	38846	14	244	100	P09651	-	-	-	-
839	Serp1n H1	9,5	46000	8,96	46435	8	292	100	P50454	-	-	-	-
848	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	10,2	39000	9,10	39595	14	370	100	P51991	-	-	-	-
853	Elongation factor 1-gamma	6,1	45000	6,25	50119	15	224	100	P26641	-	-	-	-

Anhang II Identifizierte Proteine mit IPG 4-7

In nachfolgenden Anhang sind sämtliche mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine im pH-Bereich 4-7 aufgelistet. Die Aufzählungsnummern korrespondieren mit den in der Abbildung 15 in Kapitel 5.1.2 angegebenen Nummern. Die Spalte pI gibt den isoelektrischen Punkt, die Spalte MW das Molekulargewicht an. Die Spalte „Power“ gibt die Teststärke an. Der q-Wert gibt die erwartete falsch-positiv Rate der hier aufgelisteten Proteine an. pI-exp., pI-theor., MW-exp. Und MW-theor. geben den experimentell gefundenen bzw. den theoretischen isoelektrischen Punkt bzw. das Molekulargewicht an. Peptide gibt die Anzahl der im Massenspektrometer detektierten Peptide, Score C.I.% drückt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung des Proteins (Score) in Prozent aus. Die Abkürzungen der Klassen sind in Anhang V ersichtlich.

Spot Nr.	Protein Name	exp. pl	exp. MW	theor. pl	theor. MW	Anzahl Peptide	Protein-Score	Score C.L.%	Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
Candidate cancer biomarkers (Cb)													
17	Glutathione S-transferase P	5,10	24000	5,23	23353	5	276	100	P09211	Cb	Et		
112	Creatine kinase B-type	5,48	43000	5,17	42639	9	117	100	P12277	Cb	Cc	Et	Pp
198	Chloride intracellular channel protein 1	5,05	29000	4,86	26919	7	160	100	O00299	Cb	Tc		
224	Ezrin	6,28	80000	5,86	69404	4	150	100	P15311	Cb			
234	Replication protein A 32 kDa subunit	5,82	30000	5,75	29247	2	112	100	P15927	Cb			
280	14-3-3 protein eta	4,35	27000	4,51	28215	4	171	100	Q04917	Cb			
311	Septin-2	6,45	40000	6,13	41482	14	118	100	Q15019	Cb			
315	Peroxisredoxin-4	5,62	26000	5,82	30536	5	185	100	Q13162	Cb	Eo		
316	Heat shock protein beta-1	5,08	27000	5,95	22780	5	136	100	P04792	Cb			
349	Endoplasmic	4,62	98000	4,51	92457	20	222	100	P14625	Cb	Pp		
353	Gamma-enolase	4,56	49000	4,66	47263	19	291	100	P09104	Cb	Cc	Ey	Pp
369	Heat shock 70 kDa protein 1	5,48	70000	5,27	70043	8	199	100	P08107	Cb	Tc		
384	Endoplasmic	4,72	98000	4,51	92457	4	75,2	99,56	P14625	Cb	Pp		
410	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	4,76	39000	4,98	38438	8	204	100	Q9Y3F4	Cb			
423	Heat shock protein beta-1	6,08	26000	5,95	22780	5	233	100	P04792	Cb			
433	Heat shock 70 kDa protein 4	4,92	106000	4,87	94319	19	326	100	P34932	Cb	Pp		
457	Heat shock protein 105 kDa	5,12	105000	5,28	96865	12	262	100	Q92598	Cb			
459	Heat shock 70 kDa protein 1	5,24	72000	5,27	70043	25	524	100	P08107	Cb	Tc		
468	Heat shock protein beta-1	5,45	26000	5,95	22780	4	218	100	P04792	Cb			
473	Heat shock protein 105 kDa	5,02	105000	5,28	96865	9	229	100	Q92598	Cb			
478	Annexin A1	6,76	37000	6,62	38709	15	307	100	P04083	Cb	Tc		
487	14-3-3 protein beta/alpha	4,25	27000	4,76	28082	14	164	100	P31946	Cb			
490	Heat shock 70 kDa protein 4	4,94	100000	4,87	94319	25	326	100	P34932	Cb	Pp		
492	Heat shock protein 105 kDa	5,08	105000	5,28	96865	24	316	100	Q92598	Cb			
494	Heat shock 70 kDa protein 4	4,84	105000	4,87	94319	22	262	100	P34932	Cb	Pp		
496	Alpha-enolase	6,42	47000	7,01	47169	9	98,6	100	P06733	Cb	Ey		
502	Chloride intracellular channel protein 1	4,92	29000	4,86	26919	17	334	100	O00299	Cb	Tc		
506	UV excision repair protein RAD23 homolog B	4,36	66000	4,54	43166	9	100	100	P54727	Cb			
508	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	4,28	68000	5,51	61047	20	596	100	P10809	Cb	Pp		
509	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	4,98	65000	5,51	61047	16	390	100	P10809	Cb	Pp		
520	Peroxisredoxin-2	5,35	23000	5,53	21889	13	464	100	P32119	Cb	Eo	Pp	
522	Alpha-enolase	6,96	47000	7,01	47169	17	241	100	P06733	Cb	Ey		
526	Heat shock cognate 71 kDa protein	5,10	76000	5,37	70898	26	476	100	P11142	Cb			
529	Heat shock 70 kDa protein 1	5,30	73000	5,27	70043	16	337	100	P08107	Cb	Tc		
540	Endoplasmic	4,35	96000	4,51	92457	25	333	100	P14625	Cb	Pp		
542	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,15	64000	5,51	61047	11	105	100	P10809	Cb	Pp		
560	Heat shock cognate 71 kDa protein	5,25	74000	5,37	70898	26	482	100	P11142	Cb			
Candidate cardiovascular disease genes (Cc)													
112	Creatine kinase B-type	5,48	43000	5,17	42639	9	117	100	P12277	Cb	Cc	Et	Pp
353	Gamma-enolase	4,56	49000	4,66	47263	19	291	100	P09104	Cb	Cc	Ey	Pp
Mutated genes in cancer (Cm)													
83	Nucleophosmin	4,22	37000	4,64	32575	7	93,7	99,99	P06748	Cm			
365	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	5,60	27000	5,48	25566	16	421	100	P68402	Cm	Eh	Pp	
504	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	6,80	68000	6,26	64608	19	336	100	P31939	Cm	Eh	Et	
514	Tropomyosin alpha-3 chain	4,24	34000	4,68	32819	13	129	100	P06753	Cm	Pp		
561	Nucleophosmin	4,35	38000	4,64	32575	6	87,5	99,97	P06748	Cm			
Enzymes													
Hydrolases (Eh)													
27	Thimet oligopeptidase	6,00	78000	5,63	78830	9	106	100	P52888	Eh	Pm		
70	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	6,05	36000	5,88	37508	6	135	100	P62136	Eh			
154	Ribonuclease H2 subunit A	4,80	35000	4,90	33391	5	223	100	O75792	Eh			
175	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	5,92	37000	5,88	37508	6	134	100	P62136	Eh			
186	Neutral alpha-glucosidase AB	6,00	95000	5,74	106874	15	162	100	Q14697	Eh			
206	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	5,06	38000	5,23	37607	8	325	100	Q9Y5K5	Eh	Pc		
209	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	6,72	26000	6,35	25731	8	115	100	Q15102	Eh	Pp		
221	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	5,20	62000	4,97	56062	10	150	100	P54578	Eh	Pc		
241	Phosphoserine phosphatase	5,32	26000	5,36	25005	12	309	100	P78330	Eh	Up		
264	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 11	4,68	110000	5,09	109803	9	75,7	99,61	P51784	Eh	Pc		
296	Proteasome subunit beta type-4	5,50	25000	5,57	29201	6	90,8	99,98	P28070	Eh	Pt		
346	Adenosylhomocysteinase	6,25	45000	5,88	47710	16	229	100	P23526	Eh	Pp		
355	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	6,28	36000	6,05	34573	20	225	100	O00487	Eh	Pm		
365	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	5,60	27000	5,48	25566	16	421	100	P68402	Cm	Eh	Pp	
367	Proteasome subunit alpha type-6	6,65	26000	6,36	27396	6	134	100	P06900	Eh	Pp	Pt	
418	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	5,00	38000	5,23	37607	14	283	100	Q9Y5K5	Eh	Pc		
441	ADP-sugar pyrophosphatase	4,40	33000	4,63	24325	5	409	100	Q9UKK9	Eh			
444	Proteasome subunit beta type-7	5,82	27000	7,64	29962	5	115	100	Q99436	Eh	Pt		
489	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	5,82	54000	5,06	56533	20	493	100	P06576	Eh	Pp		
504	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	6,80	68000	6,26	64608	19	336	100	P31939	Cm	Eh	Et	
512	Inorganic pyrophosphatase	5,45	36000	5,40	32656	15	186	100	Q15181	Eh			
559	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	5,24	25000	5,16	24821	12	391	100	P09936	Eh	Pc	Pp	
Isoomerase (Ei)													
189	Inositol-3-phosphate synthase 1	5,50	68000	5,52	61068	8	117	100	Q9NPH2	Ei			
318	Protein disulfide-isomerase A3	5,60	59000	5,92	56775	5	263	100	P30101	Ei			
377	Protein disulfide-isomerase A3	5,90	58000	5,92	56775	7	172	100	P30101	Ei			
479	FK506-binding protein 4	5,16	60000	5,16	51798	19	375	100	Q02790	Ei			
533	Protein disulfide-isomerase A3	5,72	58000	5,92	56775	24	417	100	P30101	Ei			
549	Protein disulfide-isomerase	4,25	62000	4,50	57109	24	479	100	P07237	Ei	Pp		
Ligase (El)													
87	Aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial	6,72	52000	8,00	73554	14	207	100	Q6PI48	El			
93	Lysyl-tRNA synthetase	6,20	73000	5,90	68040	16	225	100	Q15046	El			
163	Glutathione synthetase	5,50	50000	5,55	52378	15	208	100	P48637	El	Pp		
243	Alanine-tRNA synthetase, cytoplasmic	5,22	105000	5,13	106798	18	176	100	P49588	El			
350	Glycyl-tRNA synthetase	6,18	76000	6,61	83130	12	150	100	P41250	El			

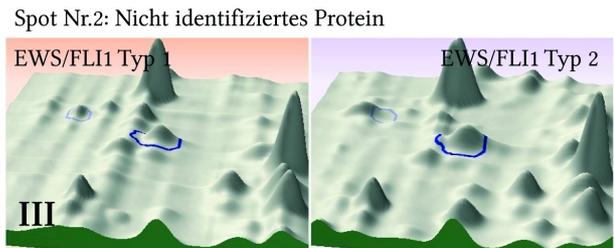
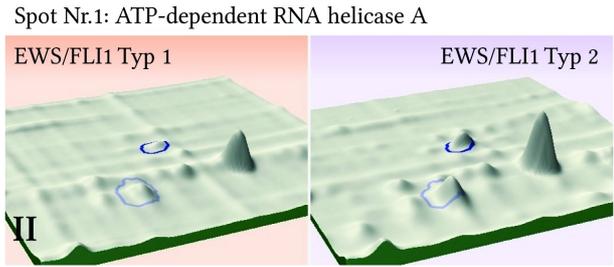
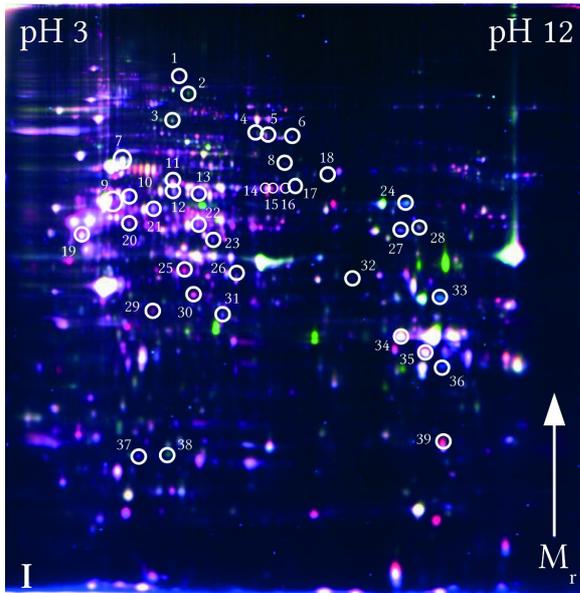
Spot Nr.	Protein Name	exp. pl	exp. MW	theor. pl	theor. MW			Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
Oxidoreductases (Eo)												
121	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	6,82	81000	6,66	87302	16	184	100	P54886	Eo	Et	
165	4-trimethylaminobutylaldehyde dehydrogenase	5,70	51000	5,69	53802	4	114	100	P49189	Eo		
315	Peroxioredoxin-4	5,62	26000	5,82	30536	5	185	100	Q13162	Cb	Eo	
382	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	5,25	77000	5,89	79468	19	141	100	P28331	Eo		
458	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6,98	35000	8,59	36049	7	150	100	P04406	Eo		
520	Peroxioredoxin-2	5,35	23000	5,53	21889	13	464	100	P32119	Cb	Eo	Pp
523	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	6,75	54000	6,28	56643	17	258	100	O43175	Eo		
530	L-lactate dehydrogenase B chain	5,70	36000	5,62	36634	16	244	100	P07195	Eo	Pp	
532	L-lactate dehydrogenase B chain	5,70	36000	5,62	36634	11	189	100	P07195	Eo	Pp	
Transferases (Et)												
17	Glutathione S-transferase P	5,10	24000	5,23	23353	5	276	100	P09211	Cb	Et	
72	Glutathione S-transferase omega-1	6,15	27000	6,21	27563	6	131	100	P78417	Et		
106	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	5,12	58000	4,99	57286	8	107	100	Q01581	Et		
112	Creatine kinase B-type	5,48	43000	5,17	42639	9	117	100	P12277	Cb	Cc	Et Pp
121	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	6,82	81000	6,66	87302	16	184	100	P54886	Eo	Et	
124	DNA polymerase delta subunit 2	5,20	52000	5,17	51283	13	423	100	P49005	Et		
130	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	5,20	58000	4,99	57286	8	109	100	Q01581	Et		
167	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	6,25	58000	5,92	58769	20	202	100	Q16222	Et		
212	Glutathione S-transferase omega-1	5,75	28000	6,21	27563	4	106	100	P78417	Et		
233	Purine nucleoside phosphorylase	6,70	30000	6,45	32118	8	146	100	P00491	Et		
293	N-terminal acetyltransferase complex ARD1 subunit homolog A	5,24	32000	5,27	26455	9	76,4	99,57	P41227	Et		
427	Spermidine synthase	5,08	35000	5,12	33821	7	241	100	P19623	Et		
432	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	5,10	60000	4,99	57286	8	106	100	Q01581	Et		
504	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	6,80	68000	6,26	64608	19	336	100	P31939	Cm	Eh	Et
Lyases (Ey)												
88	Cytoplasmic aconitate hydratase	6,72	85000	6,22	98387	11	103	100	P21399	Ey		
353	Gamma-enolase	4,56	49000	4,66	47263	19	291	100	P09104	Cb	Cc	Ey Pp
496	Alpha-enolase	6,42	47000	7,01	47169	9	98,6	100	P06733	Cb	Ey	
522	Alpha-enolase	6,96	47000	7,01	47169	17	241	100	P06733	Cb	Ey	
Peptidases												
Cysteine-type peptidases (Pc)												
206	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	5,06	38000	5,23	37607	8	325	100	Q9Y5K5	Eh	Pc	
221	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	5,20	62000	4,97	56062	10	150	100	P54578	Eh	Pc	
264	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 11	4,68	110000	5,09	109803	9	75,7	99,61	P51784	Eh	Pc	
418	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	5,00	38000	5,23	37607	14	283	100	Q9Y5K5	Eh	Pc	
559	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	5,24	25000	5,16	24821	12	391	100	P09936	Eh	Pc	Pp
Metallopeptidases (Pm)												
27	Thimet oligopeptidase	6,00	78000	5,63	78830	9	106	100	P52888	Eh	Pm	
355	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	6,28	36000	6,05	34573	20	225	100	O00487	Eh	Pm	
368	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	5,46	48000	5,90	52639	29	219	100	P31930	Pm		
499	Proliferation-associated protein 2G4	6,24	48000	6,10	43781	16	112	100	Q9UQ80	Pm		
Threonine-type peptidases (Pt)												
296	Proteasome subunit beta type-4	5,50	25000	5,57	29201	6	90,8	99,98	P28070	Eh	Pt	
367	Proteasome subunit alpha type-6	6,65	26000	6,36	27396	6	134	100	P60900	Eh	Pp	Pt
444	Proteasome subunit beta type-7	5,82	27000	7,64	29962	5	115	100	Q99436	Eh	Pt	
Plasma proteins (Pp)												
112	Creatine kinase B-type	5,48	43000	5,17	42639	9	117	100	P12277	Cb	Cc	Et Pp
127	78 kDa glucose-regulated protein	4,66	78000	5,07	72333	15	381	100	P11021	Pp		
163	Glutathione synthetase	5,50	50000	5,55	52378	15	208	100	P48637	El		
209	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	6,72	26000	6,35	25731	8	115	100	Q15102	Eh	Pp	
260	78 kDa glucose-regulated protein	4,82	78000	5,07	72333	9	264	100	P11021	Pp		
300	Vinculin	6,18	110000	5,50	123799	28	234	100	P18206	Pp		
340	Actin, cytoplasmic 1	5,06	42000	5,10	41732	10	136	100	P60709	Pp		
346	Adenosylhomocysteinase	6,25	45000	5,88	47710	16	229	100	P23526	Eh	Pp	
349	Endoplasmic	4,62	98000	4,51	92457	20	222	100	P14625	Cb	Pp	
353	Gamma-enolase	4,56	49000	4,66	47263	19	291	100	P09104	Cb	Cc	Ey Pp
365	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	5,60	27000	5,48	25566	16	421	100	P68402	Cm	Eh	Pp
367	Proteasome subunit alpha type-6	6,65	26000	6,36	27396	6	134	100	P60900	Eh	Pp	Pt
384	Endoplasmic	4,72	98000	4,51	92457	4	75,2	99,56	P14625	Cb	Pp	
403	Actin, cytoplasmic 1	4,94	45000	5,10	41732	15	313	100	P60709	Pp		
409	Splicing factor 3A subunit 3	5,12	61000	5,08	58842	11	209	100	Q12874	Pp		
433	Heat shock 70 kDa protein 4	4,92	106000	4,87	94319	19	326	100	P34932	Cb	Pp	
435	RuvB-like 1	6,62	52000	6,02	50228	8	306	100	Q9Y265	Pp		
437	Vimentin	4,34	73000	4,83	53645	26	365	100	P08670	Pp		
449	Lamin-B1	4,88	76000	4,89	66400	17	99,1	100	P20700	Pp		
453	Actin, cytoplasmic 1	4,98	45000	5,10	41732	10	272	100	P60709	Pp		
460	Elongation factor Tu, mitochondrial	6,90	44000	7,37	49536	7	426	100	P49411	Pp		
489	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	5,82	54000	5,06	56553	20	493	100	P06576	Eh	Pp	
490	Heat shock 70 kDa protein 4	4,94	100000	4,87	94319	25	326	100	P34932	Cb	Pp	
494	Heat shock 70 kDa protein 4	4,84	105000	4,87	94319	22	262	100	P34932	Cb	Pp	
508	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	4,28	68000	5,51	61047	20	596	100	P10809	Cb	Pp	
509	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	4,98	65000	5,51	61047	16	390	100	P10809	Cb	Pp	
510	Vimentin	4,22	64000	4,83	53645	13	227	100	P08670	Pp		
511	78 kDa glucose-regulated protein	4,78	78000	5,07	72333	25	613	100	P11021	Pp		
514	Tropomyosin alpha-3 chain	4,24	34000	4,68	32819	13	129	100	P06753	Cm	Pp	
520	Peroxioredoxin-2	5,35	23000	5,53	21889	13	464	100	P32119	Cb	Eo	Pp
530	L-lactate dehydrogenase B chain	5,70	36000	5,62	36634	16	244	100	P07195	Eo	Pp	
532	L-lactate dehydrogenase B chain	5,70	36000	5,62	36634	11	189	100	P07195	Eo	Pp	
540	Endoplasmic	4,35	96000	4,51	92457	25	333	100	P14625	Cb	Pp	
542	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,15	64000	5,51	61047	11	105	100	P10809	Cb	Pp	
543	78 kDa glucose-regulated protein	4,75	77000	5,07	72333	27	651	100	P11021	Pp		
549	Protein disulfide-isomerase	4,25	62000	4,50	57109	24	479	100	P07237	Ei	Pp	
553	Vimentin	4,88	82000	4,83	53645	20	313	100	P08670	Pp		

Spot Nr.	Protein Name	exp. pl	exp. MW	theor. pl	theor. MW				Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
559	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	5,24	25000	5,16	24821	12	391	100	P09936	Eh	Pc	Pp	
Ribosomal proteins (Ri)													
324	40S ribosomal protein SA	4,92	45000	4,55	32850	11	195	100	P08865	Ri			
337	40S ribosomal protein SA	4,38	45000	4,55	32850	16	86,8	99,96	P08865	Ri			
531	40S ribosomal protein SA	4,25	45000	4,55	32850	14	527	100	P08865	Ri			
SH3-domain containing proteins (Sd)													
131	Proto-oncogene C-crk	5,25	38000	5,38	33831	11	185	100	P46108	Sd	Sh		
SH2-domain containing proteins (Sh)													
131	Proto-oncogene C-crk	5,25	38000	5,38	33831	11	185	100	P46108	Sd	Sh		
Transporters													
Transporter channels and pores (Tc)													
198	Chloride intracellular channel protein 1	5,05	29000	4,86	26919	7	160	100	O00299	Cb	Tc		
369	Heat shock 70 kDa protein 1	5,48	70000	5,27	70043	8	199	100	P08107	Cb	Tc		
420	Chloride intracellular channel protein 4	5,28	27000	5,26	28769	6	202	100	Q9Y696	Tc			
459	Heat shock 70 kDa protein 1	5,24	72000	5,27	70043	25	524	100	P08107	Cb	Tc		
478	Annexin A1	6,76	37000	6,62	38709	15	307	100	P04083	Cb	Tc		
502	Chloride intracellular channel protein 1	4,92	29000	4,86	26919	17	334	100	O00299	Cb	Tc		
529	Heat shock 70 kDa protein 1	5,30	73000	5,27	70043	16	337	100	P08107	Cb	Tc		
Primary Active Transporters (Tp)													
133	Nuclear protein localization protein 4 homolog	6,36	73000	5,94	68120	6	130	100	Q8TAT6	Tp			
356	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	5,08	92000	4,90	89311	10	353	100	P55072	Tp			
381	Eukaryotic initiation factor 4A-III	6,56	46000	6,28	46865	14	154	100	P38919	Tp			
521	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	5,02	90000	4,90	89311	32	540	100	P55072	Tp			
551	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	4,94	92000	5,14	89322	29	529	100	P55072	Tp			
UniProt - no evidence at protein level (Up)													
241	Phosphoserine phosphatase	5,32	26000	5,36	25005	12	309	100	P78330	Eh	Up		
Keine Klasse in Proteinatlas													
13	TAR DNA-binding protein 43	5,65	42000	5,85	44740	1	85,4	99,96	Q13148	-			
29	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	4,88	48000	4,84	41564	15	314	100	Q15435	-			
42	Dihydropyrimidinase-related protein 2	5,98	72000	5,91	62286	13	192	100	Q16555	-			
44	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1	4,98	48000	5,30	47047	7	177	100	O06064	-			
56	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	6,90	77000	6,77	73234	13	169	100	O00571	-			
63	POTE ankyrin domain family member E	5,10	100000	5,83	121363	6	175	100	Q6S8J3	-			
73	Ubiquilin-4	4,72	74000	4,93	63845	6	72,3	99,15	Q9NRR5	-			
77	Pre-mRNA-splicing factor SPF27	5,20	26000	5,34	26128	10	83,3	99,93	O75934	-			
108	Elongation factor 1-delta	4,56	37000	4,65	31118	9	222	100	P29692	-			
111	Nuclear migration protein nudC	4,92	46000	5,06	38238	6	145	100	Q9Y266	-			
118	Scavenger mRNA-decapping enzyme Dcp5	6,10	38000	5,90	38604	5	120	100	Q96C86	-			
126	Mitochondrial inner membrane protein	6,16	83000	6,08	83678	10	99,7	100	Q16891	-			
129	4'-phosphopantetheinyl transferase	6,12	37000	6,36	35722	8	75,8	99,62	Q9NRR7	-			
134	TAR DNA-binding protein 43	5,70	44000	5,85	44740	4	110	100	Q13148	-			
140	COP9 signalosome complex subunit 4	5,50	41000	5,45	46263	17	311	100	Q9BT78	-			
144	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	6,90	75000	6,77	73234	13	201	100	O00571	-			
145	HCLS1-associated protein X-1	4,30	36000	4,76	31621	7	130	100	O00165	-			
179	POTE ankyrin domain family member E	5,00	120000	5,83	121363	6	128	100	Q6S8J3	-			
181	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	6,10	49000	5,84	49223	6	135	100	P31943	-			
185	T-complex protein 1 subunit alpha	5,82	68000	5,69	60336	12	75,1	99,55	P17987	-			
190	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	6,85	73000	8,27	80100	8	120	100	Q12931	-			
192	DNA replication licensing factor A/C/M4	6,30	96000	6,27	96546	18	128	100	P33991	-			
194	POTE ankyrin domain family member E	5,10	130000	5,83	121363	7	206	100	Q6S8J3	-			
214	Phosducin-like protein 3	4,22	35000	4,53	27611	8	138	100	Q9H2J4	-			
219	Tetrapeptide repeat protein 1	4,78	42000	4,54	35522	8	150	100	Q99614	-			
228	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	5,18	43000	5,31	39250	16	354	100	O15160	-			
231	Coatomer subunit epsilon	4,70	35000	4,73	34478	8	241	100	O14579	-			
240	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	6,82	72000	8,27	80100	23	419	100	Q12931	-			
244	Endoplasmic reticulum protein ERp29	6,20	26000	7,11	28990	7	139	100	P30040	-			
251	Thioredoxin-like protein 1	4,72	36000	4,58	32247	16	249	100	O43396	-			
254	Programmed cell death 6-interacting protein	6,52	90000	6,13	96023	14	161	100	Q8WUM4	-			
256	Alpha-SGT	4,32	36000	4,55	34059	5	174	100	O43765	-			
267	POTE ankyrin domain family member E	5,08	160000	5,83	121363	9	213	100	Q6S8J3	-			
272	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	4,72	47000	4,70	42148	3	112	100	Q16186	-			
274	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	4,32	38000	4,52	31437	8	156	100	P19387	-			
278	Alpha-centractin	6,68	44000	6,18	42609	10	267	100	P61163	-			
283	Tubulin beta chain	4,92	56000	4,53	49665	19	297	100	P07437	-			
286	Actin, cytoplasmic 2	4,88	45000	5,13	41788	14	265	100	P63261	-			
294	Protein SEC13 homolog	4,98	38000	5,04	35536	2	104	100	P55735	-			
295	Glutaredoxin-3	5,22	39000	5,13	37427	15	423	100	O76003	-			
297	Thioredoxin domain-containing protein 5	5,24	52000	5,55	47623	8	113	100	Q8NBS9	-			
298	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	4,72	41000	5,07	41024	14	215	100	Q9Y2Z0	-			
299	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	4,88	31000	4,77	29995	11	221	100	Q15691	-			
306	Coatomer subunit epsilon	4,80	35000	4,73	34478	11	167	100	O14579	-			
309	Eukaryotic translation initiation factor 4B	5,04	86000	5,55	69151	2	78,6	99,74	P23588	-			
320	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	4,34	62000	4,82	49419	24	325	100	Q9BQ67	-			
322	TAR DNA-binding protein 43	5,98	44000	5,85	44740	4	184	100	Q13148	-			
326	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	6,10	49000	5,84	49223	8	135	100	P31943	-			
328	Transcription intermediary factor 1-beta	5,26	120000	5,52	88550	11	252	100	Q13263	-			
329	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	4,80	38000	5,07	41024	13	256	100	Q9Y2Z0	-			
330	Endoplasmic reticulum resident protein ERp44	4,80	48000	4,86	46965	10	366	100	Q9BS26	-			
331	O-GlcNAc transferase subunit p110	6,72	95000	6,22	116925	19	307	100	O15294	-			
341	PP2A, subunit A, PR65-alpha isoform	4,72	68000	4,76	65300	12	371	100	P30153	-			
343	26S protease regulatory subunit 6A	4,92	52000	4,89	49197	9	213	100	P17980	-			
347	Eukaryotic translation initiation factor 4B	5,25	84000	5,55	69151	3	79,5	99,79	P23588	-			
352	PABPC4 protein	4,42	36000	4,56	28554	14	198	100	Q4VBZ6	-			

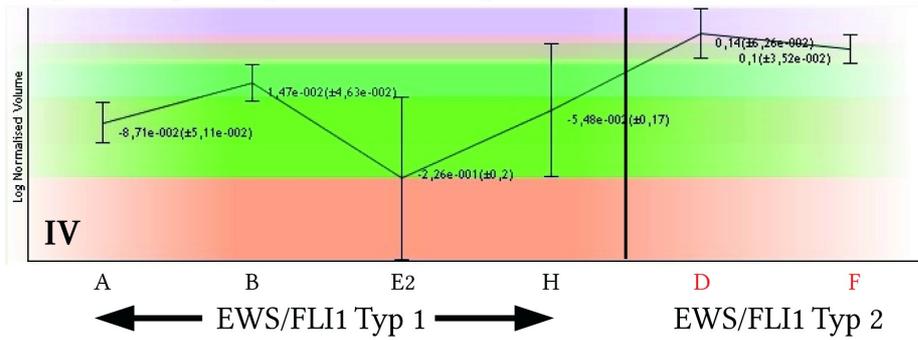
Spot Nr.	Protein Name	exp. pI	exp. MW	theor. pI	theor. MW			Uniprot Acc. Nr.	Klasse	Klasse	Klasse	Klasse
364	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	4,68	38000	4,95	33670	8	118	100	P07910	-	-	-
366	Tubulin alpha-1A chain	5,02	61000	4,71	50129	15	97,7	100	Q71U36	-	-	-
373	Nucleolin	4,78	94000	4,34	76604	4	286	100	P19338	-	-	-
378	GDL2 protein	6,32	46000	6,11	50663	9	199	100	Q6IAT1	-	-	-
379	Nuclear migration protein nudC	5,26	46000	5,06	38238	10	96,2	100	Q9Y266	-	-	-
380	Dihydropyrimidinase-related protein 2	6,20	68000	5,91	62286	14	348	100	Q16555	-	-	-
383	Elongation factor 1-delta	4,66	37000	4,65	31118	15	444	100	P29692	-	-	-
387	G-rich sequence factor 1	4,98	56000	5,83	53126	18	362	100	Q12849	-	-	-
389	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,35	59000	5,39	50976	1	74,7	99,51	P61978	-	-	-
399	Nuclear migration protein nudC	4,98	46000	5,06	38238	4	168	100	Q9Y266	-	-	-
401	Dihydropyrimidinase-related protein 2	6,46	76000	5,91	62286	19	308	100	Q16555	-	-	-
402	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	6,72	75000	8,27	80100	17	350	100	Q12931	-	-	-
405	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,42	64000	5,39	50976	14	209	100	P61978	-	-	-
407	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,18	68000	5,39	50976	5	130	100	P61978	-	-	-
408	Glyoxalase domain-containing protein 4	5,25	35000	5,40	34793	4	174	100	Q9HC38	-	-	-
415	Eukaryotic translation initiation factor 4B	5,15	84000	5,55	69151	2	136	100	P23588	-	-	-
417	Hypoxia up-regulated protein 1	4,88	140000	4,94	111322	16	221	100	Q9Y4L1	-	-	-
419	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	4,72	27000	4,77	23204	4	106	100	P52565	-	-	-
424	Tubulin alpha-1B chain	4,66	62000	4,71	50145	19	353	100	P68363	-	-	-
425	F-actin-capping protein subunit beta	5,55	32000	5,36	31350	5	257	100	P47756	-	-	-
429	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	6,80	38000	6,37	36926	9	212	100	P31942	-	-	-
430	Eukaryotic translation initiation factor 4B	5,00	85000	5,55	69151	12	228	100	P23588	-	-	-
431	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	5,26	42000	5,23	38270	10	285	100	O95433	-	-	-
438	Glutaredoxin-3	5,14	39000	5,13	37427	8	321	100	O76003	-	-	-
440	Eukaryotic translation initiation factor 4B	5,08	85000	5,55	69151	2	95,9	100	P23588	-	-	-
443	Rab GDP dissociation inhibitor beta	6,32	48000	6,11	50663	20	300	100	P50395	-	-	-
448	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,28	74000	5,39	50976	18	233	100	P61978	-	-	-
452	Stomatin-like protein 2	5,22	41000	7,16	38529	5	171	100	Q9UJZ1	-	-	-
455	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	5,00	79000	5,08	71457	6	246	100	Q13409	-	-	-
461	Chromobox protein homolog 1	4,32	25000	4,61	21415	4	127	100	P83916	-	-	-
464	14-3-3 protein gamma	4,26	28000	4,56	28299	10	248	100	P61981	-	-	-
465	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	5,22	49000	5,21	45666	8	209	100	P52597	-	-	-
475	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	6,22	52000	5,84	49223	8	335	100	P31943	-	-	-
476	BH3-interacting domain death agonist	4,94	23000	5,27	21995	6	171	100	P55957	-	-	-
477	Reticulocalbin-1	4,64	45000	4,61	38885	14	222	100	Q15293	-	-	-
480	26S protease regulatory subunit 6A	4,90	49000	4,89	49197	23	443	100	P17980	-	-	-
483	T-complex protein 1 subunit alpha	6,00	64000	5,69	60336	25	232	100	P17987	-	-	-
484	Tropomodulin-2	4,94	42000	4,99	39590	3	99,8	100	Q9NZR1	-	-	-
485	Lupus La protein	6,72	47000	6,74	46831	14	240	100	P05455	-	-	-
486	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,12	69000	5,39	50976	14	208	100	P61978	-	-	-
488	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	5,00	49000	5,21	45666	8	157	100	P52597	-	-	-
498	Tubulin alpha-1B chain	4,88	56000	4,71	50145	21	437	100	P68363	-	-	-
500	T-complex protein 1 subunit gamma	6,40	66000	6,05	60526	16	241	100	P49368	-	-	-
501	Stress-induced-phosphoprotein 1	6,85	64000	6,38	62632	22	228	100	P31948	-	-	-
503	Hypoxia up-regulated protein 1	4,94	140000	4,94	111322	25	437	100	Q9Y4L1	-	-	-
505	Prohibitin	5,35	28000	5,40	29800	22	743	100	P35232	-	-	-
513	T-complex protein 1 subunit zeta	6,72	62000	6,22	58017	24	354	100	P40227	-	-	-
515	Dynactin subunit 2	4,90	50000	5,10	44231	17	294	100	Q13561	-	-	-
516	T-complex protein 1 subunit beta	6,42	52000	5,98	57481	23	411	100	P78371	-	-	-
518	Transcriptionally-controlled tumor protein	4,32	23000	4,60	19593	7	147	100	P13693	-	-	-
519	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,00	69000	5,39	50976	14	175	100	P61978	-	-	-
527	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	6,04	52000	5,84	49223	13	501	100	P31943	-	-	-
528	Actin, cytoplasmic 2	5,16	45000	5,13	41788	10	223	100	P63261	-	-	-
538	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5,28	68000	5,39	50976	18	230	100	P61978	-	-	-
547	T-complex protein 1 subunit epsilon	5,36	64000	5,27	59664	19	209	100	P48643	-	-	-
548	Tubulin beta-2A chain	4,62	58000	4,53	49901	21	319	100	Q13885	-	-	-
555	Actin, cytoplasmic 2	5,08	45000	5,13	41788	13	304	100	P63261	-	-	-
556	Stress-70 protein, mitochondrial	5,36	76000	5,76	73671	24	603	100	P38646	-	-	-

Anhang III Differentiell exprimierte Proteine EWS/FLI1 Typ1/Typ2 mit IPG 3-12

Nachfolgend sind die ausführlichen grafischen Darstellungen der zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3-12 aufgeführt.

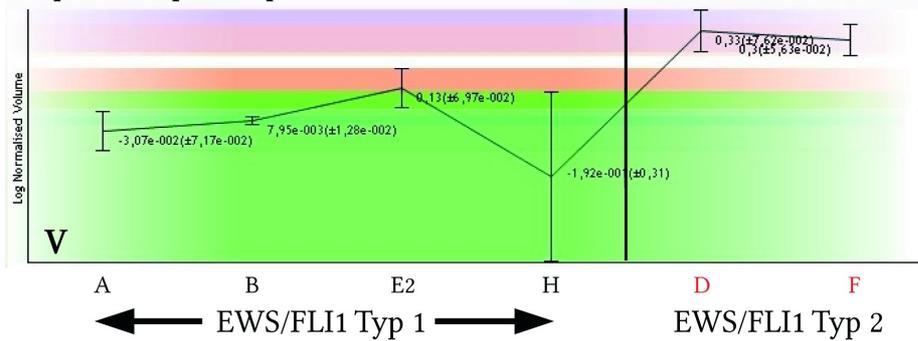


Expressionsprofil Spot Nr.1: ATP-dependent RNA helicase A

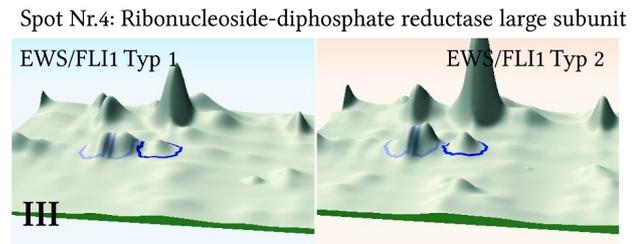
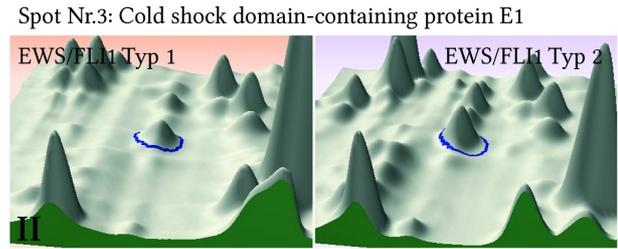
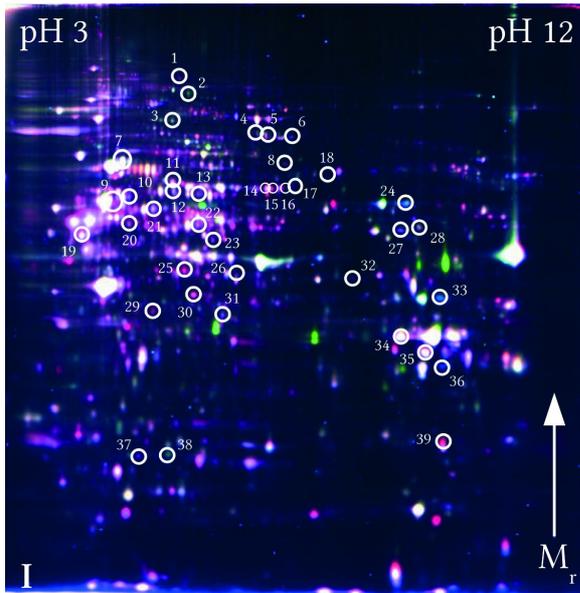


Typ1/Typ2:
-1,6

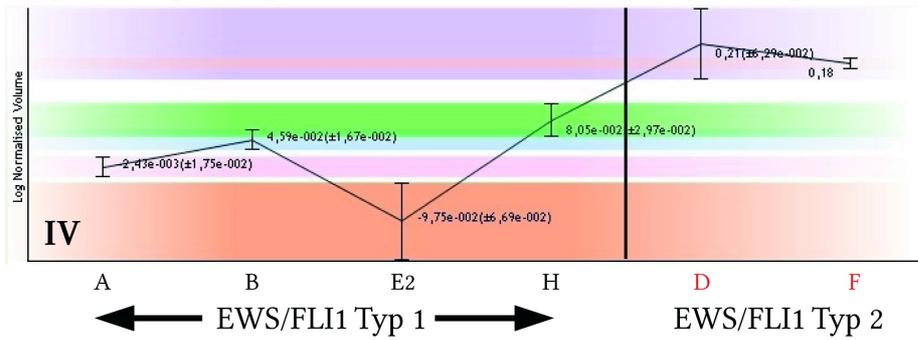
Expressionsprofil Spot Nr.2: Nicht identifiziertes Protein



Typ1/Typ2:
-2,2

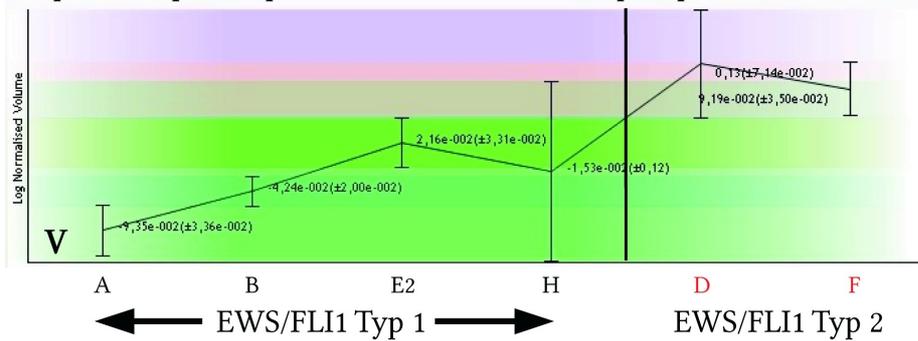


Expressionsprofil Spot Nr.3: Cold shock domain-containing protein E1

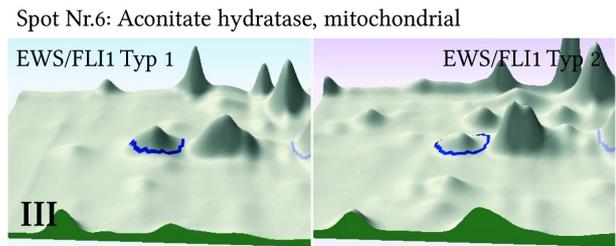
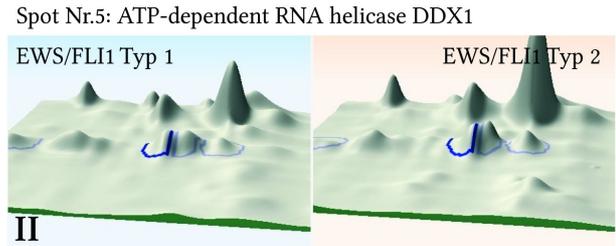
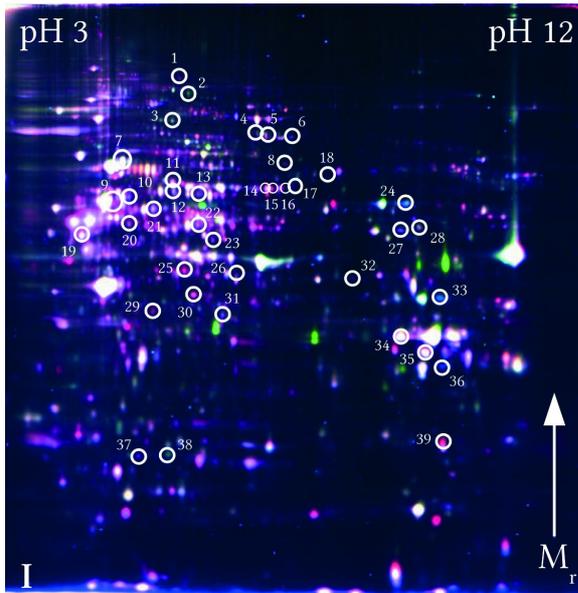


Typ1/Typ2:
-1,6

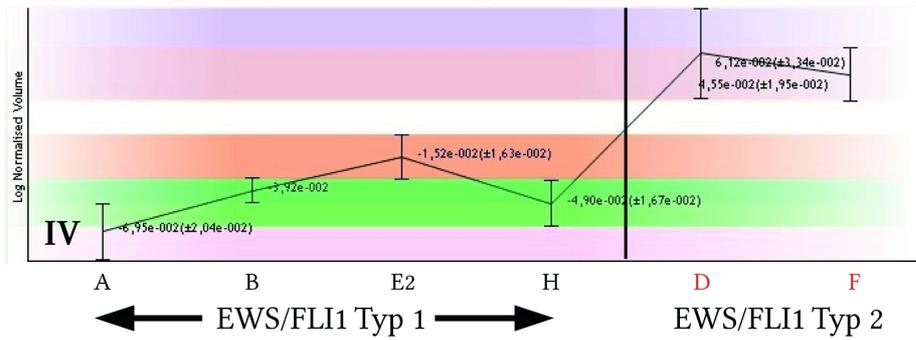
Expressionsprofil Spot Nr.4: Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit



Typ1/Typ2:
-1,4

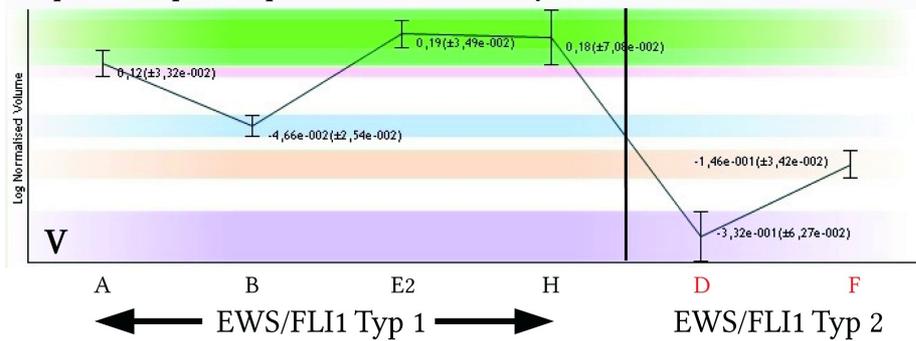


Expressionsprofil Spot Nr.5: ATP-dependent RNA helicase DDX1

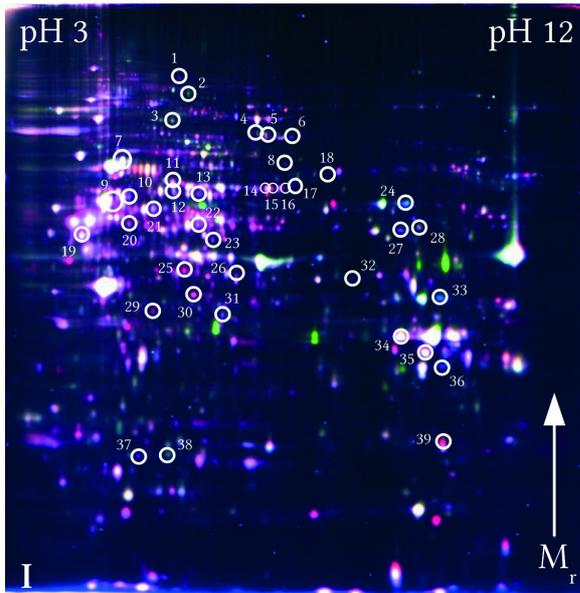


**Typ1/Typ2:
-1,3**

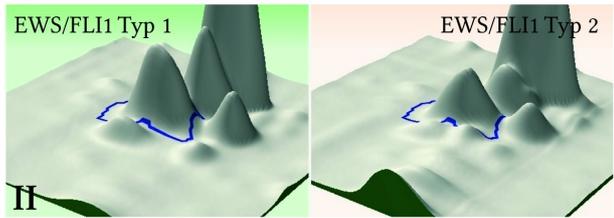
Expressionsprofil Spot Nr.6: Aconitate hydratase, mitochondrial



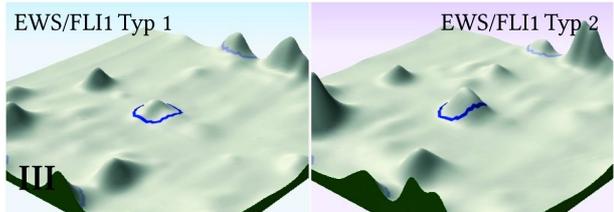
**Typ1/Typ2:
+2,3**



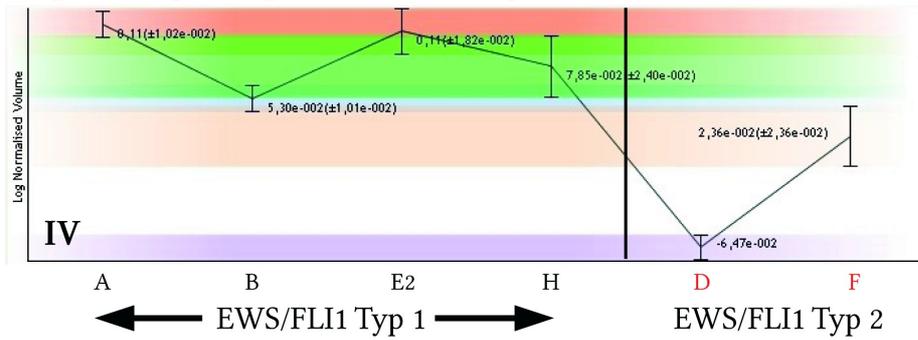
Spot Nr.7: Stress-70 protein, mitochondrial



Spot Nr.8: Nicht identifiziertes Protein

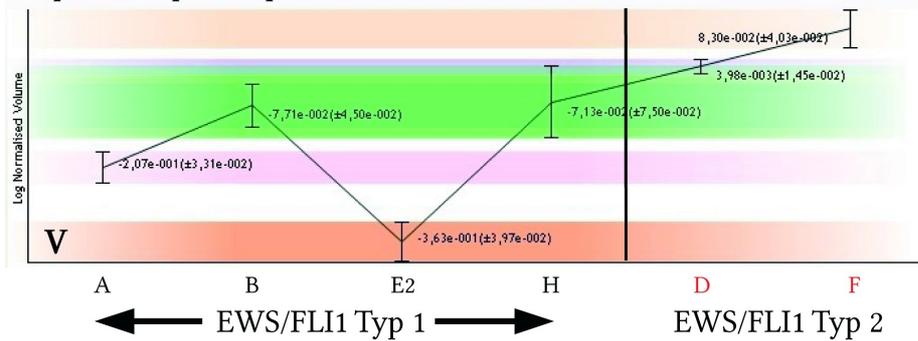


Expressionsprofil Spot Nr.7: Stress-70 protein, mitochondrial

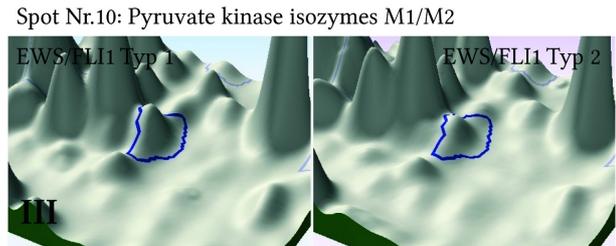
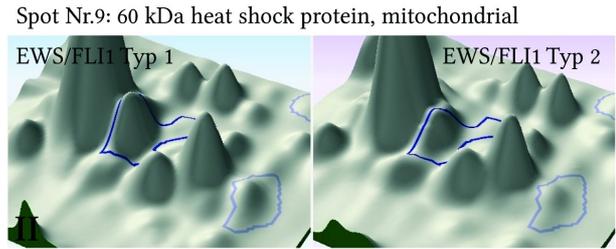
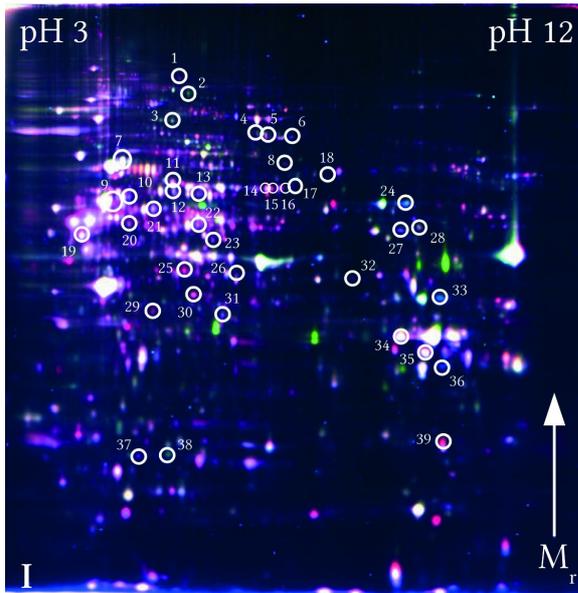


Typ1/Typ2:
+1,3

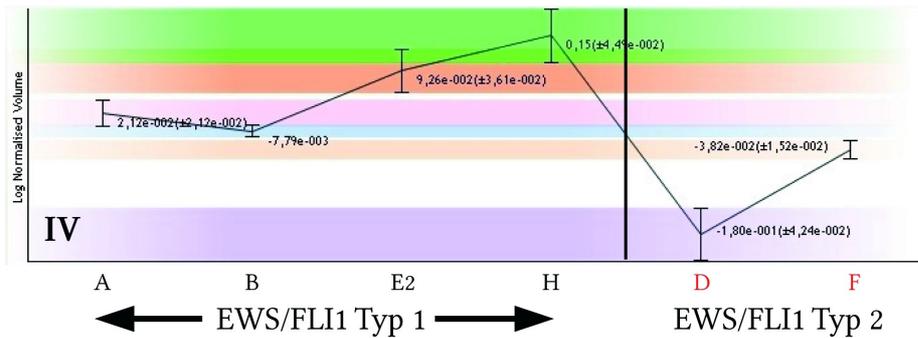
Expressionsprofil Spot Nr.8: Nicht identifiziertes Protein



Typ1/Typ2:
-1,7

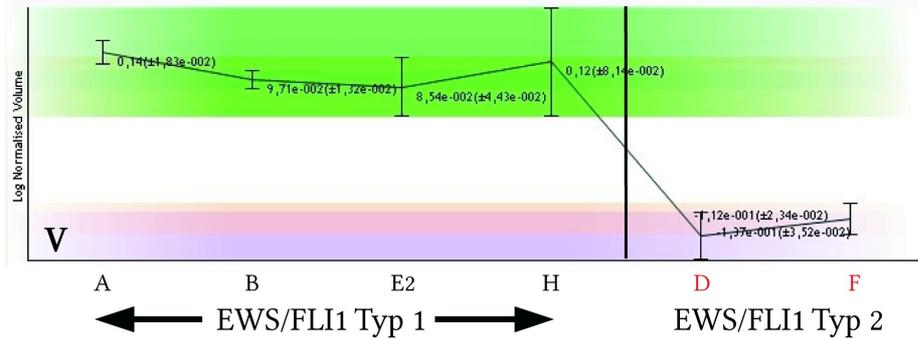


Expressionsprofil Spot Nr.9:60 kDa heat shock protein, mitochondrial

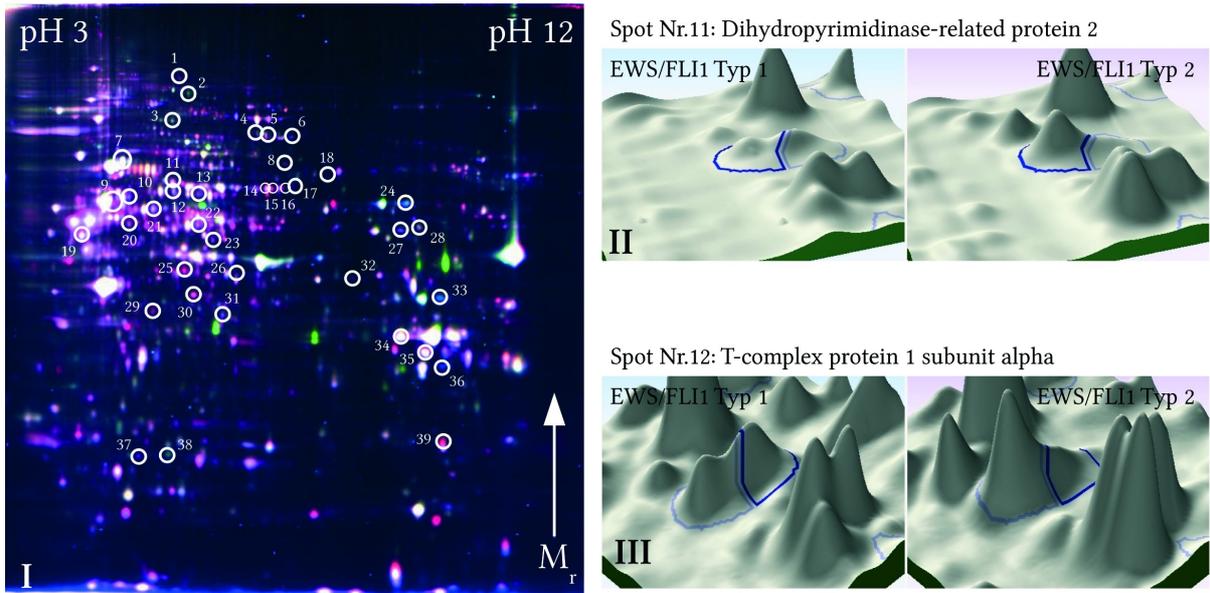


**Typ1/Typ2:
+1,5**

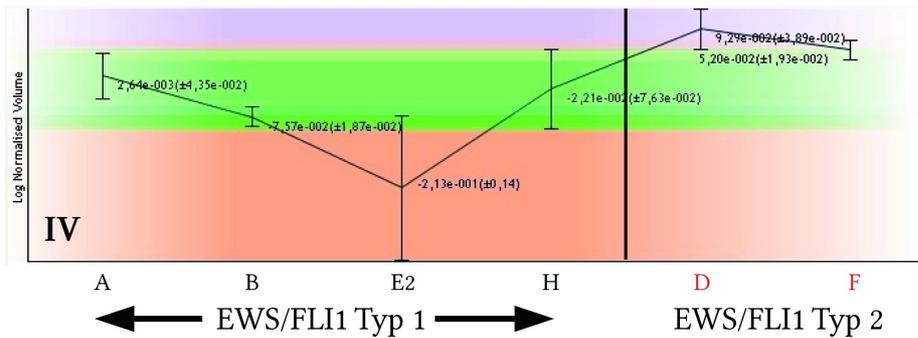
Expressionsprofil Spot Nr.10: Pyruvate kinase isozymes M1/M2



**Typ1/Typ2:
+1,7**

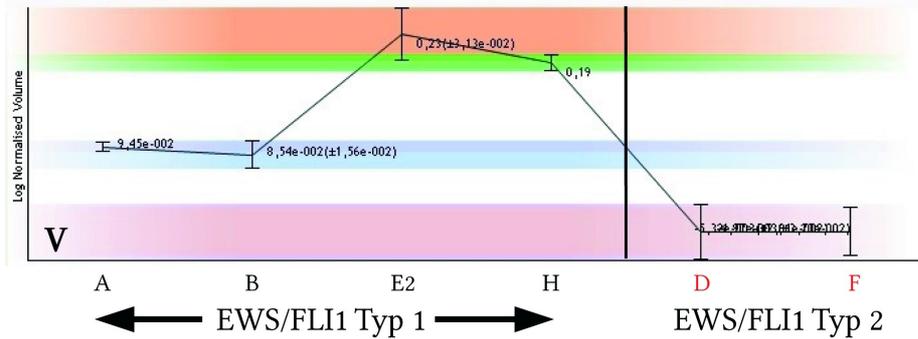


Expressionsprofil Spot Nr.11: Dihydropyrimidinase-related protein 2

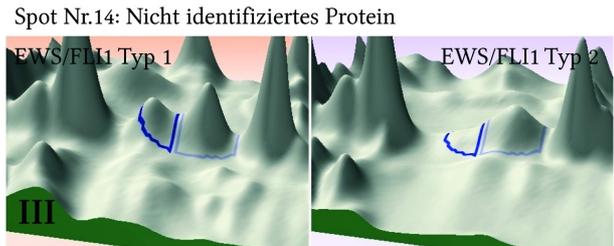
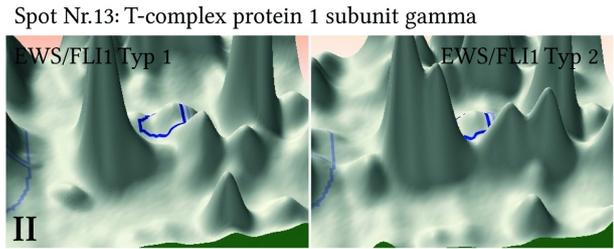
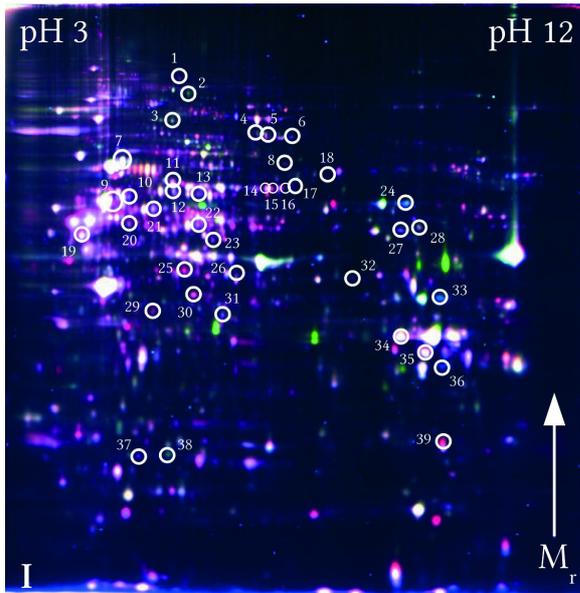


Typ1/Typ2:
-1,4

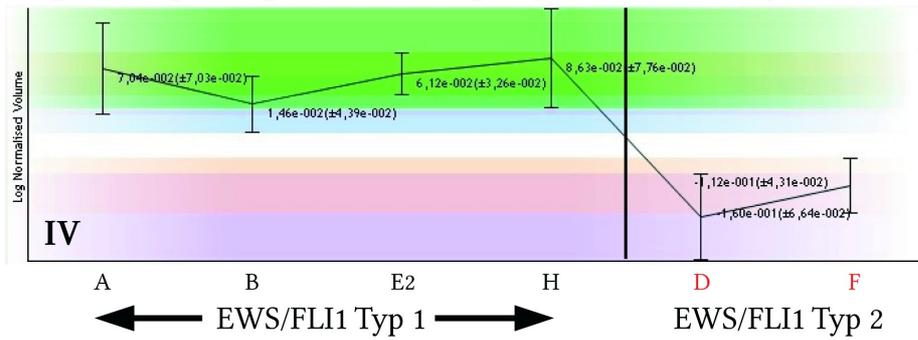
Expressionsprofil Spot Nr.12: T-complex protein 1 subunit alpha



Typ1/Typ2:
+1,5

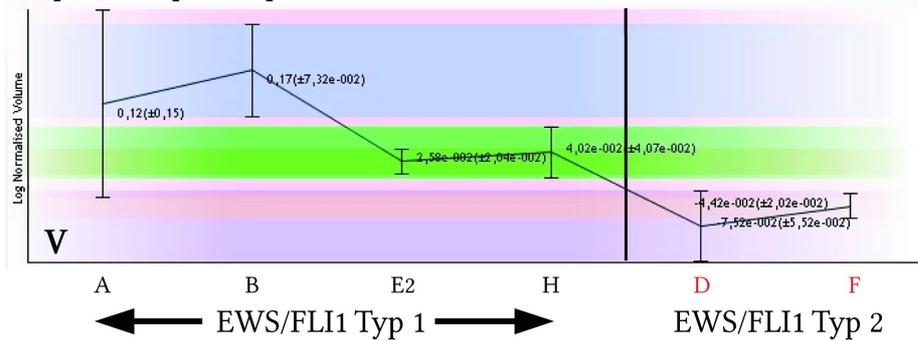


Expressionsprofil Spot Nr.13:T-complex protein 1 subunit gamma

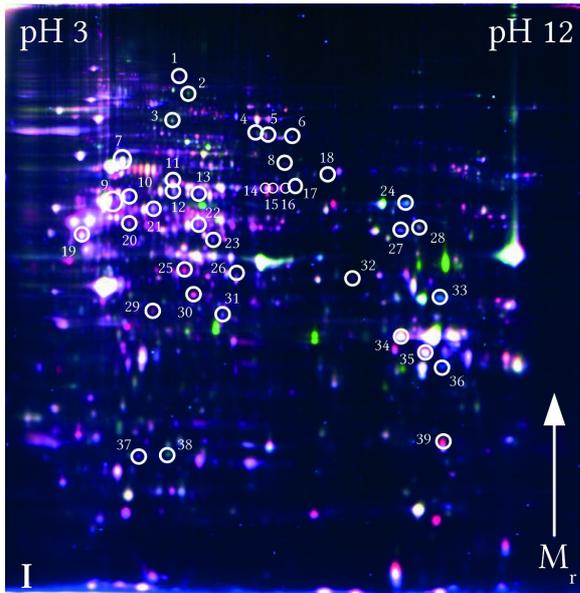


Typ1/Typ2:
+1,6

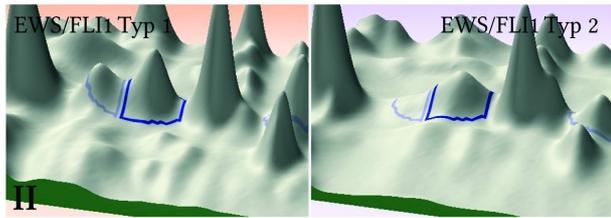
Expressionsprofil Spot Nr.14: Nicht identifiziertes Protein



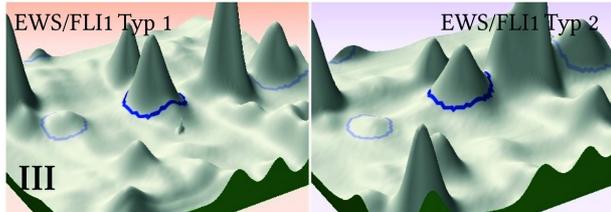
Typ1/Typ2:
+1,4



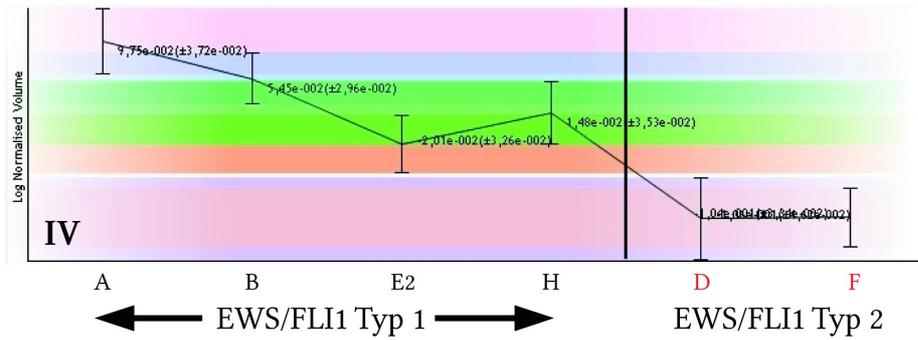
Spot Nr.15: Nicht identifiziertes Protein



Spot Nr.16: Nicht identifiziertes Protein

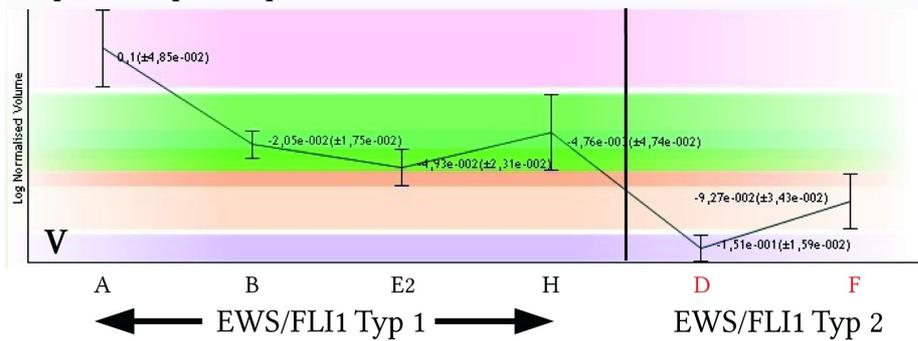


Expressionsprofil Spot Nr.15: Nicht identifiziertes Protein

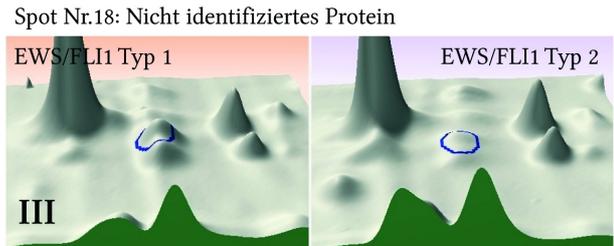
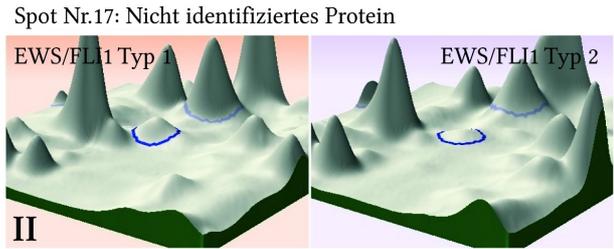
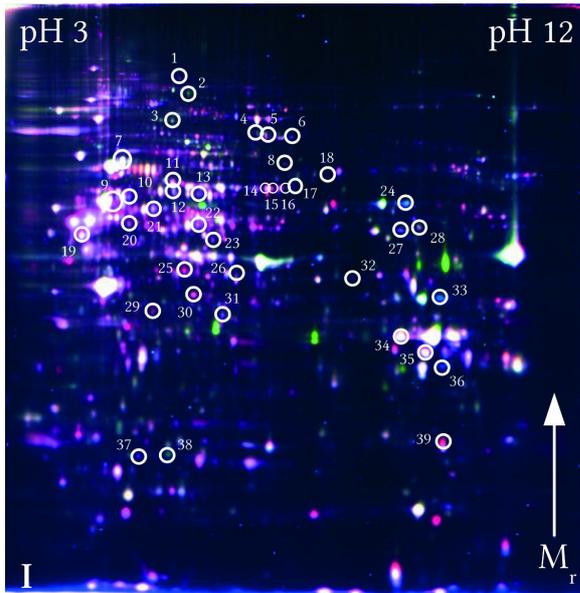


Typ1/Typ2:
+1,4

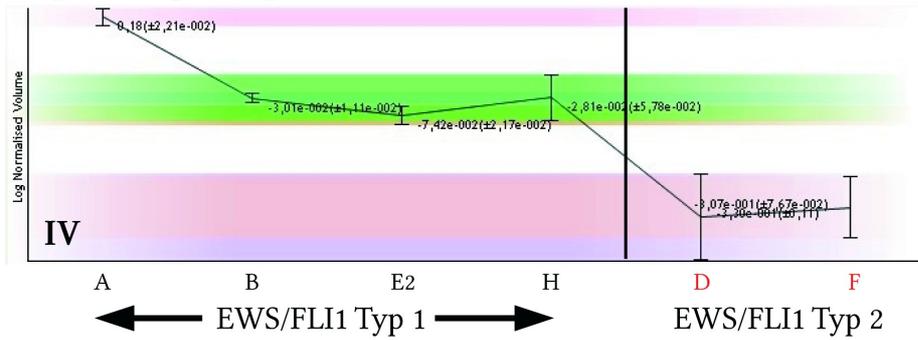
Expressionsprofil Spot Nr.16: hnRNP L



Typ1/Typ2:
+1,4

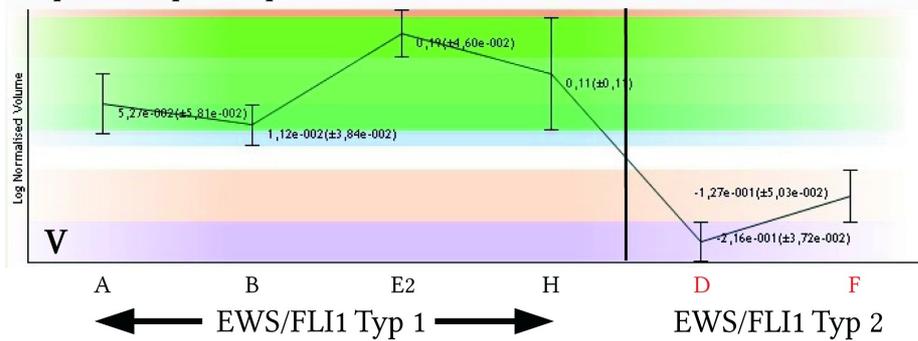


Expressionsprofil Spot Nr.17: Nicht identifiziertes Protein

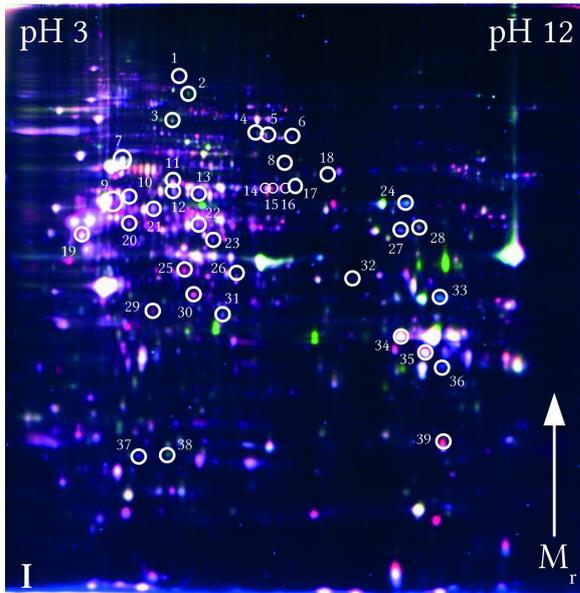


**Typ1/Typ2:
+2,2**

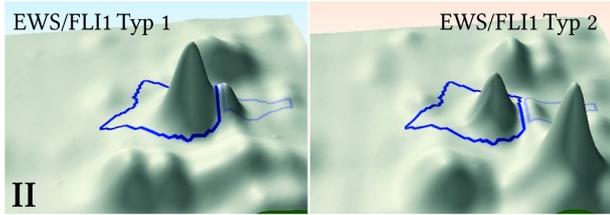
Expressionsprofil Spot Nr.18: Nicht identifiziertes Protein



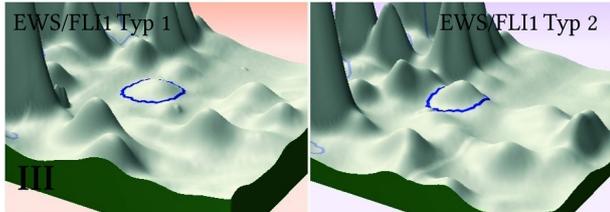
**Typ1/Typ2:
+1,9**



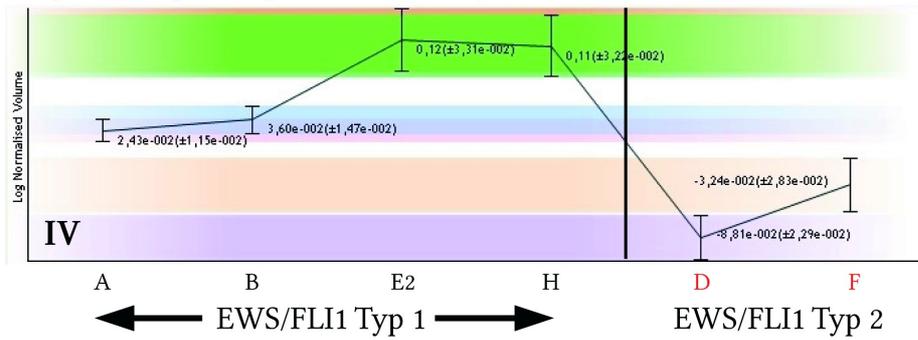
Spot Nr.19: Nicht identifiziertes Protein



Spot Nr.20: Nicht identifiziertes Protein

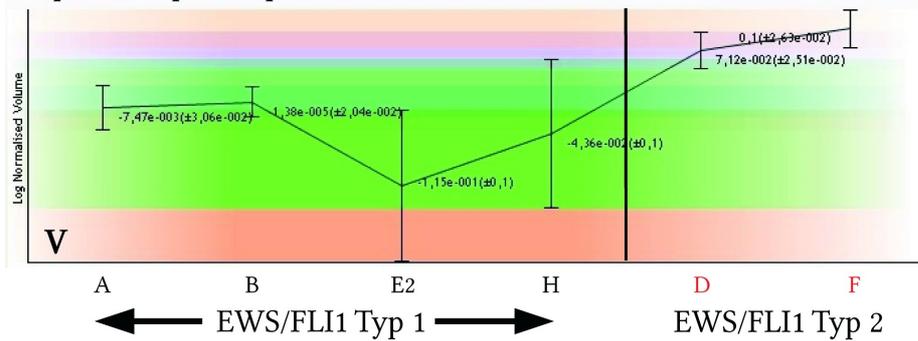


Expressionsprofil Spot Nr.19: ATP synthase subunit beta

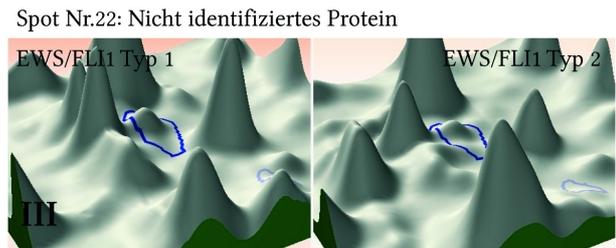
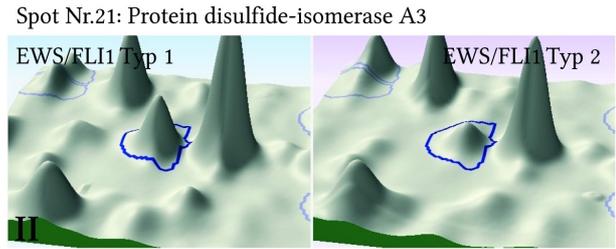
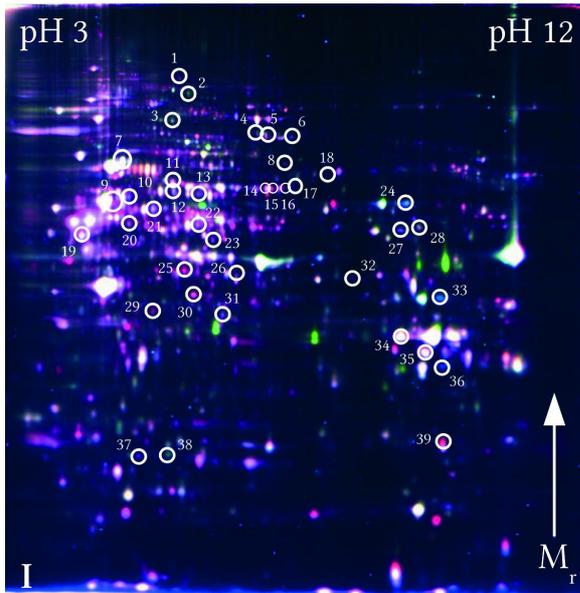


**Typ1/Typ2:
+1,4**

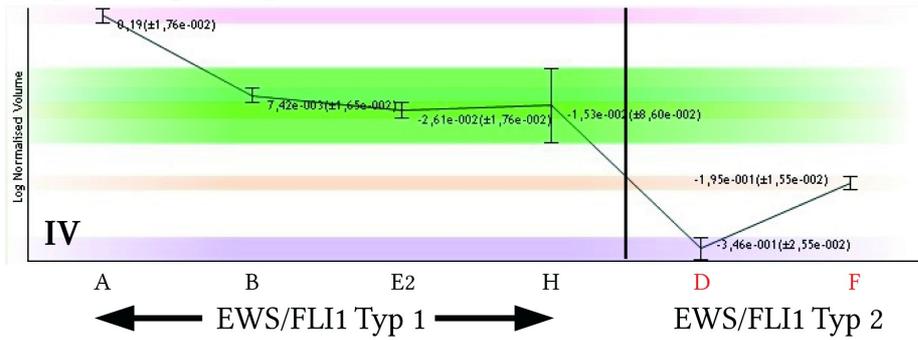
Expressionsprofil Spot Nr.20: Nicht identifiziertes Protein



**Typ1/Typ2:
-1,4**

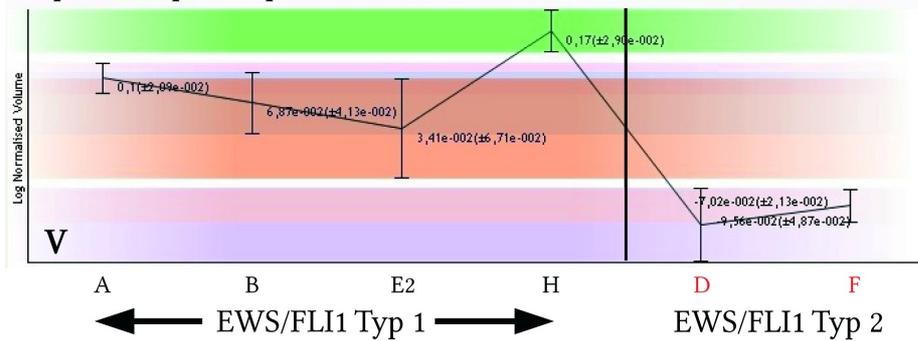


Expressionsprofil Spot Nr.21: Protein disulfide-isomerase A3

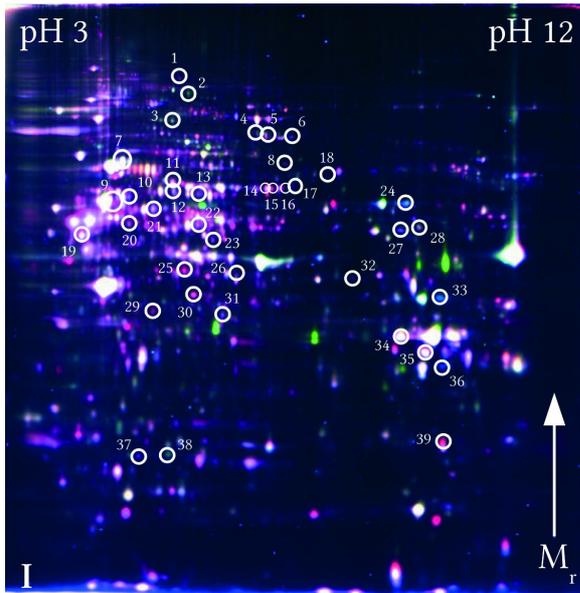


**Typ1/Typ2:
+2,1**

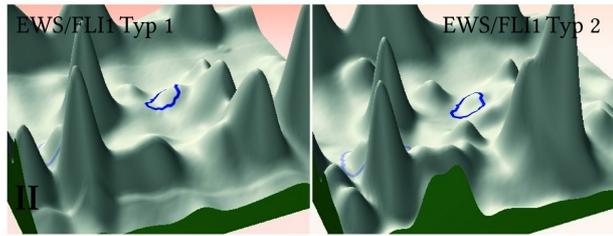
Expressionsprofil Spot Nr.22: Nicht identifiziertes Protein



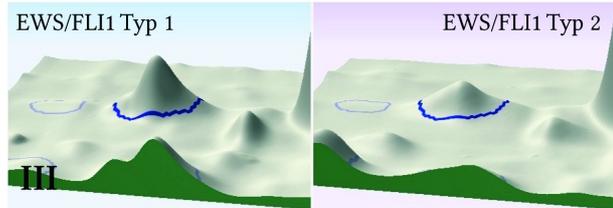
**Typ1/Typ2:
+1,5**



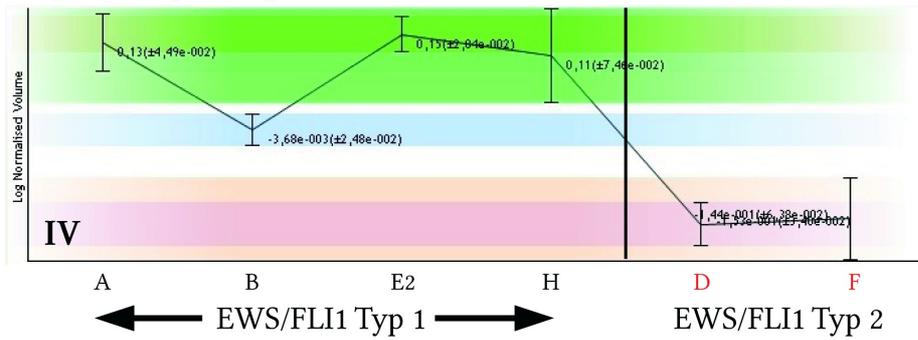
Spot Nr.23: Nicht identifiziertes Protein



Spot Nr.24: Nicht identifiziertes Protein

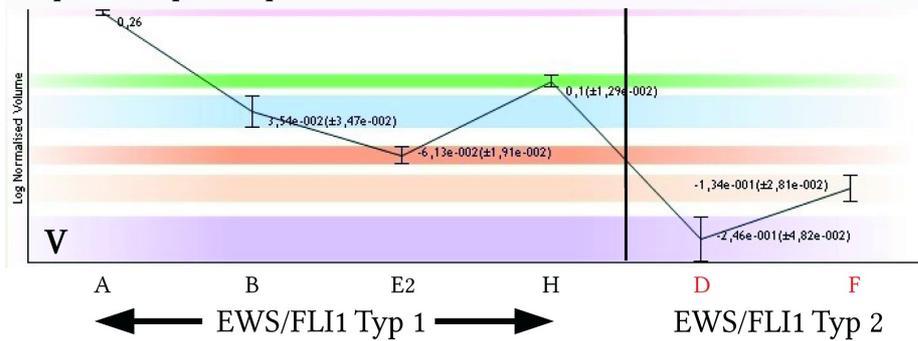


Expressionsprofil Spot Nr.23: Nicht identifiziertes Protein

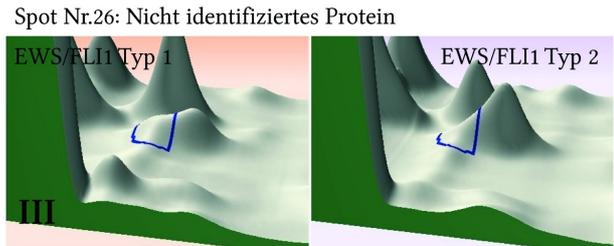
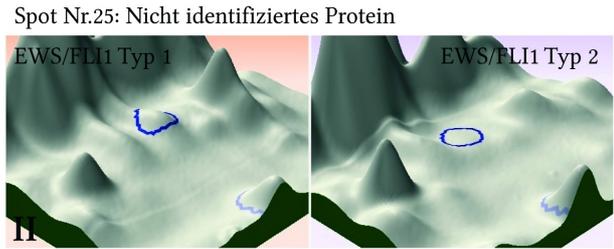
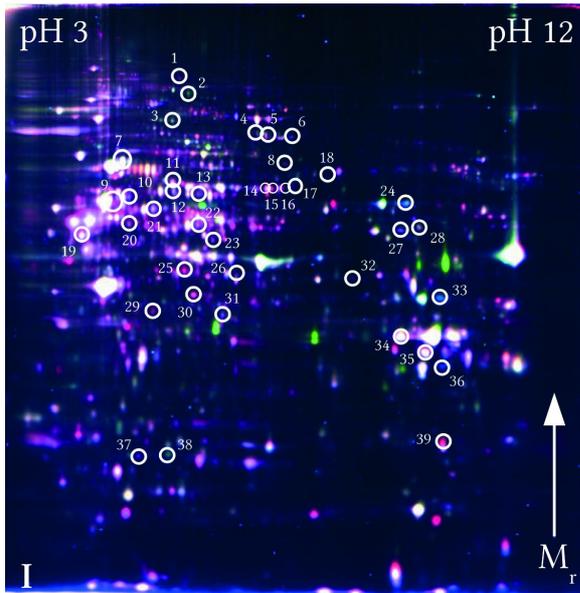


Typ1/Typ2:
+1,8

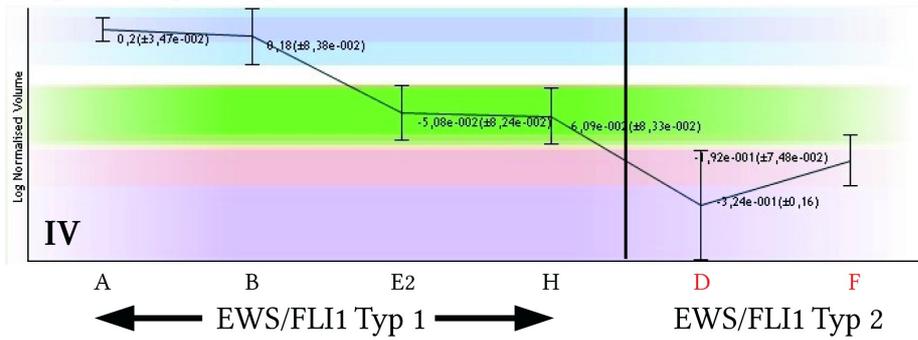
Expressionsprofil Spot Nr.24: Nicht identifiziertes Protein



Typ1/Typ2:
+2,0

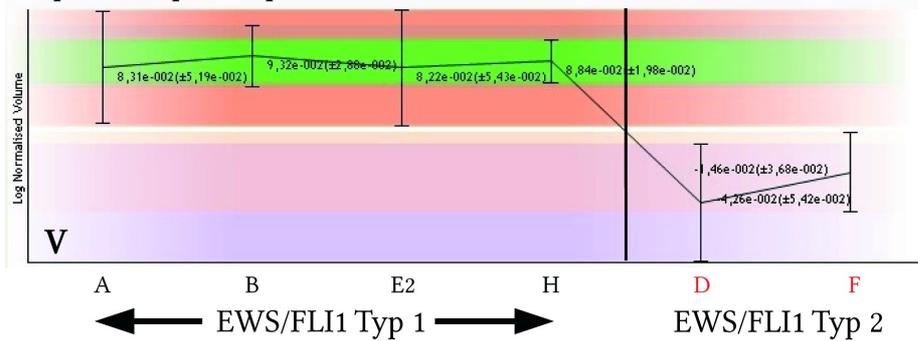


Expressionsprofil Spot Nr.25: Nicht identifiziertes Protein

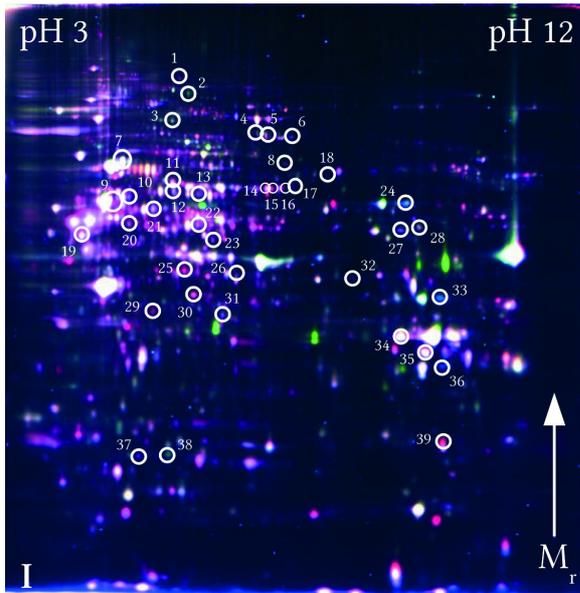


**Typ1/Typ2:
+2,2**

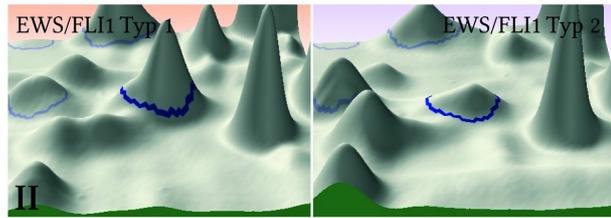
Expressionsprofil Spot Nr.26: Nicht identifiziertes Protein



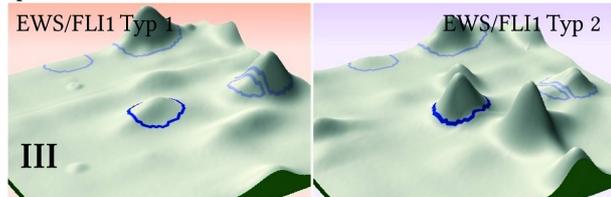
**Typ1/Typ2:
+1,3**



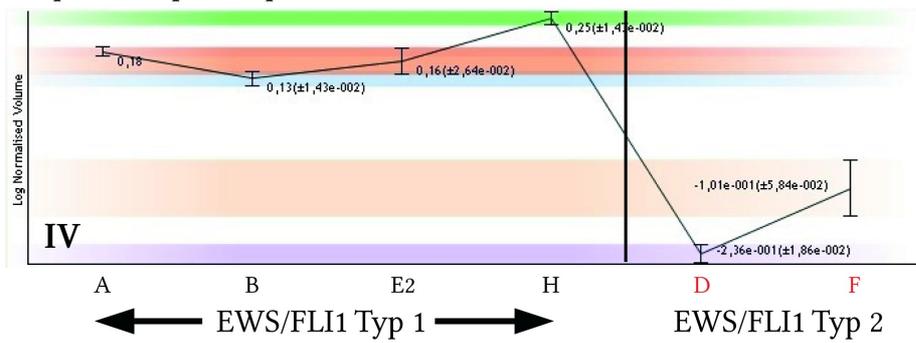
Spot Nr.27: Nicht identifiziertes Protein



Spot Nr.28: Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein

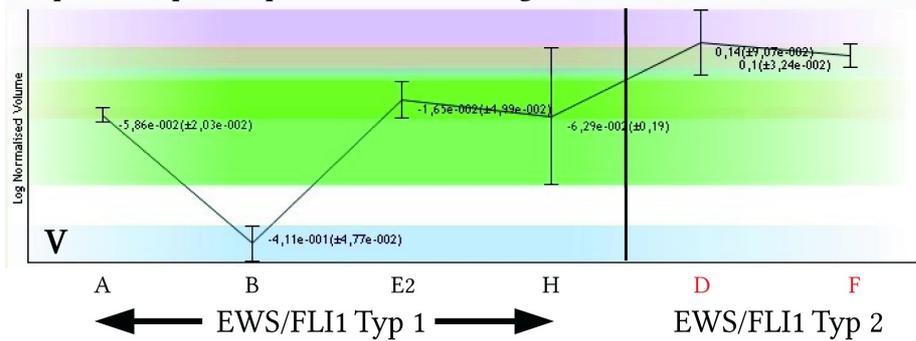


Expressionsprofil Spot Nr.27: Nicht identifiziertes Protein

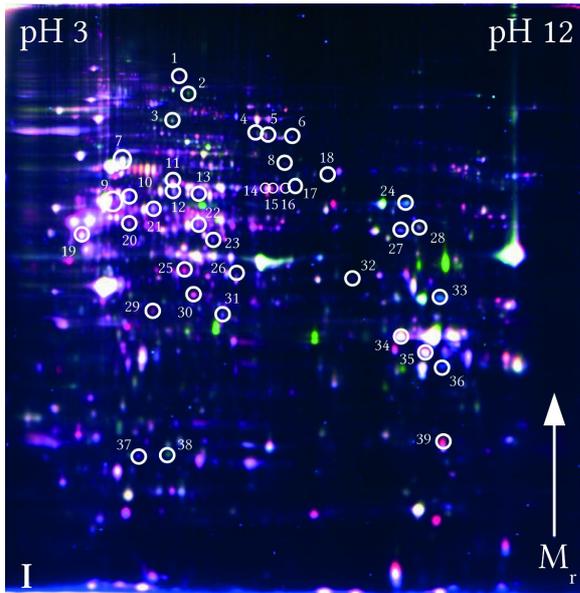


Typ1/Typ2:
+2,3

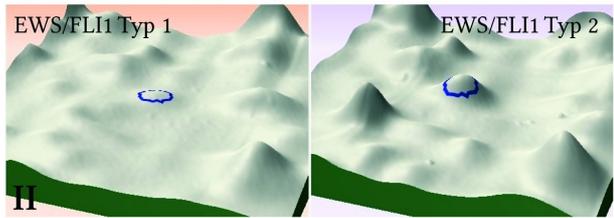
Expressionsprofil Spot Nr.28: Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein



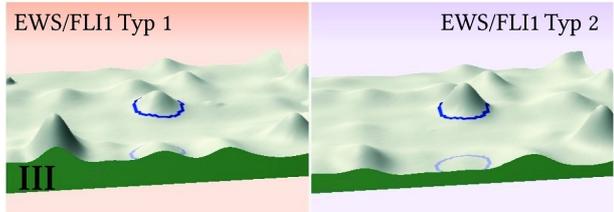
Typ1/Typ2:
-2,0



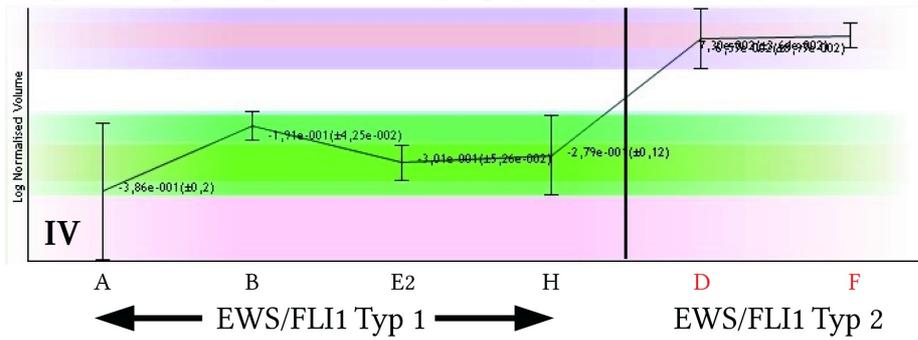
Spot Nr.29: Uroporphyrinogen decarboxylase



Spot Nr.30: Septin-2

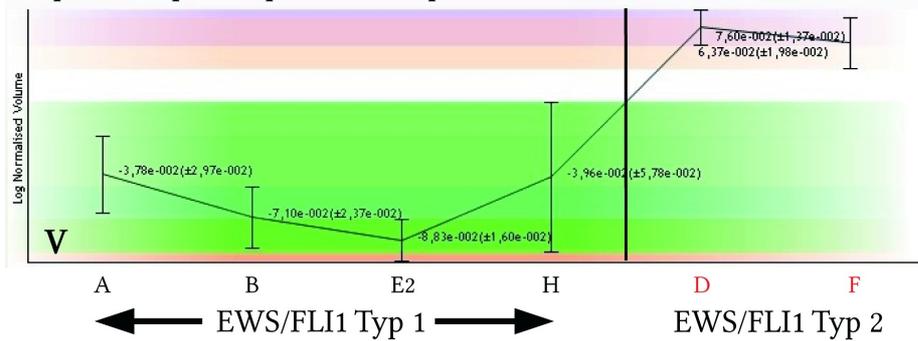


Expressionsprofil Spot Nr.29 Uroporphyrinogen decarboxylase

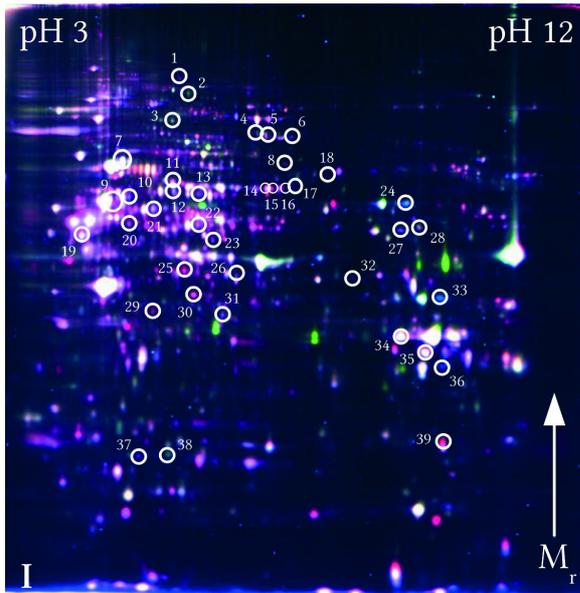


Typ1/Typ2:
-2,3

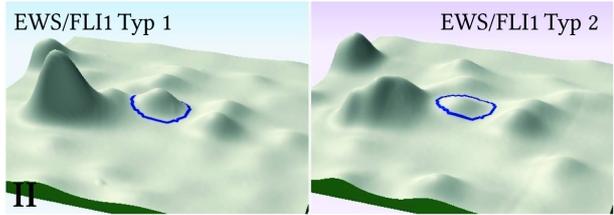
Expressionsprofil Spot Nr.30: Septin-2



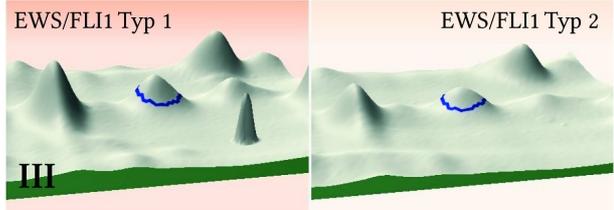
Typ1/Typ2:
-1,4



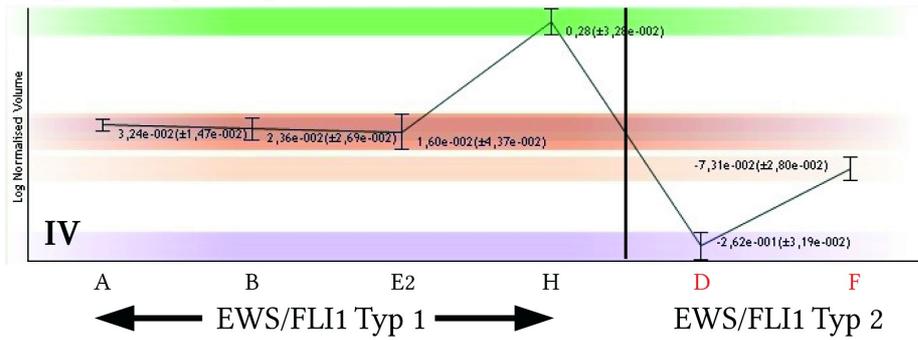
Spot Nr.31: Nicht identifiziertes Protein



Spot Nr.32: Citrate synthase, mitochondrial

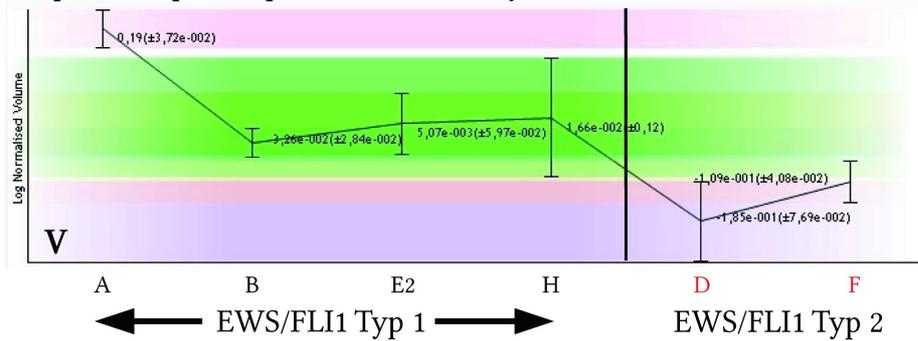


Expressionsprofil Spot Nr.31: Nicht identifiziertes Protein

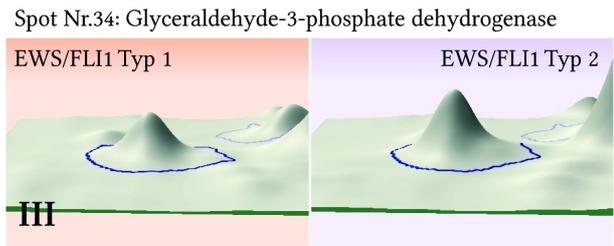
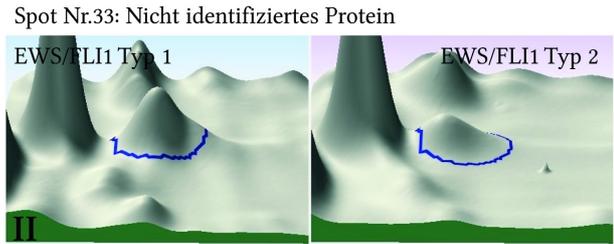
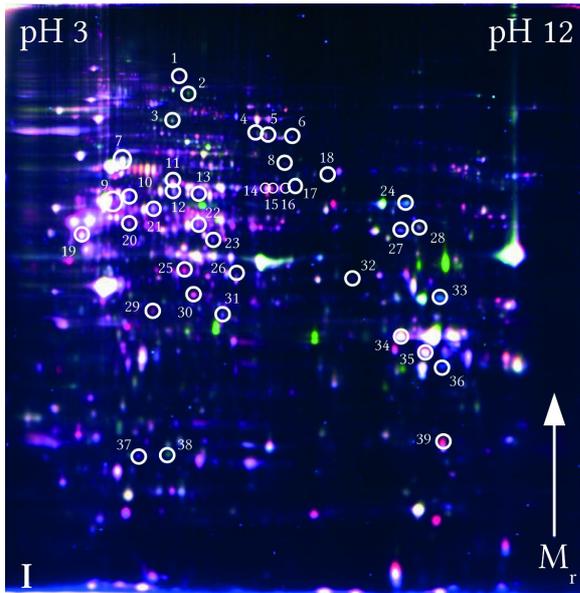


**Typ1/Typ2:
+1,9**

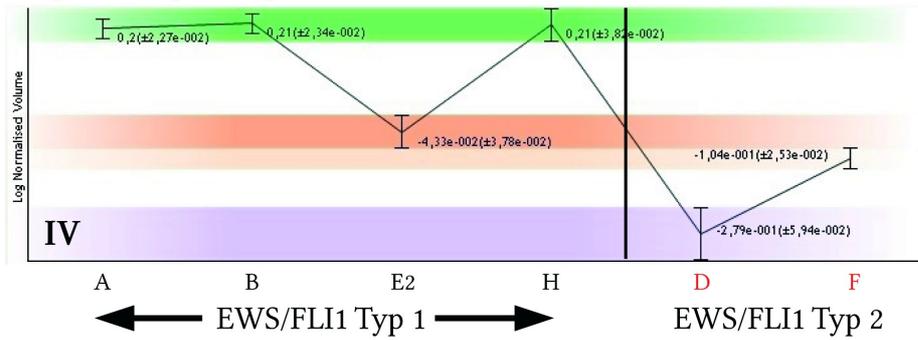
Expressionsprofil Spot Nr.32: Citrate synthase, mitochondrial



**Typ1/Typ2:
+1,6**

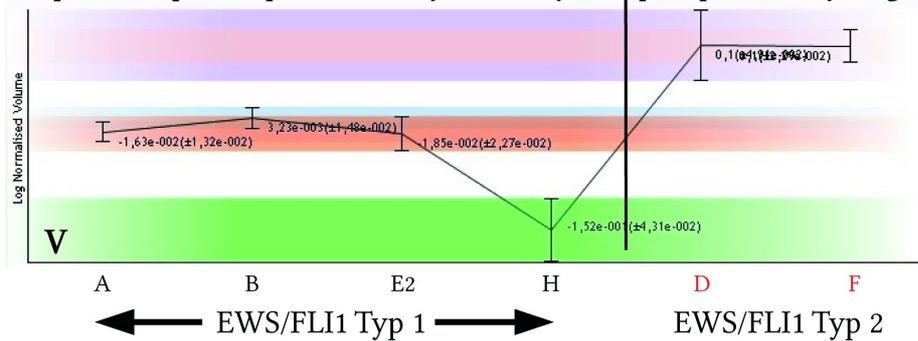


Expressionsprofil Spot Nr.33: Nicht identifiziertes Protein

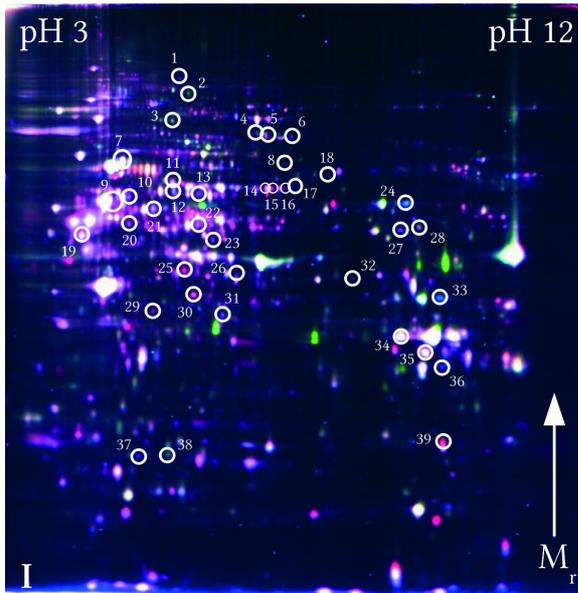


**Typ1/Typ2:
+2,3**

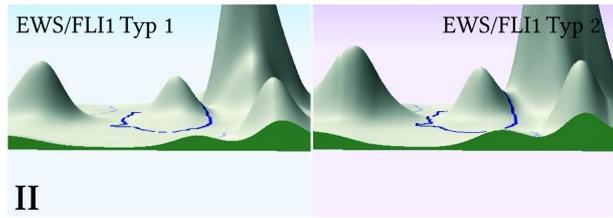
Expressionsprofil Spot Nr.34: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



**Typ1/Typ2:
-1,4**

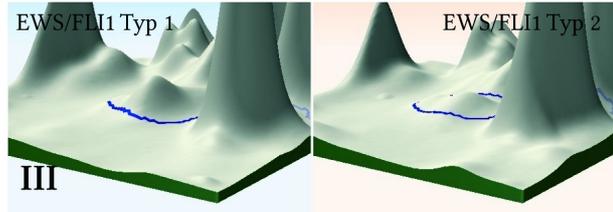


Spot Nr.35: Nicht identifiziertes Protein



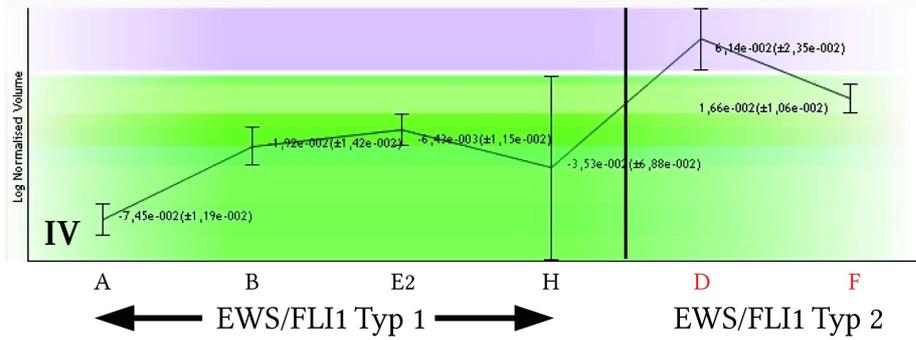
II

Spot Nr.36: L-lactate dehydrogenase A chain



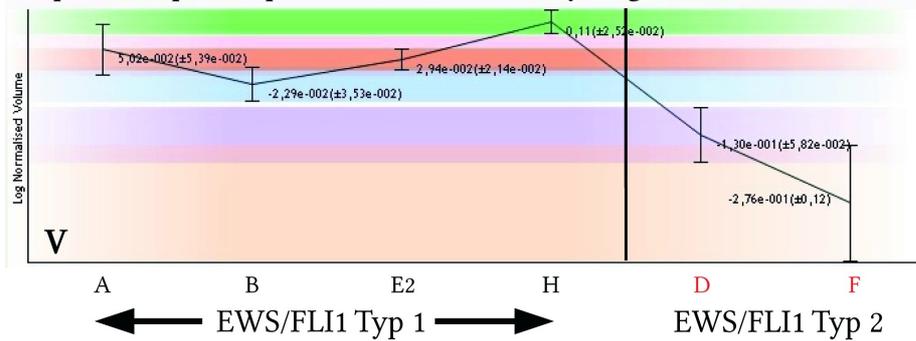
III

Expressionsprofil Spot Nr.35: Nicht identifiziertes Protein

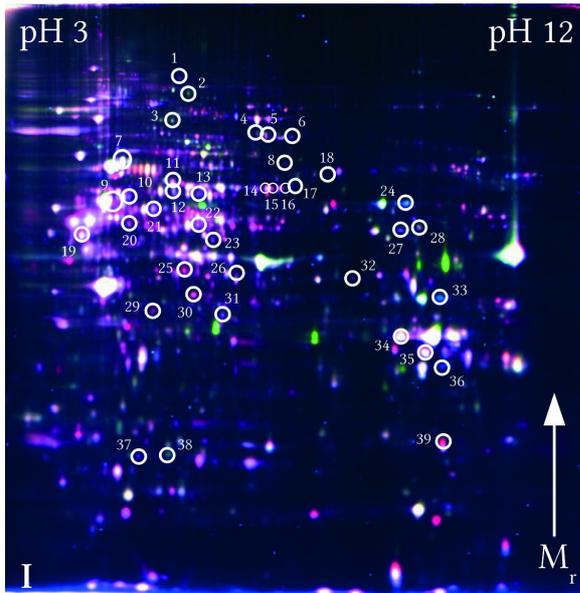


Typ1/Typ2:
-1,2

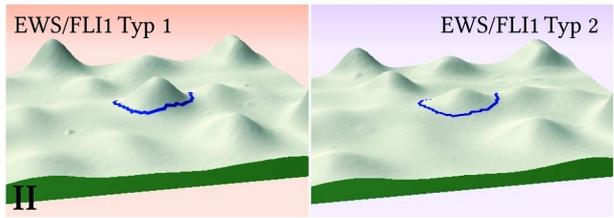
Expressionsprofil Spot Nr.36: L-lactate dehydrogenase A chain



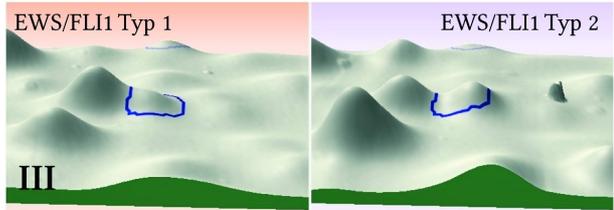
Typ1/Typ2:
+1,8



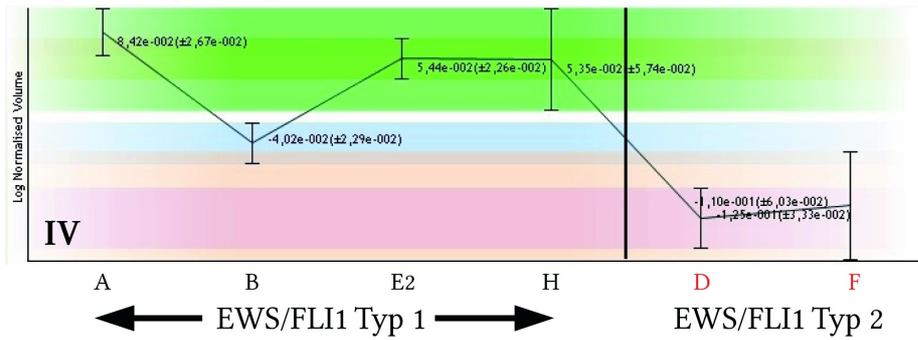
Spot Nr.37: Nicht identifiziertes Protein



Spot Nr.38: Nicht identifiziertes Protein

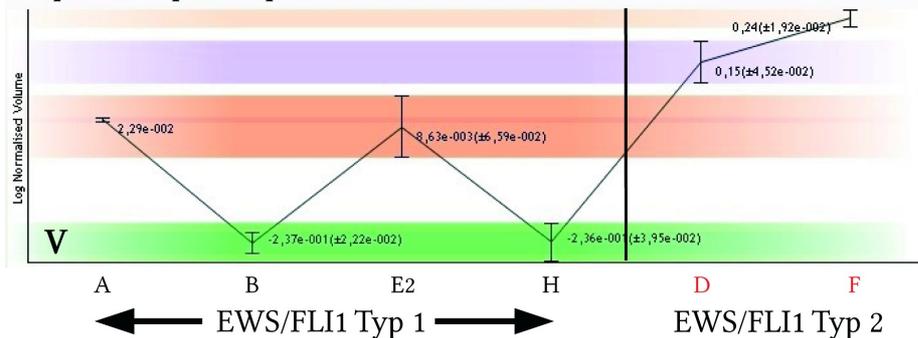


Expressionsprofil Spot Nr.37: Nicht identifiziertes Protein

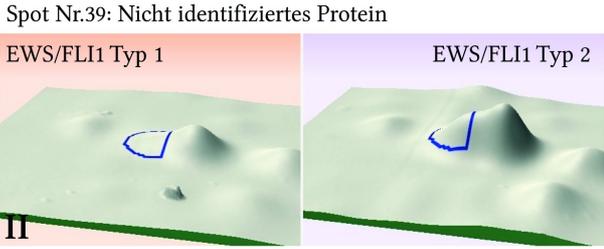
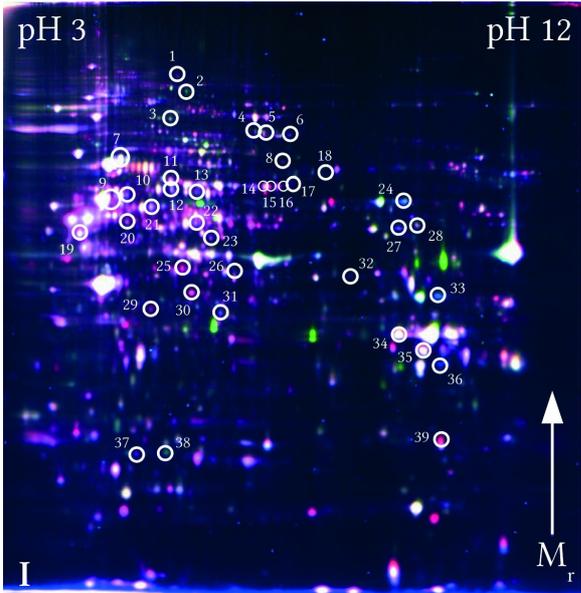


Typ1/Typ2:
+1,5

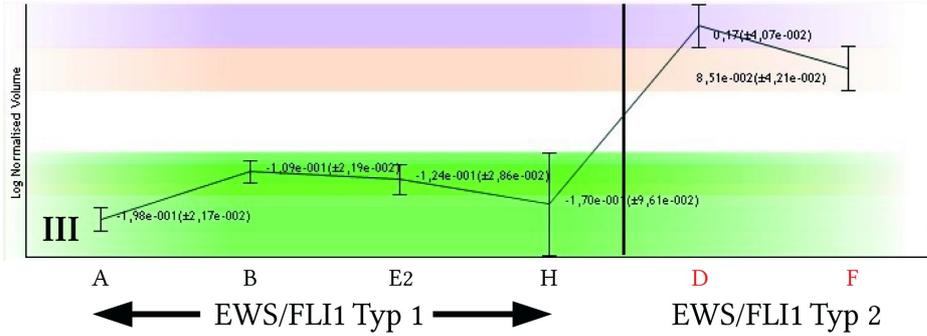
Expressionsprofil Spot Nr.38: Nicht identifiziertes Protein



Typ1/Typ2:
-2,1



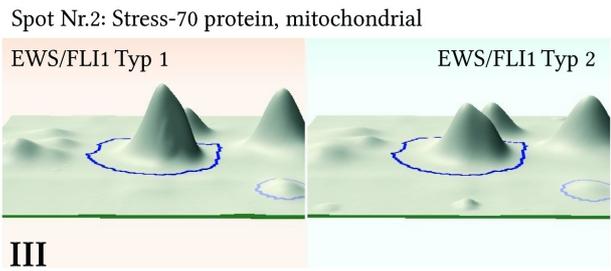
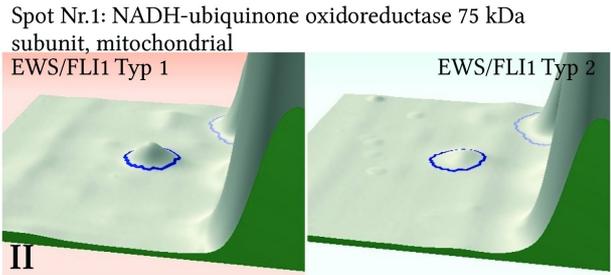
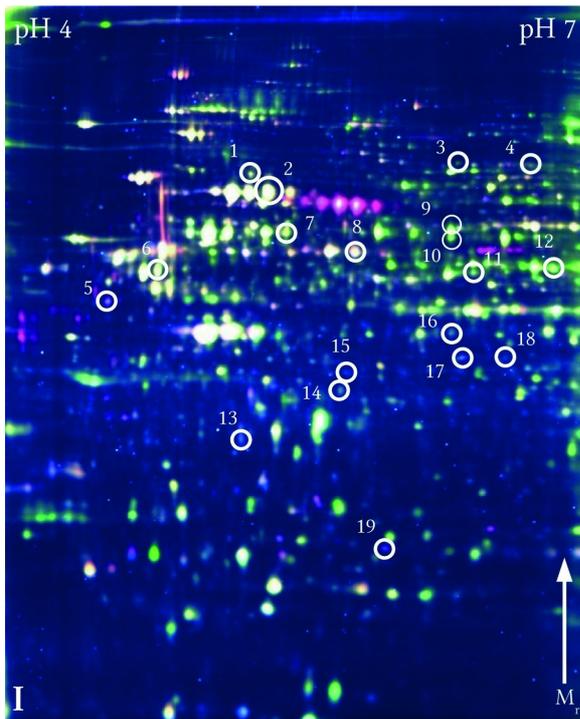
Expressionsprofil Spot Nr.39: Nicht identifiziertes Protein



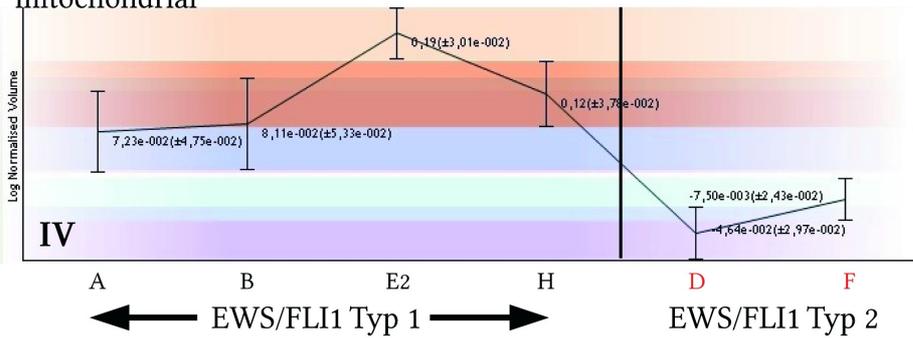
Typ1/Typ2:
-1,9

Anhang IV Differentiell regulierte Proteine EWS/FLI1 Typ1/Typ2 mit IPG 4-7

Nachfolgend sind die grafischen Darstellungen der zwischen EWS/FLI1 Typ1 und Typ2 differentiell exprimierten Proteinen im pH-Bereich 4-7 aufgeführt.

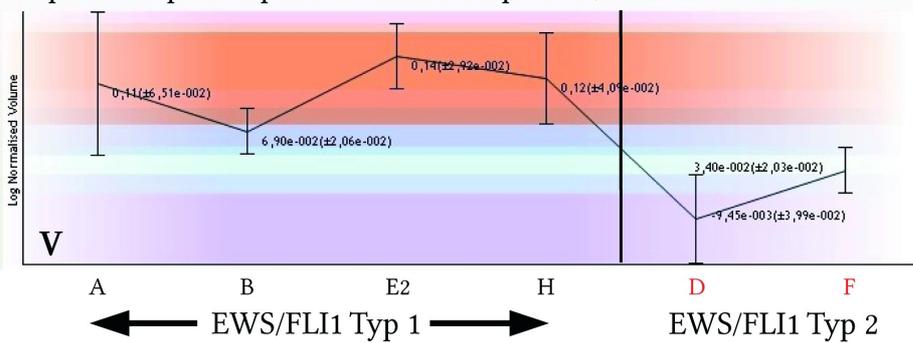


Expressionsprofil Spot Nr.1: NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial

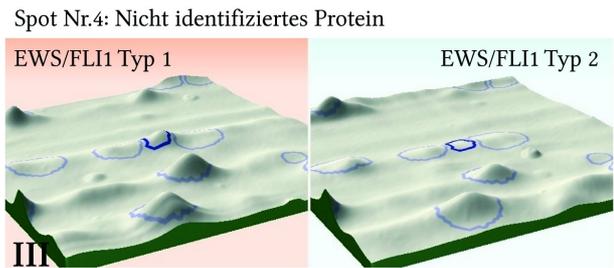
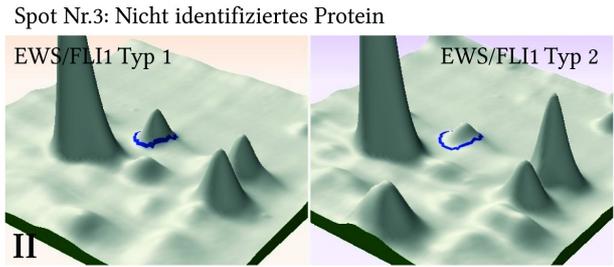
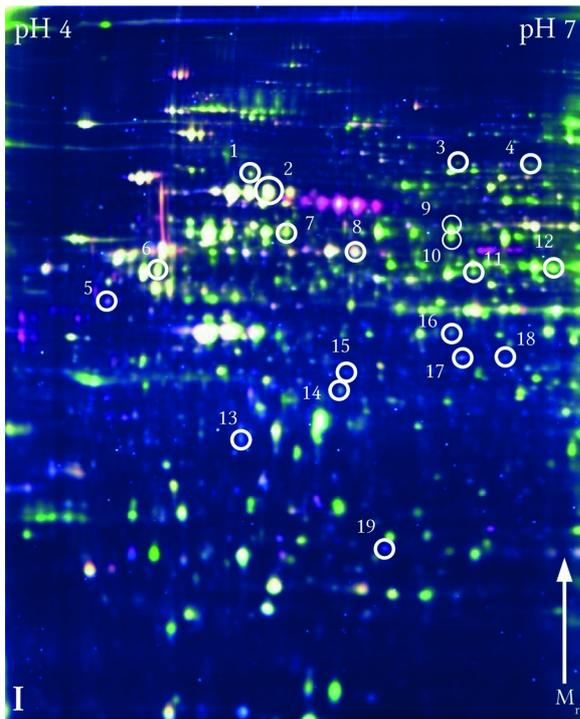


Typ1/Typ2:
+1,4

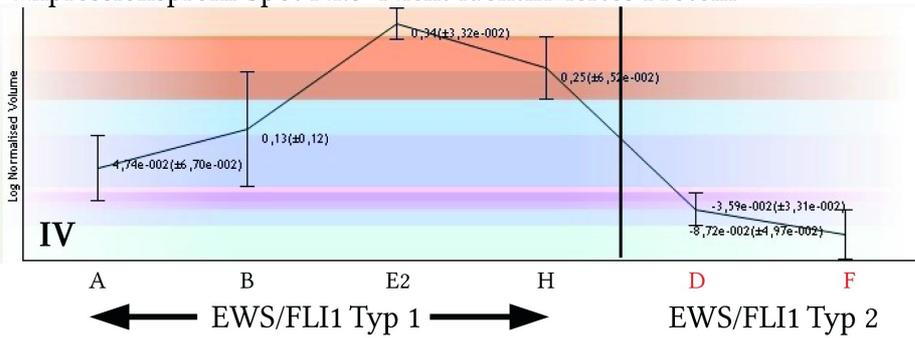
Expressionsprofil Spot Nr.2: Stress-70 protein, mitochondrial



Typ1/Typ2:
+1,3

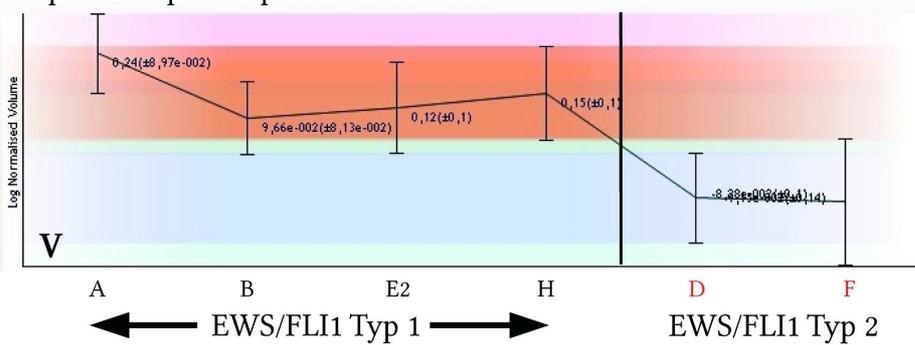


Expressionsprofil Spot Nr.3: Nicht identifiziertes Protein

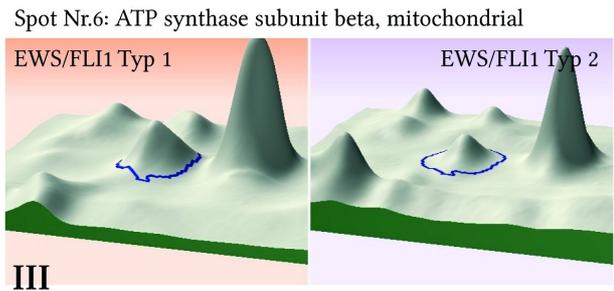
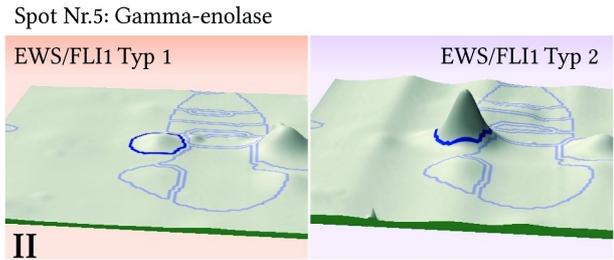
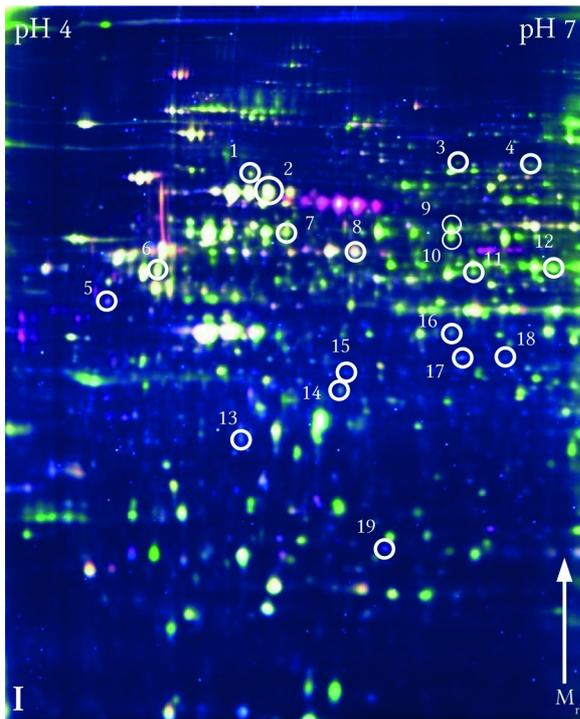


**Typ1/Typ2:
+1,9**

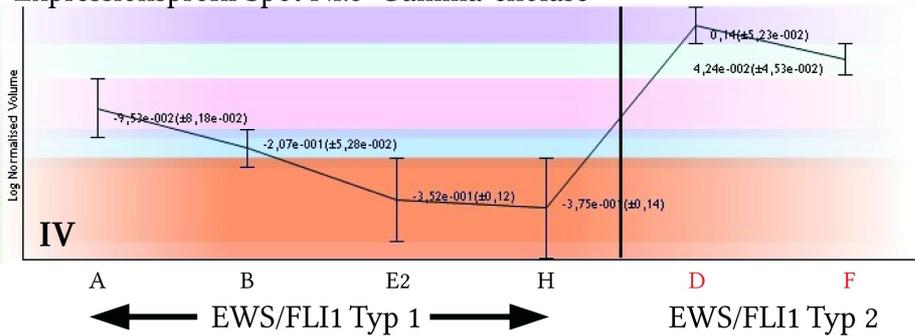
Expressionsprofil Spot Nr.4: Nicht identifiziertes Protein



**Typ1/Typ2:
+1,7**

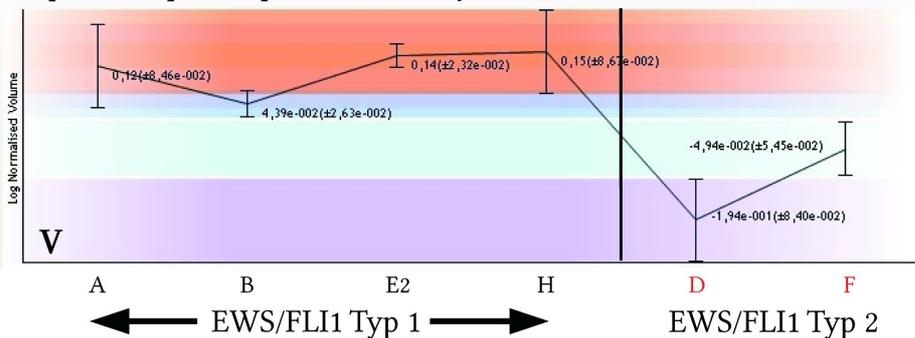


Expressionsprofil Spot Nr.5: Gamma-enolase

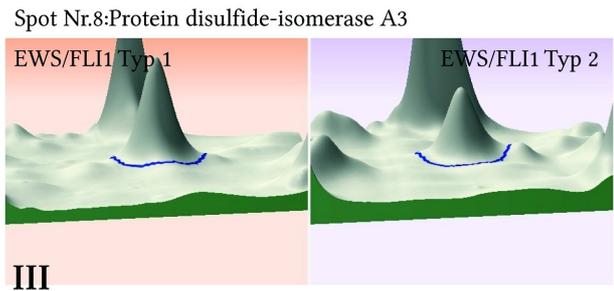
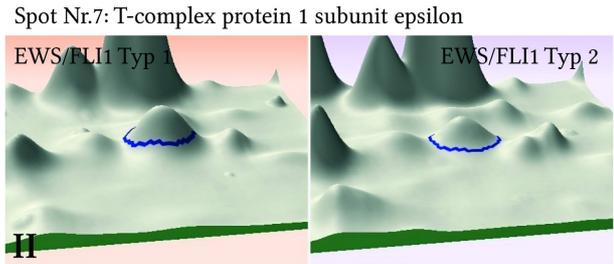
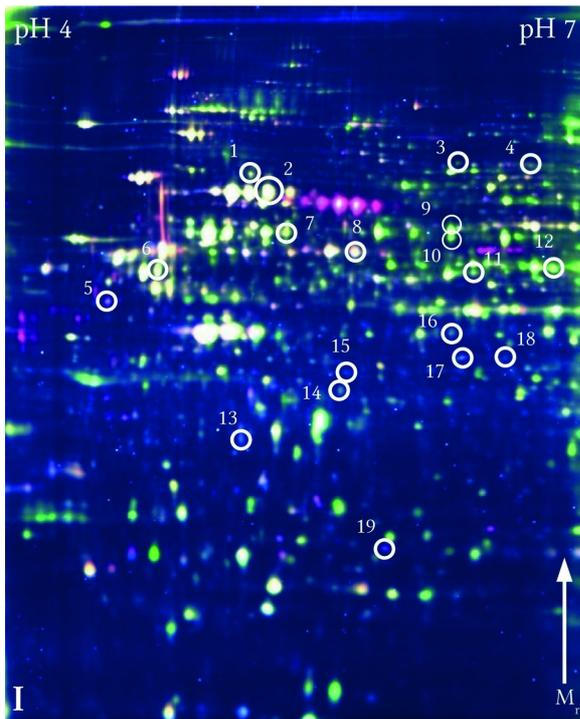


Typ1/Typ2:
-2,3

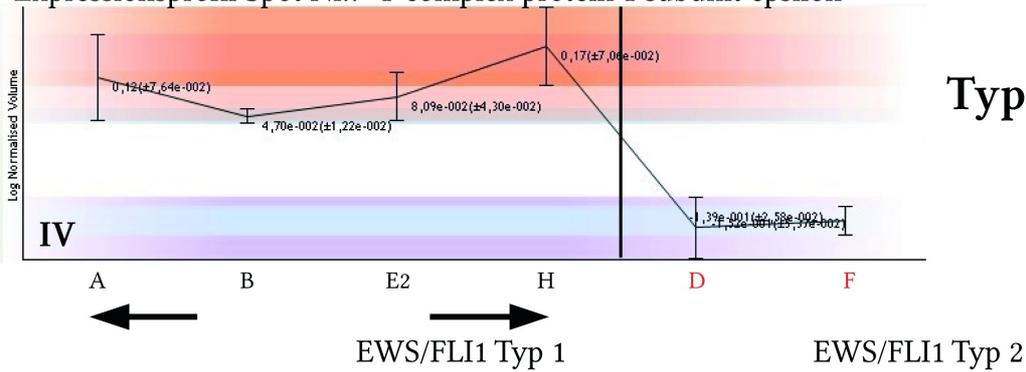
Expressionsprofil Spot Nr.6: ATP synthase subunit beta, mitochondrial



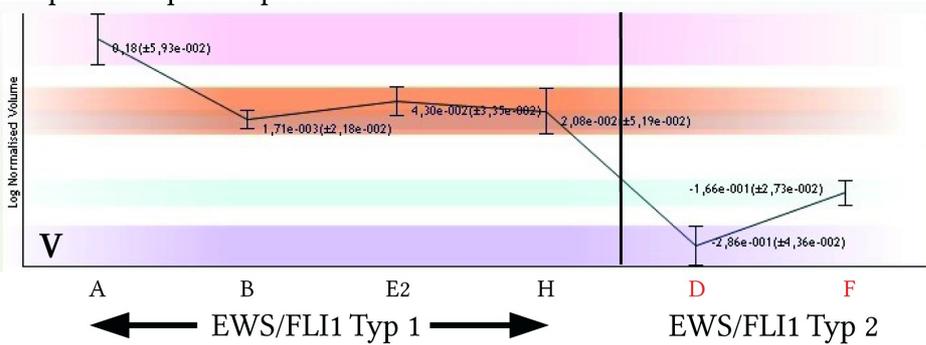
Typ1/Typ2:
+1,8

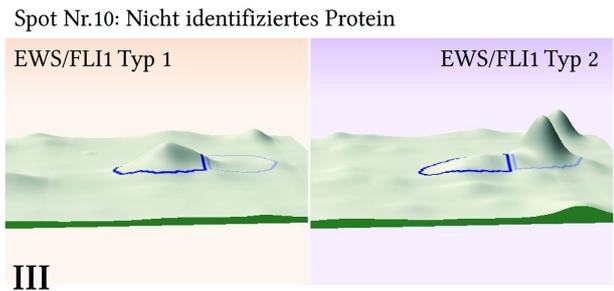
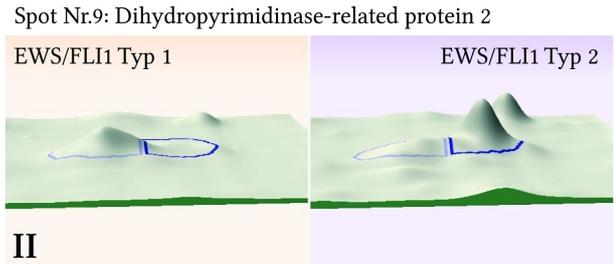
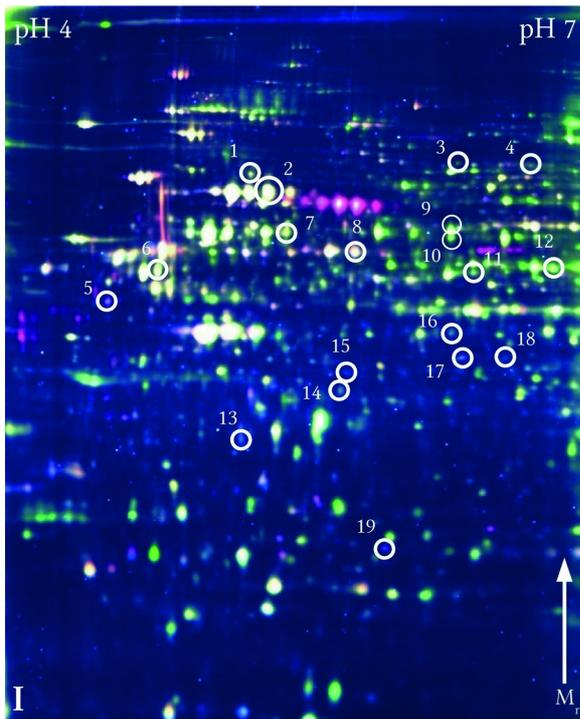


Expressionsprofil Spot Nr.7: T-complex protein 1 subunit epsilon

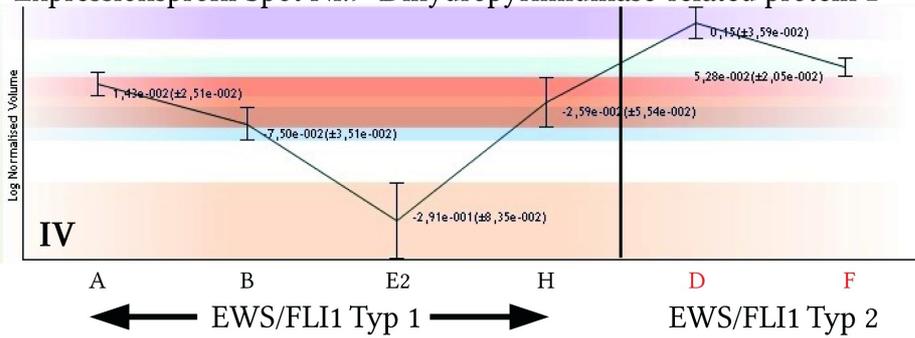


Expressionsprofil Spot Nr.8: Protein disulfide-isomerase A3



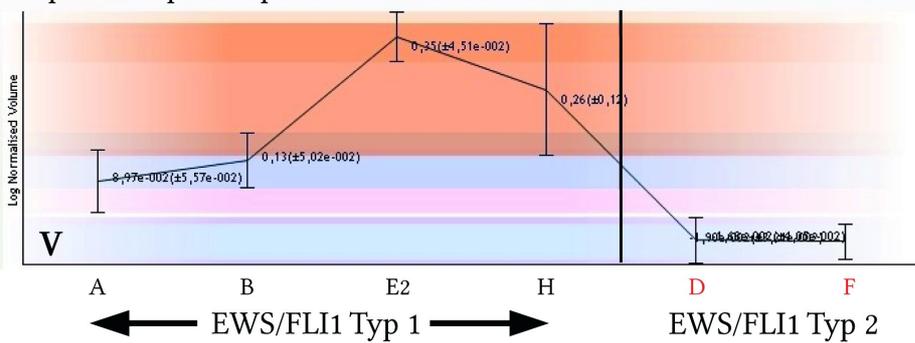


Expressionsprofil Spot Nr.9: Dihydropyrimidinase-related protein 2

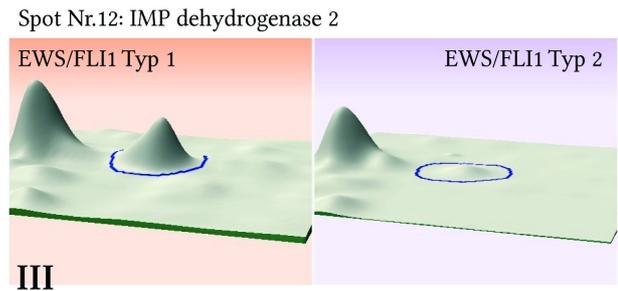
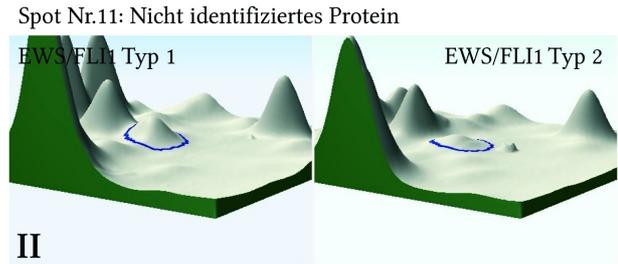
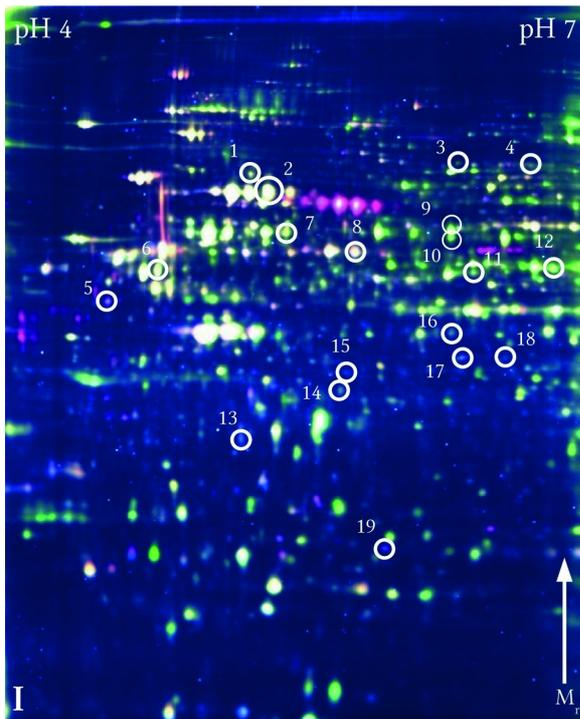


Typ1/Typ2:
-1,7

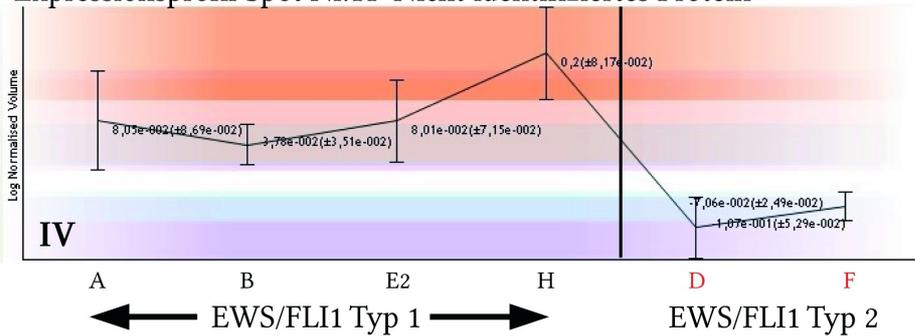
Expressionsprofil Spot Nr.10: Nicht identifiziertes Protein



Typ1/Typ2:
+1,7

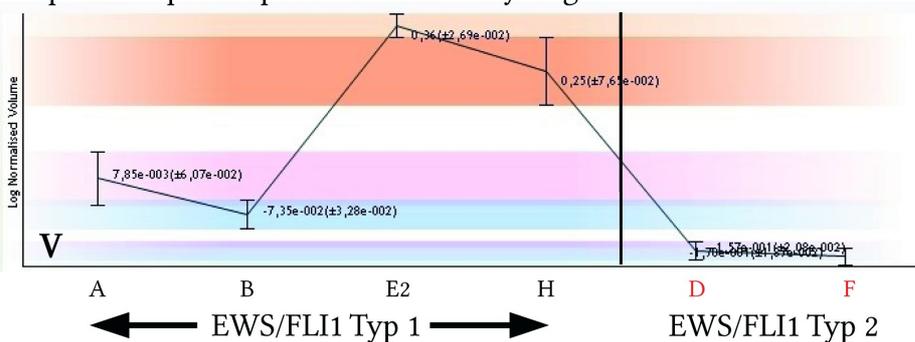


Expressionsprofil Spot Nr.11: Nicht identifiziertes Protein

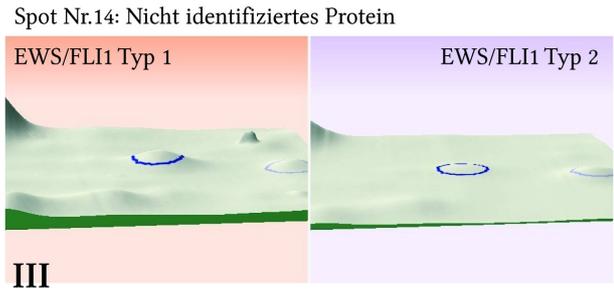
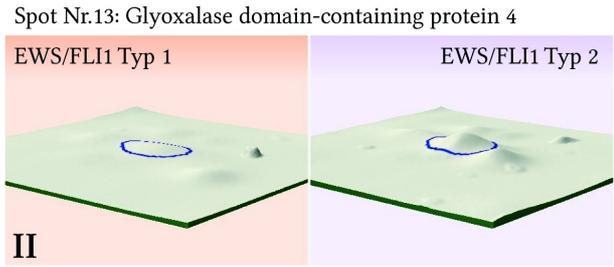
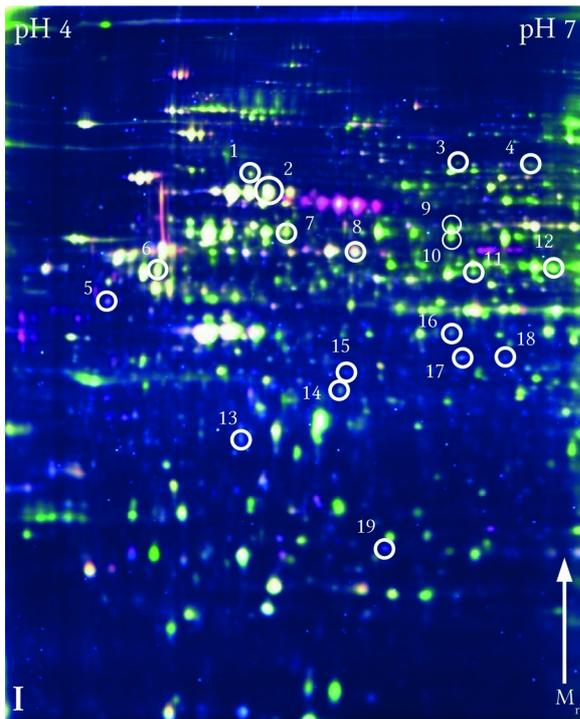


**Typ1/Typ2:
+1,6**

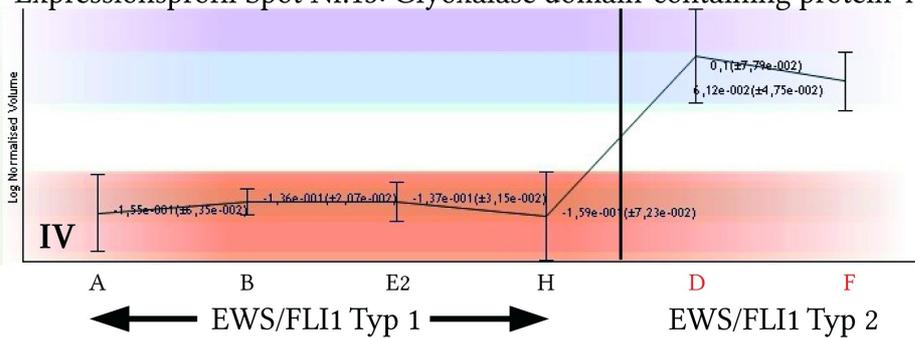
Expressionsprofil Spot Nr.12: IMP dehydrogenase 2



**Typ1/Typ2:
+2,2**

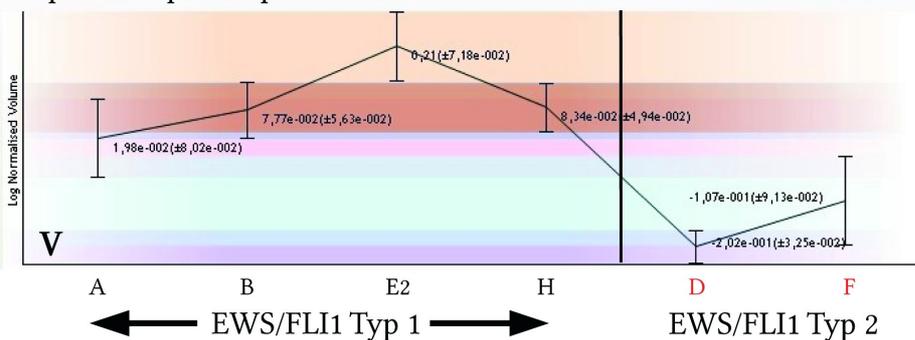


Expressionsprofil Spot Nr.13: Glyoxalase domain-containing protein 4

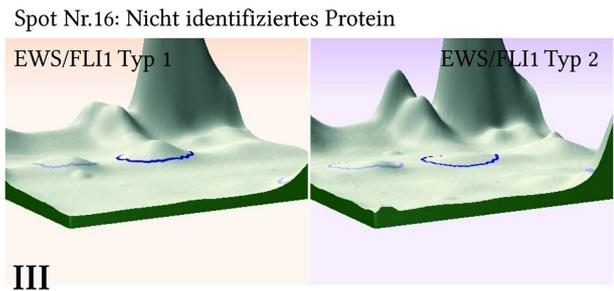
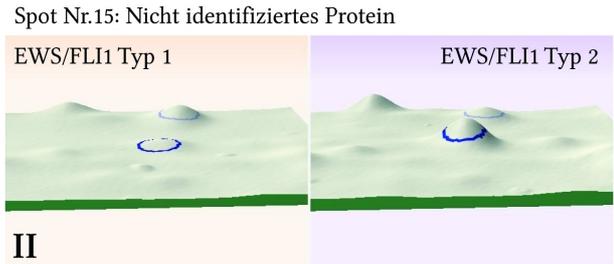
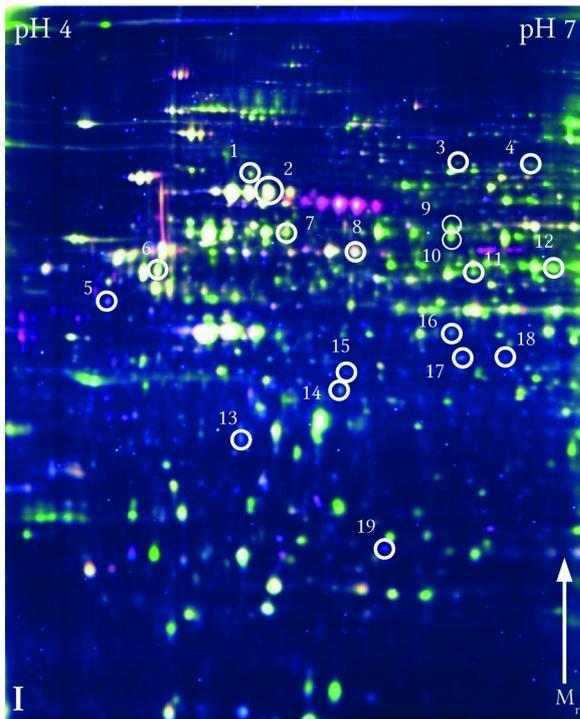


Typ1/Typ2:
-1,7

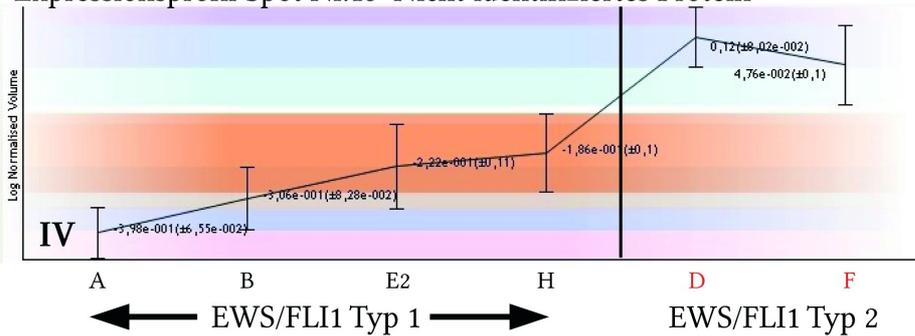
Expressionsprofil Spot Nr.14: Nicht identifiziertes Protein



Typ1/Typ2:
+1,8

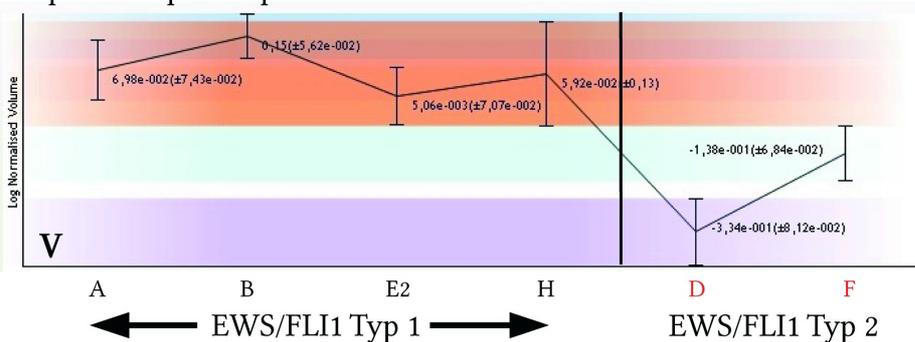


Expressionsprofil Spot Nr.15: Nicht identifiziertes Protein

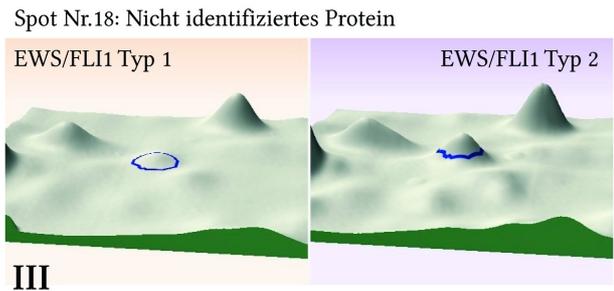
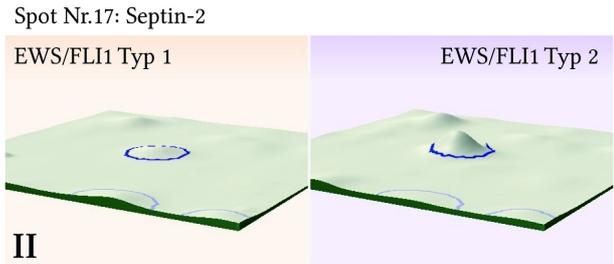
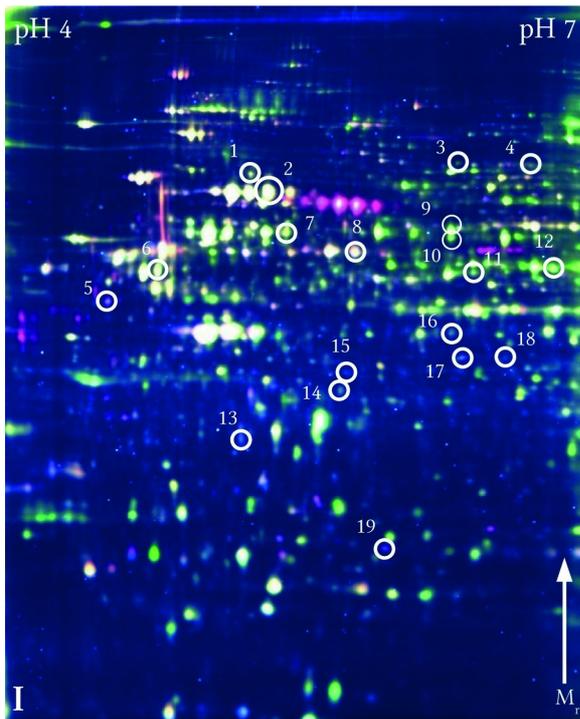


Typ1/Typ2:
-2,4

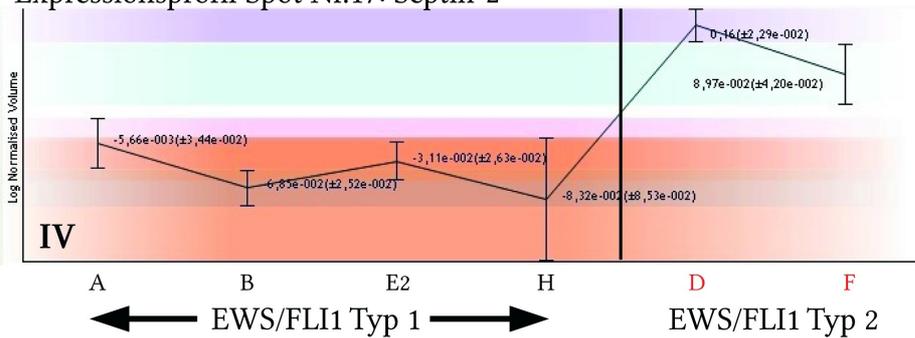
Expressionsprofil Spot Nr.16: Nicht identifiziertes Protein



Typ1/Typ2:
+2,1

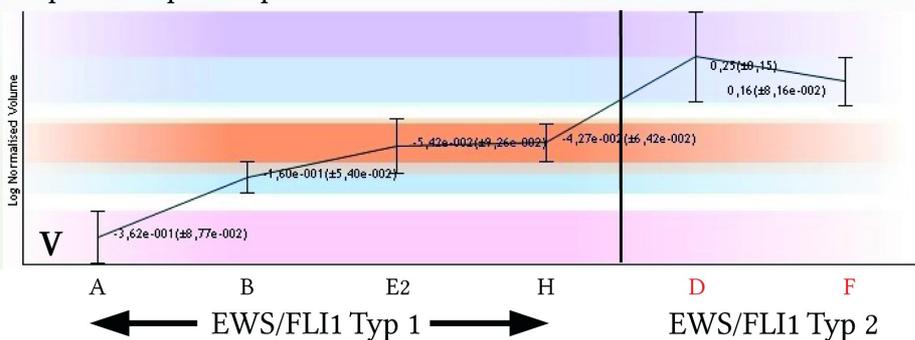


Expressionsprofil Spot Nr.17: Septin-2

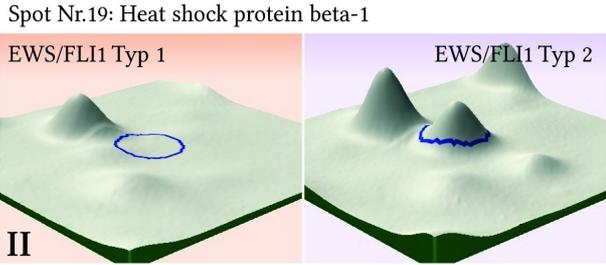
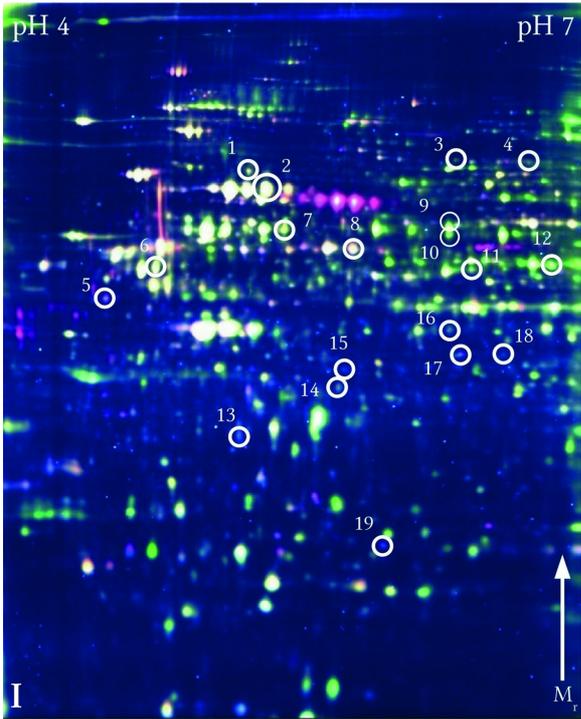


Typ1/Typ2:
-1,5

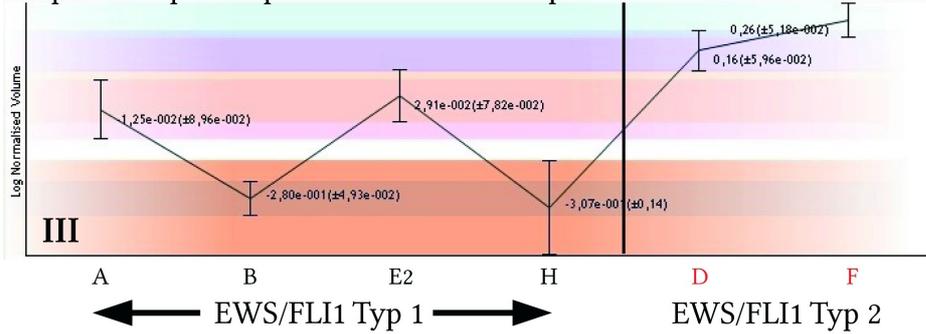
Expressionsprofil Spot Nr.18: Nicht identifiziertes Protein



Typ1/Typ2:
-2,5



Expressionsprofil Spot Nr.19: Heat shock protein beta-1



Typ1/Typ2:
-2,4

Anhang V Abkürzungsverzeichnis der Proteinklassen

Proteinklasse	Abkürzung
Candidate cancer biomarkers	Cb
Plasma proteins	Pp
Candidate cardiovascular disease genes	Cc
UniProt - no evidence at protein level	Up
Mutated genes in cancer	Cm
Kinases	Ki
AGC Ser/Thr protein kinases	Kg
CAMK Ser/Thr protein kinases	Kc
CK1 Ser/Thr protein kinases	Kk
CMGC Ser/Thr protein kinases	Km
NEK Ser/Thr protein kinases	Kn
RGC receptor guanylate cyclase kinases	Kr
STE Ser/Thr protein kinases	Ks
TKL Ser/Thr protein kinases	Kl
Tyr protein kinases	Kt
Atypical kinases	Ka
Transporters	Tr
Transporter channels and pores	Tc
Electrochemical Potential-driven transporters	Te
Primary Active Transporters	Tp
Transport Electron Carriers	Tt
Accessory Factors Involved in Transport	Ta
Peptidases	Pe
Aspartic-type peptidases	Pa
Cysteine-type peptidases	Pc
Metallopeptidases	Pm
Serine-type peptidases	Ps
Threonine-type peptidases	Pt
G-protein coupled receptors	Gr
Adenosine and adenine nucleotide receptors	Ga
Chemokines and chemotactic factors receptors	Gh
Lysolipids receptors	Gl
Odorant/olfactory and gustatory receptors	Go
Opsins	Gi
Serotonin receptors	Gs
Family 2 (B) receptors	Gb
Family T2R receptors (taste receptor GPCRs)	Gt
Family fz/smo receptors	Gf
GPCRs excl olfactory receptors	Gp
Enzymes	Ez
Oxidoreductases	Eo
Transferases	Et
Hydrolases	Eh
Lyases	Ey
Isomerase	Ei
Ligase	El
Voltage-gated ion channels	Ic
Calcium-Activated Potassium Channels	Id
CatSper and Two-Pore Channels	Ie
Cyclic Nucleotide-Regulated Channels	If
Inwardly Rectifying Potassium Channels	Ig
Transient Receptor Potential Channels	Ih
Two-P Potassium Channels	Ii
Voltage-Gated Calcium Channels	Ij
Voltage-Gated Potassium Channels	Ik
Voltage-Gated Sodium Channels	Il

Anhang VI Geräteliste

Autoklav	Tuttnauer, New York, USA
DeCyder Software 5.0	GE, Freiburg, Deutschland
Dry Strip Kit	GE, Freiburg, Deutschland
Durchlichtscanner Epson Expression Pro	Epson, Hong Kong, China
Elektrophoresekammer Ettan DALT II	GE, Freiburg, Deutschland
Eppendorf Tubes 1,5 und 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ettan DIGE-Imager	GE, Freiburg, Deutschland
Falcontobes 12 mL	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Fokussierungskammer 2117 Multiphor II	GE, Freiburg, Deutschland
Fokussierungskammer IPGphor	GE, Freiburg, Deutschland
Fokussierungsvorlage "Sephadex"	Werkstatt, Mikrobiologie Lehrstuhl, Universität Greifswald
GelBond PAGFilm (203 mm x 260 mm)	GE, Freiburg, Deutschland
Gießkammer IsoDalt	GE, Freiburg, Deutschland
Gießkammer EttanDalt II System	GE, Freiburg, Deutschland
Glasplatten mit Abstandshalter	GE, Freiburg, Deutschland
Glasplatten für IsoDalt	GE, Freiburg, Deutschland
Glasplatten für EttanDalt	GE, Freiburg, Deutschland
Gradientenmischer (2 x 15 ml)	Werkstatt, Proteomik Lehrstuhl, TU München
Hartgummiwalze	Hama, Monheim, Deutschland
Hebebühne Laborboy	Grauer, Degersheim, Schweiz
IEF- Probenauftragsstreifen	GE, Freiburg, Deutschland
Klammern für Glasplatten	GE, Freiburg, Deutschland
Kühlschrank Bosch froster	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Kühltruhe Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific, Hertfordshire, Irland
Kühlzentrifuge Hermle ZK 401	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laborwaagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer IKA Mini Mr	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Massenspektrometer Ettan MALDI ToF Pro	GE, Freiburg, Deutschland
Mikro-Gradientmischer	GE, Freiburg, Deutschland
Milli-Q System	Millipore, Bedford, MA
Multit-Strip Holder "Manifold"	GE, Freiburg, Deutschland
Papierschneidemaschine Dahle roll+schnitt	Dahle, Coburg, Deutschland
Parafilm (50 cm x 15 m)	ACN, Greenwich, CT, USA
pH-Meter pH 535 Multical	WTW, Weilheim, Deutschland
Progenesis Same Spots Software	Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK
Reswellingtray	GE, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer	Beckman, Fullerton, USA
Striphholder	GE, Freiburg, Deutschland
Thermostat 2219 Multitemp II	LKB Bromma, Texas, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Typhoon 9400 Scanner	GE, Freiburg, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK 102 H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Ultraschallstab 60 W	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortexer Vf 2	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland

Anhang VII Chemikalienliste

Acetonitril	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid	GE, Freiburg, Deutschland
Agarose	Sigma, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat APS	GE, Freiburg, Deutschland
Bromphenolblau	VWR, Darmstadt, Deutschland
2-Butanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
CHAPS	Roche, Mannheim, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma, München, Deutschland
2',2'-Dithiodiethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol DTT	Sigma, München, Deutschland
Dry Strip Cover Fluid	GE, Freiburg, Deutschland
Essigsäure 100 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Filterkarton für Elektrodenstreifen MN 440	Macherey, Nagel & Co., Oensingen, Schweiz
Flamingo Fluorescent Stain	BioRad, Hercules, USA
Formaldehyd 37 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Octyl- β -D-Glucopyranosid	Sigma, München, Deutschland
Glutardialdehyd 25 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glycerol 100 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Harnstoff	VWR, Darmstadt, Deutschland
Immobiline II pK 1,0	Fluka, Buchs, Schweiz
Immobiline II pK 3,1	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 3,6	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 4,6	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 6,2	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 7,0	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 8,5	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 9,3	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 10,3	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 13	Sigma, München, Deutschland
Iodacetamid	Sigma, München, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kerosin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Flachbettionenaustauscher Serolit MB-1	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N'-Methylbisacrylamid 2x cryst.	GE, Freiburg, Deutschland
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Natronlaugeplätzchen	VWR, Darmstadt, Deutschland
NP-40 Substitut	Fluka, Buchs, Schweiz
Pefabloc SC PLUS	Roche, Mannheim, Deutschland
Pharmalyte, pH 3-10	GE, Freiburg, Deutschland

Pharmalyte, pH 8-10,5	GE, Freiburg, Deutschland
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ProQ Diamond	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
ProQ Emerald	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
2DE Quant Kit	GE, Freiburg, Deutschland
Repel-Silane	GE, Freiburg, Deutschland
Salpetersäure 65 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Sephadex G200 SF	GE, Freiburg, Deutschland
Servalyte 2-11	Serva, Heidelberg, Deutschland
Servalyte 9-11	Serva, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure 25 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Siliconöl DC 200 fluid	Serva, Heidelberg, Deutschland
TEMED	BioRad, München, Deutschland
Thioharnstoff	VWR, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma, München, Deutschland
Trizma Base	Sigma, München, Deutschland

Literaturverzeichnis

- 1: MS Staeger et al.: "DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets"; *Cancer Res*: 64; 8213–8221, 2004
- 2: T Triche, FB Askin, JM Kissane: "Neuroblastoma, Ewing Sarcoma and the differential diagnosis of small- round- blue-cell tumor"; *Pathology of neoplasia in children and adolescents: M Finegold* ; 145–195
- 3: C Zanini, F Pulerà, F Carta, G Giribaldi, G Mandili, MM Maule, M Forni, F Turrini: "Proteomic identification of heat shock protein 27 as a differentiation and prognostic marker in neuroblastoma but not in Ewing's sarcoma"; *Virchows Arch*: 452; 157–167, 2008
- 4: LN Johnson, D Barford: "The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins"; *Annu Rev Biophys Biomol Struct*: 22; 199–232, 1993
- 5: T Pawson: "Protein modules and signaling networks"; *Nature*: 373; 573–580, 1995
- 6: HH Freeze: "Genetic defects in the human glycome"; *Nature Reviews Genetics*: 7; 537–551, 2006
- 7: M Demetriou, M Granovsky, S Quaggin, JW Dennis: "Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation"; *Nature*: 409; 733–739, 2001
- 8: S Wopereis, DJ Lefeber, E Morava, RA Wevers: "Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review."; *Clin. Chem*: 52; 574–600, 2006
- 9: J Jaeken: "Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it!"; *J. Inherit. Metab. Dis.*: 26; 99–118, 2003
- 10: F Muntoni: "Journey into muscular dystrophies caused by abnormal glycosylation"; *Acta Myol*: 23; 79–84, 2004
- 11: RG Spiro: "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds"; *Glycobiology*: 12; 43R–56R, 2002
- 12: A Görg, G Boguth, A Köpf, G Reil, H Parlar, W Weiss: "Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels"; *Proteomics*: 2; 1652–1657, 2002
- 13: A Görg, C Lück, W Weiss: "Sample Prefractionation in granulated Sephadex IEF-Gels"; *Methods in Molecular Biology: Sample Prefractionation and Fractionation for 2D PAGE/Proteomics: Methods and Protocols* ; , 2007
- 14: A Görg, W Weiss, MJ Dunn: "Current two-dimensional electrophoresis technology for

proteomics"; *Proteomics*: 4; 3665-3685, 2004

15: GL Corthals, VC Wasinger, DF Hochstrasser, JC Sanchez: "Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects."; *Electrophoresis*: 21; 1104-1115, 2000

16: MR Wilkins, E Gasteiger, JC Sanchez, A Bairoch, DF Hochstrasser: "Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: The effects of protein hydrophobicity and copy number"; *Electrophoresis*: 19; 1501-1505, 1998

17: S Wolff, H Antelmann, D Albrecht, D Becher, J Bernhardt, S Bron, K Büttner, JM van Dijl, C Eymanna, A Otto, LT Tama, M Hecker: "Towards the entire proteome of the model bacterium *Bacillus subtilis* by gel-based and gel-free approaches"; *J. Chromatogr. B*: 849; 129-140, 2007

18: C Lück: "Methodische Arbeiten zur Analyse des Gesamtproteoms von *Corynebacterium glutamicum*"; *Dissertation*: ; , 2008

19: A Lücke : "Beiträge zur Geschwulstlehre"; *Virchows Arch. f. path. Anat.*: 35; 524, 1866

20: Hildebrand: "Über das tubuläre Angiosarkom oder Endotheliom des Knochens"; *Deutsche Zeitschrift f. Chir.*: 31; 263, 1890

21: J Ewing: "Diffuse endothelioma of bone"; *Proc NY Pathol Soc*: 21; 17-24, 1921

22: J Ewing: "Further report on endothelial myeloma of bone"; *Proc NY Pathol Soc*: 34; 93, 1924

23: J Ewing: "A review and classification of bone tumors"; *Surg Gyn Obstet*: 68; 971-976, 1939

24: H Kovar: "Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union"; *Curr Opin Oncol*: 10; 334-342, 1998

25: ME Nesbit Jr, EA Gehan, EO Burgert Jr, TJ Vietti, A Cangir, M Tefft, R Evans, P Thomas, FB Askin, JM Kissane, Multimodal therapy for the management of primary, nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone: A long-term follow-up of the First Intergroup study, 1990

26: DM Parkin, CA Stiller, GJ Draper, CA Bieber: "The international incidence of childhood cancer"; *Int J Cancer*: 42; 511-520, 1988

27: J Zucman-Rossi, MA Batzer, M Stoneking, O Delattre, G Thomas: "Interethnic polymorphism of EWS intron 6: Genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination"; *Hum Genet*: 99; 357-363, 1997

28: HW Hense, S Ahrens, M Paulussen, M Lehnert, H Jürgens: "Deskriptive Epidemiologie der Ewing-Tumoren - Analysen der deutschen Patienten von (EI)CESS 1980-1997"; *Klin Pädiatr*: 211; 271-275, 1999

- 29: ME Nesbit:"Ewing's Sarcoma"; CA Cancer J Clin: 26; 174-180, 1976
- 30: SJ Cotterill, S Ahrens, M Paulussen, HF Jürgens, PA Voûte, H Gadner, AW Craft:"Prognostic Factors in Ewing's Tumor of Bone: Analysis of 975 Patients From the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group"; J Clin Oncol: 18; 3108-3114, 2000
- 31: M Zielenska, MZ Zong, NG Kwang, P Marrano, J Bayani, OC Ramirez, P Sorensen, P Thorner, M Greenberg, JA Squire : "Acquisition of Secondary Structural Chromosomal Changes in Pediatric Ewing Sarcoma is a Probable Prognostic Factor for Tumor Response and Clinical Outcome"; Cancer: 91; 2156-2164, 2001
- 32: M Paulssen, S Ahrens, G Braun-Munzinger, AW Craft, B Dockhorn-Dworniczak, W Dörffel, J Dunst, B Fröhlich, U Göbel, M Häussler, T Klingebiel, E Koscielniak, U Mittler, C Rube, W Winkelmann, PA Voûte, A Zoubek, H Jürgens : "EICESS 92 (European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study) – Erste Ergebnisse"; Klin Pädiatr: 211; 276-283, 1999
- 33: B Fröhlich, S Ahrens, S Burdach, T Klingebiel, R Ladenstein, M Paulussen, A Zoubek, H Jürgens: "Hochdosistherapie bei primär metastasiertem und rezidiviertem Ewing-Sarkom"; Klin Pädiatr: 211; 284-290, 1999
- 34: F Schajawicz, , 1981
- 35: LP Dehner:"Primitive Neuroectodermal Tumor and Ewing's Sarcoma"; Am J Surg Pathol: 17; 1-13, 1993
- 36: E de Alava, WL Gerald:"Molecular Biology of the Ewing's Sarcoma/Primitive Neuroectodermal Tumor Family"; J Clin Oncol: 18; 204-213, 2000
- 37: G Richter, S Plehm, A Fasan, S Rössler, R Unland, IM Bennani-Baiti, M Hotfilder, D Löwel, I von Luettichau, I Moßbrugger, L Quintanilla-Martinez, H Kovar, M Staeger, C Müller-Tidow, S Burdach:"EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuroectodermal differentiation"; PNAS: ; im Druck, 2009
- 38: IM Ambros, PF Ambros, S Strehl, H Kovar, H Gadner, M Salzer-Kuntschik:"MIC2 is a specific marker for ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration"; Cancer: 67; 1886-1893, 1991
- 39: N Weidner, J Tjoe:"Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13: Antibody that recognizes glycoprotein p30/32MIC2 and is useful in diagnosing Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma"; Am J Surg Pathol: 18; 486-494, 1994
- 40: A Roessner, U Mittler, I Röse, K Radig, H Grote : "Pathologie des Ewing-Sarkoms"; Pathologe: 17; 6-17, 1996

- 41: A Llombart-Bosch, MJ Lacombe, G Contesso, A Peydro-Olaya: "Small round blue cell sarcoma of bone mimicking atypical Ewing's sarcoma with neuroectodermal features. An analysis of five cases with immunohistochemical and electron microscopic support"; *Cancer*: 60; 1570-1582, 1987
- 42: S Lizard-Nacol, G Lizard, E Justrabo, C Turc-Carel: "Immunologic Characterization of Ewing's Sarcoma Using Mesenchymal and Neural Markers"; *A J Pathol*: 135; 847-855, 1989
- 43: F van Valen, Ewing's Sarcoma Family of Tumors, 1999
- 44: J Zucman, O Delattre, C Desmaze, B Plougastel, I Joubert, T Melot, M Peter, P De Jong, G Rouleau, A Aurias, G Thomas, Cloning and characterization of the Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma t(11;22) translocation breakpoints, 1992
- 45: J Whang-Peng, TJ Triche, T Knutsen, J Miser, EC Douglass, MA Israel: "Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma"; *N Engl J Med*: 311; 584-585, 1984
- 46: C Turc-Carel, A Aurias, F Mugneret, S Lizard, I Sidaner, C Volk, JP Thiery, S Olschwang, I Philip, MP Berger, T Philip, GM Lenoir, A Mazabraud: "Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases and remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12)"; *Cancer Genet Cytogenet*: 32; 229-238, 1988
- 47: O Delattre, J Zucman, T Melot, XS Garau, JM Zucker, GM Lenoir, PF Ambros, D Sheer, C Turc-Carel, TJ Triche, A Aurias, G Thomas: "The Ewing Family of Tumors -- A Subgroup of Small-Round-Cell Tumors Defined by Specific Chimeric Transcripts"; *N Engl J Med*: 331; 294-299, 1994
- 48: J Zucman, T Melot, C Desmaze, J Ghysdael, B Plougastel, M Peter, JM Zucker, TJ Triche, D Sheer, C Turc-Carel, P Ambros, V Combaret, G Lenoir, A Aurias, G Thomas, O Delattre: "Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours"; *EMBO J*: 12; 4481-4487, 1993
- 49: WA May, SL Lessnick, BS Braun, M Klemsz, BC Lewis, LB Lunsford, R Hromas, CT Denny: "The Ewing's Sarcoma EWS/FLI1-Fusion Gene encodes a more potent Transcriptional activator and is a more powerful transforming Gene than FLI1"; *Mol Cell Biol*: 13; 7393-7398, 1993
- 50: M Peter, J Couturier, H Pacquement, J Michon, G Thomas, H Magdelenat, O Delattre: "A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors"; *Oncogene*: 14; 1159-1164, 1997
- 51: Y Kaneko, K Yoshida, M Handa, Y Toyoda, H Nishihira, Y Tanaka, Y Sasaki, S Ishida, F Higashino, K Fujinag: "Fusion of an ETS-Family Gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) Chromosome Translocation in an Undifferentiated Sarcoma of Infancy"
- 52: IS Jeon, JN Davis, BS Braun, JE Sublett, MF Roussel, CT Denny, DN Shapiro: "A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1"; *Oncogene*: 10; 1229-1234, 1995

53: : "EURO-E.W.I.N.G. 99"

54: DJ Giard, SA Aaronson, GJ Todaro, P Arnstein, JH Kersey, H Dosik, WP Parks: "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors"; J Natl Cancer Inst: 51; 1417-1423, 1973

55: A Martínez-Ramírez, S Rodríguez-Perales, B Meléndez, B Martínez-Delgado, M Urioste, JC Cigudosa, J Benítez: "Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques"; Cancer Genet Cytogenet: 141; 138-142, 2003

56: PP Lin, RI Brody, AC Hamelin, JE Bradner, JH Healey, M Ladanyi: "Differential Transactivation by Alternative EWS-FLI1 Fusion Proteins Correlates with Clinical Heterogeneity in Ewing's Sarcoma"; Canc Res: 59; 1428-1432, 1999

57: DC Shing, CA Morley-Jacob, I Roberts, E Nachevac, N Colemana: "Ewing's tumour: Novel recurrent chromosomal abnormalities demonstrated by molecular cytogenetic analysis of seven cell lines and one primary culture"; Cytogenet Genome Res: 97; 20-27, 2002

58: : "ATCC - American Type Culture Collection"

59: JL Biedler, L Helson, BA Spengler: "Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture"; Canc Res: 33; 2643-2652, 1973

60: J Whang-Peng, TJ Triche, T Knutsen, J Miser, S Kao-Shan, S Tsai, MA Israel: "Cytogenetic Characterization of Selected Small Round Cell Tumors of Childhood"; Cancer Genet Cytogenet: 21; 185-208, 1986

61: T Dunn, L Praissman, N Hagag, MV Viola: "ERG Gene Is Translocated in an Ewing's Sarcoma Cell Line"; Cancer Genet Cytogenet: 76; 19-22, 1994

62: K Ida, S Kobayashi, T Taki, R Hanada, F Bessho, S Yamamori, T Sugimoto, M Ohki, Y Hayashi: "EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric mRNAs in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor"; Int J Cancer: 63; 500-504, 1995

63: T Pietsch, E Gottert, HJ Feickart, H Riehm, N Blin, G Kovacs: "MHH-ES-1, A New Ewing Sarcoma Cell Line"; Cancer Genet Cytogenet: 38; 167, 1989

64: DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

65: M Lae, T Saito, F Barr et al.: "Expression profiling of pediatric sarcomas with chimeric transcription factors: A study of 153 samples"; Mod Pathol: 17 Suppl 1; 330A, 2004

66: JA Weston : "The migration and differentiation of neural crest cells"; Adv Morphog: 8; 41-114, 1970

67: R Virchow: "Die krankhaften Geschwülste", 1863

- 68: JB Beckwith, EV Perrin:"In situ Neuroblastomas: A contribution to the natural history of neural crest tumors"; Am J Pathol: 43; 1089-1104, 1963
- 69: V Hamburger:"History of the discovery of neuronal death in embryos"; J Neurobiol: 23; 1116-1123, 1992
- 70: RW Oppenheim:"Naturally occurring cell death during neural development"; Trends Neurosci: ; 487-493, 1985
- 71: MJ Cooper, GM Hutchins, PS Cohen, LJ Helman, RJ Mennie and MA Israel:"Human neuroblastoma tumor cell lines correspond to the arrested differentiation of chromaffin adrenal medullary neuroblasts"; Cell Growth & Differentiation: 1; 149-159, 1990
- 72: H Shimada; IM Ambros; LP Dehner; J Hata; VV Joshi; B Roald:"Terminology and Morphologic Criteria of Neuroblastic Tumors"; Cancer: 86; 349-363, 1999
- 73: H Cushing; SB Wolbach:"Transformation of malignant paravertebral sympathicoblastoma into benign ganglioneuroma"; Am J Pathol: 3; 203-216, 1927
- 74: AE Evans; J Gershon; L Schaufler:"Spontaneous regression of neuroblastoma"; Natl Cance Inst Monogr: 44; 49-54, 1976
- 75: TC Everson, WH Cole:"Spontaneous regression of malignant disease"; JAMA: 169; 1758-1759, 1959
- 76: JG Gurney; JA Ross; DA Wall; WA Bleyer; RK Severson; LL Robison:"Infant cancer in the US: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992"; J Pediatr Hematol Oncol: 19; 428-432, 1997
- 77: GM Brodeur:"Neuroblastoma: Biological Insights into a clinical Enigma"; Nature Reviews Cancer: 3; 203-215, 2003
- 78: KD Bachmann:"Das Neuroblastoma sympathicum: Problematik und Klinik"; Zeitschrift für Kinderheilkunde: 77; 391-412, 1955
- 79: KD Bachmann; W Kröll:"Über das pränatal entstandene Neuroblastoma sympathicum"; Zeitschrift für Kinderheilkunde: 103; 61-72, 1968
- 80: GJ D'Angio, AE Evans, CE Koop:"Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis"; Lancet: 7708; 1046-9, 1971
- 81: WG Woods; R Gao; JJ Shuster; LL Robison; M Bernstein; S Weitzman; G Bunin; I Levy; J Brossard; G Dougherty; M Tuchman; B Lemieux:"Screening of Infants and Mortality Due to Neuroblastoma"; NEJM: 346; 1041-1046, 2002
- 82: FH Schilling; C Spix; F Berthold; R Erttmann; N Fehse; B Hero; G Klein; J Sander; K Schwarz; J Treuner; U Zorn; J Michaelis:"Neuroblastoma Screening at One Year of Age";

NEJM: 346; 1047-1053, 2002

83: T Tajiri; S Suita; Y Sera; H Takamatsu; H Mizote; A Nagasaki; N Kurosaki; N Handa; T Hara; J Okamura; S Miyazaki; T Sugimoto; K Kawakami; H Eguchi; M Tsuneyoshi: "Clinical and biologic characteristics for recurring neuroblastoma at mass screening cases in Japan"; *Cancer*: 92; 349-353, 2001

84: S Suita; Y Zaizen; H Yano; H Akiyama; Y Sera; H Takamatsu; K Ueda; H Tasaka; S Miyazaki; K Kawakami: "How to deal with advanced cases of neuroblastoma detected by mass screening: A report from the Pediatric Oncology Study Group of the Kyushu area of Japan"; *J Pediatr Surg*: 29; 599-603, 1994

85: B Hero; F Berthold: "Neuroblastom"; *Monatsschr Kinderheilk*: 150; 775-788, 2002

86: KD Bachmann; HC Dominik; H Mildenerger: "Neuroblastom, Ganglioneurom, Phäochromozytom. Pädiatrie in Praxis und Klinik. Band 3"; ; ; ,

87: H Shimada; IM Ambros; LP Dehner; J Hata; VV Joshi; B Roald; DO Stram; RB Gerbing; JN Lukens; KK Matthay; RP Castleberry: "The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System)"; *Cancer*: 86; 364-372, 1999

88: GM Brodeur; JM Maris; DJ Yamashiro; MD Hogarty; PS White: "Biology and genetics of human neuroblastomas"; *J Pediatr Hematol Oncol*: 19; 93-101, 1997

89: M Schwab, K Alitalo, KH Klempnauer, HE Varmus, JM Bishop, F Gilbert, GM Brodeur, M Goldstein, J Trent: "Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour"; *Nature*: 305; 245 - 248, 1983

90: M Schwab, HE Varmus, JM Bishop, KH Grzeschik, SL Naylor, AY Sakaguchi, GM Brodeur, J Trent: "Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc"; *Nature*: 308; 288 - 291, 1984

91: GM Brodeur, FA Hayes, AA Green, JT Casper, J Wasson, S Wallach, RC Seeger: "Consistent N-myc Copy Number in Simultaneous or Consecutive Neuroblastoma Samples from Sixty Individual Patients"; *Cancer Res*: 47; 4248-4253, 1987

92: RC Seeger, GM Brodeur, H Sather, A Dalton, SE Siegel, KY Wong, and D Hammond: "Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas"; *NEJM*: 313; 1111-1116, 1985

93: GM Brodeur, RC Seeger, M Schwab, HE Varmus, and JM Bishop: "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage"; *Science*: 224; 1121-1124, 1984

94: MD Norris et al. : "Evidence that the MYCN oncogene regulates MRP gene expression in neuroblastoma"; *Eur. J.Cancer*: 33; 1911-1916, 1997

- 95: JM Shohet, MJ Hicks, SE Plon, SM Burlingame, S Stuart, SY Chen, MK Brenner, JG Nuchtern: "Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma"; *Cancer Res*: 62; 1123–1128, 2002
- 96: A Nakagawara, M Arima, CG Azar, NJ Scavarda, GM Brodeur: "Inverse Relationship between trk Expression and N-myc Amplification in Human Neuroblastomas"; *Cancer Res*: 52; 1364-1368, 1992
- 97: CT Fong, NC Dracopoli, PS White, PT Merrill, RC Griffith, DE Housman, GM Brodeur: "Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification"; *PNAS*: 86; 3753-3757, 1989
- 98: A Edsjo, Helen Nilsson, J Vandesompele, J Karlsson, F Pattyn, LA Culp, F Speleman, S Pahlman: "Neuroblastoma cells with overexpressed MYCN retain their capacity to undergo neuronal differentiation"; *Laboratory Investigation*: 84; 406-17, 2004
- 99: M Schwab, F Westermann, B Hero, F Berthold: "Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology."; *Lancet Oncol*: 4; 472-80, 2003
- 100: JM Maris: "The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification."; *Curr Opin Pediatr*: 17; 7-13, 2005
- 101: JS Wei, BT Greer, F Westermann, SM Steinberg, CG Son, QR Chen, CC Whiteford, S Bilke, AL Krasnoselsky, N Cenacchi, D Catchpoole, F Berthold, M Schwab, J Khan: "Prediction of Clinical Outcome Using Gene Expression Profiling and Artificial Neural Networks for Patients with Neuroblastoma"; *Cancer Res*: 64; 6883–6891, 2004
- 102: M Fischer, Andre Oberthuer, B Brors, Y Kahlert, M Skowron, H Voth, P Warnat, K Ernestus, B Hero, F Berthold: "Differential Expression of Neuronal Genes Defines Subtypes of Disseminated Neuroblastoma with Favorable and Unfavorable Outcome"; *Clin Cancer Res*: 12; 5118-5128, 2006
- 103: F Westermann, KO Henrich, JS Wei, W Lutz, M Fischer, R Koenig, R Wiedemeyer, V Ehemann, B Brors, K Ernestus, I Leuschner, A Benner, J Khan, M Schwab: "High Skp2 Expression Characterizes High-Risk Neuroblastomas Independent of MYCN Status"; *Clin Cancer Res*: 13; 4695-4703, 2007
- 104: GM Brodeur, J Pritchard, F Berthold, NL Carlsen, V Castel, RP Castelberry, B De Bernardi, AE Evans, M Favrot, and F Hedborg: "1466-1477 Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment"; *J Clin Oncol*: 11; , 1993
- 105: BH Kushner; MP LaQuaglia; K Kramer; NV Cheung: "Radically different treatment recommendations for newly diagnosed neuroblastoma: Pitfalls in assessment of risk"; *J Pediatr Hematol Oncol*: 26; 35-39, 2004
- 106: B Hero; T Simon; R Spitz; K Ernestus; AK Gnekow; H-G Scheel-Walter; D Schwabe; FH Schilling; G Benz-Bohm; F Berthold: "Localized infant neuroblastomas often show spontaneous

regression:Results of the prospective trials NB95-S and NB97"; J Clin Oncol: 26; 1504-1510, 2008

107: GM Brodeur, RC Seeger, A Barrett, et al.:"International criteria for diagnosis, staging and responseto treatment in patients with neuroblastoma"; J Clin Oncol: 6; 1874-1881, 1988

108: T Monclair, GM Brodeur, PF Ambros, HJ Brisse, G Cecchetto, K Holmes, M Kaneko, WB London, KK Matthay, JG Nuchtern, D von Schweinitz, T Simon, SL Cohn, ADJ Pearson:"The International Neuroblastoma Risk Group (INRG)Staging System: An INRG Task Force Report"; J Clin Oncol: 27; 298-303, 2009

109: NB2004 (Studie)

110: P Marini, RAF MacLeod, C Treuner, G Bruchelt, W Böhm, H Wolburg, P Schweizer, R Girtgert:"SiMa, a New Neuroblastoma Cell Line Combining Poor Prognostic Cytogenetic Markers with High Adrenergic Differentiation"; Cancer Genet Cytogenet: 112; 161-164, 1999

111: RA Ross, BA Spengler, JL Biedler:"Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells"; J Natl Cancer Inst: 71; 741-747, 1983

112: RK. Wada, RC Seeger, GM Brodeur, PA Einhorn, SA Rayner, MM. Tomayko, CP Reynolds:"Human Neuroblastoma Cell Lines that Express N-myc without Gene Amplification"; Cancer: 72; 3346-3354, 1993

113: N Cohen, DR Betts, G Rechavi, N Amariglio, L Trakhtenbrot:"Clonal expansion and not cell interconversion is the basis for the neuroblast and nonneuronal types of the SK-N-SH neuroblastoma cell line"; Cancer Genetics and Cytogenetics: 143; 80-84, 2003

114: T Pietsch, E Göttert, E Meese, N Blin, HJ Feickert, H Riehm, G Kovacs:"Characterization of a continuous cell line (MHH-NB-11) derived from advanced neuroblastoma"; Anticancer research: 8; 1329-33, 1988

115: MR Wilkins, RD Appel, DF Hochstrasser:"Proteome Research: New Frontiers in FunctionalGenomics", 1997

116: VC Wasinger et al.:"Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium"; Electrophoresis: 16; 1090-1094, 1995

117: "Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era", NCI, USA

118: A Kolin : "Separation and Concentration of Proteins in a pH Field Combined with an Electric Field"; J. Chem. Phys.: 22; 1628, 1954

119: H Svensson:"Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. II. Buffering Capacity and Conductance of Isoionic Ampholytes"; Acta Chemica Scandinavica: 16; 456-466, 1962

- 120: PG Righetti: "Isoelectric focussing: Theory, methodology and applications", 1983
- 121: GR Finlayson, A Chrambach: "Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its preparative application"; *Anal biochem*: 40; 292-311, 1971
- 122: P Righetti, JW Drysdale: "Isoelectric focusing in polyacrylamide gels"; *Biochim Biophys Acta*: 236; 17-28, 1971
- 123: PZ O'Farrell, HM Goodman, P O'Farrell: "High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Basic as Well as Acidic Proteins"; *Cell*: 12; 1133-1142, 1977
- 124: G Piperno, B Huang, DJL Luck: "Two-dimensional analysis of flagellar proteins from wild-type and paralyzed mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*"; *PNAS*: 74; 1600-1604, 1977
- 125: B Bjellqvist, K Ek, PG Righetti, E Gianazza, A Görg, R Westermeier, W Postel: "Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications"; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*: 6; 317-339, 1982
- 126: JM Corbett, MJ Dunn, A Posch, A Görg: "Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: An interlaboratory comparison"; *Electrophoresis*: 15; 1205-1211, 1994
- 127: A Blomberg, L Blomberg, J Norbeck, SJ Fey, PM Larsen, M Larsen, P Roepstorff, H Degand, M Boutry, A Posch, A Görg: "Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis"; *Electrophoresis*: 16; 1935-1945, 1995
- 128: A Görg, W Postel, J Weser, W Patutschnick, H Cleve: "Improved resolution of PI (alpha 1-antitrypsin) phenotypes by a large-scale immobilized pH gradient"; *Am J Hum Genet*: 37; 922-930, 1985
- 129: A Görg, W Postel, S Günther: "Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients"; *Electrophoresis*: 9; 531-546, 1988
- 130: R Wildgruber, A Harder, C Obermaier, G Boguth, W Weiss, SJ Fey, PM Larsen, A Görg: "Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients"; *Electrophoresis*: 21; 2610-2616, 2000
- 131: A Görg: "Two-dimensional electrophoresis Recent developments in the first- and second-dimension steps of two-dimensional electrophoresis have improved pattern reproducibility"; *Nature*: 349; 546, 1991
- 132: A Görg, C Obermaier, G Boguth, A Csordas, JJ Diaz, JJ Madjar: "Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins"; *Electrophoresis*: 18; 328-337, 1997

- 133: B Bjellqvist, JC Sanchez, C Pasquali, F Ravier, N Paquet, S Frutiger, GJ Hughes, D Hochstrasser: "Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins"; *Electrophoresis*: 14; 1375-1378, 1993
- 134: PH O'Farrell: "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins"; *J Biol Chem*: 250; 4007-4021, 1975
- 135: A Görg et al.: "Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems"; *Electrophoresis*: 16; 1079-1086, 1995
- 136: A Görg et al.: "Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient"; *Electrophoresis*: 19; 1516-1519, 1998
- 137: A Görg et al.: "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients"; *Electrophoresis*: 21; 1037-1053, 2000
- 138: A Görg et al.: "Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures"; *Electrophoresis*: 20; 712-717, 1999
- 139: A Görg, W Weiss: "2-D electrophoresis with immobilized pH gradients"; *Proteome Research: Two-Dimensional Electrophoresis and Identification Methods*: T. Rabilloud; 57-106, 2000
- 140: M Ünlü, ME Morgan, JS Minden: "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts"; *Electrophoresis*: 18; 2071-2077, 1997
- 141: A Alban, SO David, L Bjorkesten, C Andersson, E Sloge, S Lewis, I Currie: "A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard"; *Proteomics*: 3; 36-44, 2003
- 142: R Westermeier: *Electrophoresis in Practice*, 1997
- 143: JJ Kyhse-Andersen: "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose"; *J Biochem Biophys Methods*: 10; 203-209, 1984
- 144: M Karas, F Hillenkamp: "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons"; *Anal Chem*: 60; 2299-2301, 1988
- 145: JB Fenn et al.: "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules"; *Science*: 246; 64-71, 1989
- 146: RS Brown, JJ Lennon: "Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a Matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass

spectrometry"; Anal Chem: 67; 1998, 1995

147: BA Mamyrin, VI Karataev, DV Shmikk, VA Zagulin: "The massreflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution"; Soviet Physics JETP: 37; 45, 1973

148: RW Kondrat, RG Cooks: "Direct analysis of mixtures by mass spectrometry"; Anal. Chem.: 50; 81A, 1978

149: RA Yost, CG Enke: "Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer"; J. Am. Chem. Soc: 100; 2274-2275, 1978

150: Lottspeich, Engels: " "; Bioanalytik: Angela Simeon; , 2006

151: JA Westbrook, JX Yan, R Wait, SY Welson, MJ Dunn: "Zooming-in on the proteome: Very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms"; Electrophoresis: 22; 2865-2871, 2001

152: X Zuo, DW Speicher: "A Method for Global Analysis of Complex Proteomes Using Sample Prefractionation by Solution Isoelectrofocusing Prior to Two-Dimensional Electrophoresis"; Anal. biochem: 284; 266-278, 2000

153: BJ Radola: "Isoelectric focusing in layers of granulated gels. 1. Thinlayer isoelectric focusing of proteins"; Biochem. Biophys. Acta: 295; 412-428, 1973

154: BJ Radola: "Isoelectric focusing in layers of granulated gels. 2. Preparative isoelectric focusing"; Biochim. Biophys. Acta: 386; 181-195, 1975

155: W Weiss, C Lück, G Reil, A Görg: "Sample prefractionation with Sephadex IEF for enrichment of low abundance proteins and improvement of MALDI-MS spectra"; Mol Cell. Proteomics: 4 Suppl. 1; S346, 2005

156: M Stastná, M Trávníek, K Slais: "New azo dyes as colored isoelectric point markers for isoelectric focusing in acidic pH region"; Electrophoresis: 26; 53-59, 2005

157: C Anagnostopoulos, J Spizizen : "Requirements for Transformation in Bacillus subtilis"; J Bacteriol: 81; 741-746, 1961

158: J Stülke, R Hanschke, M Hecker: "Temporal activation of beta-glucanase synthesis in Bacillus subtilis is mediated by the GTP pool"; J Gen Microbiol: 139; 2041-2045, 1993

159: G Bertani: "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli"; J Bacteriol: 62; 293-300, 1951

160: Y Matsuo, T Morimoto, M Kuwano, PC Loh, T Oshima, N Ogasawara : "The GTP-binding protein YlqF participates in the late step of 50 S ribosomal subunit assembly in Bacillus subtilis"; J Biol Chem: 281; 8110-8117, 2006

- 161: C Eymann, A Dreisbach, D Albrecht, J Bernhardt, D Becher, S Gentner, T Le Thi, K Büttner, G Buurmann, C Scharf, S Venz, U Völker, M Hecker: "A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells"; *Proteomics*: 4; 2849-2876, 2004
- 162: D Schluesener, F Fischer, J Kruip, M Rögner, A Poetsch: "Mapping the membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum*"; *Proteomics*: 5; 1317-1330, 2005
- 163: A Görg et al.: "Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers"; *J Biochem Biophys Methods*: 3; 273-284, 1980
- 164: A Görg et al.: "Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer"; *Electrophoresis*: 8; 122-124, 1987
- 165: R Westermeier: "Two-Dimensional Electrophoresis in Proteomics"; *Protein Purification*: ; , 2004
- 166: H Blum, H Beier, H Gross: "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels"; *Electrophoresis*: 8; 93-99, 1987
- 167: V Neuhoff et al.: "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250"; *Electrophoresis*: 9; 255-262, 1988
- 168: V Neuhoff, et al.: "essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution"; *Electrophoresis*: 11; 101-117, 1990
- 169: G Candiano et al.: "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis"; *Electrophoresis*: 25; 1327-1333, 2004
- 170: J Cohen: "Statistical Power Analysis for the Behavior Science"; Hillsdale; 1969
- 171: IP Smirnov et al.: "Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry"; *Anal Chem*: 76; 2958-2965, 2004
- 172: M Uhlen et al.: "A Human Protein Atlas for Normal and Cancer Tissues Based on Antibody Proteomics"; *Mol Cell Proteomics*: 4; 1920-1932, 2005
- 173: MW Duncan, SW Hunsucker: "Proteomics as a Tool for Clinically Relevant Biomarker Discovery and Validation"; *Exp Biol Med*: 230; 808-817, 2005
- 174: WG Cox, MP Beaudet, JY Agnew, JL Ruth: "Possible sources of dye-related signal correlation bias in twocolor DNA microarray analysis"; *Analytical Biochemistry*: 331; 243-254, 2004

- 175: I González, S Vicent, E de Alava, F Lecanda: "EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model"; *Journal of molecular medicine*: 85; 1015-1029, 2007
- 176: G Perrière, M Gouy, T Gojobori: "The non-redundant *Bacillus subtilis* (NRSub) database: update 1998"; *Nucleic Acids Research*: 26; 60-62, 1998
- 177: C Klein, C Garcia-Rizo, B Bisle, B Scheffer, H Zischka, F Pfeiffer, F Siedler, D Oesterhelt: "The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*"; *Proteomics*: 5; 180-197, 2005
- 178: B Bisle, A Schmidt, B Scheibe, C Klein, A Tebbe, J Kellermann, F Siedler, F Pfeiffer, F Lottspeich, D Oesterhelt: "Quantitative Profiling of the Membrane Proteome in a Halophilic Archaeon"; *Mol Cell Proteomics*, 5, 1543
- 179: J Bernhardt, K Buttner, C Scharf, M Hecker: "Dual channel imaging of two-dimensional electropherograms in *Bacillus subtilis*"; *Electrophoresis*: 20; 2225-2240, 1999
- 180: C Eymann, A Dreisbach, D Albrecht, J Bernhardt, D Becher, S Gentner, LT Tam, K Büttner, G Buurman, C Scharf, S Venz, U Völker, M Hecker: "A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells"; *Proteomics*: 4; 2849-2876, 2004
- 181: J Bernhardt, J Weibezahn, C Scharf, M Hecker: "Bacillus subtilis during feast and famine: visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis"; *Genome Res*: 13; 224-37, 2003
- 182: VD Nguyen, C Wolf, U Mäder, M Lalk, P Langer, U Lindequist, M Hecker, H Antelmann: "Transcriptome and proteome analyses in response to 2-methylhydroquinone and 6-brom-2-vinyl-chroman-4-on reveal different degradation systems involved in the catabolism of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*"; *Proteomics*: 7; 1391-1408, 2007
- 183: T le Tam, C Eymann, D Albrecht, R Sietmann, F Schauer, M Hecker, H Antelmann: "Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*"; *Environ Microbiol*: 8; 1408-1427, 2006
- 184: D Höper, J Bernhardt, M Hecker: "Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach"; *Proteomics*: 6; 1550-1562, 2006
- 185: T le Tam, H Antelmann, C Eymann, D Albrecht, J Bernhardt, M Hecker: "Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach"; *Proteomics*: 6; 4565-4585, 2006
- 186: C Eymann, G Homuth, C Scharf, M Hecker: "Bacillus subtilis functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis"; *J Bacteriol*: 184; 2500-2520, 2002

- 187: L Aravind, EV Koonin:"A natural classification of ribonucleases"; *Methods Enzymol.*: 341; 3-28, 2001
- 188: B Bisle, A Schmidt, B Scheibe, C Klein, A Tebbe, J Kellermann, F Siedler, F Pfeiffer, F Lottspeich, D Oesterhelt:"Quantitative Profiling of the MembraneProteome in a Halophilic Archaeon"; *Mol Cell Proteomics*: 5; 1543,
- 189: GE Tusnády, I Simon:"Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to Topology Prediction"; *J. Mol. Biol.*: 283; 489-506, 1998
- 190: GE Tusnády, I Simon:"The HMMTOP transmembrane topology prediction server"; *Bioinformatics*: 17; 849-850, 2001
- 191: ELL Sonnhammer, G von Heijne, A Krogh:"A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences"; *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*: J Glasgow, T Littlejohn, F Major, R Lathrop, D Sankoff, C Sensen; 175-182, 1998
- 192: A Krogh, B Larsson, G von Heijne, ELL Sonnhammer:"Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes"; *Journal of Molecular Biology*: 305; 567-580, 2001
- 193: M Cserzo, E Wallin, I Simon, G von Heijne, A Elofsson:"Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method"; *Prot. Eng.*: 10; 673-676, 1997
- 194: M Cserzo, F Eisenhaber, B Eisenhaber, I Simon:"On filtering false positive transmembrane protein predictions"; *Protein Eng*: 15; 745-752, 2002
- 195: K Hiller, A Grote, M Maneck, R Münch, D Jahn:"JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins"; *Bioinformatics*: 22; 2441-2443, 2006
- 196: K Bunai, M Nozaki, H Kakeshita, T Nemoto, K Yamane:"Quantitation of de Novo Localized ¹⁵N-Labeled Lipoproteins and Membrane Proteins Having One and Two Transmembrane Segments in a *Bacillus subtilis* secA Temperature-Sensitive Mutant Using 2D-PAGE and MALDI-TOF MS"; *J. Proteome Res*: 4; 826-836, 2005
- 197: F Fischer, D Wolters, M Rögner, A Poetsch:"Toward the complete membrane proteome: high coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection"; *Mol Cell Proteomics*: 5; 444-453, 2006
- 198: "www.uniprot.org"
- 199: RL Blakley:"The Interconversion of Serine and Glycine: Participation of Pyridoxal Phosphate"; *Biochem J*: 61; 315-323, 1966

- 200: J Thorndike, TT Pelliniemi, WS Beck:"Serine Hydroxymethyltransferase Activity and Serine Incorporation in Leukocytes"; *Cancer Res*: 39; 3435-3440, 1979
- 201: DD Anderson, P J Stover:"SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis"; *PLoS ONE*: 4; , 2009
- 202: C Grandori, MS Cowley, LP James, RN Eisenman:"The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior"; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*: 16; 653-699, 2000
- 203: MA Nikiforov, S Chandriani, B O'Connell, O Petrenko, I Kotenko, A Beavis, JM Sedivy, MD Cole:"A Functional Screen for Myc-Responsive Genes Reveals Serine Hydroxymethyltransferase, a Major Source of the One-Carbon Unit for Cell Metabolism"; *Mol. Cell. Biol*: 22; 5793-5800, 2002
- 204: C Bouchard, O Dittrich, A Kiemaier, K Dohmann, A Menkel, M Eilers, B Luscher:"Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter"; *Genes Dev.*: 15; 2042-2047, 2001
- 205: SR Frank, M Schroeder, P Fernandez, S Taubert, B Amati:"Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation"; *Genes Dev*: 15; 2069-2082, 2001
- 206: SB McMahon, MA Wood, MD Cole:"The c-Myc cofactor TRRAP recruits the histone acetylase hGCN5"; *Mol. Cell. Biol*: 20; 556-562, 2000
- 207: MD Norris et al.:"Evidence that the MYCN oncogene regulates MRP gene expression in neuroblastoma"; *Eur. J.Cancer*: 33; 1911-1916, 1997
- 208: JM Shohet et al.:"Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma"; *Cancer Res*: 62; 1123-1128, 2002
- 209: K Berns, EM Hijmans, E Koh, GQ Daley, R Bernards:"A genetic screen to identify genes that rescue the slow growth phenotype of c-myc null Fibroblasts"; *Oncogene*: 19; 3330-3334, 2000
- 210: Persönliche Kommunikation mit Dr. Günther Richter, Funktionelle Genomik pädiatrischer Krebskrankheiten, TUM
- 211: RL Stallings, J Howard, A Dunlop, M Mullarkey, M McDermott, F Breatnach, A O'Meara:"Are gains of chromosomal regions 7q and 11p important abnormalities in neuroblastoma?"; *Cancer Genetics and Cytogenetics*: 140; 133-137, 2003
- 212: H Ueyamaa, J Inazawab, H Nishinoc, I Ohkuboa, T Miwad:"FISH localization of human cytoplasmic actin genes ACTB to 7p22 and ACTG1 to 17q25 and characterization of related pseudogenes"; *Cytogenet Cell Genet*: 74; 221-224, 1996

- 213: TD Pollard, L Blanchoin, RD Mullins:"Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells"; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*: 29; 545-576, 2000
- 214: H Chen, BW Bernstein, JR Bamburg:"Regulating actin-filament dynamics in vivo"; *Trends Biochem Sci*: 25; 19-23, 2000
- 215: AE Engqvist-Goldstein, DG Drubin:"Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals"; *Annu Rev Cell Dev Biol*: 19; 287-332, 2003
- 216: D Yarar, CM Waterman-Storer, SL Schmid:"A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis"; *Mol Biol Cell*: 16; 964-975, 2005
- 217: A Lambrechts, M Van Troys, C Ampe:"The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility"; *Int J Biochem Cell Biol*: 36; 1890-1909, 2004
- 218: D Plantaz, J Vandesompele, N Van Roy, M Lastowska, N Bown, V Combaret, MC Favrot, O Delattre, J Michon, J Benard, O Hartmann, JC Nicholason, FM Ross, C Brinkschmidt, G Laureys, H Caron, KK Matthay, BG Feuerstein, F Speleman:"Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification"; *Int J Cancer*: 91; 680-686, 2001
- 219: SC Hsu, CD Hazuka, R Roth, DL Foletti, J Heuser, RH Scheller:"Subunit Composition, Protein Interactions, and Structures of the Mammalian Brain sec6/8 Complex and Septin Filaments"; *Neuron*: 20; 1111-1122, 1998
- 220: E Joo, MC Surka, WS Trimble:"Mammalian SEPT2 Is Required for Scaffolding Nonmuscle Myosin II and Its Kinases"; *Developmental Cell*: 13; 677-690, 2007
- 221: J Xue, CW Tsang, WP Gai, CS Malladi, WS Trimble, JA Rostas, PJ Robinson:"Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals"; *J. Neurochem*: 91; 579-590,
- 222: IG Macara, R Baldarelli, CM Field et al.:"Mammalian Septins Nomenclature"; *Molecular Biology of the Cell*: 13; 4111-4113, 2002
- 223: M Kinoshita, S Kumar, A Mizoguchi, C Ide, A Kinoshita, T Haraguchi, Y Hiraoka, M Noda:"Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures"; *Genes Dev*: 11; 1535-1547, 1997
- 224: CL Beites, H Xie, R Bowser, WS Trimble:"The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis"; *Nature neuroscience*: 2; , 1999
- 225: J Rappsilber, U Ryder, AI Lamond, M Mann:"Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome"; *Genome Res*: 12; 1231-1245, 2002
- 226: D Mahe, P Mahl, R Gattoni, N Fischer, MG Mattei, J Stevenin, JP Fuchs:"Cloning of human 2H9 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. Relation with splicing and early heat

shock-induced splicing arrest"; *J. Biol. Chem.*: 272; 1827-1836, 1997

227: M Nakamura, M Yamada, T Ohsawa, H Morisawa, T Nishine, O Nishimura, T Toda: "Phosphoproteomic profiling of human SH-SY5Y neuroblastoma cells during response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress"; *Biochimica et Biophysica Acta*: 1763; 977-989, 2006

228: B Honore: "The hnRNP 2H9 gene, which is involved in the splicing reaction, is a multiply spliced gene"; *Biochimica et Biophysica Acta*: 1492; 108-119, 2000

229: MC Wahl, CL Will, R Lührmann: "The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine"; *Cell*: 136; 701-718, 2009

230: D Mahe, N Fischer, D Decimo, JP Fuchs: "Spatiotemporal regulation of hnRNP M and 2H9 gene expression during mouse embryonic development"; *Biochimica et Biophysica Acta*: 1492; 414-424, 2000

231: V Gerke, SE Moss: "Annexins: from structure to function"; *Physiol Rev*: 82; 331-371, 2002

232: E Cockrell, RG Espinola, KR McCrae: "Annexin A2: biology and relevance to the antiphospholipid syndrome"; *Lupus*: 17; 943-951, 2008

233: O Lambert, V Gerke, MF Bader, F Porte, A Brisson: "Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryoelectron microscopy"; *J Mol Biol*: 272; 42-55, 1997

234: S Blanchard, JL Barwise, V Gerke, A Goodall, PFT Vaughan, JH Walker: "Annexins in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y: Demonstration of Relocation of Annexins II and V to Membranes in Response to Elevation of Intracellular Calcium by Membrane Depolarisation and by the Calcium Ionophore A23187"; *J. Neurochem.*: 67; 805-813, 1996

235: SJ Harrop, MZ DeMaere, WD Fairlie, WD et al.: "Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution"; *J Biol Chem*: 276; 4993-5000, 2001

236: TJ Jentsch, V Stein, F Weinreich, AA Zdebik: "Molecular structure and physiological function of chloride channels"; *Physiol Rev*: 82; 503-568,

237: KS Suh, M Malik, A Shukla, SH Yuspa: "993-5000[251] Kwang S. Suh, Mariam Malik, Anjali Shukla, and Stuart H. Yuspa: CLIC4, Skin Homeostasis and Cutaneous Cancer: Surprising Connections"; *Mol Carcinogenesis*: 46; 599-604, 2007

238: B Ulmasov, J Bruno, N Gordon, ME Hartnett, JC Edwards: "Chloride Intracellular Channel Protein-4 Functions in Angiogenesis by Supporting Acidification of Vacuoles Along the Intracellular Tubulogenic Pathway"; *The American Journal of Pathology*: 174; , 2009

239: JJ Tung, O Hobert, M Berryman, J Kitajewski: "Chloride intracellular channel 4 is involved

- in endothelial proliferation and morphogenesis in vitro"; *Angiogenesis: Epub ahead of print*; , 2009
- 240: KS Suh, JM Crutchley, A Koochek, A Ryscavage, K Bhat, T Tanaka, A Oshima, P Fitzgerald, SH Yuspa: "Reciprocal Modifications of CLIC4 in Tumor Epithelium and Stroma Mark Malignant Progression of Multiple Human Cancers"; *Clin Cancer Res*: 13; 121, 2007
- 241: KS Suh, M Mutoh, K Nagashima et al.: "The organellular chloride channel protein CLIC4/mtCLIC translocates to the nucleus in response to cellular stress and accelerates apoptosis"; *J Biol Chem*: 279; 4632–4641, 2004
- 242: JH Do, IS Kim, TK Park, DK Choi: "Genome-wide Examination of Chromosomal Aberrations in Neuroblastoma SH-SY5Y Cells by Array-based Comparative Genomic Hybridization"; *Mol. Cells*: 24; 105-112, 2007
- 243: GJ Kim, SY Park, H Kim, YH Chun, SH Park: "Chromosomal aberrations in neuroblastoma cell lines identified by cross species color banding and chromosome painting"; *Cancer Genetics and Cytogenetics*: 129; 10–16, 2001
- 244: MD Henry, C Gonzalez Agosti, F Solomon : "Molecular dissection of radixin: distinct and interdependent functions of the amino- and carboxy-terminal domains"; *J Cell Biol*: 129; 1007-1022, 1995
- 245: K Takeuchi, N Sato, H Kasahara, N Funayama, A Nagafuchi, S Yonemura, S Tsukita: "Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members"; *J Cell Biol*: 125; 1371–1384, 1994
- 246: MA del Pozo, M Vicente-Manzanares, R Tejedor, JM Serrador, F Sanchez-Madrid: "Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes"; *Eur J Immunol*: 29; 3609–3620, 1999
- 247: S Yonemura, S Tsukita, S Tsukita: "Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins"; *J Cell Biol*: 145; 1497–1509, 1999
- 248: TC Dickson, CD Mintz, DL Benson, SR Salton: "Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family"; *J Cell Biol*: 157; 1105–1112, 2002
- 249: PI Imoukhuede, FJ Moss, DJ Michael, RH Chow, HA Lester: "Ezrin Mediates Tethering of the γ -Aminobutyric Acid Transporter GAT1 to Actin Filaments Via a C-Terminal PDZ-Interacting Domain"; *Biophysical Journal*: 96; 2949-2960, 2009
- 250: N Nelson: "Structure and pharmacology of the proton-ATPases"; *TiPS*: 12; 71-75, 1991
- 251: J Sanders, M Brandsma, GMC Janssen, J Dijk, W Möller: "Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 β in the

endoplasmic reticulum"; *Journal of Cell Science*: 109; 1113-1117, 1996

252: Y Lew, DV Jones, WM Mars, D Evans, D Byrd, ML Frazier: "Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer"; *Pancreas*: 7; 144-52, 1992

253: K Mimori, M Mori, H Inoue, H Ueo, K Mafune, T Akiyoshi, K Sugimachi: "Elongation factor 1 gamma mRNA expression in oesophageal carcinoma"; *Gut*: 38; 66-70, 1996

254: K Mimori, M Mori, S Tanaka, T Akiyoshi, K Sugimachi: "The overexpression of elongation factor 1 gamma mRNA in gastric carcinoma"; *Cancer*: 75; 1446-1449, 1995

255: JSanders, JA Maassen, W Moller: "Elongation factor-1 messenger-RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation"; *Nucleic Acids Research*: 20; 5907-5910, 1992

256: AD Taylor, HC Christian, JF Morris, RJ Flower, JC Buckingham: "An antisense oligodeoxynucleotide to lipocortin 1 reverses the inhibitory actions of dexamethasone on the release of adrenocorticotrophin from rat pituitary tissue in vitro"; *Endocrinology*: 138; 2909-2918, 1997

257: K Tasaka, T Tsurukai, M Mio: "Histamine-induced bi-directional differentiation of HL-60 cells towards neutrophils and eosinophils"; *Agents Actions*: 41; C106-C107, 1994

258: S McArthur, S Yazid, H Christian, R Sirha, R Flower, J Buckingham, E Solito: "Annexin A1 regulates hormone exocytosis through a mechanism involving actin reorganization"; *FASEB J*: Epub ahead of print; , 2009

259: E de Alava, A Kawai, JH Healey, I Fligman, PA Meyers, AG Huvos et al: "EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma"; *J Clin Oncol*: 16; 1248-1255, 1998

260: A Zoubek, B Dockhorn-Dworniczak, O Delattre, H Christiansen, F Niggli, I Gatterer-Menz et al: "Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients?"; *J Clin Oncol*: 14; 1245-1251, 1996

261: BJ Soltys, RS Gupta: "Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: are they exported?"; *Trends Biochem Sci*: 24; 174-177, 1999

262: JJ Hansen, P Bross, M Westergaard, MN Nielsen, H Eiberg, AD Børglum et al: "Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter"; *Hum Genet*: 112; 71-77, 2003

263: A Samali, J Cai, B Zhivotovsky, DP Jones, S Orrenius: "Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells"; *EMBO J*: 18; 2040-2048, 1999

264: L Bini, B Magi, B Marzocchi, F Arcuri, S Tripodi, M Cintorino et al: "Protein expression

profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue"; Electrophoresis: 18; 2832-2841, 1997

265: J Schneider, E Jimenez, K Marenbach, H Romero, D Mark, H Meden: "Immunohistochemical detection of HSP60-expression in human ovarian cancer. Correlation with survival in a series of 247 patients"; *Anticancer Res*: 19; 2141-2146, 1999

266: F Cappello, M Bellafiore, A Palma, V Marciano, G Martorana, P Belfiore P et al.: "Expression of 60-kD heat shock protein increases during carcinogenesis in the uterine exocervix"; *Pathobiology*: 70; 83-88, 2002-2003

267: F Cappello, M Bellafiore, A Palma, S David, V Marcianó, T Bartolotta et al.: "60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis"; *Eur J Histochem*: 47; 105-110, 2003

268: F Cappello, F Rappa, S David, R Anzalone, Zummo G: "Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis"; *Anticancer Res*: 23; 1325-1331, 2003

269: D Pignatelli, J Ferreira, P Soares, MJ Costa, MC Magalhaes: "Immunohistochemical study of heat shock proteins 27, 60 and 70 in the normal human adrenal and in adrenal tumors with suppressed ACTH production"; *Microsc Res Tech*: 61; 315-323, 2003

270: F Cappello, S David, F Rappa, F Bucchieri, L Marasá, TE Bartolotta et al.: "The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase"; *BMC Cancer*: 5; 139, 2005

271: F Cappello, A Di Stefano, SE D'Anna, CF Donner, G Zummo: "Immunopositivity of heat shock protein 60 as a biomarker of bronchial carcinogenesis"; *Lancet Oncol*: 6; 816, 2005

272: YJ Hwang, SP Lee, SY Kim, YH Choi, MJ Kim, CH Lee, JY Lee, DY Kim: "Expression of Heat Shock Protein 60 kDa Is Upregulated in Cervical Cancer"; *Yonsei Med J*: 50; 399-406, 2009

273: GA Spoden, U Rostek, S Lechner, M Mitterberger, S Mazurek, W Zwerschke: "Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a glycolytic sensor differentially regulating cell proliferation, cell size and apoptotic cell death dependent on glucose supply"; *Exp Cell Res*: Epub ahead of print; , 2009

274: KR Willison & H Kubota: "The structure, function, and Genetics of the chaperonin containing TCP-1 (CCT) in eukaryotic cytosol, in *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*"; : Morimoto, R. I., Tissieres, A. & Georgopoulos, C.; 299-312, 1994

275: Y Gao, JO Thomas, RL Chow, GH Lee & NJ Cowan: "A cytoplasmic chaperonin that catalyze p-actin folding"; *Cell*: 69; 1043-1050, 1992

276: J Frydman, E Nimmesgern, H Erdjument-Bromage, JS Wall, P Tempst & FU Hartl: "Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and

structurally related subunits"; EMBO J: 11; 4767-4778, 1992

277: MB Yaffe, GW Farr, D Miklos, AL Horvich, ML Stemlicht & H Stemlicht: "TCPI complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis"; Nature: 358; 245-248, 1992

278: J Frydman, E Nimmesgern, K Ohtsuka and FU Hartl: "Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones"; Nature: 370; 111-117, 1994

279: GW Farr, EC Scharl, RJ Schumacher, S Sondek and AL Horvich: "Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms"; Cell: 89; 927-937, 1997

280: KA Won, RJ Schumacher, GW Farr, AL Horvich and SI Reed: "Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT"; Mol. Cell. Biol.: 18; 7584-7589, 1998

281: R Srikakulam and DA Winkelmann: "Myosin II folding is mediated by a molecular chaperonin"; J Biol. Chem.: 274; 27265-27273, 1999

282: DE Feldman, V Thulasiraman, RG Ferreyra and J Frydman: "Formation of the VHL-Elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC"; Mol. Cell: 4; 1051-1061, 1999

283: C Dekker, PC Stirling, EA McCormack, H Filmore, A Paul, RL Brost, M Costanzo, C Boone, MR Leroux, KR Willison: "The interaction network of the chaperonin CCT"; EMBO J: 27; 1827-39, 2008

284: S Yokota, H Yanagi, T Yura, H Kubota: "Cytosolic chaperonin is up-regulated during cell growth"; J. Biol. Chem.: 274; 37070-37078, 1999

285: S Yokota, Y Yamamoto, K Shimizu, H Momoi, T Kamikawa, Y Yamaoka, et al.: "Increased expression of cytosolic chaperonin cct in human hepatocellular and colonic carcinoma"; Cell Stress Chaperones: 6; 345-350, 2001

286: C Coghlin, B Carpenter, SR Dundas, LC Lawrie, C Telfer, GI Murray: "Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer"; J. Pathol.: 210; 351-357, 2006

287: J Hui, G Reither, A Bindereif: "Novel functional role of CA repeats and hnRNP Lin RNA stability"; RNA: 9; 931-936, 2003

288: CR Rothrock, AE House, KW Lynch: "HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer"; EMBO J: 24; 2792-2802, 2005

289: J Hui, LH Hung, M Heiner, S Schreiner, N Neumuller, G Reither, SA Haas, A Bindereif: "Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian

alternative splicing"; EMBO J: 24; 1988–1998, 2005

290: DH Lee, MH Lim, DY Youn, SE Jung, YS Ahn, Y Tsujimoto, JH Lee:"hnRNP L binds to CA repeats in the 3'UTR of bcl-2 mRNA"; Biochem Biophys Res Commun: 382; 583-587, 2009

291: L De Mena, E Coto, E Sanchez-Ferrero, R Ribacoba, LM Guisasola, C Salvador, M Blazquez, V Alvarez:"Mutational screening of the mortalin gene (HSPA9) in Parkinson's disease"; J Neural Transm : ePub ahead of Print; ,

292: M Brunner, HC Schneider, R Lill, W Neupert:"Dissection of protein translocation across the mitochondrial outer and inner membranes"; Cold Spring Harb Symp Quant Biol: 60; 619–627,

293: HC Schneider, J Berthold, MF Bauer, K Dietmeier, B Guiard, M Brunner, W Neupert:"Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import"; Nature: 371; 768–774, 1994

294: R Dutkiewicz, B Schilke, H Knieszner, W Walter, EA Craig and J Marszalek:"Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron–sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart"; J. Biol. Chem.: 278; 29719-29727, 2003

295: CC Rider, CB Taylor:"Evidence for a new form of enolase in rat brain"; Biochem. Biophys. Res Commun: 66; 814-820, 1975

296: CC Rider, CB Taylor:"Enolase isozymes. II. Hybridization studies, developmental and phylogenetic aspects"; Biochim. Biophys. Acta: 405; 175-187, 1975

297: SM McAleese, B Dunbar, JE Fothergrill, LJ Hinks, INM Day:"Complete amino acid sequence of the neurone-specific γ isozyme of enolase (NSE) from human brain and comparison with the non-neuronal α form (NNE)"; Eur. J. Biochem: 178; 413-417, 1988

298: PM Zeltzer, PJ Marangos, AM Parma, H Sather, A Dalton, D Hammond, SE Siegel, RC Seeger:"Raised neuron-specific enolase in serum of children with metastatic neuroblastoma. A report from the Children's Cancer Study Group"; Lancet: 2; 361–363, 1983

299: Y Kagawa:""; Bioenergetics: L Ernster; 149-186, 1984

300: LM Amzel, PL Pedersen:"Proton Atpases: Structure and Mechanism"; Annu. Rev. Biochem: 52; 801-824, 1983

301: P Mitchell:"The Correlation of Chemical and Osmotic Forces in Biochemistry"; J Biochem: 97; 1-18, 1985

302: RJ Ellis, SM van der Vies:"Molecular chaperones"; Annu. Rev. Biochem: 60; 321–347, 1991

303: D Lanneau, M Brunet, E Frisan, E Solary, M Fontenay, C Garrido:"Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation"; J. Cell Mol. Med.: 12; 743–761, 2008

- 304: CG Concannon, AM Gorman, A Samali: "On the role of Hsp27 in regulating apoptosis"; *Apoptosis*: 8; 61–70, 2003
- 305: P Mehlen, C Kretz-Remy, X Preville, AP Arrigo: "Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death"; *EMBO J*: 15; 2695–2706, 1996
- 306: DE Read, AM Gorman: "Heat shock protein 27 in neuronal survival and neurite outgrowth"; *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 382; 6–8, 2009
- 307: L IJlst, RJ Wanders, S Ushikubo, T Kamijo, T Hashimoto: "Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the alpha-subunit of the mitochondrial trifunctional protein"; *Biochim Biophys Acta*: 1215; 347–350, 1994
- 308: JH Choi, HR Yoon, GH Kim, SJ Park, YL Shin, HW Yoo: "Identification of novel mutations of the HADHA and HADHB genes in patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency"; *Int J Mol Med*: 19; 81–87, 2007
- 309: C Meng, X Jin, L Xia, SM Shen, XL Wang, J Cai, GQ Chen, LS Wang, NY Fang: "Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats"; *J Proteome Res*: 8; 2463–2475, 2009
- 310: T Dechat, K Pflieger, K Sengupta, T Shimi, DK Shumaker, L Solimando, RD Goldman: "Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin"; *Genes Dev*: 22; 832–853, 2008
- 311: CW Tang, A Maya-Mendoza, C Martin, K Zeng, S Chen, D Feret, SA Wilson, DA Jackson: "The integrity of a lamin-B1-dependent nucleoskeleton is a fundamental determinant of RNA synthesis in human cells"; *J. Cell Sci*: 121; 1014–1024, 2008
- 312: A Chiarini, JF Whitfield, R Pacchiana, U Armato, I Dal Pra: "Photoexcited calphostin C selectively destroys nuclear lamin B1 in neoplastic human and rat cells - a novel mechanism of action of a photodynamic tumor therapy agent"; *Biochim. Biophys. Acta*: 1783; 1642–1653, 2008
- 313: AN Malhas, CF Lee, DJ Vaux: "Lamin B1 controls oxidative stress responses via Oct-1"; *J. Cell Biol*: 184; 45–55, 2009
- 314: R Fiume, G Ramazzotti, G Teti, F Chiarini, I Faenza, G Mazzotti, AM Billi, L Cocco: "Involvement of nuclear PLCbeta1 in lamin B1 phosphorylation and G2/M cell cycle progression"; *FASEB J*: 23; 957–966, 2009
- 315: S Sun, MZ Xu, RT Poon, PJ Day, JM Luk: "Circulating Lamin B1 (LMNB1) Biomarker Detects Early Stages of Liver Cancer in Patients"; *J Proteome Res*: Epub ahead of print; , 2009

- 316: HJ Worman, G Bonne:"Laminopathies": a wide spectrum of human diseases"; *Exp Cell Res*: 313; 2121-2133, 2007
- 317: H Daub, JV Olsen, M Bairlein, F Gnad, FS Oppermann, R Körner, Z Greff, G Kéri, O Stemmann, M Mann:"Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle"; *Mol Cell*: 31; 438-448, 2008
- 318: CA Geuijen, N Bijl, RC Smit, F Cox, M Throsby, TJ Visser, MA Jongeneelen, AB Bakker, AM Kruisbeek, J Goudsmit, J de Kruif:" proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry"; *Eur J Cancer*: 41; 178-187, 2005