Massenspektrometrische Untersuchungen des Sekretoms nicht-kleinzelliger Lungenkrebszellen

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Konstanze Bosse

(geborene Witte)

geboren am17.01.1983 in Eisleben

GutachterInnen:

1. Prof. Dr. Andrea Sinz
2. Prof. Dr. Elisabeth Schwarz
3. Prof. Dr. Michael Glocker

Halle (Saale), den 10.01.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Mai 2017

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

Abbildungsverzeichnis ..... **IX**

Tabellenverzeichnis ..... **XI**

ZUSAMMENFASSUNG **1**

SUMMARY **4**

1 EINLEITUNG **6**

1.1 Biologische Grundlagen **6**

1.1.1 Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC) 6

1.1.2 Resistenzproblematik bei Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) 9

1.1.3 T-PA 10

1.1.3.1 Das Plasmin-Plasminogen-System *10*

1.1.3.2 Struktur und Funktion von t-PA *11*

1.2 Massenspektrometrische Gundlagen **15**

1.2.1 ESI-Orbitrap Massenspektrometrie 15

1.2.1.1 Elektrospray-Ionisierung (ESI) *15*

1.2.1.2 Massenanalysatoren *17*

1.2.1.3 Fragmentierung *19*

1.3 Quantifizierung mittels metabolischer Markierung **21**

1.3.1 SILAC 22

1.4 Chemische Quervernetzung und Massenspektrometrie **24**

1.5 Zielstellung **28**

2 MATERIAL UND METHODEN **29**

2.1 Material **29**

2.1.1 Plasmide 29

2.1.2 Oligonukleotide 29

2.1.3 Bakterienstämme 30

2.1.4 Humane Zelllinien 31

2.1.5 Medien und Antibiotika 31
2.1.6 Puffer und Lösungen 31
2.1.7 Enzyme 32
2.1.8 Proteine und Peptide 33
2.1.9 Quervernetzungsreagenzien 33
2.1.10 Kits 33
2.1.11 Chemikalien 33
2.1.12 Geräte 36
2.1.12.1 Chromatographiesysteme 36
2.1.12.2 Massenspektrometer 37
2.1.12.3 Laborgeräte 37
2.1.12.4 Verbrauchsmaterialien 38
2.1.13 Software 38
2.2 Molekularbiologische Methoden 40
2.2.1 Präparation chemisch kompetenter Zellen 40
2.2.2 Transformation von DNA in chemisch kompetente Zellen 40
2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA von *E. coli* 40
2.2.4 Polymerasekettenreaktion 41
2.2.5 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen 41
2.2.6 Agarosegelelektrophorese 42
2.2.7 Gelextraktion von DNA 42
2.2.8 Ligation 42
2.2.9 Sequenzierung 43
2.3 Proteinchemische Methoden 43
2.3.1 Expression von t-PA-Varianten 43
2.3.2 Präparation der Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*) 43
2.3.3 Rückfaltung der t-PA-Varianten 44
2.3.4 Reinigung der t-PA-Varianten 44
2.3.4.1 Reinigung von t-PA(P) 44
2.3.4.2 Reinigung von t-PA(K2P) 45
2.3.5 Pufferaustausch und Konzentrierung von Proteinlösungen 45

2.3.5.1 Wechsel von Puffersystemen *45*
2.3.5.2 Konzentrierung von Proteinlösungen *46*
2.3.6 Aktivitätsbestimmung der t-PA-Varianten 47
2.3.7 SDS-PAGE 47
2.3.8 Enzymatische Proteolyse 48
2.3.8.1 Enzymatische Proteolyse in Lösung *48*
2.3.8.2 Enzymatische In-Gel-Proteolyse *49*
2.4 Zellbiologische Methoden 50
2.4.1 Zellkultur 50
2.4.2 Zellüberstände für *Pulldown*-Experimente 50
2.4.3 SILAC 50
2.4.3.1 SILAC-Experimente in E. coli-Zellen *50*
2.4.3.2 SILAC-Experimente in NSCLC-Zelllinien *51*
2.4.3.3 Bestimmung der Einbaurate isotopenmarkierter Aminosäuren *52*
2.4.3.4 Konditionierte Zellüberstände *52*
2.5 Chemische Quervernetzung und massenspektrometrische Analyse 53
2.5.1 Chemische Quervernetzung (*Pulldown*-Experimente) 53
2.5.2 Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie 53
2.5.3 Quantifizierung von Proteinen der SILAC-Experimente 55
2.5.4 Quantifizierung von Proteinen der *Pulldown*-Experimente 55
2.5.5 Identifizierung von Quervernetzungsprodukten 56
3 ERGEBNISSE 58
3.1 Quantifizierung sekretierter Proteine mittels SILAC 58
3.1.1 Optimierung der SILAC-Experimente mit *E. coli*-Zellen 58
3.1.2 SILAC-Experimente mit NSCLC-Zelllinien 60
3.1.2.1 Bestimmung der Einbaurate isotopenmarkierter Aminosäuren *60*
3.1.2.2 Präparation konditionierter Zellüberstände *61*
3.1.2.3 Identifizierung unterschiedlich regulierter Proteine des NSCLC-Sekretoms *65*

3.2 Klonierung, Expression und Reinigung von t-PA 70

3.2.1 Klonierung von t-PA in verschiedene Vektoren 70

3.2.1.1 Klonierung von t-PA(P) in pET-28a(+) 70

3.2.1.2 Klonierung von t-PA(K2P) in pS_C und pS_N 72

3.2.2 Expression und Reinigung von t-PA(P)-Varianten 74

3.2.3 Expression und Reinigung von t-PA(K2P) 79

3.3 Identifizierung von t-PA-Interaktionspartnern im NSCLC-Sekretom 83

3.3.1 Proteinidentifizierung mittels Quervernetzung und MS 83

3.3.2 Auswertung der Ergebnisse 90

3.3.3 Analyse von Quervernetzungsprodukten in t-PA/Protein-Komplexen 94

4 DISKUSSION 95

4.1 Quantitative Sekretomanalyse mittels SILAC 95

4.2 Klonierung, Expression und Reinigung der t-PA-Varianten 99

4.3 *Pulldown*-Experimente der Interaktionspartnerstudien 101

4.4 Chemische Quervernetzungsexperimente 103

4.5 Identifizierte t-PA-Interaktionspartner 104

4.5.1 t-PA-Bindungspartner aus dem Sekretom von PC9- und PC9ER-Zellen 104

4.5.2 t-PA-Bindungspartner aus dem Sekretom von PC9-Zellen 107

4.5.3 t-PA-Bindungspartner aus dem Sekretom von PC9ER-Zellen 109

5 AUSBLICK 110

A ANHANG XII

Literaturreferenzen XXVI

Danksagung XLII

Publikationen und Tagungsbeiträge XLIV

Lebenslauf XLVI

Selbstständigkeitserklärung XLVII

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ACTN1	Alpha-Aktinin-1
ACTN4	Alpha-Aktinin-4
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
amp^R	Ampicillinresistenz
API	Atmosphärendruckionisierung (*Atmospheric pressure ionization)*
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BS^2G	Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat
C3	Komplement C3 (*complement C3*)
CFD	Komplementfaktor D (*complement factor D*)
CID	Kollisionsinduzierte Fragmentierung (*collision-induced dissociation*)
CRM	Modell des geladenen Rückstands (*charged residue model*)
C-Trap	Gekrümmte Ionenfalle (*Curved ion trap)*
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
DTT	Dithiothreitol
E	EGF-Domäne
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfactor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
ER	Erltinibrestistent
ESI	Elektrosprayionisierung
ETD	Elektronentransfer-Fragmentierung (*electron transfer dissociation*)
EtOH	Ethanol
F	Fingerdomäne
FA	Ameisensäure (*formic acid*)

FBLN1	Fibulin-1
FBS	Fötales bovines Serum (*fetal calf serum*)
FPLC	*Fast protein liquid chromatography*
FT	Fouriertransformation
FTICR	Fouriertransformation-Ionencyclotronresonanz
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HCD	Höher energetische kollisionsinduzierte Fragmentierung (*higher energy collisional dissociation)*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (*human epidermal growth factor*)
HGFR	Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor (*hepatocyte growth factor receptor*)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high-performance liquid chromatography*)
IAA	Iodacetamid
IB	Einschlusskörper (*inclusion body*)
IEM	Modell der Ionenverdampfung (*ion evaporation model)*
IGF-1R	Insulinartiger Wachstumsfaktor 1-Rezeptor (*insulinlike growth factor receptor*)
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätachromatographie (*immobilized metal affity chromatography*)
IPTG	*D*-Isopropylthiogalaktose
IUCC	International Union gegen Krebs (*Union Internationale Contre le Cancer*)
K	Kringeldomäne
kDa	Kilodalton
LAMB3	Laminin-332 (auch Laminin β3)
LB	*Lysogeny broth*
LC	Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*)
LFQ	Markierungsfreie Quantifizierung (*label-free quantification*)
LTQ	Lineare Ionenfalle (Markenname Thermo Fisher Scientific)
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MeOH	Methanol
M	Molekulargewicht
MCS	Multipler Klonierungsbereich (*multiple cloning site*)

MGF	*mascot generic format*
m/m	Masse pro Masse
MS	Massenspektrometrie; Massenspektrometer
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
m/v	Masse pro Volumen
MYDGF	Myeloidstämmiger Wachstumsfactor (*myeloid derived growth factor*)
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NMR	Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*)
NSCLC	Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (*non-small cell lung carcinoma*)
OD	Optische Dichte
OLFML3	Olfaktomedinartiges Protein 3 (*olfactomedin-like protein 3*)
ori	Replikationsursprung (*origin of replication*)
p	Wahrscheinlichkeit
P	Proteasedomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitor
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PC9	Pulmonale Adenokarzinomzelllinie (erlotinibsensitiv)
PC9-ER	Pulmonale Adenokarzinomzellinie (erlotinibresistent)
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
pdb	Proteindatenbank (*protein data bank*)
PDGF-D	Plättchenstämmiger Wachstumsfaktor D (*platelet-derived growth factor D*)
PTEN	Phosphatase- und Tensinhomolog
RF	Radiofrequenz
RMSD	Effektivwertabweichung (*root mean square deviation*)
RP	Umkehrphase (*reversed phase*)
SAP	*shrimp alkaline phosphatase*
SDC4	Syndecan 4
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S/L	Schwer-zu-Leicht-Verhältnis
SILAC	Stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren mittels Zellkultur (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*)
SRSF1	Serin-/Arginin-reicher Splicingfaktor 1
STC2	Stanniocalcin 2
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TCA	Trichloressigsäure (*Trichloroacetic acid*)
TEMED	*N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamine
TFA	Trifluoressigsäure (*Triflouroacetic acid*)
TFE	Trifluoroethanol
Th	Thomson
TIC	Totalionenstrom (*total ion current*)
TINAGL1	Tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1 (*tubulointerstitial nephritis antigen-like 1*)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TMEM132A	Transmembranprotein 132A
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator (*tissue-type plasminogen activator*)
t-PA(K2P)	t-PA-Variante, bestehend aus der Kringel2 – und Proteasedomäne
t-PA(P)	t-PA-Variante, bestehend aus der Proteasedomäne
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane
u	Atomare Masseneinheit
u-PA	Urokinasespezifischer Plasminogenaktivator (*urokinase-type plasminogen activator*)
u-PAR	Urokinasespezifischer Plasminogenaktivator-Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (*world health organization*)
wt	Wildtyp
XL	Chemische Quervernetzung (*cross-link/cross-linker*)
YBX3	Y-Box-Bindeprotein 3
z	Ladung
ω	Kreisfrequenz der axialen Oszillation (Orbitrap)

Proteinogene Aminosäuren

Alanin Ala A	Glutamin Gln Q	Leucin Leu L	Serin Ser S
Arginin Arg R	Glutaminsäure Glu E	Lysin Lys K	Threonin Thr T
Asparagin Asn N	Glycin Gly G	Methionin Met M	Tryptophan Trp W
Asparaginsäure Asp D	Histidin His H	Phenylalanin Phe F	Tyrosin Tyr Y
Cystein Cys C	Isoleucin Ile I	Prolin Pro P	Valin Val V

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: EGFR-Signalweg nach Berg und Soreide. 8
Abbildung 1.2: Aufbau von t-PA 11
Abbildung 1.3: Die Rolle von t-PA im Plasmin-Plasminogen-System. 12
Abbildung 1.4: Therapeutisch genutzte Plasminogenaktivatoren 14
Abbildung 1.5: Darstellung der Prozesse bei der Elektrospray-Ionisierung. 16
Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau des LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometers. 18
Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau des Orbitrap Fusion Massenspektrometers. 19
Abbildung 1.8: Nomenklatur der Fragmentierung nach Roepstorff und Biemann. 21
Abbildung 1.9: Schematisches Prinzip von SILAC. 24
Abbildung 1.10: Kovalente Verknüpfung Lysin-haltiger Peptide durch BS^2G. 26
Abbildung 1.11: Schematischer Ablauf eines Pull-Down-Ansatzes für Protein-Proteininteraktionsstudien. 27
Abbildung 3.1: Massenspektrum einer SILAC-markierten E. coli-Probe. 59
Abbildung 3.2: Einbaurate der ^{13}C-Isotopenmarkierten Aminosäuren. 61
Abbildung 3.3: Vergleich verschiedener Ultrafiltrationseinheiten. 62
Abbildung 3.4: Vergleich verschiedener Konzentrierungsmethoden mittels SDS-PAGE. 63
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der SILAC-Experimente. 64
Abbildung 3.6: ESI-Massenspektren. 69
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der DNA-Inserts der t-PA-Expressionsplasmide. 70
Abbildung 3.8: Klonierung von t-PA(P) in pET28a(+). 71
Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie. 73
Abbildung 3.10: Expressionstest des t-PA(P)-Fusionsproteins. 75
Abbildung 3.11: Reinigung des t-PA(P)-Fusionsproteins mit linearem Imidazolgradient. 76
Abbildung 3.12: Reinigung des t-PA(P)-Fusionsproteins mit Imidazolstufengradient. 77
Abbildung 3.13: Aminosäuresequenzen der t-PA(P)-Fusionsproteine. 78
Abbildung 3.14: Übersicht zur Aufarbeitung von t-PA. 79
Abbildung 3.15: Aminosäuresequenz des t-PA(K2P)-Fusionsproteins 80
Abbildung 3.16: Expression und Reinigung des t-PA(K2P)-Fusionsproteins. 81
Abbildung 3.17: Aktivitätsbestimmung des t-PA(K2P)-Fusionsproteins. 82
Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der chemischen Quervernetzungsexperimente. 84
Abbildung 3.19: T-PA(K2P)-PC9ER-Crosslinking-Experiment — SDS-PAGE-Analyse. 85
Abbildung 3.20: Volcano Plots der Crosslinking-Experimente. 91

Abbildung 3.21: Venn-Diagramme der Pulldown-Experimente. 93

Abbildung A.1: Übersicht der Signalwege einer Zelle bei Krebserkrankung. XII
Abbildung A.2: ESI-Massenspektren eines EGFR-Peptids. XIV
Abbildung A.3: ESI-Massenspektren eines MYDGF-Peptids. XV
Abbildung A.4: ESI-Massenspektren eines PDGF-D-Peptids. XVI
Abbildung A.5: ESI-Massenspektren eines u-PA-Peptids. XVII
Abbildung A.6: T-PA(K2P)-PC9-Pulldown-Experiment — SDS-PAGE-Analyse. XVIII
Abbildung A.7: Venn-Diagramme der Pulldown-Experimente. XXV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Einteilung von Tumoren gemäß UICC.....6
Tabelle 2.1: PCR Programm zur DNA Amplifikation. 41
Tabelle 2.2: Zusammensetzung eines 20 µl-PCR-Ansatzes.....41
Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.....47
Tabelle 2.4: Probenansätze für die SILAC-Experimente. 51
Tabelle 3.1: Übersicht der biologischen Replikate der SILAC-Experimente. 66
Tabelle 3.2: Unterschiedlich regulierte Proteine von PC9- und PC9ER-Zellen. 67
Tabelle 3.3: Angereicherte Proteine – PC9-Zellen.....87
Tabelle 3.4: Angereicherte Proteine – PC9ER-Zellen.....89
Tabelle 3.5: Potentielle Interaktionspartner des t-PA.....94

Tabelle A.1: Potentiell unterschiedlich regulierte Proteine und ihre S/L-Verhältnisse. XIII
Tabelle A.2: Anzahl einzigartiger Peptide– PC9, angereichert mit Quervernetzung.....XIX
Tabelle A.3: Anzahl einzigartiger Peptide – PC9, angereichert ohne Quervernetzung XXI
Tabelle A.4: Anzahl einzigartiger Peptide – PC9ER, angereichert mit Quervernetzung.... XXII
Tabelle A.5: Anzahl einzigartiger Peptide – PC9ER, angereichert ohne Quervernetzung.XXIV

ZUSAMMENFASSUNG

Lungenkrebs steht mit 353.500 Todesfällen pro Jahr an der Spitze der Krebsstatistiken. In ca. 80-85 % der Fälle handelt es sich um nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC, *non-small cell lung carcinoma*). Die Prognosen im Falle einer Erkrankung von NSCLC sind sehr schlecht (5-Jahres-Überlebensrate < 20 %), da die Krankheit häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, wenn bereits Metastasen bestehen und somit eine operative Entfernung des Tumors in den meisten Fällen nicht mehr möglich ist. Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs), wie z. B. Erlotinib, gewährleisten ein zuverlässiges Ansprechen der NSCLC-Patienten auf die Therapie und verbessern die Überlebensaussichten deutlich. Der Therapieerfolg ist jedoch meist von kurzer Dauer. Unglücklicherweise manifestieren sich bei den meisten Patienten im Verlauf einer Behandlung mit TKIs primäre oder erworbene Resistenzen gegenüber dem Therapeutikum. Nicht nur bei der Krebsentstehung, sondern auch bei der Entwicklung von Resistenzen gegen Apoptose- und Nekrose-induzierende Therapien, spielen Tumor-Wirtsinteraktionen eine wichtige Rolle. Diese Interaktionen werden durch therapeutische Eingriffe modifiziert und verändern sich wesentlich, wenn Tumorzellen Resistenzen gegen spezifische Therapeutika entwickeln.

In dieser Arbeit wurden eingehende massenspektrometrische Analysen von NSCLC-Sekretomen durchgeführt. Um die Proteine der Sekretome zweier verschiedener NSCLC-Zelllinien (PC9, erlotinibsensitiv und PC9ER, erlotinibresistent) quantitativ miteinander zu vergleichen, wurde der Ansatz der stabilen Isotopenmarkierung von Aminosäuren mittels Zellkultur (SILAC, *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) angewandt. Insgesamt konnten vierzehn Proteine zwischen den erlotinibsensitiven und -resistenten Zelllinien als unterschiedlich reguliert identifiziert werden. Fünf der vierzehn Proteine zeigten markante Regulationsunterschiede zwischen den Zelllinien, im Speziellen handelt es sich dabei um den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (t-PA, *tissue-type plasminogen activator*), den urokinasespezifischen Plasminogenaktivator (u-PA, *urokinase-type plasminogen activator*), den plättchenstämmigen Wachstumsfaktor D (PDGF-D, *platelet-derived growth factor D*), den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) und den myeloidstämmigen Wachstumsfaktor (MYDGF, *myeloid-derived growth factor*). T-PA wurde in den erlotinibresistenten NSCLC-Zellen in einer bis 10-mal erhöhten Menge gegenüber den erlotinibsensitiven NSCLC-Zellen gefunden und

könnte daher ein vielversprechender prognostischer Marker zur Unterscheidung von erlotibresistenten und -sensitiven NSCLC-Zellen sein. Desweiteren ist t-PA bereits ein etablierter Tumormarker für Brustkrebs und wird bereits bezüglich seiner Rolle bei anderen Krebsarten studiert.

Ziel der in dieser Arbeit angewandten Proteomikansätze war aber nicht nur die Identifizierung der zwischen PC9- und PC9ER-Zellen unterschiedlich regulierten Proteine. Vielmehr sollten auch die Interaktionen der identifizierten Proteine charakterisiert werden, im Speziellen die Proteinwechselwirkungen von t-PA. Um einen besseren Einblick in die durch t-PA regulierten Signalwege zu erlangen, wurde eine in *E. coli* exprimierte Variante von t-PA genutzt und deren Interaktionen mit den sekretierten Proteinen der erlotinibsensitiven und -resistenten NSCLC-Zelllinien untersucht. Hierfür wurde eine mit Affinitätsanreicherung kombinierte chemische Quervernetzungsstrategie mit massenspektrometrischer Analyse durchgeführt.

Bedingt durch die Tatsache, dass t-PA eine hohe Anzahl von Disulfidbrücken enthält (die gewählte Variante enthält 9, das 17 Disulfidbrücken), wurde eine Expression in *E. coli* als Einschlusskörper (IB, *inclusion* body) mit anschließender Solubilisierung, Rückfaltung mittels schneller Verdünnung und Reinigung des t-PA-Fusionsproteins durchgeführt. Aktivitätsuntersuchungen bezüglich der Plasminogenaktivierung ergaben eine Aktivität der exprimierten t-PA-Variante von 86 % gegenüber dem Volllängenprotein (WHO-Standard).

Chemische Quervernetzung kombiniert mit einer massenspektrometrischen Analyse der erzeugten Reaktionsprodukte stellt eine alternative Methode zur Charakterisierung von Protein-Proteininteraktionen dar. Die Nutzung eines mit einem *Tag* versehenen Zielproteins erlaubt weiterhin die Identifizierung von Interaktionspartnern durch Anreicherung und Reinigung der entstandenen Komplexe mittels Affinitätsanreicherung, gefolgt von der massenspektrometrischen Analyse. In dieser Arbeit wurde diese Strategie mit t-PA als Zielprotein genutzt. Auf diese Weise konnten vierzehn Proteinen als mögliche Bindungspartner von t-PA identifiziert werden, für die sich weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Resistenzmechanismen bezüglich Erlotinib bei NSCLC anbieten. Um auszuschließen, dass es sich bei den identifizierten Bindungspartnern um falsch-positive Ergebnisse oder unspezifische Bindungen handelt, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt.

Acht der insgesamt vierzehn möglichen Bindungspartner von t-PA, Alpha-Aktinin-4 (ACTN4), Komplementfaktor D (CFD), Fibulin-1 (FBLN1), Laminin-332 (LAMB3),

Quiescin-Sulfhydryloxidase 1 (QSOX1), Stanniocalcin-2 (STC2), tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1 (TINAGL1) und Y-Box-Bindeprotein 3 (YBX3) wurden sowohl für PC9- als auch für PC9ER-Zellen angereichert. Außerdem wurden die vier Proteine Komplement C3 (C3), olfaktomedinartiges Protein 3 (OLFML3), Serin-/Arginin-reicher Splicingfaktor 1 (SRSF1) und Transmembranprotein 132A (TEMEM132A) spezifisch in PC9-Zellen, nicht aber in PC9ER-Zellen angereichert. Im Gegenzug wurden ausschließlich in PC9ER-Zellen, nicht aber in PC9-Zellen, die zwei Proteine Alpha-Aktinin-1 (ACTN1) und Syndecan 4 (SDC4) durch Anreicherung als mögliche t-PA-Interaktionspartner identifiziert. Interessant ist, dass die meisten der in dieser Arbeit als t-PA-Bindungspartner identifizierten Proteine bereits im Zusammenhang mit NSCLC oder anderen Krebsarten beschrieben sind und einige von ihnen sogar als prognostische Marker diskutiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen wichtige Fragen auf: Spielt einer oder möglicherweise auch alle vierzehn der identifizierten t-PA-Interaktionspartner eine Rolle bei den spezifischen Mechanismen, welche zur Resistenzentwicklung gegen Erlotinib führen, einem TKI der ersten Generation? Wie genau wird die Erlotinibsensitivität von NSCLC-Zellen moduliert? Besonders die Proteine, welche ausschließlich in PC9- oder PC9ER-Zellen als Bindungspartner von t-PA identifiziert wurden, verdienen eine genauere Untersuchung bezüglich ihres Einflusses auf die Resistenzentwicklung gegenüber Erlotinib.

SUMMARY

Lung cancer is the most common cancer fatality in Europe (353,500 deaths/year) with non-small cell lung cancer (NSCLC) comprising 80-85 % of all casualties. Survival rates are poor (5-year survival rate < 20 %) as most patients develop a metastatic disease that is too advanced for curative surgical resection. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as erlotinib, display reliable responses and survival benefits for the treatment of NSCLC patients. Unfortunately, the therapeutic success is shadowed by the fact that most patients undergoing TKI therapy suffer from primary or acquired resistance towards TKIs. Tumor-host interactions play a major role in carcinogenesis, but also in resistance to apoptosis- and necrosis-inducing treatment. These interactions are modified by therapeutic interventions and change substantially when tumor cells become resistant to a therapeutic agent.

In this study, in-depth mass spectrometric analyses of NSCLC cell secretomes were conducted. For a quantitative comparison of proteins secreted by two different NSCLC cell lines (PC9, erlotinib-sensitive and PC9ER, erlotinib-resistant) a stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) approach was applied. Overall, fourteen proteins were found to be differently regulated among erlotinib-sensitive and -resistant NSCLC cell lines, with five proteins, namely tissue-type plasminogen activator (t-PA), epidermal growth factor receptor (EGFR), urokinase-type plasminogen activator (u-PA), platelet-derived growth factor D (PDGF-D) and myeloid-derived growth factor (MYDGF) showing the most prominent regulation. T-PA was up to 10-fold upregulated in erlotinib-resistant NSCLC cells compared to erlotinib-sensitive cells and seems to be a promising prognostic marker to differentiate erlotinib-sensitive from erlotinib-resistant NSCLC cells. Moreover, t-PA is an established tumor marker for breast cancer and further studies on its role in other cancer types are currently underway.

The aim of the proteomics approach used in this work was to go beyond a mere identification of proteins that are differentially regulated between PC9 and PC9ER cells. The intention was to additionally characterize the interactions of these proteins, especially those involving t-PA. To gain further insights into t-PA-regulated pathways, a t-PA variant was expressed in *E. coli* cells and its interactions with proteins secreted from erlotinib-sensitive and -resistant NCSLC

cells were studied by a combined affinity enrichment chemical cross-linking/mass spectrometry (MS) approach.

Due to the fact that the t-PA variant used herein comprises eighteen cysteines that are all involved in stabilizing disulfide bonds, a rapid dilution refolding approach was performed to purify the fusion protein. Activity analysis revealed 86 % activity compared to full-length t-PA (WHO standard) on average.

Chemical cross-linking combined with an MS analysis of the created reaction products presents an alternative strategy to map protein-protein interactions. Employing a tagged bait protein allows the identification of interaction partners by enrichment and purification of the cross-linked assemblies using affinity capture followed by MS analysis. Using this strategy, with t-PA as a bait protein allowed fourteen proteins to be identified as potential t-PA interaction partners, deserving a closer inspection to unravel the mechanisms underlying erlotinib resistance in NSCLC cells. Various control experiments were performed to exclude non-specific binding.

Eight candidate proteins, namely alpha-actinin-4 (ACTN4), complement factor D (CFD), fibulin-1 (FBLN1), laminin β-3 (LAMB3), quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1), stanniocalcin-2 (STC2), tubulointerstitial nephritis antigen-like (TINAGL1), and y-box-binding protein 3 (YBX3) were identified as potential t-PA interaction partners in secretomes of PC9 as well as PC9ER cells. Furthermore, the proteins complement c3 (C3), olfactomedin-like 3 protein (OLFML3), serine/argine-rich splicing factor 1 (SRSF1), and transmembrane protein 132A (TMEM132A) were identified as specific t-PA interaction partners in PC9 cells, while alpha-actinin-1 (ACTN1) and syndecan 4 (SDC4) were found only in PC9ER cells. Remarkably, most of these proteins identified herein have already been described in the context of NSCLC or other cancer types and some of them have even been reported as prognostic markers.

The findings of this work pose important questions whether one or all of the fourteen t-PA interaction partners identified herein are involved in specific mechanisms underlying the acquired resistance towards the first-generation tyrosine kinase inhibitor erlotinib and how they modify erlotinib sensitivity in NSCLC cells. Specifically, these proteins that have been identified as t-PA interaction partners exclusively in PC9 or PC9ER cells deserve a closer inspection regarding their role in the development of erlotinib resistance.

1 EINLEITUNG

1.1 Biologische Grundlagen

1.1.1 Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC)

Lungenkrebs führt mit 353.500 Todesfällen pro Jahr die Tabellen der Krebsstatistiken in Europa und auch global mit 1.825.000 Neuerkrankungen und 1.590.000 Todesfällen pro Jahr an [1, 2]. Damit verursacht Lungenkrebs ca. ein Fünftel aller durch Krebs bedingten Todesfälle. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei nur 18 %, da Symptome für gewöhnlich erst auftreten, wenn die Tumore das umliegende Gewebe infiltrieren oder metastasieren und so mehr als die Hälfte der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird [3]. Lungenkrebs wird in kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC, *Non-small cell lung carcinoma*) untergliedert. Bei 83 % der Fälle handelt es sich um nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, zu denen Adenokarzinome, squamöse, bronchioalveolare und anaplastische Zellkarzinome sowie großzellige Karzinome zählen [4]. Nach der Internationalen Union gegen Krebs (IUCC, *Union Internationale Contre le Cancer*) werden vier Tumorstadien unterschieden (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Einteilung von Tumoren gemäß UICC.

Stadium (UICC)	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium II	T3, T4	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1, N2	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

Tis So genanntes Carcinoma in situ.
T1 Der Primärtumor ist kleiner als 2 Zentimeter.
T2 Der Primärtumor ist 2-5 Zentimeter groß.
T3 Der Primärtumor ist größer als 5 Zentimeter.
T4 Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung in der Nachbarschaft.
N0 Die benachbarten (regionären) Lymphknoten sind frei von Tumorzellen.
N1 Ein bis drei Lymphknoten in der Umgebung des Tumors sind von Krebszellen befallen.
N2 Vier oder mehr Lymphknoten der näheren Umgebung sind von Krebszellen befallen.
M0 Es sind keine Fernmetastasen vorhanden.
M1 Es sind Fernmetastasen in anderen Organen oder entfernten Lymphknoten vorhanden.

NSCLC-Patienten mit Tumoren der Stadien I und II wird der Tumor meist operativ entfernt. Bei 25 % der operierten Patienten wird zusätzlich eine Chemotherapie und/oder eine thorakale Bestrahlungstherapie durchgeführt. Patienten mit NSCLC-Tumoren der Stadien III und IV erhalten größtenteils eine Chemo- und eine Bestrahlungstherapie, da die operative Entfernung der Tumore meist nicht möglich ist. Zielgerichtete Therapeutika, wie Angiogeneseinhibitoren, Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) oder anaplastische Lymphomkinase (ALK)-Inhibitoren sind ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der NSCLC-Therapie [5]. NSCLC zeigen im Allgemeinen eine Vielzahl somatischer Mutationen, welche möglicherweise für den Therapieerfolg entscheidend sind. Laut aktuellen internationalen Richtlinien wird daher vor Beginn einer palliativen Therapie von Lungenkarzinomen eine Analyse der Gene *KRAS, EGFR, ALK, ROS1, HER2, BRAF* und *RET* empfohlen [6]. Leider stehen nur für einige der genannten Gene zielgerichtete Therapien zur Verfügung.

Bei 10-15 % der NSCLC bestehen aktivierende Mutationen des EGFR-Gens [7]. Das EGFR-Gen codiert für ein 170 kDa umfassendes Glycoprotein, eine transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinase, deren Liganden Wachstumsfaktoren sind [8]. EGFR gehört zur Familie der humanen epidermalen Wachstumsfaktorezeptoren (HER, *human epidermal growth factor receptor*) und wird in den meisten humanen Geweben exprimiert. EGFR ist an der Vermittlung der Signalübertragung für Zellwachstum und Zellproliferation beteiligt [9]. Der durch seine Liganden aktivierte EGFR rekrutiert eine Reihe verschiedener Signalmoleküle, was zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege, unter anderem beim Tumorwachstum, führt (Abbildung 1.1). In vielen soliden humanen Tumortypen besteht eine verstärkte Expression von EGFR [10]. Alle Mutationen des *EGFR*-Gens sind in den Exons 18-21 lokalisiert, die sich in der ATP-bindenden Region der Tyrosinkinase-Domäne des *EGFR*-Gens anhäufen [4]. Mutationen in diesem Genabschnitt führen zu einer gesteigerten Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität, was vorrangig zu einem Anstieg der Zellproliferation führt. NSCLC-Patienten mit Mutationen im *EGFR*-Gen profitieren von einer Therapie, bei der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), wie z. B. Erlotinib, eingesetzt werden [11]. In den letzten Jahren konnte die Behandlung von NSCLC durch individualisierte Therapien zwar deutlich verbessert werden, allerdings besteht noch immer ein großer Bedarf, sowohl die Diagnostik als auch die Behandlungsmethoden zu optimieren, um die NSCLC-bedingte Sterblichkeitsrate zu verringern. Neben der meist späten Diagnose des NSCLC stellt, auch bei individualisierten NSCLC-Therapien, die Resistenzentwicklung ein großes Problem dar.

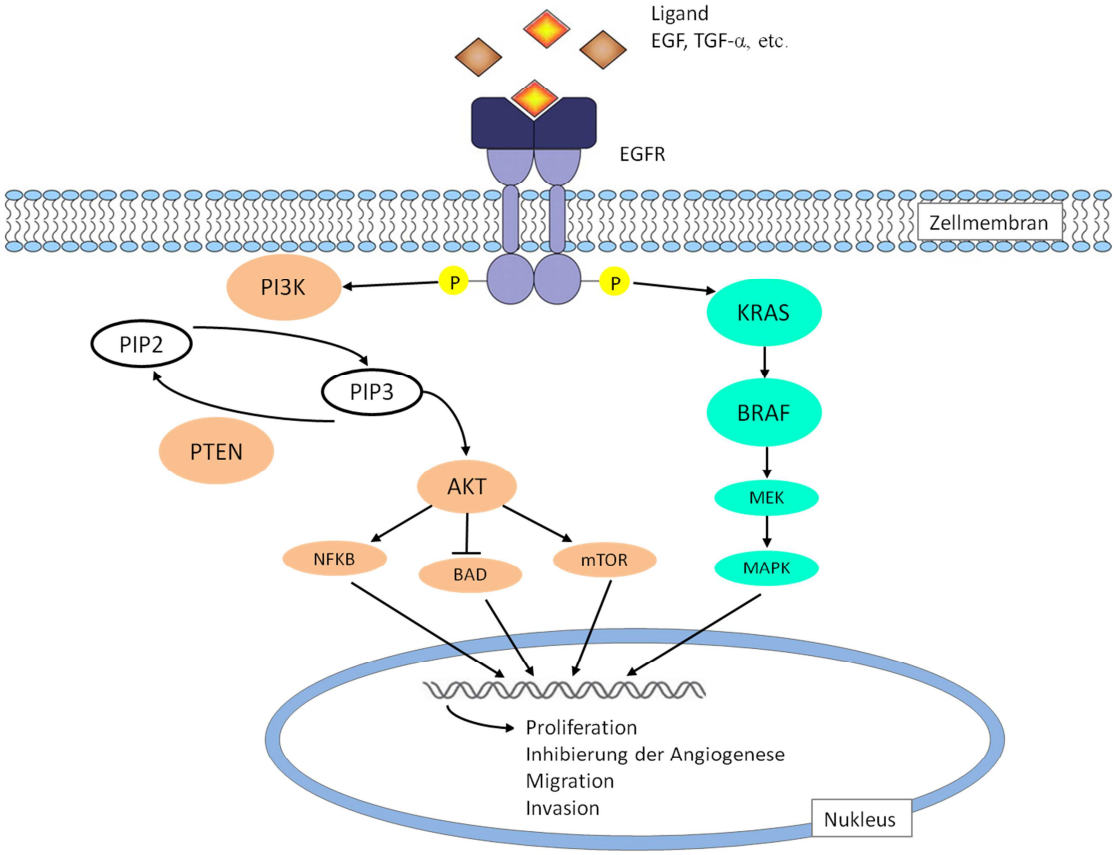

Abbildung 1.1: EGFR-Signalweg nach Berg und Soreide.

Der Ligand bindet an der extrazellulären Domäne des Rezeptors, was zur Rezeptordimerisierung und Phosphorylierung der intrazellulären Domänen führt. Die Aktivierung von EGFR führt zur Aktivierung der KRAS-Kaskade, welche die Expression wachstumsfördernder Gene auslöst. Außerdem wird der (PI3K/AKT)-Signalweg aktiviert, welcher zu Proteinsynthese, Zellwachstum und -überleben, Proliferation, Migration und Angiogenese führt [12].

EGF: *Endothelialer Wachstumsfaktor,* ***TGF-α:*** *Transformierender Wachstumsfaktor Alpha,* ***EGFR:*** *EGF-Rezeptor,* ***P:*** *Phosphorylierung,* ***KRAS****: Kirsten Rat Sarkom virales Onkogen-Homolog,* ***BRAF:*** *schnell beschleunigtes Fibrosarkom-Protein B (rapid accelerated fibrosarcome B),* ***MEK:*** *Mitogen-aktivierte Proteinkinase (****MAPK****)/extrazelluläres-Signal-regulierte Kinase (****ERK****)-Kinase,* ***PI3K:*** *Phosphoinositol 3-Kinase,* ***AKT:*** *Serin/Threonin-Kinase,* ***PTEN:*** *Phosphatase und Tensin Homolog,* ***PIP2/3****: Phosphatidylinositoldi-/triphosphat,* ***NFKB****: Nukleärer Faktor Kappa B,* ***BAD****: B-Zelllymphom 2 (Bcl-2)-Antagonist des Zelltods (Bcl-2 antagonist of cell death),* ***mTOR****: mechanistisches Ziel von Rapamycin (mechanical target of rapamycin).*

1.1.2 Resistenzproblematik bei Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs)

Noch vor einigen Jahren waren für NSCLC-Patienten Zytostatika die einzige Therapieoption. Die Entdeckung von EGFR-Mutationen bei NSCLC und die Entwicklung von EGFR-TKIs, wie Erlotinib, haben die Behandlungsmöglichkeiten von NSCLC-Patienten revolutioniert und das Zeitalter individualisierter Krebstherapien eingeleitet [13]. Doch während bei einem kleinem Teil der betroffenen Patienten die Krebserkrankung damit für Jahre erfolgreich bekämpft werden kann, wird bei den meisten NSCLC-Patienten nach weniger als einem Jahr eine Resistenzentwicklung gegenüber TKIs beobachtet [14, 15]. Arzneimittelresistenzen werden in zwei Kategorien unterteilt: 1) primäre Resistenzen, auch angeborene oder intrinsische Resistenzen genannt und 2) sekundäre Resistenzen, auch bekannt als erworbene oder adaptive Resistenzen. Primäre Resistenzen gegenüber EGFR-TKIs bei NSCLC werden mit Wildtyp-EGFR, Aktivierung von *KRAS*-Mutationen, dem Funktionsverlust des apoptotischen *BIM*-Gens oder den Liganden von Rezeptortyrosinkinasen in Verbindung gebracht [16-21]. Anders als bei Patienten mit primären Resistenzen, welche auf die entsprechende Behandlungsmethode von Beginn an nicht ansprechen, entwickeln sich sekundäre Resistenzen erst im Behandlungsverlauf nach anfänglichen Therapieerfolgen. Sekundäre Resistenzen gegenüber EGRF-TKIs bei NSCLC werden größtenteils durch Sekundärmutationen von T790M in EGFR hervorgerufen, einer Substitution der Aminosäure Threonin an Position 790 durch Methionin [22, 23]. Desweiteren spielen bei den sekundären Resistenzen auch der Expressionsverlust des Phosphatase- und Tensinhomologs (PTEN), somatische Mutationen von *PIK3CA*, Multiplikation des Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (HGFR) und des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (HER)-2 sowie die Aktivierung von HER3 und des insulinartigen Wachstumsfaktor-1-Rezeptors (IGF-1R) eine Rolle [24-28]. Bei der NSCLC-Therapie bleibt es weiterhin eine große Herausforderung, Resistenzen zu überwinden. Wenn auch schon zahlreiche Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen TKIs, wie Erlotinib, aufgedeckt wurden, werden stetig neue Mechanismen postuliert und sind anscheinend längst nicht alle gefunden. Aber auch die bekannten Mechanismen (EGFR-Mutation T790M, kompensatorische Verteilung von HGFR, HER2, HER3, IGF-1R oder Aktivierung kompensatorischer Signaltransduktionswege wie PI3K/AKT/mTOR oder JAK2/STAT3 (Abbildung A.1)) sind noch nicht vollständig oder ursächlich geklärt [29]. Tumorzellen besitzen zahlreiche Verteidigungsmechanismen und Strategien, nicht vom Immunsystem des Körpers entdeckt zu werden und finden immer neue Wege, sich gegen bestehende Behandlungsmethoden zu behaupten.

1.1.3 T-PA

1.1.3.1 Das Plasmin-Plasminogen-System

Das Plasmin-Plasminogen-System spielt eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen, wie Blutkoagulation, Gewebewachstum und Gewebeneubildung, Wundheilung, Angiogenese und Embryogenese und hat auf diese Weise auch Einfluss auf pathologische Prozesse und Krankheiten, wie Krebs, chronische Entzündungen und Blutgefäßerkrankungen [30]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Komponenten des Plasmin-Plasminogen-Systems bei den meisten Tumorarten vorgefunden werden und ihre Expressionsniveaus z. T. als prognostische Faktoren herangezogen werden können [31].

Im Körper herrscht eine stetige Balance zwischen Koagulation und Fibrinolyse, damit das Blut im Fluss bleibt, ohne jedoch bei Verletzungen der Blutgefäße Blut zu verlieren [32]. Die Koagulation endet mit der Spaltung von Fibrinogen in Fibrinmonomere durch die Protease Thrombin. Die entstandenen Fibrinmonomere polymerisieren zu einem Fibrinnetzwerk und werden schließlich mittels Quervernetzung, vermittelt durch den Koagulationsfaktor XIII, stabilisiert [33]. Um das Fibrinnetzwerk wieder abzubauen, wird die Protease Plasmin benötigt. Plasmin ist eine Serinprotease, welche aus zwei Ketten besteht [34]. Plasmin ist verantwortlich für den Abbau von Fibrin, Fibrinogen und zahlreichen anderen Plasmaproteinen, wie z. B. Faktor V, VIII, IX, XI und XII sowie Insulin und Wachstumshormen [35]. Plasminogen, das enzymatisch inaktive Zymogen von Plasmin, ist ein einkettiges Molekül, welches aus 791 Aminosäuren besteht. Plasminogenaktivatoren spalten die Peptidbindung des Plasminogens zwischen Aminosäure 561 (Arginin) und 562 (Valin) und führen so zum aktiven, zweikettigen Plasmin [36]. Es existieren zwei humane Palsminogenaktivatoren: der gewebsspezifische Plasminogenaktivator (*tissue-type plasminogen activator*, t-PA) und der urokinasespezifische Plasminogenaktivator (*urokinase plasminogen activator*, u-PA). Beide Plasminogenaktivatoren können wiederum durch Interaktionen mit Plasminaktivatorinhibitoren (PAI) gehemmt werden. Das Plasminogen-Plasmin-System bietet also Möglichkeiten, durch gezielten Eingriff mittels entsprechender Modulatoren, Effekte wie Fibrinolyse hervorzurufen und therapeutisch zur Reinfarktprophylaxe oder beim Schlaganfall zu nutzen. So sind zahlreiche Varianten der Plasminogenaktivatoren als Arzneimittel erhältlich [36].

1.1.3.2 Struktur und Funktion von t-PA

Bereits 1947 wurde in tierischem Gewebe eine Substanz entdeckt, welche in der Lage ist, Plasminogen zu aktivieren. Diese Substanz wurde ursprünglich Fibrinokinase, später jedoch gewebsspezifischer Plasminogenaktivator (t-PA) genannt [36]. Plasminogenaktivatoren wurden in verschiedenen tierischen und humanen Gewebetypen gefunden, sodass zunächst davon ausgegangen wurde, dass es eine Vielzahl verschiedener Plasminogenaktivatoren gibt. Als erstes konnte ein Plasminogenaktivator aus humanem Gebärmuttergewebe in reiner Form gewonnen werden [37]. Durch die Entwicklung eines Antiserums gegen diesen uterinen Plasminogenaktivator konnte allerdings gezeigt werden, dass die verschiedenen Plasminogenaktivatoren bis auf u-PA und t-PA alle identisch waren [38].

T-PA ist ein ca. 70 kDa umfassendes Glykoprotein, welches aus 527 Aminosäuren besteht [39]. Die Serinprotease setzt sich aus fünf Domänen zusammen: der Fingerdomäne, der EGF-artigen Domäne, zwei Kringeldomänen und der Proteasedomäne (Abbildung 1.2).

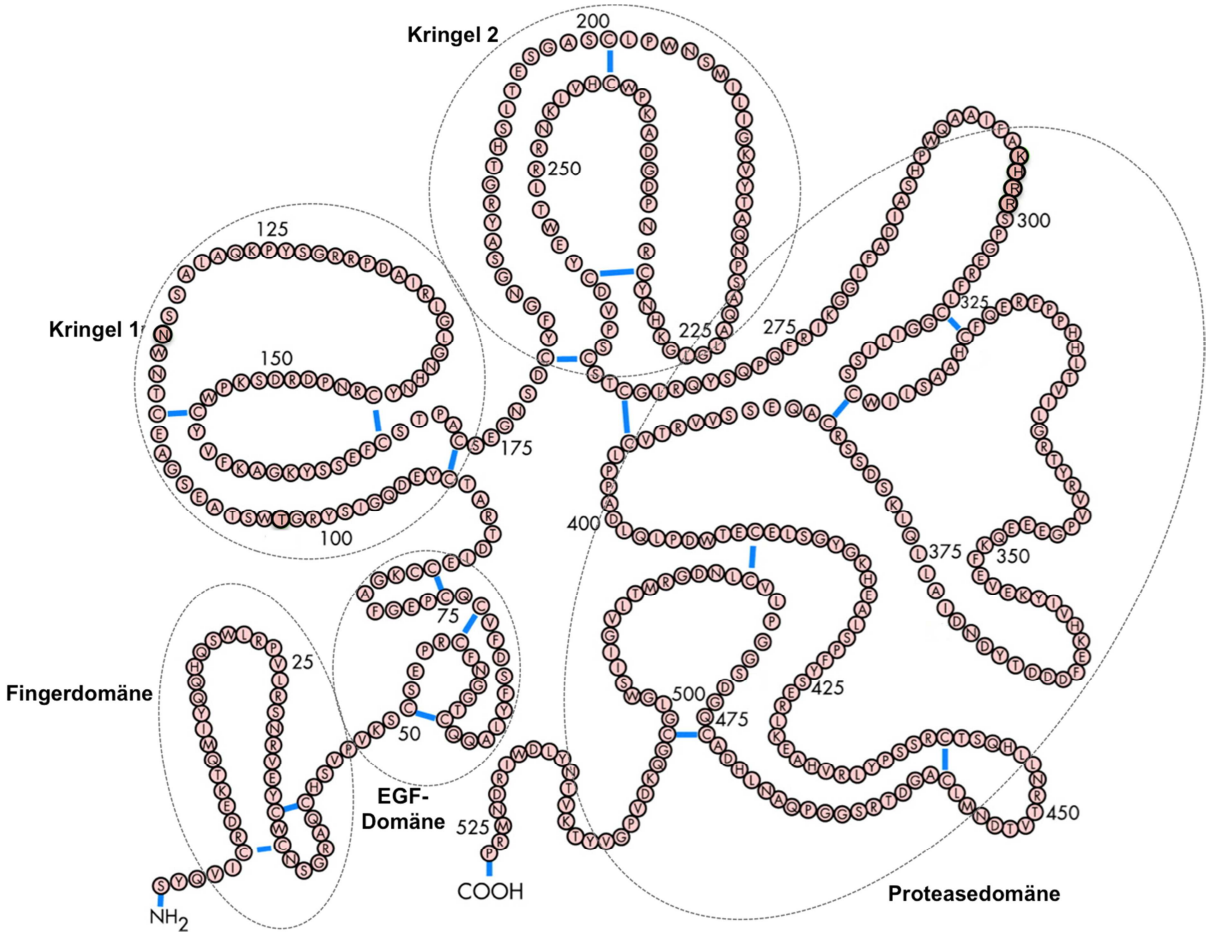

Abbildung 1.2: Aufbau von t-PA

Schematische Darstellung von t-PA nach Flemmig und Melzig [36].

Das katalytische Zentrum von t-PA setzt sich aus den Aminosäuren His322, Asp371 und Ser478 zusammen [40]. Im Gegensatz zu u-PA weist t-PA eine hohe Affinität zu Fibrin auf, was durch die Finger- und die Kringel-2-Domäne begründet ist [41, 42]. T-PA ist der häufigste, natürlich vorkommende Plasminogenaktivator. Als einkettiges Glykoprotein wird es in Endothelzellen synthetisiert und in das zirkulierende Blut sezerniert [31]. Dies geschieht sowohl konstitutiv als auch durch Rezeptorstimulaion. Die rezeptorstimulierte Freisetzung geschieht während der Koagulation als Antwort auf Koagulationsfaktoren, wie Faktor Xa oder Thrombin [43]. Ebenso können Bradykinin, Desmopressin oder Substanz P die Freisetzung von t-PA erhöhen [44]. Plasmin hingegen verringert die t-PA-Freisetzung [45]. Durch Plasmin wird t-PA auch in seine zweikettige, aktivere Form überführt. Dies geschieht durch die Hydrolyse der Bindung zwischen Arg275 und Ile276, wobei die beiden Ketten durch die Disulfidbrücke zwischen Cys264 und Cys395 verbunden sind [40]. Insgesamt besitzt t-PA 35 Cysteine, von denen 34 in Disulfidbrücken involviert sind (Abbildung 1.2). Die zweikettige t-PA-Variante ist um das Fünf- bis Zehnfache aktiver als sein einkettiges Proenzym [46]. Als Teil des Plasmin-Plasminogen-Systems konvertiert t-PA das Zymogen Plasminogen in die aktive Protease Plasmin (1.1.3.1). Plasmin wiederum ist für den Abbau von Fibrin zuständig. Die Hemmung von t-PA, und auch u-PA, erfolgt durch Plasminaktivatorinhibitoren. Eine vereinfachte Übersicht des Plasmin-Plasminogen-Systems stellt Abbildung 1.3 dar.

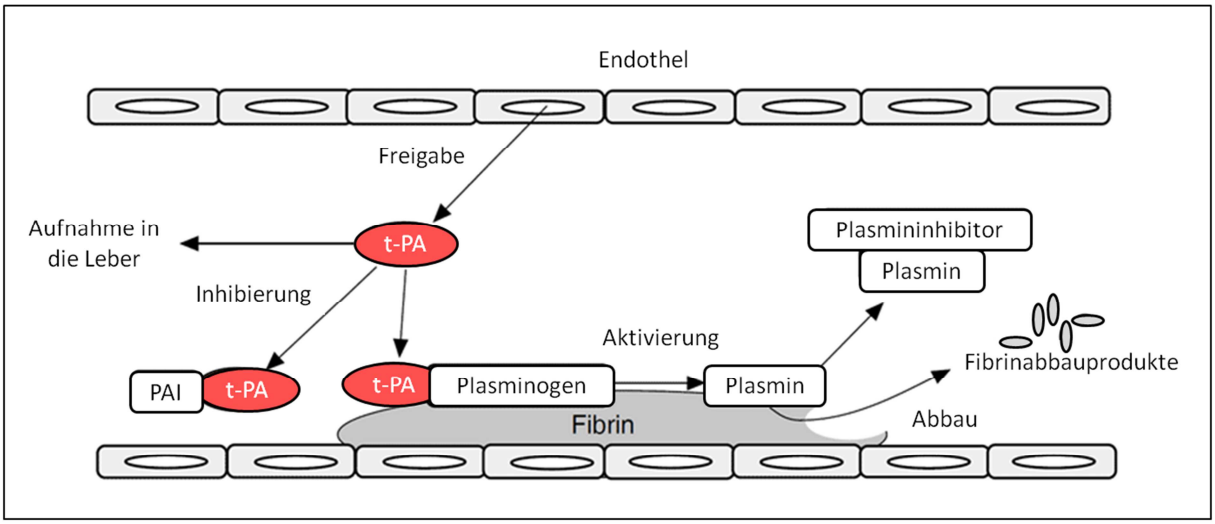

Abbildung 1.3: Die Rolle von t-PA im Plasmin-Plasminogen-System.

T-PA wird aus den Endothelzellen freigesetzt und katalysiert die Umwandlung des Proenzyms Plasminogen in die aktive Form Plasmin, welches für den Abbau von Fibrin verantwortlich ist (Abbildung von www.diapharma.com nach [47]).

Abhängig davon, in welchem Gewebe t-PA exprimiert wird, wurden bereits verschiedenen Funktionen von t-PA postuliert. Seine Funktion im vaskulären System sowie im zentralen als auch peripheren Nervensystem wurde experimentell unterlegt [48]. Im vaskulären System spielt t-PA eine Rolle bei der Fibrinolyse und Angiogenese. Im zentralen Nervensystem wird t-PA von Neuronen, Mikrogliazellen, Astrozyten und zerebralen Endothelzellen exprimiert und wird u. a. für synaptische Plastizität, Lernprozesse und Langzeitpotenzierung verantwortlich gemacht [49, 50]. Im peripheren Nervensystem schützt t-PA verletzte Nerven u.a. vor axonalem Abbau, indem Fibrinreste nahe der Verletzung entfernt werden [51]. Vaskuläre Neuronen können t-PA speichern und entlassen es als Reaktion auf Bradykinin und Phenylephrin [52, 53]. Andere postulierte Funktionen von t-PA müssen z. T. noch genauer untersucht und charakterisiert werden [48]. Die bekannten Funktionen von t-PA, z. B. bei der Fibrinolyse werden auch von der Pharmaindustrie geschätzt und genutzt. So sind heutzutage zahlreiche Varianten von Plasminogenaktivatoren als Pharmaka zur Therapie von Schlaganfällen und zur Reinfarktprophylaxe im Handel. Eine Übersicht aktuell therapeutisch genutzter Plasminogenaktivatoren findet sich in Abbildung 1.4.

Da das Plasmin-Plasminogen-System eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen wie Blutkoagulation, Gewebewachstum und Gewebeneubildung, Wundheilung, Angiogenese und Embryogenese spielt, hat es auf diese Weise Einfluss auf pathologische Prozesse und Krankheiten, wie z. B. Krebs [30]. Die Komponenten des Plasmin-Plasminogen-Systems werden bei den meisten Tumorarten vorgefunden und ihre Expressionsniveaus können z. T. als prognostische Faktoren herangezogen werden [31]. So wurde auch t-PA im Zusammenhang mit bestimmten Krebsarten, wie Brust-, Lungen- Pankreas- und Kolonkrebs beschrieben [5, 54-56]. Außerdem ist es ein etablierter Tumormarker für Brustkrebs [57]. Die Rolle anderer Komponenten des Plasmin-Plasminogen-Systems, wie PAI, u-PA und dessen Rezeptor (u-PAR) bei der Tumorzellproliferation, -migration, -invasion, Tumorangiogenese und Apoptose wurde bereits sehr ausführlich beschrieben [31]. Die Rolle von t-PA bei diesen Prozessen wie auch seine Funktion bei der Resistenzentwicklung gegen TKIs wurde bislang noch nicht studiert.

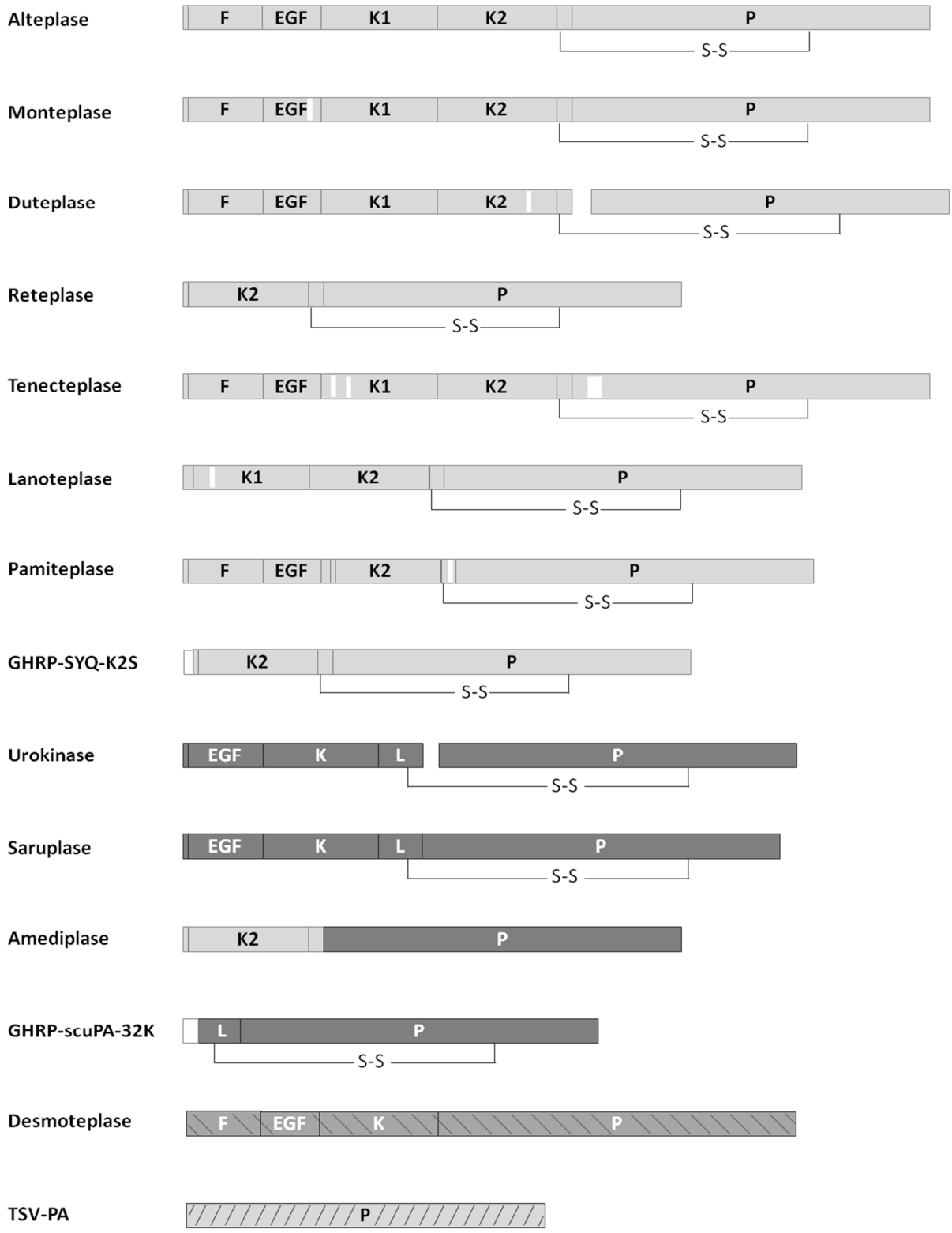

Abbildung 1.4: Therapeutisch genutzte Plasminogenaktivatoren

Übersicht therapeutisch relevanter Plasminogenaktivatoren und deren struktureller Aufbau g nach Flemmig und Melzig [36]. Hellgrau sind Strukturähnlichkeiten mit t-PA, dunkelgrau Strukturähnlichkeiten mit u-PA unterlegt. Mit dunklen Linien unterlegte Bereiche kennzeichnen Unterschiede zu u-PA und t-PA. Weiße Linien kennzeichnen Mutationen der Aminosäuresequenz. F: Fingerdomäne, EGF: EGF-artige Domäne, K: Kringeldomäne, P: Proteasedomäne, L: Verbindungsregion, S-S: Disulfidbrücke.

1.2 Massenspektrometrische Gundlagen

Massenspektrometrie (MS) ist eine analytische Methode zur Identifizierung von Verbindungen anhand der Atom- bzw. Molekülmassen ihrer Bestandteile [58]. Hierfür wird der Analyt zunächst in einer Ionenquelle, im Vakuum oder unter Atmosphärendruck, ionisiert und in die Gasphase überführt. Die entstandenen Molekülionen werden schließlich in einem Massenanalysator, im Vakuum, anhand ihrer Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (*m/z*) detektiert und können qualitativ und quantitativ charakterisiert werden. Vor allem die Entwicklung der sanften Ionisierungstechniken, wie Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung (MALDI) und Elektrospray-Ionisierung (ESI) Ende der 1980-er Jahre ermöglichte die Nutzung der MS vor allem für bioanalytische Fragestellungen, wie z. B. die Analyse von Peptiden, Proteinen oder Makromolekülen [59, 60].

Die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen basiert hauptsächlich auf der Analyse proteolytisch erzeugter Peptide [61]. Vor allem in komplexen Mischungen gibt es jedoch isobare Peptide mit unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung oder -reihenfolge. Aus diesem Grund ist eine zusätzliche Bestimmung der Aminosäuresequenz durch Fragmentierung mittels Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) üblich [61, 62]. Hierbei werden protonierte Peptide, sogenannte Vorläuferionen, mittels geeigneter Fragmentierungstechniken in Fragmentionen gespalten und deren *m/z*-Werte in einem Fragmentionen-Spektrum aufgezeichnet. Zur Bestimmung der *m/z*-Verhältnisse der Vorläufer- und Fragmentionen können verschiedene Massenanalysatoren genutzt werden. In der Proteinanalytik finden am häufigsten Ionenfallen, Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz (FTICR)-, Flugzeit-, Quadrupol- und Orbitrap-Analysatoren Anwendung [63].

Im Folgenden sollen nur die massenspektrometrischen Techniken näher erläutert werden, welche in dieser Arbeit Anwendung fanden.

1.2.1 ESI-Orbitrap Massenspektrometrie

1.2.1.1 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Mittels API (*atmospheric pressure ionization*) gelang es erstmals, Analyten direkt aus einer Lösung in die Gasphase zu überführen und in einen Analysator zu transferieren [64]. Die erste ESI-Quelle wurde von John Fenn, basierend auf Arbeiten von Malcom Dole, entwickelt [59, 65, 66]. Die Elektrospray-Ionisation von Makromolekülen basiert auf der Erzeugung eines

Aerosols aus geladenen Teilchen im elektrische Feld [59]. Eine Potentialdifferenz zwischen einer Kapillare (Abbildung 1.5 A), welche ständig Probe zuführt, und dem Massenspektrometer bewirkt eine Ladungsverteilung innerhalb der Flüssigkeit. Dient die Kapillare als Anode und der Eingang des Massenspektrometers als Kathode, wandern die negativ geladenen Ionen zur Kapillarwand und die positiv geladenen Ionen innerhalb der Flüssigkeit in Richtung Massenspektrometer. Die Kationen, welche an der dem Massenspektrometer zugewandten Flüssigkeitsoberfläche akkumulieren, erzeugen einen Flüssigkeitskonus, den Taylor-Konus (Abbildung 1.5 B) [67]. Die Anionen hingegen sammeln sich an der entgegengesetzten Seite und führen so eine Aufhebung des Feldes innerhalb der Flüssigkeit herbei.

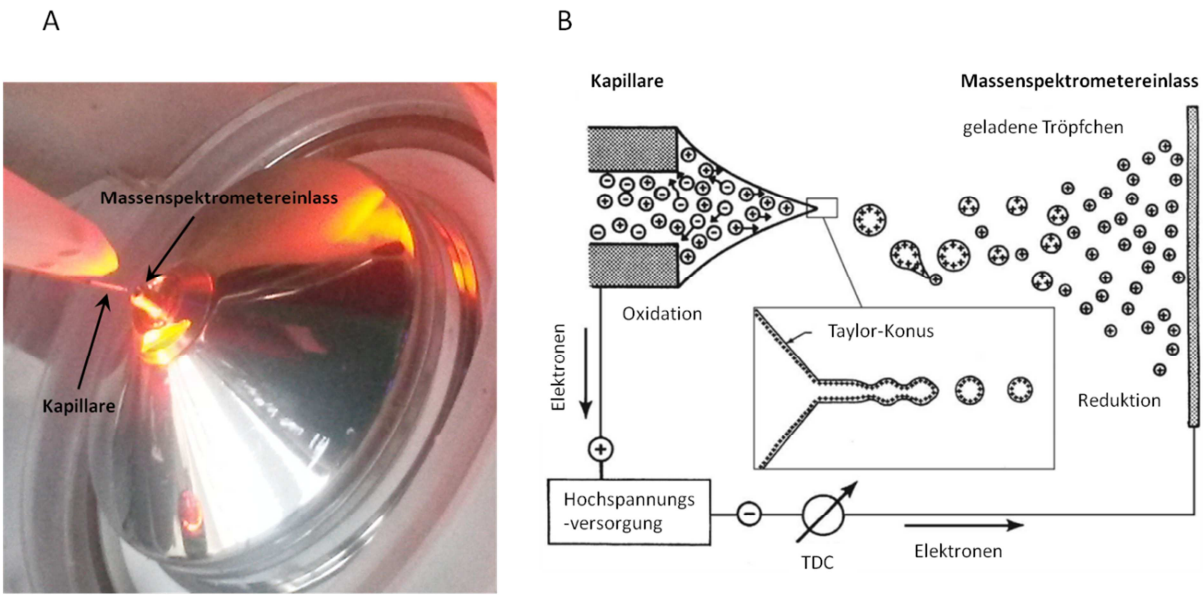

Abbildung 1.5: Darstellung der Prozesse bei der Elektrospray-Ionisierung.

A: Aufnahmen des Einlasses eines Massenspektrometers mit Nano-ESI-Quelle. B: Schematische Darstellung des ESI-Prozesses von der Bildung des Taylorkonus und der Abschnürung der Tröpfchen (Abbildung aus [58] nach [68]) .

An der Spitze des Taylor-Konus nimmt die Feldstärke zu und führt nach Überwindung der Oberflächenspannung zu einem feinen Flüssigkeitsstrom. Dieser Flüssigkeitsstrom zerfällt durch die hohe Ladungsdichte am Ende des Stroms in kleine Tröpfchen [69]. Aufgrund von Verdampfungsprozessen werden die Tröpfchen immer kleiner. Wird die kritische Ladungsdichte (Rayleigh-Limit) überschritten, führen Abstoßungskräfte zwischen den Kationen zur Entstehung von Tröpfchen mit Durchmessern von nur wenigen Nanometern (Coulomb-Explosion) [68, 70, 71]. Aus diesen „Nanotröpfchen“ gehen schließlich die

Gasphasen-Ionen hervor. Die Bildung der freien Ionen wird durch zwei verschiedene Modelle beschrieben: 1) das Modell des geladenen Rückstands (CRM, *charged residue model*) und 2) das Modell der Ionenverdampfung (IEM, *ion evaporation model*). Das CRM basiert auf der Annahme, dass jedes Nanotröpfchen immer kleiner wird und nach Verlust aller Lösungsmittelmoleküle letztlich nur ein einziges Analytmolekül enthält, auf das die verbliebenen Ladungen übertragen werden [66, 72]. So kann das Auftreten niedrig geladener Spezies großer Moleküle erklärt werden. Im Gegensatz dazu beschreibt das IEM die direkte Bildung von geladenen, desolvatisierten Ionen durch Verdampfung einzelner Ionen von der Oberfläche hochgeladener Tröpfchen [73, 74]. Beim IEM wird davon ausgegangen, dass größere Moleküle entsprechend ihrer Oberfläche mehr Ladungen erhalten als kleine Moleküle. Für dieses Modell sprechen Beobachtungen, bei denen Proteine in entfalteter Form häufig höhere Ladungen tragen als in nativer, gefalteter Form. Bei ESI-Quellen wird die Verdampfung der Ionen durch ein Trockengas, wie Stickstoff, unterstützt. In dieser Arbeit wurden Nano-ESI-Quellen genutzt, welche bereits sehr kleine Tröpfchen erzeugen, sodass kein zusätzlicher Gasstrom nötig ist [75].

1.2.1.2 Massenanalysatoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer LTQ-Orbitrap XL und Orbitrap Fusion sind Hybridgeräte, welche sich aus verschiedenen Massenanalysatoren zusammensetzen [76, 77]. Das erste Hybridmassenspektrometer, welches aus einer linearen Ionenfalle (LTQ) und einem Orbitrap-Analysator besteht, wurde 2005 vorgestellt und seither kontinuierlich weiterentwickelt [78].

1.2.1.2.1 LTQ-Orbitrap XL

Nach Eintritt der Ionen ins Massenspektrometer gelangen diese in die LTQ (Abbildung 1.6). Dort wird der Totalionenstrom (TIC) bestimmt und die Füllzeit der Falle automatisch angepasst [76]. Auf diese Weise wird ein Überfüllen der LTQ und daraus resultierende Raum-Ladungseffekte verhindert, sodass eine hohe Massengenauigkeit erzielt werden kann. Wenn eine bestimmte Anzahl Ionen in der LTQ akkumuliert wurde, können diese mit einer niedrigen Auflösung, jedoch hoher Sensitivität, in der LTQ analysiert werden oder in die gekrümmte Ionenfalle (*Curved Trap*, *C-Trap*) weitergeleitet werden. In der *C-Trap* verlieren

die Ionen kinetische Energie durch Kollision mit Stickstoffmolekülen. Sie werden abgebremst und im Zentrum der *C-Trap* konzentriert. Die Ionen werden als „Ionenpakete“ per Hochspannungspuls ausgestoßen und in die Orbitrap, eine Weiterentwicklung der Kingdon-Falle, injiziert [76, 79]. Nach Eintritt in den Analysator bewegen sich die Ionen auf Kreisbahnen um die axial gelegene Zentralelektrode und oszillieren gleichzeitig entlang der z-Achse [79]. So wird ein zeitabhängiges Stromsignal erzeugt, welches durch zwei Außenelektroden detektiert wird. Aus dem Signal kann mittels Fourier-Transformation (FT) die Kreisfrequenz ω der axialen Oszillation bestimmt werden. Da sich ω indirekt proportional zur Wurzel des *m/z*-Verhältnisses verhält (Gleichung I, k = Gerätekonstante für die Krümmung des elektrischen Feldes), kann so der *m/z*-Wert eines Ions ermittelt werden [76].

$$\textbf{(I)} \qquad \boldsymbol{\omega} = \sqrt{\frac{\boldsymbol{k}}{\boldsymbol{m/z}}}$$

Die Analyse der Ionen kann mit einer Auflösung (R) von bis zu 100.000 bei *m/z* 400 und, bei interner Kalibrierung, mit einer Massengenauigkeit von ≤ 3 ppm erfolgen. Eine schematische Darstellung des LTQ-Orbitrap XL-Hybridgerätes stellt Abbildung 1.6 dar.

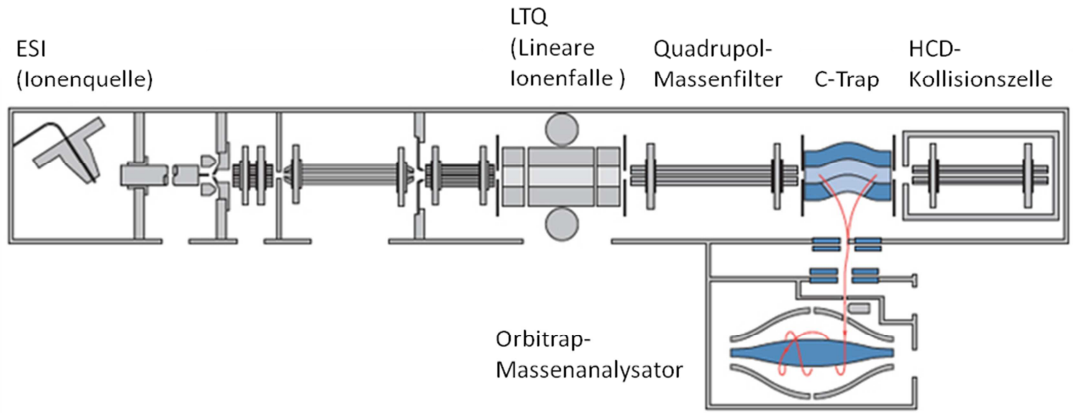

Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau des LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometers.
[www.planetorbitrap.com].

1.2.1.2.2 Orbitrap Fusion

Die Orbitrap des neueren Orbitrap Fusion Tribrid-Gerätes (Abbildung 1.7) ist im Vergleich zu der des LTQ-Orbitrap XL-Gerätes kleiner und besitzt eine dickere Innenelektrode. Durch ein stärkeres elektrisches Feld der sogenannten *High-Field* Orbitrap sowie einem niedrigeren Druck in der linearen Ionenfalle kann eine Auflösung von bis zu 400.000 bei *m/z* 200 oder

kürzere Analysezeiten bei vergleichbarer Auflösung zum LTQ-Orbitrap XL-Gerät erreicht werden [77]. Unter Nutzung einer internen Kalibrierung ist eine Massengenauigkeit von ≤ 1 ppm möglich. Bei der Orbitrap Fusion erfolgt die Transmission der Ionen zunächst über einen Ionentrichter (*S-Lens*). Folgend werden im gebogenen Transferquadrupol Neutralteilchen abgetrennt und die geladenen Moleküle in den Quadrupol-Massenfilter überführt. Im Quadrupol-Massenfilter können die Ionen eines *m/z*-Wertes isoliert oder auch alle Ionen hindurchgeleitet werden. Die Ionen werden in der *higher-energy collisional dissociation* (HCD)-Zelle gesammelt, um dann über die C-Trap in die Orbitrap oder alternativ in die zweizellige lineare Ionenfalle überführt und analysiert.

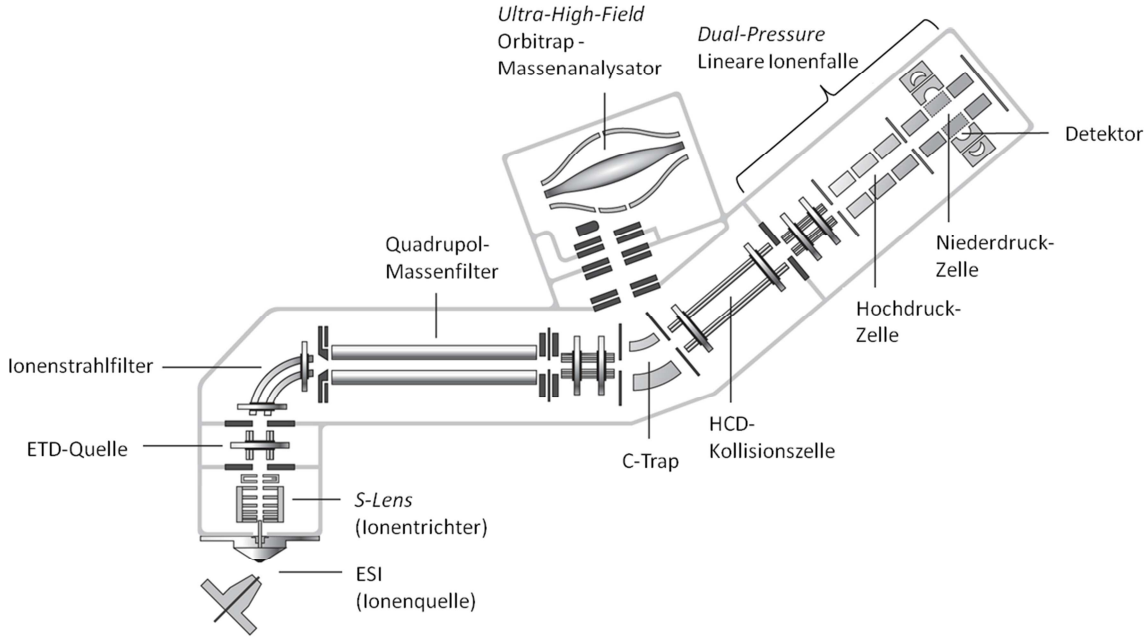

Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau des Orbitrap Fusion Massenspektrometers.
[www.planetorbitrap.com].

1.2.1.3 Fragmentierung

In dieser Arbeit wurden die Techniken der kollisionsinduzierten Fragmentierung (CID, *collision induced dissociation*), HCD sowie der Fragmentierung durch Elektronenübertragung (ETD, *electron transfer dissociation*) angewendet.

Im Falle von CID werden die in der LTQ isolierten und gespeicherten Ionen durch ein elektrisches Potential auf eine Stufe höherer kinetischer Energie angeregt [80, 81]. Durch Zufuhr eines Inertgases (z. B. Helium, Argon oder Stickstoff) kollidieren die angeregten

Ionen mit den Molekülen des Inertgases und es werden Bindungsbrüche der Vorläuferionen induziert. Wobei die schwächsten Bindungen eines Moleküls zuerst brechen. Im Falle von Peptiden ist dies die Peptidbindung. Die Fragmentionen können in der LTQ oder in der Orbitrap des LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometers detektiert werden. Beim Orbitrap Fusion Massenspektrometer mit zweizelliger linearer Ionenfalle erfolgt die Fragmentierung in der Hochdruck-Zelle und die Detektion der entstandenen Fragmentionen in der Niederdruck-Zelle (Abbildung 1.7).

Das Prinzip der HCD-Fragmentierung ähnelt dem der CID Fragmentierung [82]. Jedoch erfolgt in diesem Fall die Anregung der Ionen mittels eines Radiofrequenzpulses. Die Fragmentionen werden in die *C-Trap* transferiert und dort fokussiert. Im Falle des LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometers erfolgt die Detektion der Fragmentionen in der Orbitrap. Beim Orbitrap Fusion-Massenspektrometer kann durch eine andere Anordnung der Analysatoren die Detektion sowohl in der Orbitrap als auch in der LTQ erfolgen. Genau wie bei der CID-Fragmentierung wird bei der HCD-Technik die Bindung zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem benachbarten Stickstoffatom der Peptidbindung gespalten. Es entstehen *b*-Fragmentionen (Verbleib der Ladung am *N*-Terminus) und *y*-Fragmentionen (Verbleib der Ladung am *C*-Terminus). Trotz höherer Energie bleiben posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, erhalten und können mittels HCD-Fragmentierung analysiert werden [82].

Für das Orbitrap Fusion-Massenspektrometer steht zusätzlich die ETD-Technik zur Verfügung [77]. Die Fragmentierung erfolgt hier durch die Übertragung niederenergetischer Elektronen [83]. In einer Reaktionskammer, welche sich hinter dem Ionentrichter befindet, wird mittels eines elektrischen Feldes ein Elektron des zugeführten Stickstoffs auf ein sublimiertes Fluoranthenmolekül übertragen. In der LTQ werden interessierende Ionenspezies isoliert und gespeichert. Das erzeugte Fluoranthenradikalion wird nun ebenfalls in die LTQ überführt, wo das niederenergetischste Elektron auf das Analytmolekülion übertragen wird. Im Falle von Peptiden kommt es so zum Bruch der Bindung zwischen dem an der Peptidbindung beteiligten Amidstickstoff und dem Cα-Atom. Es entstehen *c*-Fragmentionen (*N*-terminal) und *z*-Fragmentionen (*C*-terminal). Ein Vorteil dieser Technik liegt in der zusätzlichen Fragmentierung der Seitenketten, was z. B. eine Unterscheidung der Aminosäuren Leucin und Isoleucin ermöglicht. Ein anderer Vorteil ist, dass posttranslationale Modifikationen größtenteils erhalten bleiben und analysiert werden können [84].

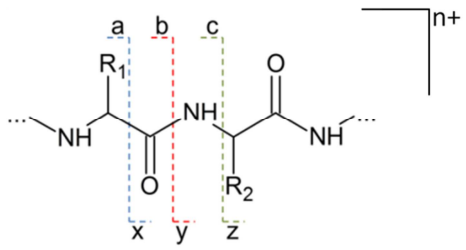

Abbildung 1.8: Nomenklatur der Fragmentierung nach Roepstorff und Biemann.
Durch einen Bindungsbruch entstehen ein N-terminales und ein C-terminales Fragmention. Je nach Fragmentierungstechnik werden unterschiedliche Bindungen bevorzugt gespalten und es kommt zur Bildung von a- und x-, b- und y- oder c- und z-Ionen [85, 86] .

1.3 Quantifizierung mittels metabolischer Markierung

Die Untersuchung lebender Systeme auf Proteinebene bietet wichtige Einblicke in zahlreiche biologische Prozesse. Dabei ist vor allem die Analyse quantitativer Unterschiede nicht trivial. Die massenspektrometriebasierte Proteomik hat sich dabei als nützliches Werkzeug zur Untersuchung biologischer Sytsteme etabliert, da tausende Proteine und posttranslationale Modifikationen parallel untersucht werden können [87]. Quantitative MS-basierte Methoden der Proteomik werden prinzipiell in solche mit Markierung und markierungsfreie (*label-free*) unterschieden. Bei markierungsfreien Methoden werden Quantitäten z. B. anhand der Anzahl zur Identifizierung eines Proteins herangezogenen Peptide, der Anzahl der zugehörigen Spektren (PSMs, *peptide spectral matches*) oder auch der durchschnittlichen Intensität aller zu einem Protein gehörigen Fragmentionenspektren abgeschätzt [87]. Die Methoden der quantitativen MS-basierten Proteomik mit Markierung werden in drei Gruppen untergliedert: a) metabolische Markierung, b) chemische oder enzymatische Markierung und c) Markierung mittels zugegebener Standards (*spiked standards*) [88]. Bei der metabolischen Markierung (SILAC oder ^{15}N-Markierung) wird die stabile Isotopensignatur bereits während der Phase der Zellteilung und des Wachstums in die Proteine eingeführt. Dies hat den Vorteil, dass Proben bereits auf der Ebene intakter Zellen, direkt zu Beginn der Probenbearbeitung zusammengeführt werden können und sich so etwaige Fehler oder Störfaktoren im Experimentenverlauf gleichermaßen auf die zu untersuchenden Zustände auswirken [89]. Bei der chemischen oder enzymatischen Markierung werden Proteine oder auch Peptide nach der Biosynthese *in vitro* mit sogenannten Massen-*Tags* versehen. Zu diesen Methoden gehören u. a. die ^{18}O-Markierung, isotopenkodierte Affinitäts-*Tags* (ICAT, *isotope-coded affinity tags*), isotopenkodierte Proteinmarkierung (ICPL, *isotope-coded protein label*), Isotopen-*Tags*

zur relativen und absoluten Quantifizierung (iTRAQ, *isotope tags for relative and absolute quantification*) und Tandemmassen-*Tags* (TMT, *tandem mass tags*) [87]. Methoden der chemischen Markierung zeichnen sich dadurch aus, dass viele verschiedene Zustände in nur einem Experiment miteinander verglichen werden können. Die Quantifizierung mittels zugegebener Standards wird z. B. bei der absoluten Proteinquantifizierung (AQUA, *absolute quantification of proteins*) realisiert. Hierbei wird im einfachsten Fall eine bekannte Menge eines Standardpeptids mit stabiler Isotopenmarkierung zu einer Mischung enzymatisch gespaltener Proteine gegeben, massenspektrometrisch analysiert und die Signale der unbekannten Peptide mit dem des Standards verglichen [88]. Die AQUA-Methode hat zwei entscheidende Nachteile. Zum einen ist die benötigte Menge an Standard vorher nicht bekannt und kann von System zu System stark abweichen. Zum anderen ist es sehr wahrscheinlich, dass sich in der zu untersuchenden Peptidmischung mehrere isobare Peptide zum Standardpeptid befinden, sodass eine Kombination von AQUA mit multiplen Reaktionsmonitoring (MRM, *multiple reaction monitoring*) sinvoll ist. Alle MS-basierten Quantifizierungsmethoden haben ihre Stärken und Schwächen, so sind chemische Markierungsmethoden oft anfällig für Nebenreaktionen mit unerwarteten Produkten, die SILAC-Methode ist nicht für alle Zellinien geeignet, da einige sehr empfindlich auf das spezielle SILAC-Medium reagieren oder gar nicht damit kultiviert werden können [88]. Die Wahl der quantitativen Methode sollte also entsprechend der Art der Proben und der Ziele, die mit den Experimenten erreicht werden sollen, passend gewählt werden.

1.3.1 SILAC

Die SILAC-Methode ist ein möglicher Ansatz in der massenspektrometriebasierten quantitativen Proteomik, welcher im Vergleich mit chemischen Markierungsmethoden oder markierungsfreien quantitativen Techniken der Proteomik die Vorteile von quantitativer Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aufweist. Das Prinzip der SILAC-Methode basiert auf dem Einbau stabil markierter Aminosäuren in ein Proteom während des Proteinstoffwechsels, im Speziellen bei der Zellkultivierung [89]. Zum ersten Mal kam die Methode im Jahre 2002 zur Anwendung [90]. Auch wenn sie ursprünglich dafür entwickelt wurde, Säugerzellen zu markieren, findet sie heute für verschiedene Organismen, wie z. B. Bakterien, Hefen, Pflanzen, Taufliegen, Zebrafische und Mäuse Verwendung [89]. Sie stellt ein ausgezeichnetes Mittel der Proteomik dar, zwei oder mehrere unterschiedliche Zustände von Zellen oder sogar Lebewesen, beispielsweise Knock-out-Mutanten gegen Wildtyp oder behandelte gegen nicht

behandelte Kontrollzellen quantitativ miteinander zu vergleichen [91-93]. Frühestmöglich, in der Phase der Zellteilung und des Wachstums, werden die Proteine durch den Einsatz von isotopen-markierten Aminosäuren in einem speziellen SILAC-Medium metabolisch markiert. Auf diese Weise wird eine Isotopensignatur in die Proteine eingeführt, welche bei der folgenden massenspektrometrische Analyse für die relative Quantifizierung von Proteinen herangezogen werden kann [88]. Entscheidend ist dabei, dass eine Quantifizierung nur möglich ist, wenn die Einbaurate der markierten Aminosäuren bei nahezu 100 % liegt. Dies erfordert die Kultivierung in einem entsprechenden Medium für durchschnittlich fünf bis acht Zellzyklen [88]. Wenn die Zellen eine ausreichend hohe Einbaurate erreicht haben, können die gewünschten Proben, wie z. B. das Zelllysat oder der Zellüberstand, analysiert werden.

Sollen zwei Zustände verglichen werden, erhält eine der Zellkulturen im Medium nur Aminosäuren, die ein schweres Isotop tragen (^{15}N statt ^{14}N und/oder ^{13}C statt ^{12}C) die andere nur Aminosäuren mit leichtem Isotop (^{14}N, ^{12}C). Diese Aminosäuren werden dem Kulturmedium zugesetzt, von den Zellen aufgenommen und in alle neu gebildeten Proteine eingebaut. Zur Markierung der Proteine werden am häufigsten die Aminosäuren Arginin und Lysin verwendet, da bei der Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie in der Regel Trypsin (spaltet *C*-terminal Lysin und Arginin) zur proteolytischen Spaltung eingesetzt wird. Dadurch trägt jedes Peptid im Idealfall genau eine schwere Aminosäure, was die Datenauswertung einfacher macht. Zur Analyse werden die Proteine beider Zellkulturen vereint und gemeinsam vermessen. Peptide, die mit „schweren Aminosäuren“ markiert wurden, unterscheiden sich in ihrer Isotopenzusammensetzung, verhalten sich aber während der Probenpräparation sowie der chromatographischen Trennung und massenspektrometrischen Analyse wie ihre „leichten“ Analoga. Wenn die zu vergleichenden Proben in einem definierten Verhältnis (meist 1:1), bezogen auf das Ausgangsvolumen, die Zellzahl oder die Gesamtproteinkonzentration gemischt werden, die Proteine proteolytisch gespalten und die Peptide massenspektrometrisch gemessen werden, erhält man für jedes Peptid ein Signalpaar mit einem spezifischen Massenunterschied, bedingt durch den Einbau der markierten Aminosäuren (Abbildung 1.9). Die relativen Verhältnisse der Peptidsignale im Massenspektrum entsprechen dem Verhältnis der zu vergleichenden Peptide aus der Probe, was eine Quantifizierung ermöglicht.

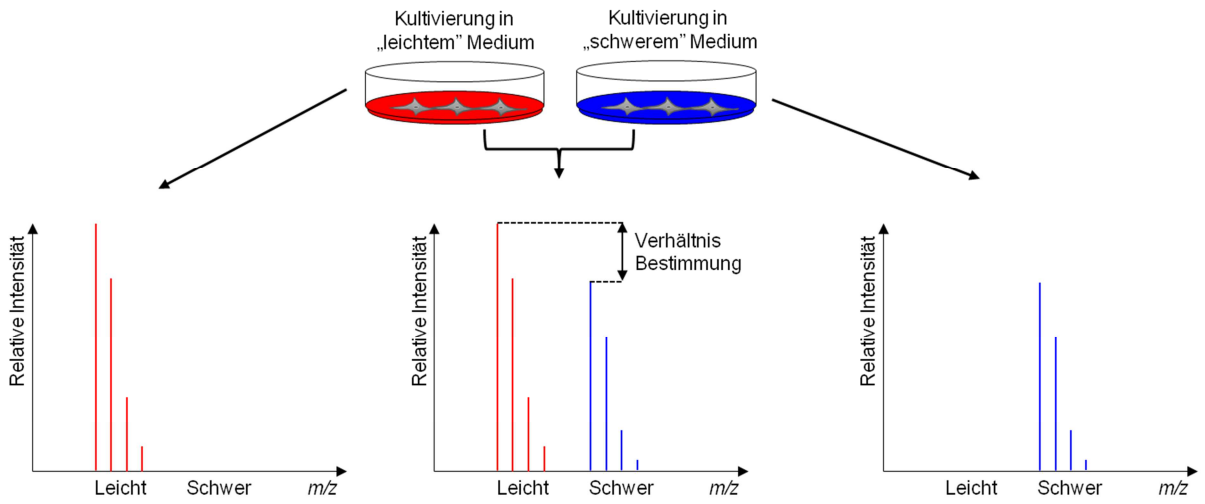

Abbildung 1.9: Schematisches Prinzip von SILAC.

Je nach genutzter Markierung kommt es zur Verschiebung des m/z-Bereichs, in welchem die Signale der Peptide detektiert werden. Mittels massenspektrometrischer Analyse kann somit eine relative Quantifizierung erfolgen.

Neuere Entwicklungen wie *spike-in* SILAC und Super-SILAC ermöglichen den Einzug der SILAC-Technologie in klinische Anwendungsgebiete zur quantitativen Untersuchung von Geweben und Körperflüssigkeiten [94, 95].

1.4 Chemische Quervernetzung und Massenspektrometrie

Die Funktion eines Proteins ist eng mit seiner dreidimensionalen Struktur verknüpft [96]. Strukturveränderungen eines Proteins können daher auch mit Veränderungen in dessen Funktion einhergehen und sind mitunter entscheidend für den Ablauf eines physiologischen Prozesses. Proteine steuern die DNA-Replikation, Transkription, Translation, Spleißen und Einführung posttranslationaler Modifikationen, intra- und interzelluläre Kommunikation, den Metabolismus und den Zellzyklus. Um die physiologischen Funktionen von Proteinen besser zu verstehen, ist die Aufklärung von Zusammenhängen zwischen ihrer dreidimensionalen Struktur und ihrer Funktion von Bedeutung. Neben den etablierten hochauflösenden Methoden Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie bietet die Kombination aus chemischer Quervernetzung (XL, *cross-linking*) von Proteinen und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse (XL/MS) eine Möglichkeit, niedrig aufgelöste Strukturinformationen zu ermitteln [96-98]. Entscheidende Vorteile von XL/MS im Vergleich

zu den klassischen Methoden sind, dass nur sehr geringe Mengen an Analyt benötigt werden, die Reaktion bei nahezu physiologischen Konzentrationen und pH-Bedingungen und auch für große Proteine oder Proteinkomplexe sowie für transiente Interaktionen durchgeführt werden kann [96].

Schon seit Jahrzehnten ist die chemische Quervernetzung von Proteinen etabliert, um Interaktionen von Proteinen zu fixieren [99]. Dabei werden die Seitenketten von Aminosäuren mit Hilfe kleiner organischer Reagenzien (chemische Quervernetzungsreagenzien) kovalent verknüpft. Die Proteine oder Proteinkomplexe werden dadurch in einer bestimmten Konformation fixiert. Das Quervernetzungsreagenz wird entsprechend des zu untersuchenden Proteins anhand dessen Primärstruktur, Größe und der spezifischen Fragestellung ausgewählt. Chemische Quervernetzungsreagenzien weisen in der Regel zwei reaktive Gruppen auf, welche identisch oder auch verschieden sein können (homo- oder heterobifunktionell) und mit den Aminosäureseitenketten spezifisch reagieren. Es gibt jedoch auch trifunktionelle Quervernetzungsreagenzien, die eine zusätzliche Funktionalität enthalten, die zur Affinitätsanreicherung von Quervernetzungsprodukten genutzt werden kann [100]. Eine Unterscheidung der Quervernetzungsreagenzien kann auch aufgrund ihrer Reaktivität erfolgen. So unterscheidet man spezifische Reagenzien (aminreaktiv, carboxylreaktiv oder sulfhydrylreaktiv), unspezifische Reagenzien (z. B. Formaldehyd oder Glutaraldehyd) und Reagenzien mit photoaktivierbaren Gruppen (Arylazide, Diazirine oder Benzophenone) [96, 100, 101].

In dieser Arbeit wurde das homobifunktionelle aminreaktive Reagenz Bis(sulfosuccinimidyl)-glutarat, kurz BS^2G, eingesetzt, mit dem Quervernetzungen zwischen Lysinseitenketten eingeführt (Abbildung 1.10) und auf diese Weise Proteinstrukturen fixiert werden.

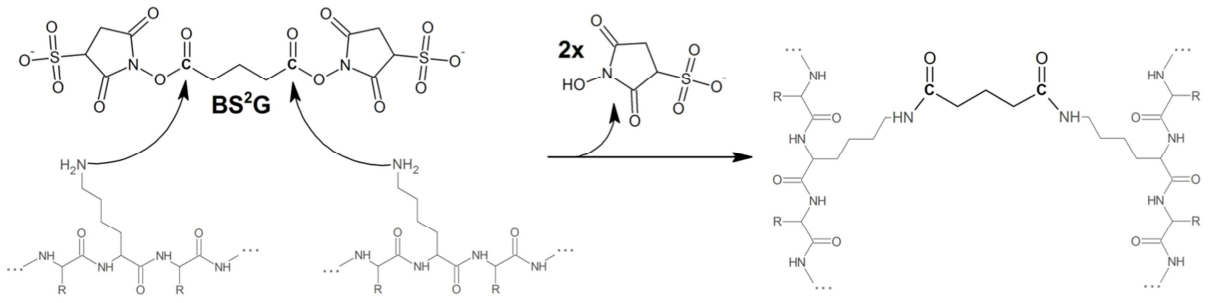

Abbildung 1.10: Kovalente Verknüpfung Lysin-haltiger Peptide durch BS²G.
Es erfolgt ein nukleophiler Angriff der Aminogruppen der Lysine an den Carbonyl-C-Atomen des Diesters. Es kommt zur Ausbildung zweier Säureamidbindungen zur Verknüpfung beider Peptide. Dabei wird N-Hydroxysulfosuccinimid abgespalten.

Die Untersuchung quervernetzter Proteine und Komplexe kann prinzipiell nach zwei verschiedenen Strategien erfolgen: der „*bottom-up*“ und der „*top-down*“-Analyse.

Bei der „*bottom-up*“-Analyse werden die fixierten Komplexe nach gelelektrophoretischer Trennung oder auch direkt in Lösung mit einer oder mehreren geeigneten Proteasen enzymatisch gespalten [96]. Die erhaltenen Peptidmischungen, welche sehr komplex sind und zum Großteil unmodifizierte, lineare Peptide und nur zu einem geringen Anteil quervernetzte Produkte enthalten, werden chromatographisch getrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Die massenspektrometrisch erzeugten Daten werden schließlich mit einer Liste theoretisch errechneter Quervernetzungsprodukte abgeglichen und mögliche identifizierte Produkte durch Kontrolle ihrer zugehörigen Fragmentionenspektren bestätigt oder widerlegt. Ein wichtiger Punkt bei der „*bottom-up*“-Analyse ist die Wahl geeigneter Proteasen, damit Peptide im Massenbereich von 1000-3000 u erhalten werden und gut zu analysieren sind. Häufig wird die Protease Trypsin genutzt, da sie spezifisch *C*-terminal an Lysin- und Argininresten spaltet. Da es durch aminreaktive Quervernetzungsreagenzien, welche mit den Lysinseitenketten reagieren, häufig zu Fehlschnittstellen kommt, empfiehlt sich zusätzlich die Verwendung einer zweiten Protease.

Der „*top-down*“-Ansatz dient der Analyse intakter Proteinkomplexe [96]. Dazu wird der Komplex ohne vorherige proteolytische Spaltung ionisiert und in die Gasphase überführt. In der Gasphase werden die Ionen des Komplexes durch einen Massenfilter isoliert und anschließend fragmentiert. Eine leistungsfähige Fragmentierungsmethode, wie die ETD- und/oder CID-Technik, ist dabei von entscheidender Bedeutung, um die

Quervernetzungsstellen genau zu identifizieren. Mit der „*top-down*“-Methode können Dank leistungsfähiger Softwarelösungen posttranslationale Modifikationen analysiert werden [102, 103]. Da es für quervernetzte Proteine keine vergleichbaren Computerprogramme gibt, erfolgt die Auswertung hier noch sehr zeitaufwendig manuell und begrenzt momentan die Anwendung der „*top-down*“-Technik.

Chemische Quervernetzung in Kombination mit massenspektrometrischer Analyse bietet auch die Möglichkeit, Protein-Proteininteraktionen zu untersuchen. Neben kovalenten Wechselwirkungen können auch transiente Interaktionen sowie dynamische Strukturänderungen in Proteinkomplexen registriert werden. Setzt man ein mit einem *Tag* versehenes Zielprotein ein, um dessen Proteininteraktionen in einer komplexen Mischung, wie einem Zelllysat, einer bestimmten Subfraktion oder einem Sekretom zu untersuchen, kann man so gezielt mittels chemischer Quervernetzung fixierte Komplexe anreichern und studieren (Abbildung 1.11). Dabei können bekannte Interaktionen bestätigt und neue Bindungspartner identifiziert werden. Die beschriebene Strategie wird als *Pull-Down*-Strategie bezeichnet [104].

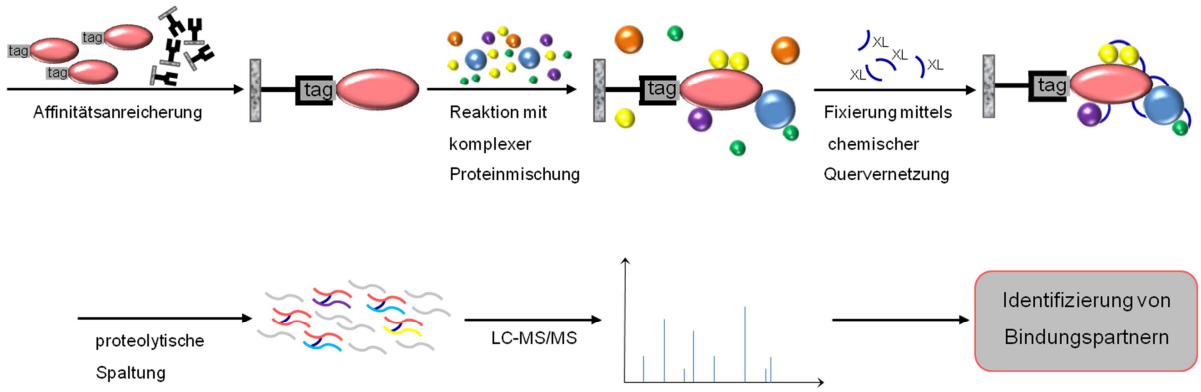

Abbildung 1.11: Schematischer Ablauf eines Pull-Down-Ansatzes für Protein-Proteininteraktionsstudien. *Ein mit einem Tag versehenes Zielprotein wird an eine Matrix angereichert, anschließend mit einer komplexen Proteinmischung inkubiert und die Proteinkomplexe werden mittels chemischer Quervernetzung fixiert. Nach Affinitätsreinigung werden die Komplexe proteolytisch gespalten, chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert.*

1.5 Zielstellung

Lungenkrebs, vor allem NSCLC, ist eine Krankheit mit sehr geringen Überlebensraten, da die Erkrankung häufig erst in fortgeschrittenen, metastasierenden Stadien diagnostiziert wird. Dies erschwert oft eine operative Entfernung des Tumors oder macht diese sogar unmöglich. Auch wenn sich in den letzten Jahren die Therapiemöglichkeiten für NSCLC-Patienten deutlich verbessert haben und inzwischen verschiedene Optionen verfügbar sind, konnten die Überlebenschancen der Patienten nur im geringen Maß gesteigert werden. Tumorzellen finden anscheinend immer neue Wege, Therapiemöglichkeiten zu unterlaufen und ihr eigenes Überleben zu sichern. Kaum wurde ein neuer Angriffspunkt für die Therapie von NSCLC entdeckt und erfolgreich zur Behandlung eingesetzt, entwickeln Tumore kurze Zeit später häufig Resistenzen gegen die eingesetzten Pharmaka. Wie genau sich diese Resistenzen entwickeln, welche Stoffe an der Resistenzentwicklung beteiligt sind und welche Signalwege Tumore dafür nutzen, ist noch größtenteils unbekannt. Erst in den letzten Jahren wurde dieses Gebiet von der Forschung in den Fokus gerückt.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von SILAC-Experimenten Regulationsunterschiede von Proteinen im Subproteom der sekretierten Proteine, dem Sekretom, von zwei NSCLC-Zelllinien zu identifizieren. Dafür wurden die erlotinibsensitve NSCLC-Zelllinie PC9 sowie die erlotinibresistente NSCLC-Zelllinie PC9ER ausgewählt. So sollten Regulationsunterschiede zwischen zwei Zelllinien untersucht werden, die sich lediglich bezüglich ihrer Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber einem Therapeutikum (in diesem Falle des TKI Erlotinib) unterscheiden, aber ansonsten identisch sind.

Desweiteren sollten die Interaktionen der unterschiedlich regulierten Proteine mit anderen Proteinen aus der Mikroumwelt eines Tumors, also den Sekretomen der verschiedenen Zelllinien, charakterisiert werden. Dazu sollte eine kombinierte Strategie aus Affinitätsanreicherung, chemischer Quervernetzung und anschließender massenspektrometrischer Analyse eingesetzt werden. Es sollte ein vielversprechender Kandidat aus der Liste der als unterschiedlich reguliert identifizierten Proteine ausgewählt und von diesem Fusionsproteine mit verschiedenen *Tags* zur späteren Affinitätsanreicherung und -reinigung generiert werden. In *E. coli* exprimierte Fusionsproteine sollten anschließend für die Interaktionsstudien mit sekretierten Proteinen genutzt werden. Ziel war es, erste Einblicke in die Mechanismen der Resistenzentwicklung von NSCLC-Zellen sowie in die beteiligten Signalwege zu erhalten und so die nächsten Schritte auf dem Weg einer verbesserten, individualisierten Therapie des NSCLC zu gehen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Plasmide

14AANVSP_tpa_PMA	Life Technologies
pA27fd7	Elisabeth Schwarz, MLU Halle-Wittenberg
pET-28a(+)	Novagen
pET-tPA(P_C)	diese Arbeit
pET-tPA(P_N)	diese Arbeit
pS_C	diese Arbeit
pS_C-K2P	diese Arbeit
pS_N	diese Arbeit
pS_N-K2P	diese Arbeit
V152	Frank Zaucke, Universität zu Köln
V162	Frank Zaucke, Universität zu Köln

2.1.2 Oligonukleotide

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden unter Nutzung der Computerprogramme SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC) und Oligonucleotide Properties Calculator (Metabion) erstellt, überprüft und entweder von der Firma Metabion International AG (Martinsried) oder Seqlab Sequence Laboratories GmbH (Göttingen) synthetisiert. Es erfolgte die direkte Nutzung gemäß Herstellerangaben ohne weitere Reinigungsschritte.

Oligonukleotide zur Sequenzierung:

Seq_tPA(K2P)_pA27fd7_Rtac	5´ CGCGGTAATCATCGGCTCGTATAAT 3´
Seq_tPA(K2P)_pA27fd7_FHindIII	5´ CTCTCATCCGCCAAAACAGAAGC 3´
Seq*N*term(K2P_*N*-TST_PCR):	5´ GCACGCGAGGCATCACAGTACTCC 3´
Seq*C*term(K2P_*N*-TST_PCR):	5´ CCACTTAGCACGACGCCTGCCAG 3´

Oligonukleotide zur Klonierung:

C-Term.His6F_tPA(P)	5´ TCTCATCCATGGGTAGCACCTGTGGTCTG 3´
C-Term.His6R_tPA(P)	5´ TACCATCTCGAGCGGACGCATGTTATCACG 3´
N-Term.His6F_tPA(P)	5´ ATCACATATGAGCACCTGTGGTCTGCG 3´
N-Term.His6R_tPA(P)	5´ TCTCCCTCGAGTTACGGACGCATGTTATC 3´
F_152_BamHI	5´ CCACTTTTCGCAGGATCCCTGGTTCC 3´
R_152_XhoI	5´ GGAGCGCTCGAGTCATTTTTCGAACTGTG 3´
F_162_XbaI	5´ GCACCTCTAGAATGTGGAGCCACCCTC 3´
R_162_BamHI	5´ CATGAACTTGGATCCGGAGCCACG 3´
F_K2P_BamHI_*N*-TST	5´ CGTCGAGGATCCGGAAACAGTGACTGC 3´
R_K2P_HindIII_*N*-TST	5´ CATCGCTTCGAATCACGGTCGCATGTTGT 3´
F_K2P_NcoI_*C*-TTS	5´ CGACTCTACCATGGGAAACAGTGACTGC 3´
R_K2P_BamHI_*C*-TTS	5´ CCTAAGACGGATCCCGGTCGCATG 3´

2.1.3 Bakterienstämme

BL21 (DE3)	*E. coli*, F^- *omp*T *gal dcm Ion hsdS*$_B$ ($r^-_B m^-_B$) λ(DE3 [*lac*I *lac*UV5-T7 gene 1 *ind*1 *sam*7 *nin*5])
BL21 (DE3) Codon Plus RIL	*E. coli*, B F^- *omp*T *hsdS*($r^-_B m^-_B$) *dcm*$^+$Tet^r *gal* λ(DE3) *end*A Hte [*argU proL* Cam^R] [*argU ileY leuW* Strep/Spec^R]
DH5α	*E.coli*, F^- *end*A1 *gln*V44 thi-1 *rec*A1 *rel*A1 *gyr*A96 *deo*R *nup*G Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, *hsd*R17(r_K^- m_K^+), λ^-
K12/MG1655	*E. coli*, F^- λ^- *ilv*G- *rfb*-50 *rph*-1
Rosetta (DE3) pLysS	F^- *omp*T *hsdS*$_B$ ($r^-_B m^-_B$) gal *dcm* λ(DE3 [*lac*I *lac*UV5-T7 gene 1 *ind*1 *sam*7 *nin*5]) pLysSRARE (Cam^R)

2.1.4 Humane Zelllinien

PC9	Pulmonale Adenokarzinom-Zelllinie (erlotinibsensitiv)
PC9ER	Pulmonale Adenokarzinom-Zelllinie (erlotinibresistent)

2.1.5 Medien und Antibiotika

Agarplatten:	15 g/l Agar-Agar in M9-Minimal- oder LB-Medium
Carbenicillin:	100 mg/ml in H_2O, Endkonzentration: 100 µg/ml, Roth
Fötales bovines Serum (FBS):	Biochrome
FBS, dialysiert	Dundeecellproducts
Kanamycin:	30 mg/ml in H_2O, Endkonzentration: 30 µg/ml, Roth
LB-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl,
M9-Minimalmedium:	10 % (v/v) M9-Salzlösung, 1 % (v/v) Aminosäuremix-1, 1,6 % (v/v) Aminosäuremix-2, 0,4 % (w/v) Glucose, 0,1 % (v/v) Spurenelementelösung, 0,1 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgSO_4$, 0,3 µM Thiamin-HCl
Penicillin:	10.000 U/ml, Endkonzentration: 100 U/ml, Gibco
RPMI-1640:	Biochrome
RPMI-R0K0:	Dundeecellproducts
RPMI-R6K6:	Dundeecellproducts
Streptomycin:	10 mg/ml, Endkonzentration: 100 µg/ml, Gibco
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM Glucose

2.1.6 Puffer und Lösungen

Aminosäuremix-1	4,2 g/l Alanin, 73 g/l Glutamin, 1 g/l Glycin, 1,55 g/l Histidin, 3,95 g/l Isoleucin, 3,95 g/l Leucin, 5,5 g/l Lysin, 4,5 g/l Methionin, 4,94 g/l Phenylalanin, 23 g/l Prolin, 42 g/l Serin, 3,5 g/l Threonin, 3,5 g/L Valin
Aminosäuremix-2	1,68 g/l Asparagin, 2,5 g/l Aspartat, 1,46 g/l Cystein, 2,5 g/l Glutamat, 4,1 g/l Tryptophan, 0,72 g/l Tyrosin,
IB-Dialyselösung	6 M Harnstoff, 10 mM HCl

IB-Puffer 1	0,1 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7
IB-Puffer 2	60 mM EDTA, 6 % (v/v) Triton X-100, 1,5 M NaCl, pH 7
IB-Solubilisierungspuffer	8 M Harnstoff, 0,1 M Tris, 0,2 M DTT, 1 mM EDTA, pH 8,6
IB-Waschpuffer	0,1 M Tris, 20 mM EDTA, pH 7
IMAC-Puffer A	6 M Harnstoff, 20 mM Imidazol, pH 5,5
IMAC-Puffer B	6 M Harnstoff, 500 mM Imidazol, pH 5,5
Lysepuffer	1% (m/v) DDM, 1 % (m/v) OGP, 0,1 % (m/v) SDS, in PBS-Puffer
M9-Salzlösung	238 mM Na_2HPO_4, 110 mM KH_2PO_4, 42,7 mM NaCl, 93 mM NH_4Cl
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,76 mM KH_2PO_4, pH 7,4
Rückfaltungspuffer	0,1 M Tris, 1 mM EDTA, 0,8 M L-Arginin, 2 mM GSH (Glutathion, reduziert), pH 8,6
Spurenelementelösung	0,25 %(v/v) HCl, 7,5 mM $FeCl_2$, 0,5 mM $ZnCl_2$, 0,5 mM $MnCl_2$, 0,1 mM $NiCl_2$, 0,1 mM H_3BO_3, 0,012 mM $CuCl_2$, 0,15 mM Na_2MoO_4, 0,1 mM Na_2Wo_4, 1 mM Na_2SeO_3, 0,1 mM $NaVO_3$, 0,8 mM $CoCl_2$
TAE-Puffer (50x)	100 ml EDTA (0,5 M pH 8,0), 57,1 ml Essigsäure, 242 g Tris, Wasser zu 1l
TRIS-Puffer	50 mM Tris, pH 8
Trypsin-Stammlösung	0,5 µg/µl in 1mM HCl
XL-Waschpuffer	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4

2.1.7 Enzyme

AspN	Promega
*Bam*HI HF	New England-Biolabs
Benzonase Nuklease	Sigma
*Hind*III HF	New England-Biolabs
Lysozym	Carl Roth

*Nco*I	New England-Biolabs
*Nde*I	New England-Biolabs
Phusion DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase	New England-Biolabs
Thrombin (human, aus Plasma)	Calbiochem
Trypsin (porcin, sequencing grade)	Promega
*Xba*I	New England-Biolabs
*Xho*I	New England-Biolabs

2.1.8 Proteine und Peptide

GSH (Glutathion, reduziert)	Roth
GSSG (Glutathion, oxidiert)	AppliChem
t-PA(P_N)	diese Arbeit
t-PA(P_C)	diese Arbeit
t-PA(K2P)	diese Arbeit

2.1.9 Quervernetzungsreagenzien

Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat-D_0/ D_4	(BS^2G- D_0/ D_4)	Thermo Fisher Scientific

2.1.10 Kits

DC Protein Assay Kit	Bio-Rad
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
Tissue-type Plasminogen Activator Human Chromogenic Activity Assay Kit	abcam
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up-System	Promega

2.1.11 Chemikalien

Aceton	VWR
Acetonitril (HPLC gradient grade, HiPerSolv)	VWR
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (37.5:1) 40 % (w/v)	Roth

Agar-Agar		Merck
Agarose (SeaKem LE)		Lonza
Ameisensäure	(FA)	Roth
Ammoniumacetat	(CH_3COONH_4)	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	(NH_4HCO_3)	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat	(APS)	Sigma-Aldrich
Bio-Rad Protein Assay		Bio-Rad
Brilliantblau G250		Sigma-Aldrich
Brilliantblau R250		Sigma-Aldrich
Borsäure	(H_3BO_3)	Roth
Calciumchlorid	($CaCl_2$)	Roth
Cobalt(II)-chlorid	($CoCl_2$)	Merck
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten		Roche
Cut Smart Puffer		New England-Biolabs
Deoxyribonukleinsäuretriphosphate (dNTPs)		Thermo Fisher Scientifc
d-Desthiobiotin		Sigma-Aldrich
D-Glukose		Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	(DMSO)	Thermo Fisher Scientifc
Dithiothreitol	(DTT)	AppliChem
DNA ladder (1 kb, 100 bp)		Thermo Fisher Scientifc
DNA-Probenpuffer (6x)		Thermo Fisher Scientific
n-Dodecyl-β-D-maltosid	(DDM)	Roth
Eisen(III)-chlorid	($FeCl_2$)	Sigma-Aldrich
Essigsäure		Roth
Ethanol		Merck
Ethylendiamintetraessigsäure	(EDTA)	Sigma-Aldrich
GelGreen		Biotium
Harnstoff		Roth
Hefeextrakt		Roth
Hydrochlorsäure, 0.1 M (endotoxinfrei)		Sigma-Aldrich
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure	(HEPES)	Roth
Iodacetamid	(IAA)	Sigma-Aldrich
Isopropanol		Merck
Isopropyl-*β*-*D*-1-thiogalaktopyranosid	(IPTG)	Roth

Kaliumchlorid	(KCl)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	(KH_2PO_4)	Merck
Kupfer(II)-chlorid	($CuCl_2$)	Merck
Laemmli-Probenpuffer (2x)		Bio-Rad
L-Alanin		Merck
L-Arginin		Sigma-Aldrich
L-Arginin, 13C-markiert		Eurisotop
L-Asparagin		Merck
L-Asparaginsäure		Roth
L-Cystein		Merck
L-Glutamin		Merck
L-Glutaminsäure		Roth
L-Glycin		Merck
L-Histidin		Merck
L-Isoleucin		Merck
L-Leucin		Merck
L-Methionin		Merck
L-Phenylalanin		Merck
L-Prolin		Merck
L-Serin		Merck
L-Threonin		Merck
L-Tryptophan		Merck
L-Tyrosin		Merck
L-Valin		Merck
Magnesiumchlorid	($MgCl_2$)	Thermo Fisher Scientifc
Magnesiumsulfat	($MgSO_4$)	Sigma-Aldrich
Mangan(II)-chlorid	($MnCl_2$)	Merck
Methanol		VWR
2-Mercaptoethanol		Roth
Natriumchlorid	(NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat	(SDS)	Roth
Natriumhydrogenphosphat	(Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Natriummetavanadat	($NaVO_3$)	Sigma-Aldrich
Nickel(II)-chlorid	($NiCl_2$)	Merck

n-Octyl-β-D-Glucopyranosid	(OGP)	Roth
PageRuler Prestained Protein Ladder		Thermo Fisher Scientifc
PageRuler Unstained Protein Ladder		Thermo Fisher Scientifc
Rotiphorese 10x SDS-PAGE		Roth
Trichloressigsäure	(TCA)	Merck
Trifluoressigsäure	(TFA)	Merck
2,2,2-Trifluorethanol	(TFE)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	(Tris)	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid	(Tris-HCl)	Roth
Triton X-100		Roth
Trypton/Pepton aus Casein		Roth
Zinkchlorid	($ZnCl_2$)	Sigma-Aldrich

2.1.12 Geräte

2.1.12.1 Chromatographiesysteme

Nano-HPLC-Systeme

UltiMate 3000 (Dionex)

Vorsäulen:

- Acclaim PepMap, C18, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å (Thermo Fisher Scientific)
- Acclaim PepMap, C18, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å (Thermo Fisher Scientific)

Trennsäulen:

- Acclaim PepMap, C18, 75 µm x 150 mm, 3 µm, 100 Å (Thermo Fisher Scientific)
- Acclaim PepMap, C18, 75 µm x 250 mm, 2 µm, 100 Å (Thermo Fisher Scientific)

FPLC-System

ÄKTA FPLC mit Fraktionssammler Frac-920

Säulen:

- HisTrap FF, 1 ml (GE Healthcare)
- HisTrap FF, 5 ml (GE Healthcare)
- HiTrap desalt, 5 ml (GE Healthcare)

2.1.12.2 Massenspektrometer

LTQ-Orbitrap XL Hybrid-Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific
mit Nano-ESI-Quelle	Proxeon
Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific
mit Nanospray Flex Nano-ESI-Quelle	Thermo Fisher Scientific

2.1.12.3 Laborgeräte

Analysenwaage LE225D	Sartorius
Autoklav V75	Systec
Brutschrank BKE 40	Memmert
DNA Electrophorese-Kammer Mini-Sub-Cell GT	Bio-Rad
Elektrophorese-System Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad
Inkubationsschüttler innova 44	New Brunswick Scientific
Inkubationsschüttler Thermoshake	Gerhardt
Magnetrührer R3T	mLw
Magnetrührer M21/1	Framo
Mikrotiterplatten-Photometer POLARstar Galaxy	BMG
pH-Meter PH211	Hanna Instruments
Pipetten (2,5-5000 µl)	Eppendorf und VWR
Plattformschüttler Titramax 101	Heidolph
Reinstwasseranlage TKA Pacific	Thermo Electron LED
Reinstwasseranlage DirectQ5	Millipore
Schütteltisch See-saw rocker SSL4	Stuart
Sicherheitswerkbank Polaris 48	Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkbank Herasafe KS 12	Thermo Fisher Scientific
Spannungsgeber PowerPac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer Ultrospec 100 pro	GE Healthcare
Spektralphotometer V-630	Jasco
Thermocycler HLC HTMR-133	HLC-Biotech
Thermocycler HLC MKR10	HLC-Biotech
Thermocycler TPersonal	Biometra
Thermocycler TS 1	Biometra
Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner	VWR

Ultraschallhomogenisator Vibra-Cell 75185	Sonics & Materials
Vakuumkonzentrator miVac Duo	Genvac
Vakuumkonzentrator Savant SPD1010	Thermo Fisher Scientific
Vortexmixer 7-2020	neoLab
Zentrifuge Centrifuge 5414R	Eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifuge Minizentrifuge	Kisker Biotech
Zentrifuge Optimal L-90K	Beckmann Coulter

2.1.12.4 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra 15 centrifugal units (3K, 10K)	Millipore
Dialyseschlauch (Servapor MWCO 12000-14000)	Serva
Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun
Einwegpipetten (5ml, 10 ml, 20 ml)	Corning
Pierce Spin Columns Snap Cap	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Eppendorf
Plastikküvetten	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml,2,0 ml)	Eppendorf
Spritzenvorsatzfilter (Filtropur S 0.2)	Sarstedt
Streptactin-Sepharose High Performance	GE Healthcare
Vivaspin 2 Centrifugal Concentrator (2K)	Sartorius
Vivaspin 6 Centrifugal Concentrator (3K, 5K, 10K)	Sartorius
Vivaspin 20 Centrifugal Concentrator (10K)	Sartorius
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	VWR
Zellkulturflaschen (750 ml)	Corning
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning

2.1.13 Software

Chromeleon 6.8	Steuerung der HPLC-Systeme der LTQ-Orbitrap XL- und Orbitrap Fusion-Massenspektrometer *(Thermo Fisher Scientific)*
GENtle	Visualisierung und Prozessierung von DNA- und Aminosäuresequenzen *(Magnus Manske, gentle.magnusmanske.de)*

GPMAW 8.1	Analyse proteolytischer Spaltprodukte, Fragmentierung von Peptiden und Identifizierung von Quervernetzungsprodukten *(Lighthouse Data)*
Mascot	Identifizierung von Proteinen, anhand massenspektrometrischer Daten *(in-house license, Matrixscience)*
MaxQuant 1.5.2.8	Quantitative Analyse massenspektrometrischer Daten von Proteinen und Peptiden *(Jürgen Cox, www.coxdocs.org)*
Oligonucleotide Properties Calculator 3.0.7	Berechnung physikalischer und thermodynamischer Parameter von Oligonukleotiden *(metabion, www.metabion.com)*
Perseus	Kalkulation und Visualisierung statistischer Parameter verschiedener Daten *(Jürgen Cox, www.coxdocs.org)*
Proteome Discoverer 1.3 und 1.4	Analyse von MS-, MS/MS- und LC/MS-Daten *(Thermo Fisher Scientific)*
ProtParam	Berechnung von pI-Werten und Extinktionskoeffizienten von Proteinen *(Expasy, www.expasy.org)*
Qual Browser 2.07	Visualisierung und Prozessierung von Massenspektren *(Thermo Fisher Scientific)*
Quantity One 4.6.2	Steuerung für das Geldokumentationsgerät Gel Doc XR *(Bio-Rad)*
SnapGene Viewer 2.8.1	Visualisierung von DNA- und Aminosäuresequenzen *(www.snapgene.com)*
StavroX 3.5.1	Identifizierung und Auswertung von Quervernetzungsprodukten anhand massenspektrometrischer Daten *(Michael Götze, www.stavrox.com)*
Unicorn	Steuerung für das ÄKTA-FPLC-System *(GE Healthcare)*
Xcalibur (2.0.7-2.2)	Aufnahme und Prozessierung von Daten der LTQ-Orbitrap XL- und Orbitrap Fusion-MS mit DCMSLink (Koordination und Kommunikation zwischen HPLC und MS) *(Thermo Fisher Scientific)*
Venny 2.1	Erstellung von Venn-Diagrammen *(bioinfo.cnb.csic.es/tool/venny)*

2.2 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders beschrieben, bezieht sich die Bezeichnung „Wasser“ in dieser Arbeit stets auf *MilliQ*-Wasser.

2.2.1 Präparation chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte gemäß dem Protokoll der $CaCl_2$-Methode nach Sambrook und Russell [105]. 200 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtkultur von DH5α-, BL21 (DE3)-, BL21 (DE3) Codon Plus- oder Rosetta (DE3) pLysS-Zellen okuliert und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte OD_{600} zwischen 0,4 und 0,7 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 4.000 xg (4 °C) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml einer 0,1 M $CaCl_2$-Lösung (steril und eiskalt) resuspendiert und für 90-120 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Suspension nochmals zentrifugiert (15 min, 4.000 xg, 4 °C). Nun wurde das Zellpellet in 2 ml einer 0,1 M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und erneut für 90-120 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde die Suspension mit Glycerol versetzt (finale Konzentration 10 % (v/v)), in Aliquoten von 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Transformation von DNA in chemisch kompetente Zellen

Ein Aliquot (50 µl) chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte für 90 s ein Hitzeschock bei 42 °C. Darauffolgend wurden den Zellen 500 µl SOC-Medium zugefügt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Um die Zellen zu selektieren, die das gewünschte Plasmid enthielten, wurden zuletzt ca. 100 µl der Zellsuspension auf Agarplatten, welche das der Resistenz entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA von *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde aus 5 ml einer Übernachtkultur von DH5α- oder BL 21 (DE3) Codon Plus-Zellen, welche die gewünschte DNA enthielten, isoliert. Die Zellen wurden geerntet und die DNA mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgte mit 40 µl Wasser.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Die *in-vitro*-Amplifikation von DNA erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*). Das für die PCR gewählte Programm des Thermocyclers (2.1.12.3) ist in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Reaktionsansätze wurden gemäß Tabelle 2.2 hergestellt.

Tabelle 2.1: PCR Programm zur DNA Amplifikation.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	
Primerhybridisierung	70 °C	30 s	25
Verlängerung	72 °C	30 s	
Endgültige Verlängerung	72 °C	10 min	1
Lagerung	4 °C	∞	

Tabelle 2.2: Zusammensetzung eines 20 µl-PCR-Ansatzes.

Volumen	Bestandteil
1 µl	Matrizen-DNA(5 ng/µl)
0,4 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	forward Primer (10 µM)
1 µl	reversed Primer (10 µM)
4 µl	5X HF Phusion-Puffer
0,2 µl	Phusion DNA-Polymerase (2 U/µl)
12,4 µl	Wasser

Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese mit GelGreen-Färbung. Im Falle eines Klonierungsprozesses wurden die gewünschten Gelbanden ausgeschnitten und mittels Wizard SV Gel and PCR Clean-Up-Systems (2.1.10) gereinigt. Nach erfolgreicher PCR wurden die gereinigten PCR-Produkte in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (2.2.2) und die gewünschten Zellen entsprechend ihrer Antibiotikaresistenz selektiert. Die mutierte DNA wurde isoliert (2.2.3) und anschließend sequenziert (2.2.9).

2.2.5 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Subklonierung wurde eine präparative DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Der übliche Restriktionsansatz enthielt ca. 40 µl DNA-Lösung (2-3 ng DNA in Wasser), 5 µl 10x CutSmart-Puffer und je 1-2 U der entsprechenden Restriktionsendo-

nukleasen (*BamH*I HF, *Nco*I, *Nde*I, *Xba*I oder *Xho*I). Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C. Im Gegensatz zu den geschnittenen PCR-Produkten wurde die linearisierte Vektor-DNA darauffolgend für 30 min bei 37 °C mit 1-2 U Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) behandelt, um im weiteren Verlauf eine Religation zu vermeiden. Zur Visualisierung wurde eine Agarosegelelektrophorese angefertigt (2.2.6).

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung der DNA bezüglich ihrer molekularen Größe erfolgte mittels Agarosegelen (1 % w/v in TAE-Puffer (2.1.6) unter Zusatz von GelGreen-Färbelösung gemäß Herstellerangaben). Die DNA wurde mit DNA-Probenpuffer gemischt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung wurde bei 200 V durchgeführt. Die Detektion der DNA im Agarosegel wurde unter UV-Licht realisiert (Geldokumentations-system Gel Doc XR (2.1.12)).

2.2.7 Gelextraktion von DNA

Die gewünschten Banden des Agarosegels wurden ausgeschnitten und die DNA mittels des Wizard SV Gel and PCR Clean-Up-Systems (Promega) extrahiert. Zur Extraktion wurde das Herstellerprotokoll befolgt, lediglich der Elutionspuffer wurde durch Wasser ersetzt. Die Konzentrationsbestimmung der erhaltenen DNA wurde spektralphotometrisch vorgenommen (JASCO V-630 (2.1.11)).

2.2.8 Ligation

Linearisierte Plasmide und Inserts mit kompatiblen Enden wurden in molaren Verhältnissen von 1:3, 1:6 und 1:9 im oberen femtomol Bereich (100-900 femtomol) gemischt und mit T4-Ligase in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in 20 µl Reaktionsansätzen inkubiert. Die Ligation erfolgte für 30 min bei 20 °C, 24 h bei 4 °C oder für 33 h mit einem Gradienten (4 °C → 16 h, 8 °C → 8 h, 12 °C → 4 h, 16 °C → 4 h, 20 °C → 1 h). Im Anschluss wurden je 10 µl des Reaktionsanasatzes in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (2.2.2) und die Zellen, welche die gewünschte DNA enthielten, entsprechend ihrer Antibiotikaresistenz selektiert. Schließlich wurde die DNA extrahiert (2.2.3) und sequenziert (2.2.9).

2.2.9 Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit genutzten oder generierten DNAs, wurden in den Laboren des Unternehmens Seqlab sequenziert und unter Zuhilfenahme des Programms GENtle (2.1.13) ausgewertet.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Expression von t-PA-Varianten

Das entsprechende Expressionsplasmid wurde chemisch in *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) Codon Plus RIL oder Rosetta (DE3) pLysS-Zellen transformiert und auf LB-Kanamycin-Agarplatten selektiert. Es wurde 1 l LB-Medium, versetzt mit Kanamycin (30 µg/ml), mit einer 5 ml-Vorkultur inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 kultiviert. Nun erfolgte die Induktion mit 0,1 mM oder 1 mM D-Isopropylthiogalaktose (IPTG). Die Expression erfolgte bei 37 °C oder alternativ bei 18 °C über Nacht für 18 h. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (4.000 xg, 15 min, 4 °C) geerntet.

2.3.2 Präparation der Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*)

Die Präparation der Einschlusskörper (IB, *inclusion bodies*) erfolgte gemäß dem Protokoll von Rudolph *et al.* [106].

Isolierung der IB:

Die Zellen wurden in 40 ml IB-Puffer 1 unter Zugabe von Proteaseinhibitor bei 4 °C resuspendiert (5 ml Puffer/1 g Zellen). Nach Zugabe von 12 mg Lysozym wurde die Mischung homogenisiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschall bei einer Amplitude von 30 % mit je 15 s Beschallung und Pause im Wechsel und einer Gesamtschalldauer von 2 min auf Eis. Um die enthaltene DNA zu spalten, wurden der Mischung 100 U Benzonase Nuklease und Magnesiumchlorid (Endkonzentration 3 mM) zugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml IB-Puffer 2 und einer Reaktionszeit von 30 min, wurden die IB durch Zentrifugation (30.000 xg, 15 min, 4 °C) isoliert. Das IB-Pellet wurde in 40 ml IB-Waschpuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde fünfmal wiederholt, um das enthaltene Detergenz nahezu vollständig zu entfernen.

Solubilisierung der IB:

Es wurden ca. 500 mg IB-Pellet in 50 ml IB-Solubilisierungspuffer resuspendiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der pH-Wert der Suspension durch Zugabe der entsprechenden Menge HCl (1 M) auf pH 3-4 gesenkt. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 10.000 xg zentrifugiert und der Überstand unter mehrmaligem Wechsel der IB-Dialyselösung bei 4 °C dialysiert.

2.3.3 Rückfaltung der t-PA-Varianten

Die Rückfaltung der t-PA-Varianten mit Hexa-Histidin-*Tag* erfolgte nach der Reinigung, die der Varianten mit Twin-Strep-*Tag* II vor der Reinigung des analysierten Proteins (2.3.4), gemäß des Protokolls von Rudolph *et al.* [106]. Die t-PA-Lösung wurde zunächst bei einer Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml (in 6 M Harnstoff, pH 3) mit oxidiertem Glutathion (GSSG, Endkonzentration 0,1 M) und Tris (Endkonzentration 50 mM) versetzt, auf pH 9,3 eingestellt für 5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der pH-Wert der Lösung auf 3 gesenkt und eine Dialyse gegen 0,1 N HCl bei 4 °C durchgeführt. Die so erhaltene Proteinlösung wurde nun in vier Pulsen im Abstand von je 12 h in das hundertfache Volumen des Rückfaltungspuffers getropft und für weitere 24 h bei 4 °C gerührt. Anschließend erfolgte ein Austausch der Pufferlösung (2.3.5) oder die Reinigung des rückgefalteten Proteins, bevor die Aktivität des erhaltenen Proteins bestimmt wurde (2.3.6).

2.3.4 Reinigung der t-PA-Varianten

2.3.4.1 Reinigung von t-PA(P)

Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels eines ÄKTA-FPLC-Systems (GE Healthcare) und IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) unter Verwendung einer Nickelsäule (HisTrap FF). Zunächst erfolgte die Äquilibrierung der Säule mit IMAC-Puffer A, bevor die Proteinlösung aufgetragen wurde. Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumina IMAC-Puffer A gewaschen, bevor die Elution des Proteins durch einen linearen Gradienten über 20 Säulenvolumina bis 100 % IMAC-Puffer B erfolgte. Alternativ wurde die Reinigung mittels eines Stufengradienten durchgeführt. Hierfür wurde das an die Säule gebundene Zielprotein über 20-50 Säulenvolumina mit 6,5 % IMAC-Puffer B gewaschen und anschließend mit 100 % IMAC-Puffer B über 2-4 Säulenvolumina eluiert. Die Reinheit des t-PA(P) wurde per SDS-PAGE überprüft.

2.3.4.2 Reinigung von t-PA(K2P)

Die Reinigung von t-PA(K2P) erfolgte mittels Zentrifugensäulen (Spin Columns) über Streptactin-Sepharose (GE Healthcare) bei 4 °C. Hierfür wurden zunächst 100 µl einer Sepharosesuspension (entspricht 50 µl Sepharose) in Zentrifugeneinheiten überführt und für 30 s bei 500 xg zentrifugiert. Dann wurde das Material dreimal gewaschen, indem es jeweils mit 300 µl HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert wurde. Nun wurde die Sepharose in 400-500 µl (~30 µg) t-PA(K2P)-Lösung resuspendiert und für 2 h Stunden unter Schwenken inkubiert. Es folgte die fünfmalige Wiederholung des oben beschriebenen Waschschrittes. Die Elution des Proteins erfolgte schließlich durch Thrombinspaltung (10 U in 50 µl HEPES-Puffer) über Nacht oder alternativ durch Inkubation mit Desthiobiotin (10 mM in 50 mM HEPES-Puffer) für 30 min und anschließender Zentrifugation. Folgend wurde mittels SDS-PAGE die Reinheit des eluierten t-PA(K2P) überprüft.

2.3.5 Pufferaustausch und Konzentrierung von Proteinlösungen

Alle nachfolgend aufgeführten Methoden zum Wechsel von Puffersystemen und zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Konzentrations-bestimmung der verschiedenen Proteinlösungen erfolgte mittels UV-Absorptionsmessung bei 280 nm, mittels DC Protein Assay Kit oder unter Anwendung des Bio-Rad Protein Assays nach Bradfordmethode gemäß Herstellerangaben [107].

2.3.5.1 Wechsel von Puffersystemen

Pufferaustausch mittels FPLC

Der Pufferwechsel wurde an einem ÄKTA-FPLC-System durchgeführt. Es wurde eine 5 ml HiTrap desalt-Säule (GE Healthcare) mit Zielpuffer äquilibriert und anschließend die Proteinlösung aufgetragen. Mit einer Flussrate von 1 ml/min wurde nun mit dem gewünschten Puffer über 2 Säulenvolumen eluiert und Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Die Fraktionen wurden hinsichtlich des Zielproteins per SDS-PAGE überprüft. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereint und erneut auf die frisch äquilibrierte Säule aufgetragen und nochmals eluiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Leitfähigkeit des Eluats der des reinen Zielpuffers entsprach.

Pufferaustausch mittels Zentrifugenfiltrationseinheiten

Für den Wechsel des Puffersystems von Proteinlösungen wurden Zentrifugationsfilter (Amicon ultra 15 oder Vivaspin 20) mit einem Molekulargewichtsausschluss von 10 kDa verwendet. Zunächst wurden die Filter zweimal mit 5 ml des entsprechenden Puffers gewaschen (10-20 min, 4.000 xg). Anschließend wurde die Proteinlösung in die Filtrationseinheit überführt und bei 4.000 xg auf ca. 0,5 ml eingeengt. Das Konzentrat wurde mit 10 ml des Zielpuffers versetzt und erneut konzentriert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Letztlich wurde das Konzentrat mit dem neuen Puffer auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert.

2.3.5.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Konzentrierung mittels Filtration

Für die Konzentrierung von Proteinlösungen wurden verschiedene Zentrifugationsfilter (Amicon ultra oder Vivaspin) mit unterschiedlichen Molekulargewichtsausschlussgrenzen (2 kDa, 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa) verwendet. Zuerst wurden die Filter zweimal mit 2-5 ml des entsprechenden Puffers durch Zentrifugation für etwa 10 min bei 4.000 xg gewaschen. Die Proteinlösung wurde in die Filtrationseinheit pipettiert und solange bei 4.000 xg zentrifugiert, bis das gewünschte Endvolumen bzw. die gewünschte Proteinkonzentration erreicht wurde. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden in neue Reaktionsgefäße pipettiert oder die Filtereinheiten umgedreht in neue Zentrifugationsgefäße platziert und die Proteinlösung durch Zentrifugieren bei 4.000 xg für eine Minute in die neuen Gefäße überführt.

Konzentrierung mittels Acetonpräzipitation

Die Proteinlösungen wurden mit dem vierfachen Probenvolumen an eiskaltem Aceton versetzt, gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 min bei 12.000xg zentrifugiert, der Überstand behutsam dekantiert und verworfen. Das erhaltene Pellet wurde zweimal durch Resuspendieren in eiskaltem Aceton und anschließender Zentrifugation (15 min, 12.000 xg) gewaschen. Schließlich wurde das saubere, trockene Pellet in der entsprechenden Menge des Probenpuffers aufgenommen.

Konzentrierung mittels Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA)

Vier Teile Proteinlösung wurden mit einem Teil kalter TCA-Lösung (100 % (w/v)) versetzt und durch Umschwenken des Reaktionsgefäßes gemischt. Die Mischung wurde bei -20 °C über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Pellet zweimal mit

eiskaltem Aceton gewaschen und das so erhaltene, trockene Pellet in der gewünschten Menge des Ausgangspuffers resuspendiert.

2.3.6 Aktivitätsbestimmung der t-PA-Varianten

Die Aktivitätsbestimmung der verschiedenen t-PA-Varianten wurde spektralphotometrisch unter Nutzung des „Tissue-type Plasminogen Activator Human Chromogenic Activity Assay“ Kits (abcam) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf der spezifischen Umwandlung von inaktivem Plasminogen in die aktive Protease Plasmin durch t-PA. Plasmin wiederum spaltet ein chromogenes Substrat und setzt dadurch *para*-Nitroanilin (pNA) frei, welches durch Absorptionsmessung bei 405 nm detektiert werden kann [108]. Zuerst wird t-PA durch Zugabe von cyanogenbromidgespaltenen Fibrinogenfragmenten um ein Vielfaches aktiviert und dadurch die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin beschleunigt [57, 109].

2.3.7 SDS-PAGE

Eine Trennung der Proteine bezüglich ihrer apparenten Molekulargewichte (Stokesradien) erfolgt mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Zusammensetzung der Sammel- und der Trenngele können Tabelle 2.3 entnommen werden.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.

	Trenngel 12 %	**Sammelgel 5 %**
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 % (w/v)	3000 µl	650 µl
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2500 µl	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1250 µl
***MilliQ*-H_2O**	4340 µl	3000 µl
10 % (v/v) SDS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10 % (v/v) APS	50 µl	25 µl

Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit Laemmli-Probenpuffer, welcher mit *β*-Mercaptoethanol versetzt war, im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt und auf das SDS-Gel aufgetragen [110]. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte zunächst für 15 min bei 100 V, gefolgt von ca. 50 min bei 200 V. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine im Gel mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Proben der

SILAC-Experimente (2.4.3) gemäß dem Protokoll der kolloidalen Coomassie-Blue-Silver-Färbung prozessiert [111]:

Fixierlösung:

40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) H_2O

Färbelösung:

2 % (v/v) Lösung A [5 % (w/v) Brilliantblau G250 in H_2O]

98 % (v/v) Lösung B [2 % (w/v) Phosphorsäure, 20 % (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ in H_2O]

Die Gele wurden für 1 h in Fixierlösung inkubiert, anschließend dreimal mit Wasser gewaschen und über Nacht in Färbelösung geschüttelt. Das Entfärben der Gele erfolgte wiederum mit Wasser. Alle anderen Proben (z. B. aus Expressionen, Proteinreinigungen oder Experimenten der chemischen Quervernetzung) wurden mit konventioneller Coomassie-färbung bearbeitet [112]:

Fixier-Färbelösung:

0,1 % (w/v) Brilliantblau R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Ethanol, 50 % (v/v) H_2O

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Methanol, 65 % (v/v) H_2O

In diesem Fall wurden die Gele für ca. 1 h in Fixier-Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht entfärbt. Danach wurden die Gele einmal mit Wasser gewaschen.

2.3.8 Enzymatische Proteolyse

Sofern nicht anders angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte an einer Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Thermomixers.

2.3.8.1 Enzymatische Proteolyse in Lösung

Vor Durchführung der Proteinspaltung wurden 20 µl der zu analysierenden Proteinlösung mit einer Vakuumzentrifuge (2.1.12) zur Trockne eingeengt und das resultierende Pellet in 5 µl einer 8 M Harnstofflösung (in Ammoniumbicarbonat, 400 mM) rekonstituiert. Die Reduktion erfolgte mit Dithiothreitol (DTT, 7,5 mM) für 15 min bei 56 °C. Die anschließende Alkylierung mit Iodacetamid (IAA, 20 mM) wurde für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss durchgeführt. Vor Zugabe der proteolytischen Enzyme wurden die Lösungen

1:6 (v/v) mit Wasser verdünnt. Im Falle einer einfachen Proteolyse wurde die Endoprotease Trypsin zugefügt (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:20 (m/m)) und die Probe für 16 h bei 37 °C inkubiert. Für eine doppelte proteolytische Spaltung wurde zunächst das Enzym AspN zugefügt (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:20 (m/m)) und bei 37 °C für 6 h inkubiert. Anschließend wurde Trypsin zugegeben (Enzym/Substrat Verhältnis 1:20 (m/m)) und erneut bei 37 °C für 16 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Trifluoressigsäure(TFA)-Lösung (10 % (v/v)) gestoppt und die Peptidmischungen für die massenspektrometrische Analyse (2.5.2) mit einer Vakuumzentrifuge (2.1.12) auf ein Volumen von 20-40 µl eingeengt.

2.3.8.2 Enzymatische In-Gel-Proteolyse

Für die proteolytische Spaltung wurden nachfolgend aufgeführte Lösungen frisch hergestellt:

Reduktionslösung:	10 mM Dithiothreitol in 100 mM NH_4HCO_3
Alkylierungslösung:	55 mM Iodacetamid in 100 mM NH_4HCO_3
Entfärbelösung:	ACN und 100 mM NH_4HCO_3 1:1 (v/v)
Trypsinlösung:	2 µl Trypsin-Stammlösung, 78 µl 20 mM NH_4HCO_3
Extraktionslösung:	ACN und TFA (5% (v/v)) 1:2 (v/v)

Die zu untersuchenden Proteinbanden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, in ca. 1 mm^3 große Stücke zerteilt, in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße überführt und für 10 min in 500 µl ACN gewaschen. Nachdem der Überstand entfernt wurde, erfolgte die Zugabe von 50 µl Reduktionslösung und die Proben wurden für 30 min bei 56 °C geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Gelstücke in ACN gewaschen und der Überstand entfernt. Die Gelstücke wurden mit 50 µl Alkylierungslösung versetzt und die Reaktion für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss durchgeführt. Nachfolgend wurden die Gelstücke für 10 min in ACN, dann 30 min in 100 µl Entfärbelösung und schließlich wieder 10 min in ACN gewaschen. Die trockenen Gelstücke wurden mit ca. 50 µl Trypsinlösung (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:20 (m/m) überschichtet, für 2 h bei 4 °C und danach für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Peptide wurden mit dem doppelten Probenvolumen an Extraktionslösung aus dem SDS-Gel extrahiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und für die massenspektrometrische Analyse (2.5.2) mit einer Vakuumzentrifuge (2.1.12) auf ein Volumen von 20-40 µl eingeengt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

Die humanen nicht-kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (NSCLC) PC9 und PC9ER (zur Verfügung gestellt von Julian Downward, Cancer Research UK) wurden in Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI), ergänzt mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalen bovinen Serum (FBS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.4.2 Zellüberstände für *Pulldown*-Experimente

Für die Gewinnung von Zellüberständen zur Identifizierung von t-PA-Interaktionspartnern wurden PC9- bzw. PC9ER-Zellen, wie unter 2.4.1 beschrieben, in Kultur gebracht. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten, wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen viermal mit phosphatgepufferter Saline (PBS) und einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend in serumfreiem RPMI-Medium kultiviert. Nach 48 h wurden die Zellüberstände abgenommen, filtriert (Porengröße 0,22 µm) und anschließend für 1 h bei 1.000 xg (4 °C) zentrifugiert. Die Überstände wurden mit Vivaspin2-Zentrifugaleinheiten auf ca. ein Zwanzigstel ihres Ausgangsvolumens eingeengt und die Proteinkonzentrationen der Lösungen wurden nach Bradford bestimmt. Die konzentrierten Zellüberstände wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.3 SILAC

2.4.3.1 SILAC-Experimente in E. coli-Zellen

Je 5 ml M9-Minimalmedium-R0 (^{12}C-Arginin-enthaltend, „leichtes“ M9-Medium) und M9-Minimalmedium-R6 (^{13}C-Arginin-enthaltend, „schweres“ M9-Medium) wurden mit einer in „leichtem“ M9-Medium angezogenen Kultur des Bakterienstammes *E. coli* K12/MG1655 angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Je 50 ml „leichtes“ und „schweres“ M9-Medium wurden mit jeweils 500 µl der entsprechenden Übernachtkulturen versetzt und bei 37 °C in 250 ml-Schikanekolben unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von ca. 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 4.000 xg (4 °C) zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in je 300 µl Tris-Puffer (50 mM, pH 8)

resuspendiert. Von jeder Zellsuspension wurden Proben entnommen und in verschiedenen Mischverhältnissen (100:1, 50:1, 10:1, 5:1, 4:1, 4:3, 1:1, 3:4, 1:4, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100), bezogen auf die Proteinkonzentrationen, gemischt. Diese definierten Mischungen wurden per SDS-PAGE (2.3.7) aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mit kolloidaler Coomassie-Färbung. Die vollständigen Trennspuren wurden in je 8 Banden geteilt und proteolytisch gespalten (2.3.8). Die proteolytischen Peptidmischungen wurden mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS (2.5.2) analysiert.

2.4.3.2 SILAC-Experimente in NSCLC-Zelllinien

Für den SILAC-Ansatz wurden die PC9- und PC9ER-Zellen in RPMI-R0K0 (^{12}C-L-Arginin- und ^{12}C-L-Lysin-enthaltendes, „leichtes“ SILAC-Medium) oder RPMI-R6K6 (^{13}C-L-Arginin- und ^{13}C-L-Lysin-enthaltendes, „schweres“ SILAC-Medium) ergänzt mit 10 % (v/v) dialysiertem und hitzeinaktiviertem fötalen bovinen Serum (FBS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C, 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die konditionierten und konzentrierten Zellüberstände (2.4.3.4) wurden gemäß Tabelle 2.4 bezüglich ihrer Proteinkonzentrationen im Verhältnis 1:1 gemischt und mit SDS-PAGE (2.3.7) getrennt.

Tabelle 2.4: Probenansätze für die SILAC-Experimente.

Bezeichnung	leicht	schwer
Probe 1	PC9	PC9ER
Probe 2	PC9ER	PC9
Kontrolle 1	PC9	PC9
Kontrolle 2	PC9ER	PC9ER

Die auf dem Gel getrennten Proben wurden pro Gelspur in je 8 Banden unterteilt, proteolytisch gespalten (2.3.8) und die erhaltenen Peptidmischungen mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS (2.5.2) analysiert. Dabei wurden jeweils 8 aus einem SILAC-Ansatz erhaltene Proben direkt nacheinander analysiert, bevor drei Blindproben (1 µl TFA 0,1 % (v/v)) und die nächsten 8 Proben analysiert wurden.

2.4.3.3 Bestimmung der Einbaurate isotopenmarkierter Aminosäuren

Um die Einbaurate der markierten Aminosäuren (Lysin und Arginin) zu verfolgen, wurden die jeweiligen Zelllinien unter den oben beschriebenen Bedingungen auf Mikrotiterplatten mit „schwerem“ SILAC-Medium (2 ml je Probe, tägliche Probennahme) bis zu 8 Tage kultiviert. Für jeden Probentag wurde Zelllysat präpariert, indem das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen anschließend einmal mit PBS gewaschen und schließlich nach Zugabe von 500 µl eiskalter PBS entfernt wurden. Die Zellsuspension wurde bei 1.000 xg und 4 °C für 5 min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in Lysepuffer (2.1.6) suspendiert. Die Zelllysate wurden bei 13.000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Für die Überstände wurden mittels DC-Assay die Proteinkonzentrationen bestimmt und anschließend wurde die Proteinspaltung in Lösung (2.3.8.1) durchgeführt. Die erhaltenen Peptidmischungen wurden mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS (2.5.2) analysiert. Die Datenanalyse erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Proteome Discoverer 1.3 (2.1.13).

2.4.3.4 Konditionierte Zellüberstände

PC9- und PC9ER-Zellen wurden parallel jeweils in „schwerem“ und „leichtem“ SILAC-Medium für neun Tage kultiviert, um eine Einbaurate der markierten Aminosäuren von über 95 % sicherzustellen. Es wurden durchschnittlich 2,5-3 x 10^6 Zellen in 10 cm Zellkultur-schalen ausgesät und in entsprechendem SILAC-Medium bis zu einer Konfluenz von ca. 60 % kultiviert. Es folgte die Inkubation für 24 h in serumfreiem Medium, nachdem die Zellen viermal mit PBS und einmal mit serumfreiem SILAC-Medium gewaschen wurden. Die Zellüberstände, welche die sekretierten Proteine der Zellen enthielten, wurden gesammelt, gemäß Herstellerangaben mit Complete Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche) versetzt und bei 200 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die konditionierten Zellüber-stände mit Vivaspin2-Zentrifugaleinheiten konzentriert (2.3.5.2) und mittels DC-Assay die Proteinkonzentrationen der Lösungen bestimmt.

2.5 Chemische Quervernetzung und massenspektrometrische Analyse

2.5.1 Chemische Quervernetzung (*Pulldown*-Experimente)

Zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern des t-PA wurden chemische Quervernetzungsexperimente mit t-PA(K2P) und konditionierten Zellüberständen von PC9- bzw. PC9ER-Zellen bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde t-PA(K2P), wie unter 2.3.4.2 beschrieben, auf mit Streptactin-Sepharose-Material beladene Zentrifugensäulen aufgetragen, inkubiert und gewaschen. Danach wurde die beladene Sepharose in zehnfachem Überschuss konditionierter Zellüberstände resuspendiert (30 µg t-PA, 300 µg Sekretomproteine) und mit einem 1000-fachen molaren Überschuss des aminreaktiven Quervernetzungsreagenz BS^2G (Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat) versetzt. Der molare Überschuss von BS^2G bezieht sich dabei auf die eingesetzte Menge t-PA und setzte sich aus je einem 500-fachen molaren Überschuss von BS^2G-D_0 und BS^2G-D_4 zusammen. Die Quervernetzungsreagenzien wurden direkt vor der Zugabe in DMSO gelöst. Nach zwei Stunden Reaktionszeit wurden die Proben mit NH_4HCO_3 (Endkonzentration 50 mM) abgestoppt. Die an die Sepharosematrix gebundenen Proteinkomplexe wurden fünfmal mit HEPES-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Matrix in 50 µl HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4), welcher 10 U Thrombin und 2 mM $CaCl_2$ enthielt, resuspendiert und über Nacht für 16 h inkubiert. Die Elution erfolgte schließlich durch Zentrifugation. Von den jeweiligen Arbeitsschritten wurden je 10 µl Probe entnommen und anschließend per SDS-PAGE analysiert. Die eluierten Proteinlösungen wurden in der Lösung proteolytisch gespalten und mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert.

2.5.2 Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie

Die Peptidlösungen wurden vor der massenspektrometrischen Analyse chromatographisch mittels Nano-HPLC getrennt. Die Trennung der Peptide wurde anhand ihrer UV-Absorption bei 214 nm verfolgt. Das Nano-HPLC-System wurde direkt mit einer Nano-ESI-Quelle eines LTQ-Orbitrap XL Hybrid- oder Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt.

Zur Trennung der Peptidgemische mit dem LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer wurden folgende Fließmittel verwendet:

Fließmittel A:	*5 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) FA*
Fließmittel B:	*80 % (v/v) ACN, 0,08 % (v/v) FA*

Die Peptidgemische, welche aus den tryptischen Spaltungen im Gel resultierten, wurden mittels automatischen Probengebers in eine Probenschleife überführt und auf eine Vorsäule (Acclaim PepMap, C18, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) gegeben. Um die Proben zu entsalzen, wurde 15 min mit 0,1 % (v/v) TFA bei einer Flussrate von 20 µl/min auf der Vorsäule gewaschen. Anschließend wurden die proteolytischen Peptidlösungen mit 100 % Fließmittel A auf die Trennsäule (Acclaim PepMap, C18, 75 µm x 150 mm, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) eluiert und mit einem Fließmittel-gradienten (von 0 auf 20 % B in 130 min, 20 auf 40 % B in 50 min, 40 auf 100 % B in 4 min, 100 % B für 11 min) getrennt.
Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte über den gesamten Zeitraum des Gradienten. Hierfür wurde ein Übersichtsmassenspektrum bei einer Auflösung von R = 60.000 (bei *m/z* 400) in einem Massenbereich *m/z* 350 – 2.000 aufgenommen und datenabhängig die fünf höchsten Signale einzeln mit einem Massenfenster von 2 Th in der linearen Ionenfalle isoliert, mit CID fragmentiert (normierte Fragmentierungsenergie 35 %) und bei einer Auflösung von R = 15.000 (bei *m/z* 400) in der Orbitrap analysiert.

Zur Trennung der Peptidgemische mit dem Orbitrap Fusion-Massenspektrometer wurden folgende Fließmittel verwendet:

Fließmittel A: *0,1 % (v/v) FA in H_2O*
Fließmittel B: *0,08 % (v/v) FA in ACN*

Mit Hilfe eines automatischen Probengebers wurden die aus der proteolytischer Spaltung in Lösung resultierenden Peptidmischungen in eine Probenschleife injiziert und auf die Vorsäule (Acclaim PepMap, C8, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) gegeben. Zunächst folgte dort die Entsalzung durch 15-minütiges Waschen mit 0,1 % (v/v) TFA. Schließlich wurden Peptide mit 100 % Fließmittel A auf die Trennsäule (Acclaim PepMap, C18, 75 µm x 250 mm, 2 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) eluiert. Die Trennung erfolgte über 6 h mittels eines Gradienten (von 0 auf 35 % B in 290 min, 35 auf 85 % B in 5 min, 85 % B für 5 min). Die Datenregistrierung erfolgte in datenabhängigem MS/MS-Modus. Jedem bei einer Auflösung von R = 120.000 (bei *m/z* = 200) registrierten, hochaufgelösten Übersichtsmassenspektrum in einem Massenbereich von *m/z* 300 – 1500 folgte die Aufnahme von HCD-Fragmentionenspektren bei einer Auflösung von R = 15.000 (bei *m/z* = 200) für 5 s, beginnend mit dem intensitätsstärksten Signal. Das Isolierungsfenster betrug 2 Th. Bereits fragmentierte Signale wurden automatisch für 60 s auf eine dynamische Ausschlussliste

gesetzt, um den erfassten dynamischen *m/z*-Bereich zu vergrößern und somit auch weniger abundante Ionen eines Massenspektrums zu fragmentieren.

2.5.3 Quantifizierung von Proteinen der SILAC-Experimente

Die massenspektrometrischen Daten der SILAC-Experimente wurden mit dem Computerprogramm Proteome Discoverer 1.3 analysiert. Die Tandemmassenspektren der Vorläuferionen im Massenbereich *m/z* 500-5.000 wurden unter Nutzung von Mascot (Version 2.2, Matrixscience) gegen die SwissProt Datenbank (Version 07/2012, 536.789 Einträge) abgeglichen. Im Falle der SILAC-Experimente mit PC9- und PC9ER-Zellen wurde die Suche auf humane Proteine beschränkt. Die Massengenauigkeit der Vorläuferionen wurde mit maximal 3 ppm, die der Fragmentionen mit maximal 0,8 Da angegeben. Als fixe Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cysteinen, als variable Modifikation die Oxidation von Methioninen angenommen. Bis zu zwei Fehlschnittstellen der Protease Trypsin wurden akzeptiert. Es erfolgte eine *Decoy*-Analyse mit einer Falschpositivrate von $p \leq 0{,}01$. Zur Quantifizierung wurde die SILAC2plex (Arg6, Lys6)-Methode (bzw. SILAC2plex (Arg6, Lys0)-Methode für die Experimente mit *E. coli*) der Proteome Discoverer-Software verwendet, welche die Peakflächen der durch die Isotopenmarkierung entstandenen Peptidpaare miteinander vergleicht. Die erhaltenen Daten wurden manuell hinsichtlich des „Schwer-zu-Leicht“ (S/L)-Verhältnisses, S/L-Variabilität, der Anzahl der einzigartigen Peptide und der Anzahl der gefundenen Paare eines Proteins untersucht. Proteine mit einem „Schwer-zu-Leicht“-Verhältnis $S/L \geq 2$ bzw. $S/L \leq 0{,}5$ wurden als unterschiedlich exprimiert angesehen. Als sicher unterschiedlich exprimiert galten Proteine nur, wenn sie konstant in allen biologischen Replikaten zusätzlich eine S/L-Variabiltät von maximal 10 %, mindestens zwei einzigartigen Peptiden sowie mindestens zwei identifizierte, isotopenmarkierten Peptidpaare aufwiesen.

2.5.4 Quantifizierung von Proteinen der *Pulldown*-Experimente

Die aus den chemischen Quervernetzungsexperimenten erhaltenen massenspektrometrischen Rohdaten wurden zur Proteinidentifizierung und -quantifizierung mit der MaxQuant-Software (Version 1.5.2.8) prozessiert. Es wurden die Standardeinstellungen für Orbitrapgeräte in Kombination mit der UniProt Datenbank, humanes Proteom (Version 01/15, 89.734 Einträge) gewählt. Zusätzlich wurden als fixe Modifikation die Carbamido-methylierung von Cysteinen

und als variable Modifikation die Oxidation von Methioninen angegeben. Als Proteasen wurden Trypsin und AspN mit maximal vier Fehlschnittstellen je Enzym angegeben. Es wurden jeweils alle biologischen Replikate gleichzeitig mittels markierungsfreier Quantifizierung (label-free quantification, LFQ) berechnet. In tabellarischer Form wurden LFQ-Intensitäten zusammengefasst, welche zur weiteren statistischen Auswertung mit der Software Perseus herangezogen wurden. Die LFQ-Intensitäten wurden als Expressionswerte aus den Ausgabedaten zusammen mit den anderen Parametern, z. B. Proteinname, Anzahl einzigartiger Peptide, Genname, als Matrix generiert. Zunächst wurden aus der Matrix alle Proteine entfernt, welche als potentielle Kontaminanten (ermittelt mit der Kontaminantendatenbank), Proteine mit umgekehrter Aminosäuresequenz (ermittelt mit der Reverse-Proteindatenbank) oder ausschließlich als modifizierte Proteine identifiziert wurden. Um die Anreicherung von t-PA und dessen Bindungspartnern zu untersuchen, wurden die LFQ-Intensitäten zur Basis 2 logarithmiert und gegebenenfalls fehlende Werte aus einer Normalverteilung berechnet. Die so transformierten Expressionswerte wurden aus allen Replikaten kategorisch zusammengefasst und gemittelt. Weiterhin wurden doppelte t-Tests mit einer Irrtumswahr-scheinlichkeit von $p \leq 0{,}01$ für die Daten durchgeführt. Proteine mit einem signifikanten, positiven Testergebnis wurden als angereichert betrachtet. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden die t-Test-Differenzen gegen die $-\log_2$-transformierten Wahrscheinlichkeitswerte in sogenannten *Volcano Plots* aufgetragen. Als Interaktionspartner von t-PA wurden nur die angereicherten Proteine in Betracht gezogen, welche in allen Proben mit mindesten zwei einzigartigen Peptiden identifiziert wurden.

2.5.5 Identifizierung von Quervernetzungsprodukten

Die Identifizierung von Quervernetzungsprodukten erfolgte unter Nutzung der Software StavroX (Version 3.5.1) [55]. Aus den massenspektrometrischen Rohdaten wurden mit dem Programm Proteome Discoverer MGF (Mascot generic format)-Dateien erstellt. Die in den MGF-Dateien enthaltenen, experimentell ermittelten Massen wurden durch StavroX mit einer Liste theoretischer Quervernetzungsprodukte abgeglichen. Für den Abgleich wurden maximale Massenabweichungen von 3 ppm für Vorläuferionen bzw. 10 ppm für Fragmentionen sowie ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens zwei angenommen. Als Endoproteasen wurden Trypsin und AspN, (*C*-terminale Spaltung nach Lysin und Arginin bzw. *N*-terminaler Spaltung vor Asparaginsäure und Glutaminsäure, bis zu drei Fehlschnittstellen je Enzym) gewählt. Desweiteren wurden als mögliche Modifikationen die

Carbamidomethylierung von Cysteinen und die Oxidation von Methioninen berücksichtigt. Als Quervernetzungsreagenz wurde BS^2G-D_0/D_4 mit Lysinseitenketten sowie den *N*-Termini der Proteine als möglichen Reaktionsstellen akzeptiert. Die Übersichtsspektren sowie die Fragmentionenspektren der durch StavroX ermittelten potentiellen Vernetzungsprodukte wurden manuell überprüft.

3 ERGEBNISSE

3.1 Quantifizierung sekretierter Proteine mittels SILAC

Die SILAC-Methode stellt ein ausgezeichnetes Mittel der Proteomik dar, zwei oder mehrere unterschiedliche Zustände von Zellen oder Organismen quantitativ miteinander zu vergleichen [91-93]. Frühestmöglich, d.h. bereits während der Zellteilung und des Wachstums, werden die Proteine durch den Einsatz von isotopenmarkierten Aminosäuren metabolisch markiert. Auf diese Weise wird eine Isotopensignatur in die Proteine eingeführt [88]. In der Regel werden die Aminosäuren Lysin und/oder Arginin für die Markierung eingesetzt. Die zu untersuchenden Proteome werden vor der Analyse mit Trypsin proteolytisch gespalten, sodass eine Quantifizierung auf Peptidebene im Massenspektrum erfolgen kann. Peptide, die mit „schweren Aminosäuren“ markiert wurden, unterscheiden sich in ihrer Isotopenzusammensetzung (^{15}N statt ^{14}N und/oder ^{13}C statt ^{12}C), verhalten sich aber während der Probenpräparation sowie der chromatographischen Trennung und massenspektrometrischen Analyse genauso wie ihre „leichten“ Analoga. Die relativen Verhältnisse der Peptidsignale im Massenspektrum erlauben eine direkte Abschätzung der Peptid- und damit der Proteinmengen zwischen verschiedenen Zuständen.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten SILAC-Experimenten mit NSCLC-Zellen (PC9 und PC9ER) sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Proteinregulation zwischen erlotinibsensitiven und erlotinibresistenten Lungenkarzinomzellen bestehen. Die Wechselwirkungen zwischen einem Tumor und dem ihn umgebenden Gewebe spielen eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese und der Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Behandlungsmethoden. Unterschiede im Tumorsekretom dieser Zellen könnten damit wichtige Informationen bezüglich potentieller Resistenzmarker liefern und mögliche neue Therapieansätzen begründen.

3.1.1 Optimierung der SILAC-Experimente mit *E. coli*-Zellen

Für die Optimierung und Validierung der SILAC-Auswertung wurden zunächst beispielhaft SILAC-Experimente mit dem Bakterienstamm *E. coli* K12/MG1655 durchgeführt. Hierfür erfolgte die Kultivierung der Zellen in entsprechendem „leichtem“ (^{12}C-L-Arginin enthaltendem) und „schwerem“ (^{13}C-L-Arginin enthaltendem) Minimalmedium, wie unter

2.4.3.1 beschrieben. Nachdem die Zellen geerntet und in Tris-Puffer resuspendiert wurden, erfolgte die Mischung von „schweren“ (S) und „leichten“ (L) Proben bezüglich ihrer Biofeuchtmasse in definierten Verhältnissen (1:100 – 100:1 (m/m)). Die definierten Mischungen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, im Gel proteolytisch gespalten und die durch Proteolyse erhaltenen Peptidmischungen mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS analysiert. Beispielhaft ist in Abbildung 3.1 das Massenspektrum mit zwei Peptiden der Ribosephosphat-Pyrophosphokinase (*E. coli*) mit zwei exemplarisch ausgewählten S/L-Paaren dargestellt. Der Abstand der Isotopenmuster beträgt 3 Th (entsprechend 6 Da bei z = 2). Die Intensitäten der charakteristischen Isotopenmuster spiegeln das in diesem Fall eingesetzte definierte „Schwer zu Leicht“ (S/L)-Verhältnis von 4:3 wider.

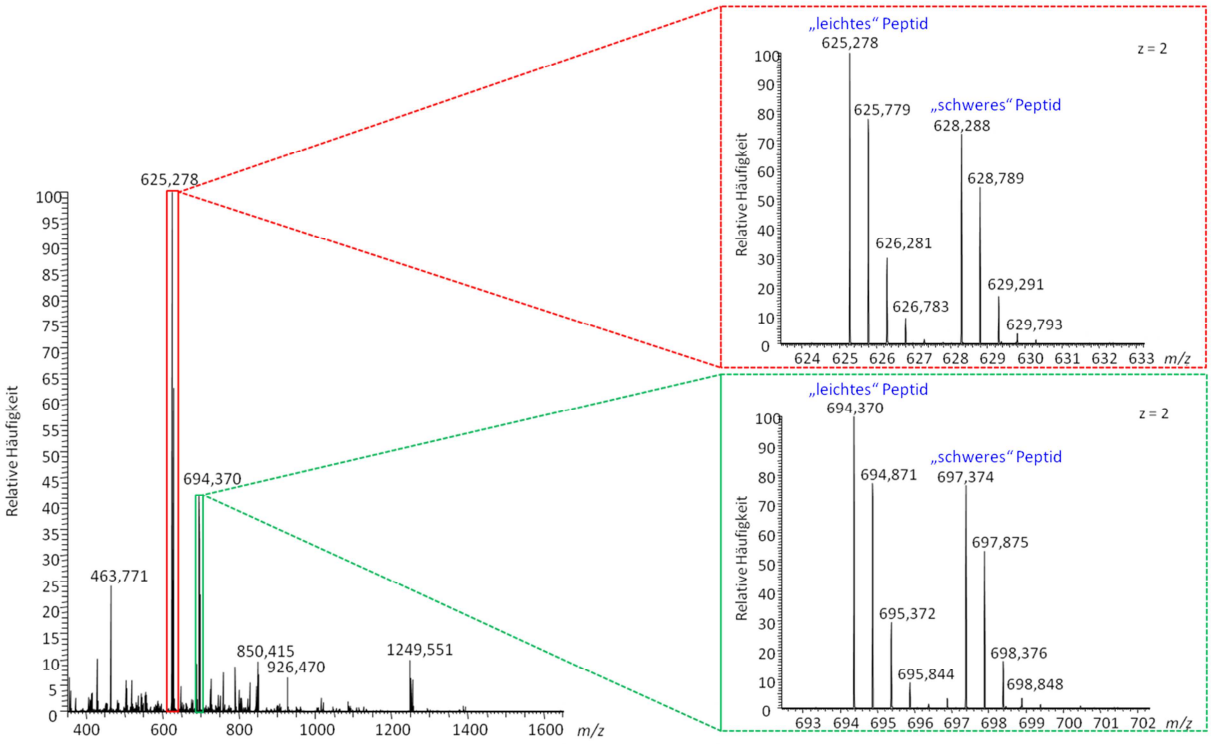

Abbildung 3.1: Massenspektrum einer SILAC-markierten E. coli-Probe.

Die E. coli-Probe wurde im definierten SILAC-S/L-Verhältnis von 4:3 eingesetzt, welches sich in den charakteristischen Isotopenmustern der beiden beispielhaft ausgewählten Peptide der Ribosephosphat-Pyrophosphokinase (Swiss Prot-Eintrag P0A719) wiederfindet.

Die massenspektrometrischen Daten wurden mit der Software Proteome Discoverer 1.3 und den unter 2.5.3 beschriebenen Einstellungen prozessiert. So erhaltene Daten wurden auch manuell untersucht, um die Richtigkeit der automatisch ermittelten Ergebnisse zu überprüfen. Ziel dabei war es, die eingesetzten definierten Verhältnisse, welche sich im S/L-Verhältnis widerspiegeln, mit geringstmöglicher Falschpositivrate zu erhalten. Im Allgemeinen entsprachen die von der Software berechneten Werte den vorher eingesetzten Verhältnissen, jedoch gab es bei nahezu allen Proben zahlreiche Ausreißer in den Ergebnislisten. Daher sollte untersucht werden, auf welche Parameter Einfluss genommen werden kann bzw. für welche Parameter noch weitere Beschränkungen eingefügt werden können, um die Ausreißer zu minimieren, ohne dabei wahre Quantifizierungsergebnisse zu verlieren. Als optimale Methode stellte sich heraus, die S/L-Variabilität kleiner als 10 %, mindestens zwei einzigartige Peptide pro Protein und mindestens zwei zur Quantifizierung herangezogene S/L-Paare festzulegen. Durch die zusätzlichen Beschränkungen konnten Ausreißer nahezu vollständig ausgeschlossen werden.

3.1.2 SILAC-Experimente mit NSCLC-Zelllinien

3.1.2.1 Bestimmung der Einbaurate isotopenmarkierter Aminosäuren

Zur Bestimmung der Einbaurate der isotopenmarkierten Aminosäuren Arginin und Lysin wurden sowohl PC9- als auch PC9ER-Zellen in „schwerem“ SILAC-Medium kultiviert. Dabei wurden für jede Zelllinie je 8 Proben (jeweils in 2 ml Medium) auf Mikrotiterplatten angesetzt, um die Einbaurate mit täglicher Probennahme über einen Zeitraum von 8 Tagen zu verfolgen. Der gewählte Zeitraum wurde vorab aus den Zelldopplungsraten und der empfohlenen Anzahl an Zelldopplungen für SILAC-Experimente berechnet. Es wird allgemein angeraten, nach Erreichen einer Einbaurate von mindestens 95 %, was in der Regel nach 5-7 Zelldopplungen der Fall ist, die Zellen für den Zeitraum zwei weiterer Zelldopplungen im entsprechenden Medium zu kultivieren, um eine Einbaurate von nahezu 100 % zu erhalten [90, 113].

Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, wurde nach 7 Tagen Kultivierung in „schwerem“ SILAC-Medium, was für PC9ER-Zellen 6,5 bzw. für PC9-Zellen 7 Zelldopplungen entspricht, für beide Zelllinien eine durchschnittliche Einbaurate von über 95 % (PC9ER: 96,82 %, PC9: 97,07 %) erreicht. Die abgeschätzten Werte entsprachen also den empfohlenen Werten der Literatur. Um eine Einbaurate von nahezu 100 % zu gewährleisten, wurden die Zellen für die

vergleichenden SILAC-Experimente zwischen erlotinibresistenten und elrotinibsensitiven Zellen folglich für 9 Tage in „schwerem“ SILAC-Medium kultiviert.

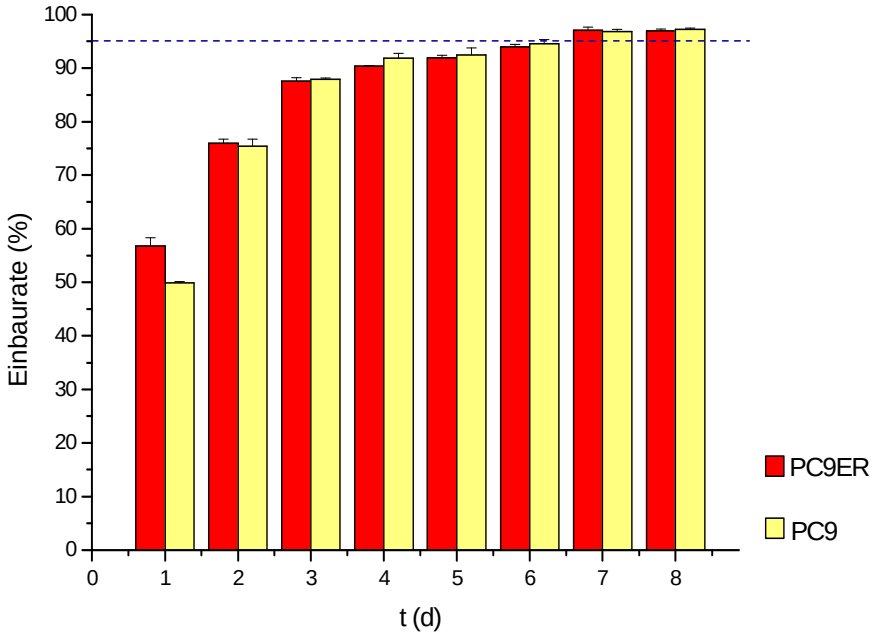

Abbildung 3.2: Einbaurate der ^{13}C-Isotopenmarkierten Aminosäuren.

Die Einbaurate der ^{13}C-markierten Aminosäuren Arginin und Lysin in PC9- (gelb) und PC9ER-Zellen (rot) ist für acht Tage dargestellt. Bereits nach sieben Tagen (entsprechen 6,5–7 Zelldopplungen) wurde für beide Zelllinien eine angestrebte Einbaurate von über 95 % erreicht.

3.1.2.2 Präparation konditionierter Zellüberstände

Die Zellüberstände der gewählten NSCLC-Zelllinien wurden für 9 Tage im entsprechenden serumhaltigen Medium kultiviert, um eine Einbaurate der ^{13}C-markierten Aminosäuren von nahezu 100 % sicherzustellen. Danach wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.4.3.4 beschrieben, gewaschen und anschließend für 24 h serumfrei gesetzt, um danach die Zellüberstände abzunehmen, welche das Sekretom enthielten. Neben einer vollständigen Markierung stellte die Konzentrierung der Zellüberstände einen wichtigen Punkt der Probenaufarbeitung dar. Für die weiteren Untersuchungen der Proben mittels SDS-PAGE und LC/MS/MS waren die Ausgangsvolumina zu groß, um sie vollständig zu bearbeiten bzw. der Proteingehalt der Überstände zu gering, um nur mit Teilmengen weiterzuarbeiten. Es wurden verschiedene Methoden getestet, das Volumen der Zellüberstände zu verringern und dabei möglichst geringe Proteinverluste zu verzeichnen. Es wurden drei etablierte Vorgehensweisen (Ultrafiltration, Acetonpräzipitation und TCA-Präzipitation) einander gegenübergestellt.

Zunächst wurden unterschiedliche Filtereinheiten verschiedener Hersteller für die Ultrafiltration evaluiert. Im Speziellen handelte es sich um Zentrifugenfiltrationseinheiten der Firmen Merck Millipore (Amicon Ultra mit 3 kDa bzw. 10 kDa Molekulargewichts-ausschluss (MWCO)) und Sartorius (Vivaspin mit 2 kDa, 3 kDa, 5 kDa und 10 kDa MWCO). Die Filtereinheiten wurden mit dem entsprechenden Füllvolumen an Zellüberständen befüllt und gemäß Herstellerangaben zentrifugiert, bis das gewünschte Restvolumen erreicht war (2.3.5.2). Mittels DC-Assay wurde der Proteingehalt der Proben vor und nach der Filtration bestimmt und die Werte der verschiedenen Ansätze miteinander verglichen. In Abbildung 3.3 sind die Werte aller getesteten Ultrafiltrationseinheiten einander gegenübergestellt.

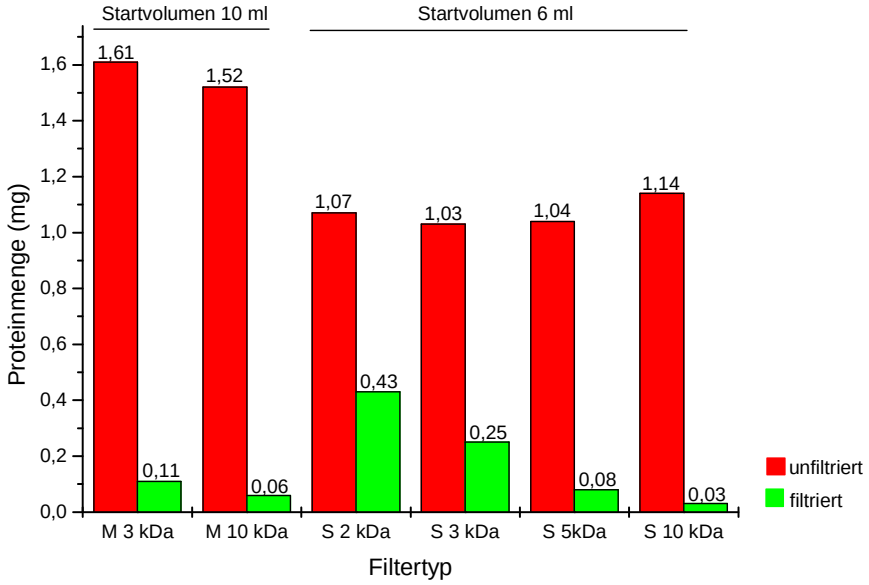

Abbildung 3.3: Vergleich verschiedener Ultrafiltrationseinheiten.

Es wurden Filter der Firmen Merck Millipore (M, Amiconfilter) und Sartorius (S, Vivaspinfilter) mit verschiedenen Molekulargewichtsausschlüssen getestet. Dabei wurden die Proben auf ein vergleichbares Volumen von 150-250 µl eingeengt und bezüglich des Proteinverlustes bei der Probenkonzentrierung untersucht. In rot sind dabei die Proben vor, in grün nach der Filtration dargestellt.

Es ist klar ersichtlich, dass die Vivaspin-Filter mit 2 kDa MWCO das beste Ergebnis erzielten. Während bei beiden Zentrifugationsfiltereinheiten von Merck Millipore sowie bei denen von Sartorius mit einem Ausschluss von 5 bzw. 10 kDa ein Proteinverlust von über 90 % verzeichnet wurde, konnte der Proteinverlust mit den Sartoriusfiltern mit 3 bzw. 2 kDa MWCO auf 75 % bzw. 60 % reduziert werden. Die Experimente wurden einmal wiederholt und führten zu vergleichbaren Resultaten. Die Vivaspin-Filter mit 2 kDa MWCO stellten

unter den Ultrafiltrationseinheiten also die mit Abstand beste Alternative dar. Da der Proteinverlust mit knapp 60 % aber immer noch vergleichsweise hoch lag, sollten alternative Methoden zur Konzentrierung der Zellüberstände vor der weiteren Probenbearbeitung entwickelt werden.

Um zu prüfen, ob sich der Proteinverlust bei der Probenkonzentrierung weiter reduzieren lässt, wurden die Vivaspin-Filter (2 kDa Größenausschluss) mit den Methoden der Acetonpräzipitation und der TCA-Präzipitation verglichen (Methodenbeschreibung siehe 2.3.5.2). Hierfür wurden für die verschiedenen Zelllinien jeweils Zellüberstände gesammelt, vereinugt und in gleichen Ausgangsvolumina für die unterschiedlichen Methoden eingesetzt. Die Versuche wurden dreimal wiederholt und die Proben mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.4).

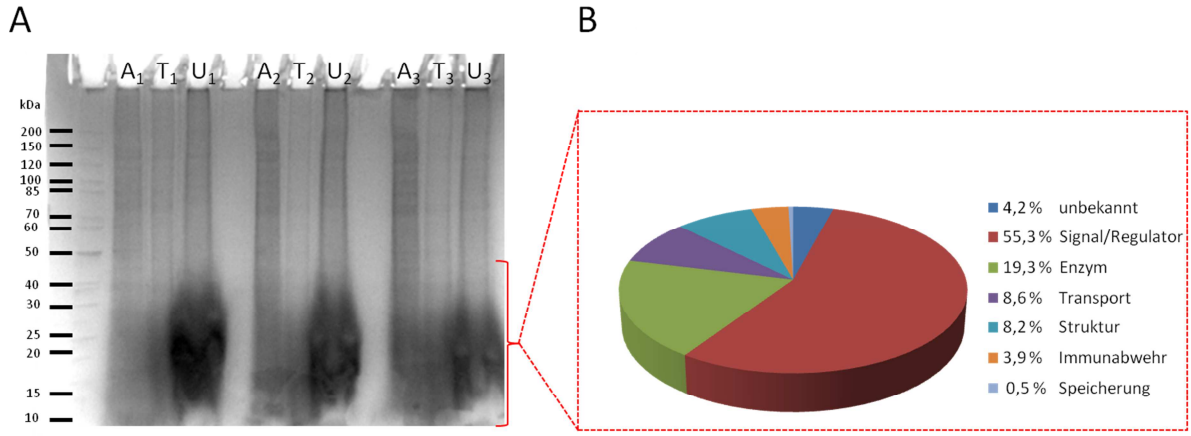

Abbildung 3.4: Vergleich verschiedener Konzentrierungsmethoden mittels SDS-PAGE.
*(**A**) Um Acetonpräzipitation (A), TCA-Präzipitation (T) und Ultrafiltration (U) miteinander zu vergleichen, wurden gleiche Mengen bezüglich der Ausgangs- und Endvolumina auf ein Gradientengel (4-20 %) aufgetragen. Die Experimente wurden in Triplikaten (1-3) durchgeführt. (**B**) Funktionseinteilung der Proteine, die bei der Ultrafiltration im Molekulargewichtsbereich < 50 kDa massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten.*

Von den untersuchten Methoden zur Konzentrierung der Zellüberstände ist die Ultrafiltration als am besten geeignet zu betrachten. Bei gleichen Ausgangsvolumina identischer Lösungen ist bei vergleichbaren Endvolumina nach der Ultrafiltration im Vergleich zur Aceton- oder TCA-Präzipitation die größte Proteinmenge nachweisbar. Vor allem bei Proteinen mit Molekulargewichten kleiner als 50 kDa ist eine deutliche Anreicherung im Vergleich zu den anderen Methoden sichtbar. Dieser Bereich ist hinsichtlich der Sekretomanalytik besonders

interessant, da es sich bei sekretierten Proteinen hauptsächlich um kleinere Proteine und Peptide handelt. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt eine Überladung des Gels in diesem Bereich. Eine massenspektrometrische Analyse nach proteolytischer Spaltung des Gelbereichs < 50 kDa ergab, dass es sich bis auf wenige Ausnahmen, welche auf geringe Mengen an Zellrückständen und nicht charakterisierte Proteine zurückzuführen sind, um sekretierte Proteine handelt. Auch die in Abbildung 3.4 B gezeigte Einteilung der Proteine gemäß ihrer Funktion ist aufschlussreich und entspricht der Vermutung, dass im Sekretom hautsächlich kleine Proteine mit regulatorischer, signalgebender oder enzymatischer Funktion zu finden sind.

Um bei der Probenvorbereitung für eine vergleichende SILAC-Analyse verschiedener NSCLC-Zelllinien möglichst geringe Proteinverluste zu verzeichnen und probenspezifische Fehler zu minimieren, wurden die Arbeitsabläufe standardisiert (Abbildung 3.5).

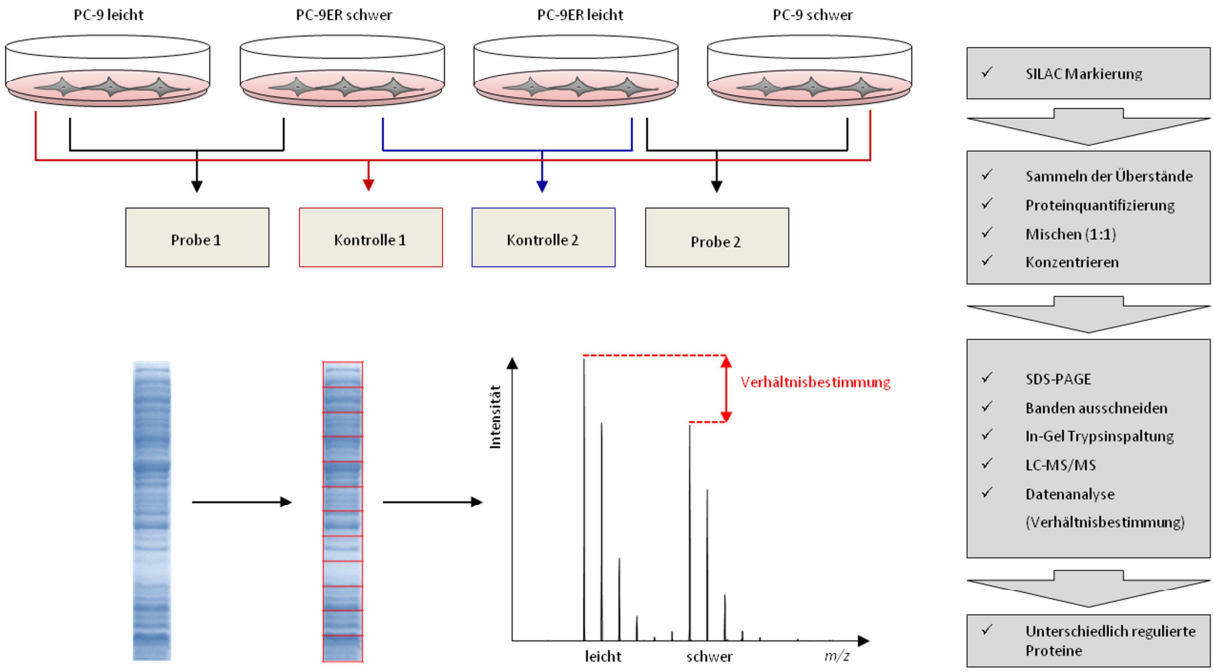

Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der SILAC-Experimente.

Dargestellt ist die Versuchsdurchführung eines biologischen Experiments zur Untersuchung in der Proteinregulation im Sekretom verschiedener NSCLC-Zelllinien.

Es wurden zunächst PC9- und PC9ER-Zellen jeweils in „schwerem“ und „leichtem“ SILAC-Medium für neun Tage kultiviert, gewaschen, serumfrei gesetzt und nach 24 h die Überstände abgenommen. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Überstände wie beschrieben im Verhältnis 1:1 (bezogen auf ihre Proteinkonzentration) gemischt, mittels Ultrafiltration (Vivaspin, 2 kDa MWCO) konzentriert und anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt. Die erhaltenen Proben wurden im Gel enzymatisch proteolysiert und mit Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie analysiert.

3.1.2.3 Identifizierung unterschiedlich regulierter Proteine des NSCLC-Sekretoms

Ziel der SILAC-Experimente mit PC9- und PC9ER-Zellen war es, herauszufinden, ob Unterschiede in den Proteinmengen zwischen erlotinibsensitiven und erlotinibresistenten Zellen bestehen. Die Wechselwirkungen zwischen einem Tumor und dem umliegenden Gewebe spielen eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese und Resistenzentwicklung gegenüber apoptose- oder nekroseinduzierenden Behandlungsmethoden. Differenzen im Tumorsekretom zwischen resistenten und sensitiven Zellen könnten damit Aufschluss über Resistenzmechanismen, Resistenzmarker oder potentielle neue Therapieansätze geben.

Die SILAC-Experimente wurden in vier biologischen Replikaten durchgeführt, welche jeweils aus zwei Proben und zwei Kontrollen bestanden (Tabelle 3.1). Bei den zwei Proben waren die Zelllinien jeweils entgegengesetzt markiert, sodass eine weitere Kontrollfunktion zur Minimierung falsch positiver Ergebnisse gegeben war, welche zusätzlich zu den ohnehin sehr strikten Beschränkungen die Zuverlässigkeit der Quantifizierungsergebnisse erhöhte.

Die aus den verschiedenen Proben erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden mit den unter 3.1.1 beschriebenen Auswahlkriterien auf unterschiedlich regulierte Proteine untersucht. Durchschnittlich wurden bei den Analysen 900 humane Proteine, mit geringfügigen Abweichungen in der Anzahl identifizierter Proteine zwischen einzelnen Messungen, identifiziert.

Bis auf wenige Ausnahmen blieben die Kontrollen ohne quantitative Unterschiede. Einige wenige Ausreißer (Elafin, Serin-Protease 23, Protein S100-A8 und Protein S100-A9) fanden sich jedoch trotz der stringenten Auswahlkriterien in verschiedenen Kontrollen und sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Auffällig war, dass die in den Kontrollen als „unterschiedlich reguliert“ identifizierten Proteine nur vereinzelt auftraten und nicht konstant in allen

Kontrollen vorzufinden waren. Aus dieser Tatsache ergab sich die zusätzliche Einschränkung für die Auswertung der SILAC-Proben, dass Kandidaten konstant in allen Proben aller Replikate „unterschiedlich reguliert“ sein müssen, als „sicher differenziert reguliert“ kategorisiert zu werden.

Tabelle 3.1: Übersicht der biologischen Replikate der SILAC-Experimente.

	Bezeichnung	Typ	Zelllinie		Anzahl identifizierter Proteine	Falsch Positive
			„leicht“	„schwer“		
1. biologisches Replikat	P1.1	Probe	PC9	PC9ER	972	
	P1.2	Probe	PC9ER	PC9	752	
	K1.1	Kontrolle	PC9	PC9	861	Elafin
	K1.2	Kontrolle	PC9ER	PC9ER	860	Serin Protease 23
2. biologisches Replikat	P2.1	Probe	PC9	PC9ER	790	
	P2.2	Probe	PC9ER	PC9	816	
	K2.1	Kontrolle	PC9	PC9	931	
	K2.2	Kontrolle	PC9ER	PC9ER	1043	Protein S100-A8 und -A9
3. biologisches Replikat	P3.1	Probe	PC9	PC9ER	857	
	P3.2	Probe	PC9ER	PC9	963	
	K3.1	Kontrolle	PC9	PC9	911	
	K3.2	Kontrolle	PC9ER	PC9ER	886	
4. biologisches Replikat	P4.1	Probe	PC9	PC9ER	833	
	P4.2	Probe	PC9ER	PC9	924	
	K4.1	Kontrolle	PC9	PC9	843	Protein S100-A8
	K4.2	Kontrolle	PC9ER	PC9ER	994	Protein S100-A8

Die Auswertung der SILAC-Proben ergab eine Liste von 50 Proteinen mit einem auffälligem S/L-Verhältnis (Tabelle A.1). Von diesen 50 Proteinen erfüllten nur fünf alle geforderten Kriterien, in allen Replikaten und Messungen (Regulationsfaktor ≥ 2, S/L-Variabilität < 10 %, Anzahl einzigartiger Peptide eines Proteins ≥ 2, Anzahl zur Quantifizierung herangezogenen S/L-Paare ≥ 2, sekretorisches Protein) und wurden als „sicher differenziert reguliert“ kategorisiert. Weitere neun Proteine konnten nicht alle Auswahlkriterien vollständig erfüllen und wurden aufgrund der aus den SILAC-Experimenten mit *E. coli* gewonnenen Erkenntnisse als „möglicherweise differenziert reguliert“ eingestuft. Eine Auflistung dieser in den untersuchten NSCLC-Zelllinien unterschiedlich regulierten Proteine stellt Tabelle 3.2 dar. Der

Tabelle ist auch zu entnehmen, in welcher der Zelllinien eine Hochregulierung stattfand und wie groß das Ausmaß der Regulierung in Bezug zur Vergleichszelllinie war.

Für die fünf „sicher differenziert regulierten“ Proteine, dem gewebespezifischen Plasminogenaktivator (*tissue-type plasminogen activator*, t-PA), urokinasespezifischen Plasminogenaktivator (*urokinase-type plasminogen activator*, u-PA), plättchenstämmigen Wachstumsfaktor D (*platelet-derived growth factor D*, PDGF-D), epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) und myeloidstämmigen Wachstumsfaktor (*myeloid-derived growth factor*, MYDGF) konnte, abgesehen vom letztgenanntem, in den letzten Jahren ein klarer Zusammenhang zur Entstehung bzw. Entwicklung verschiedener Krebsarten hergestellt werden.

Tabelle 3.2: Unterschiedlich regulierte Proteine von PC9- und PC9ER-Zellen.

Die grau hinterlegten Proteine wurden als „sicher differenziert reguliert“, die nicht hinterlegten als „möglicherweise differenziert reguliert“ eingestuft. In der ersten Spalte ist die Zelllinie angegeben, in der das betreffende Protein hochreguliert wurde. In der zweiten Spalte ist der Faktor bzw. das Ausmaß der Regulierung (bezugnehmend auf die Vergleichszellline) aufgeführt.

↑	Faktor	Uniproteintrag	Name (Abkürzung)
PC9ER	3 - 10	P00750	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator (t-PA)
PC9	2 - 6	P00749	Urokinasespezifischer Plasminogenaktivator (u-PA)
PC9	2 - 3	Q9GZP0	Plättchenstämmiger Wachstumsfaktor D (PDGF-D)
PC9	2 - 3	P00533	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)
PC9	2 - 4	Q969H8	Myeloidstämmiger Wachstumsfaktor (MYDGF)
PC9	8 - 10	P02750	Leucinreiches Alpha-2-Glykoprotein (LRG1)
PC9	3 - 6	Q9UI42	Carboxypeptidase A4 (CPA4)
PC9	2 - 3	P43251	Biotinidase (BTD)
PC9	2 - 3	Q9UM22	Ependyminverwandtes Protein 1 (EPDR1)
PC9	2 - 3	Q13162	Peroxiredoxin-4 (PRDX4)
PC9	2 - 3	Q99584	Protein S100-A13 (S100A13)
PC9	3 - 5	Q03169	Tumornekrosefaktor Alpha-induziertes Protein 2 (TNFAIP2)
PC9	2 - 5	P55145	Mesencephalischer Astrozytenstämmiger Neurotrophischer Faktor (MANF)
PC9	2 - 3	Q9HB40	Retinoidinduzierbare Serin-Carboxypeptidase 1 (SCPEP1)

Der größte Unterschied ist für t-PA (hochreguliert in PC9ER-Zellen um den Faktor 3-10) zu verzeichnen, gefolgt von u-PA (hochreguliert in PC9-Zellen um den Faktor 2-6), MYDGF (Faktor 2-4) sowie PDGF-D und EGFR (jeweils Faktor 2-3). Auch wenn in Tabelle 3.2 noch weitere Proteine mit beachtlichen quantitativen Differenzen zwischen den zwei Zelllinien zu finden sind, wurden diese aufgrund ihrer Zuordnung als nur „möglicherweise differenziert reguliert“ eingestuft und werden im Folgenden nicht weiter diskutiert. Beispielhafte Massenspektren der 5 differenziert regulierten Proteinen sind in den Abbildungen A.2-A.5 sowie 3.6 gegeben.

Wie in dieser Arbeit beschrieben, handelt es sich beim gewebespezifischen Plasminogenaktivator um eine Serinprotease, welche aus fünf Domänen (F, E, K1, K2 und P) besteht. Auch für t-PA wurden Zusammenhänge zwischen dessen Regulation und bestimmten Krebsarten, wie Brust-, Lungen- Pankreas- und Kolonkrebs beschrieben [5, 54-56]. T-PA ist ein etablierter Tumormarker für Brustkrebs [57]. Obwohl t-PA im Zusammenhang mit bestimmten Aspekten der Krebsentstehung und Entwicklung diskutiert wird, ist das Protein diesbezüglich längst nicht so gut charakterisiert wie sein Urokinase-spezifisches Analogon u-PA (Kapitel 4.1). Dies und die Tatsache, dass t-PA in den in dieser Arbeit durchgeführten SILAC-Experimenten das deutlichste Ergebnis (Regulationsunterschied bis zu Faktor 10) aufwies, führten dazu, dass t-PA in weiterführenden Experimenten genauer charakterisiert werden sollte. Im Speziellen sollten Bindungspartnerstudien mit verschiedenen klonierten und in *E. coli* exprimierten Varianten von t-PA durchgeführt werden (Kapitel 3.2).

Das Massenspektrum eines t-PA-Peptids, welches in einem der SILAC-Experimente identifiziert wurde, ist in Abbildung 3.6 A gegeben. In diesem Fall lag das t-PA-Peptid fünfmal so häufig im PC9-Sekretom wie im PC9ER-Sekretom vor (vgl. Intensitäten der Isotopenmuster im Massenspektrum von Abbildung 3.6 B). Das hier gezeigte Peptid konnte mit einer guten Fragmentionenabdeckung sicher identifiziert werden (MS/MS, Abbildung 3.6 unten).

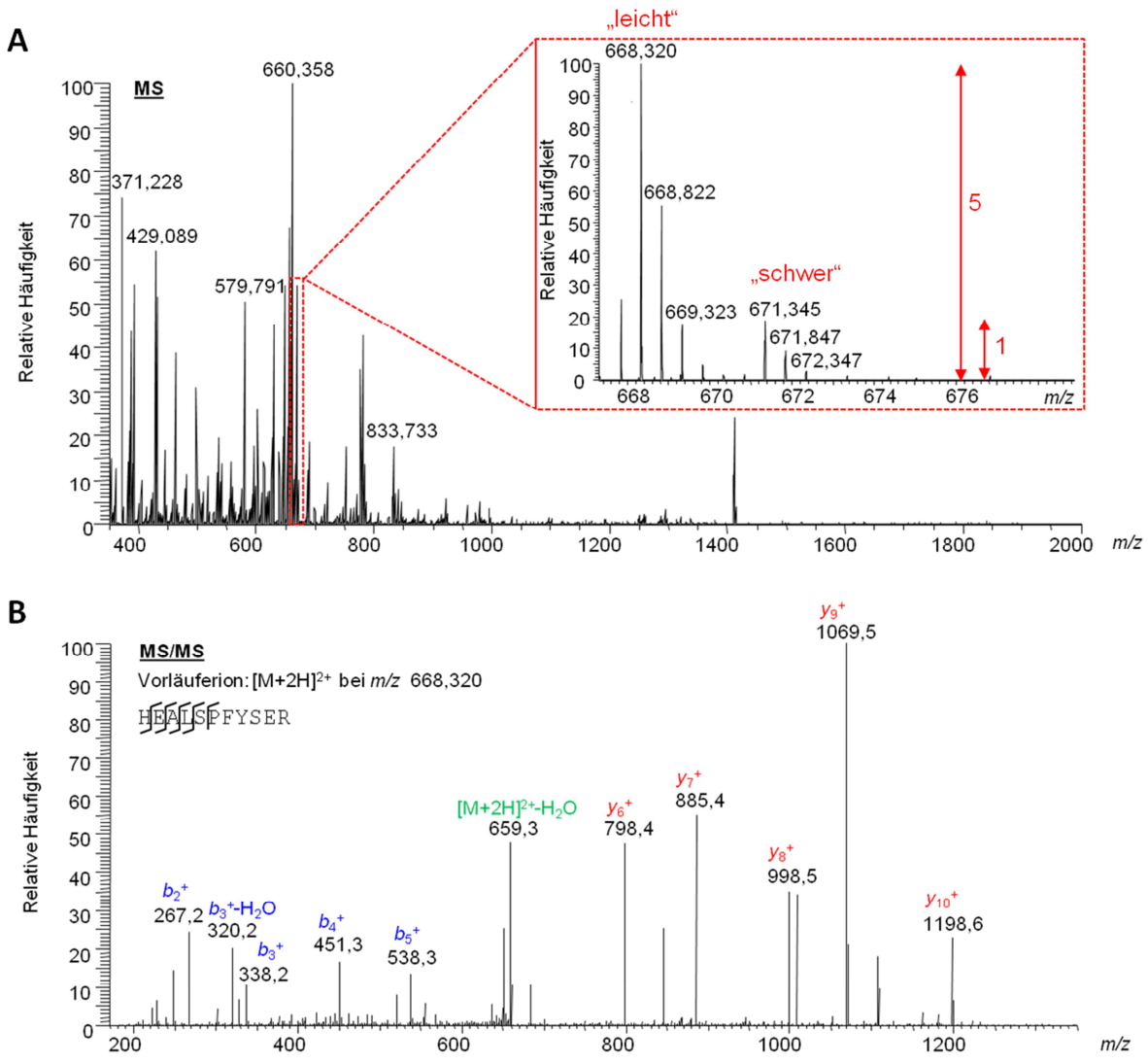

Abbildung 3.6: ESI-Massenspektren.

*(**A**) Massenspektrum mit Trypsin proteolytisch gespaltener Proteine, einer Mischung aus „schweren“ PC9ER- (^{13}C-Arg, ^{13}C-Lys) und „leichten“ PC9-Zellen (^{12}C-Arg, ^{12}C-Lys). Das Isotopenmuster des ausgewählten t-PA-Peptids spiegelt ein S/L-Verhältnis von 1:5 wider. (**B**) Fragmentionenspektrum des aus dem Massenbereich m/z 400-2000 ausgewähltent-PA- Signals bei m/z 668,320 des Peptids HEALSPPFYSER (Aminosäuren 417-427).*

3.2 Klonierung, Expression und Reinigung von t-PA

3.2.1 Klonierung von t-PA in verschiedene Vektoren

Es wurden drei Expressionsplasmide für unterschiedliche t-PA-Varianten hergestellt (Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2). In Abbildung 3.7 sind die verwendeten Inserts der Plasmide dargestellt.

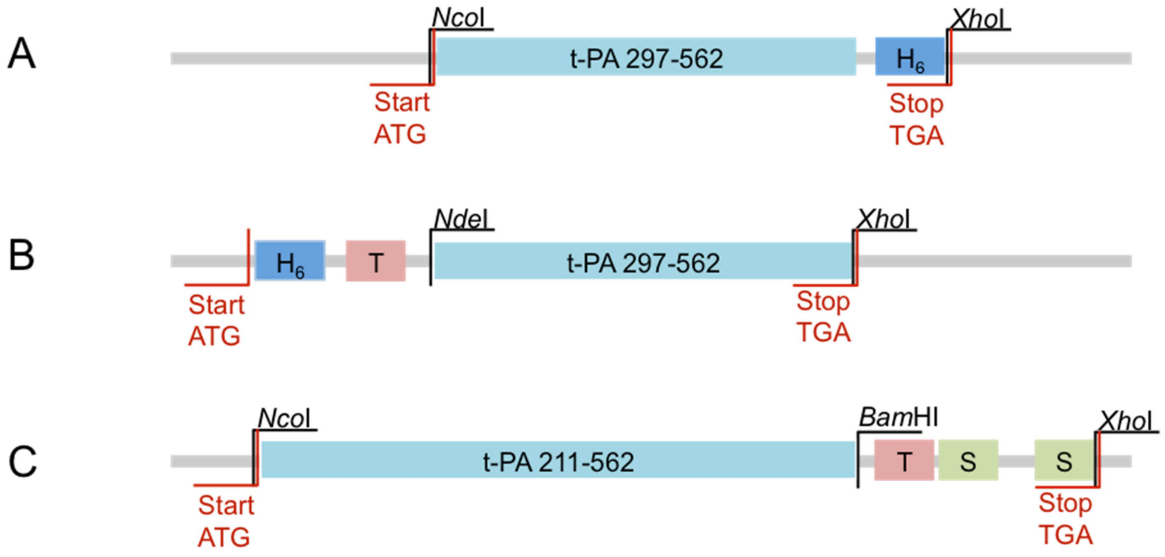

Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der DNA-Inserts der t-PA-Expressionsplasmide.
*(**A**) Ausschnitt der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) des pEt-28a(+)-Vektors, in den das Insert für t-PA(P) inklusive C-terminalem Hexahistidin-Tag (H_6) kloniert wurde. (**B**) MCS-Ausschnitt mit t-PA(P)-Insert inklusive N-terminalem Hexahistidin-Tag und Thrombinschnittstelle (T). (**C**) Ausschnitt der MCS des Klonierungsvektors mit den Inserts für t-PA(K2P) und doppeltem C-terminalen Strep-Tag II (S) inklusive Thrombinschnittstelle.*

3.2.1.1 Klonierung von t-PA(P) in pET-28a(+)

Um verschiedene t-PA(P)-Expressionsplasmide für die Herstellung der Proteasedomäne von t-PA zu konstruieren, wurde das Plasmid 14AANVSP_t-PA-pMA, welches die zur Expression mit *E. coli* codonoptimierte DNA-Sequenz der Proteasedomäne (P) von t-PA enthält, eingesetzt (Kapitel 2.1.1). Es wurde sowohl eine t-PA(P)-Variante mit *N*-terminalem als auch mit *C*-terminalem His_6-*Tag* hergestellt (Abbildung 3.8).

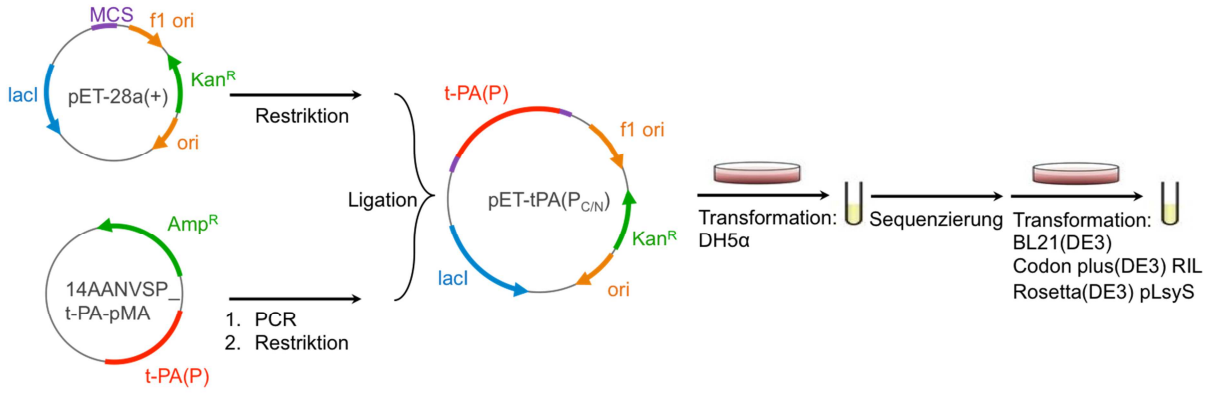

Abbildung 3.8: Klonierung von t-PA(P) in pET28a(+)

Die DNA-Sequenz der t-PA-Proteasedomäne (P) wurde aus dem Vektor 14AANVSP_t-PA-pMA in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pET-28a(+), mit Kanamycinresistenz (Kan^R), f1 Replikationsursprung (ori) und T7-Promotor (prm) subkloniert und so der Expressionsvektor pET-tPA(P_C) bzw. pET-tPA(P_N) hergestellt. Die Plasmide wurden anschließend in DH5α-Zellen transformiert, sequenziert und Plasmide mit der gewünschten Sequenz zur Expression in verschiedene E. coli-Stämme transformiert.

Mittels PCR wurden die t-PA(P)-Inserts vervielfältigt und durch passende Primer gezielt Restriktionsschnittstellen angefügt. Es wurden die Primer *C*-Term.His6F_tPA(P) und *C*-Term.His6R_tPA(P) genutzt, um die Insertions-DNA für die t-PA(P)-Variante mit *C*-terminalem His$_6$-*Tag* (t-PA(P_C)) mit den Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Nco*I und *Xho*I zu erweitern. Desweiteren wurden die Primer *N*-Term.His6F_tPA(P) und *N*-Term.His6R_tPA(P) verwendet, um die Amplifizierung der Insert-DNA für die t-PA(P) Variante mit *N*-terminalem His$_6$-*Tag* (t-PA(P_N)) und den Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Xho*I zu gewährleisten. Nach erfolgreicher PCR wurden die gewünschte Insertions-DNA und die Vektor-DNA mit den passenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, gereinigt und anschließend ligiert. Da sich die Ligation bei 20 °C für 30 min mit einem Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 als nicht erfolgreich erwies, wurden weitere Temperaturbedingungen (24 h bei 4 °C, 33 h mit einem Temperaturgradient von 4 °C bis 20°C) mit verschiedenen Vektor/Insert-Verhältnissen (1:3, 1:6, 1:9) getestet. Dabei erwies sich die Ligation mit einem Temperaturgradienten als effektivste die Variante. Die Vektor/Insert-Verhältnisse hatten dabei keinen signifikanten Einfluss. Bei allen folgenden Ligationen (Kapitel 3.2.1.2) wurden daher der beschriebene Temperaturgradient und ein Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 als Standardbedingungen gewählt. Die Plasmide pET-tPA(P_C) und pET-tPA(P_N) zur Expression

von t-PA(P_C) bzw. t-PA(P_N) in *E.coli* konnten erfolgreich hergestellt werden. Die subklonierten DNA-Inserts entsprechen den codierenden DNA-Sequenzen der vollständigen Proteasedomäne des t-PA, welche die Aminosäuren 297-562 umfasst (Abbildung 3.7*)*. Chemisch kompetente DH5α-Zellen wurden mit den Plasmiden pET-tPA(P_C) und pET-tPA(P_N) transformiert (Kapitel 2.2.2). Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen wurden jeweils 5 ml-Tageskulturen der entsprechenden Zellen angefertigt und die Plasmid-DNA aus den geernteten Zellen extrahiert und sequenziert (Kapitel 2.2.3 und 2.2.9). Chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3)-, BL21 (DE3) Codon Plus RIL- und Rosetta (DE3) pLysS-Zellen wurden mit Plasmiden transformiert, welche die gewünschte Insertions-DNA enthielten.

3.2.1.2 Klonierung von t-PA(K2P) in pS_C und pS_N

Zur Konstruktion der beiden t-PA(K2P)-Expressionsplasmide wurden die Plasmide pA27fd7 von Elisabeth Schwarz sowie V152 und V162 von Frank Zaucke zur Verfügung gestellt (Kapitel 2.1.1). Das Plasmid pA27fd7 enthält die für die Aminosäuren 211-562 des t-PA codierende DNA-Sequenz. Die Plasmide V152 und V162 enthalten die codierende DNA-Sequenz eines *C*-terminalen bzw. *N*-terminalen, doppelten Strep-*Tag* II mit Thrombinschnittstelle.

Klonierung von t-PA(K2P) in pS_C

Zunächst wurde das Strep-*Tag*-Insert mittels PCR amplifiziert und durch die Primer F_152_BamHI und R_152_XhoI um die Restriktionsschnittstellen der Endonukleasen *Bam*HI und *Xho*I erweitert. Das so erhaltene Insert und der Vektor pET-28a(+) wurden mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend ligiert. Es wurde erfolgreich der Klonierungsvektor pS_C hergestellt. Weiterhin wurden die Primer F_K2P_NcoI_*C*-TTS und R_K2P_BamHI_*C*-TTS verwendet. Diese Primer dienten bei der PCR zur Amplifikation des t-PA(K2P)-Inserts mit den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nco*I. Das vervielfältigte Insert und der Vektor pS_C wurden mit beiden Enzymen geschnitten und danach ligiert. Die Produktion des Expressionsvektors pS_C-K2P, welcher die DNA-Sequenz von t-PA(K2P) inklusive abspaltbaren doppelten Strep-*Tag* II enthält, war erfolgreich. Eine Zusammenfassung der Subklonierung ist in Abbildung 3.9 veranschaulicht.

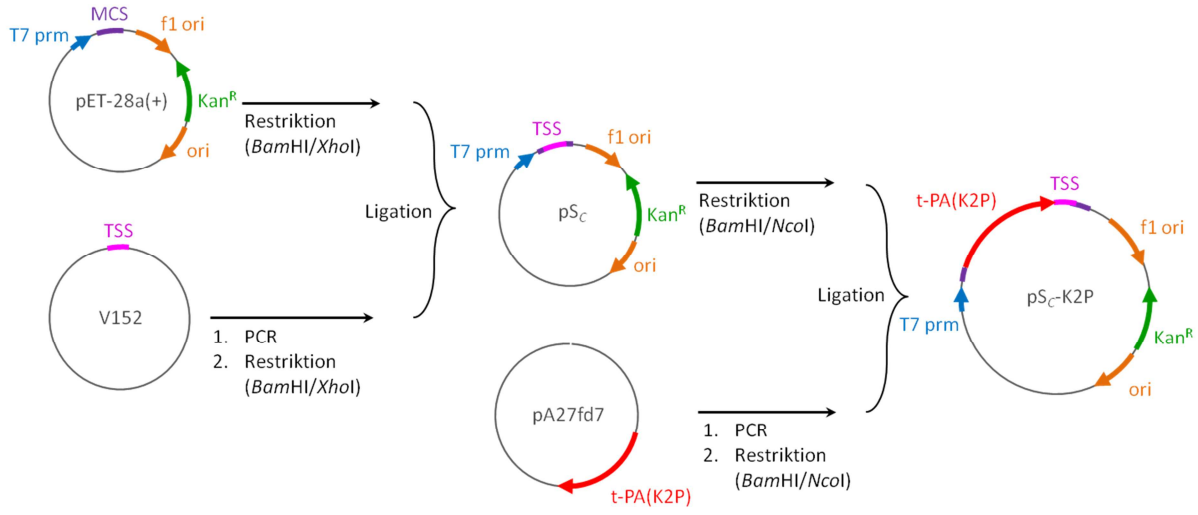

Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie.

Die DNA-Sequenz für einen doppelten Strep-Tag II inklusive Thrombinschnittstelle (TSS, Thrombinschnittstelle-Strep II-Strep II) wurde aus dem Vektor V152 in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pET-28a(+), mit Kanamycinresistenz (Kan^R), f1 Replikationsursprung (ori) und T7-Promotor (prm) subkloniert. In den so erstellten Klonierungsvektor pS$_C$, wurde anschließend die DNA-Sequenz von t-PA(K2P aus dem Vektor pA 27fd7) subkloniert und so der Expressionsvektor pS$_C$-K2P hergestellt.

Das Expressionsplasmid pS$_C$-K2P wurde in chemisch kompetente DH5α-Zellen transformiert. Aus den Zellen einer 5 ml-Tageskultur wurde die Plasmid-DNA extrahiert und durch Sequenzierung die Richtigkeit der gewünschten DNA-Sequenz bestätigt. Zur Vorbereitung der Expression wurde das gewünschte Plasmid in chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL-Zellen transformiert. Da das t-PA(K2P)-Gen Codons enthält, die *E. coli* nur selten verwendet, würde die Translation daher gebremst werden. Bei dem Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL handelt es sich um einen gentechnisch veränderten Stamm, welcher für einen erweiterten Codongebrauch zusätzliche tRNAs enthält. Somit kann das artfremde, humane Gen schnell und effizient translatiert werden, was die Proteinausbeute erhöht.

Klonierung von t-PA(K2P) in pS_N

Zunächst wurde das Strep-*Tag*-Insert mittels PCR amplifiziert und durch die Primer F_162_XbaI und R_162_BamHI um die Restriktionsschnittstellen der Endonukleasen *Xba*I und *Bam*HI erweitert. Das so erhaltene Insert und der Vektor pET-28a(+) wurden mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend ligiert. Weiterhin wurden die Primer F_K2P_BamHI_*N*-TST und R_K2P_HindIII_*N*-TST genutzt, um bei der PCR zur Amplifikation des t-PA(K2P)-Inserts, dieses mit den Restriktionsschnittstellen der Endonukleasen *Bam*HI und *Hind*III zu erweitern. Die Sequenzierung des PCR-Produktes zeigte jedoch, dass die gewünschte Restriktionsschnittstelle für das Enzym *Hind*III nicht vorhanden war. Eine Produktion des Expressionsvektors pS_N-K2P, welcher die DNA-Sequenz von t-PA(K2P) inklusive abspaltbaren doppelten Strep-*Tag* II enthält, konnte somit nicht erfolgen. Der neue Klonierungsvektor pS_N zur Subklonierung von Fusionsproteinen mit *N*-terminalem, doppeltem Strep-*Tag* II wurde jedoch erfolgreich hergestellt.

3.2.2 Expression und Reinigung von t-PA(P)-Varianten

E. coli BL21 (DE3)-, BL21 (DE3) Codon Plus RIL- und Rosetta (DE3) pLysS-Zellen, welche die Expressionsplasmide pET-tPA(P_C) oder pET-tPA(P_N) enthielten, wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5-0,6 wurde die Expression mit 0,1 mM oder 1 mM IPTG induziert. Nach der Expression bei 18 °C bzw. 37 °C für 18 h über Nacht wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet, aufgeschlossen und fraktioniert. Da t-PA(P) 12 Cysteine enthält, welche alle in Disulfidbrücken involviert sind (Abbildung 1.2), konnte mit keinem der drei genutzten *E. coli*-Stämme eine lösliche Expression von t-PA(P), wie von Lee *et al.* beschrieben, erzielt werden (Abbildung 3.10) [114]. Dabei war es nicht von Belang, welche Bedingungen (Expressionsstamm, Expressionstemperatur oder IPTG-Konzentration) eingesetzt wurden (Abbildung 3.10). Daher wurde folgend die Rückfaltung des Proteins aus Einschlusskörpern (*inclusion bodies*, IB) von *E. coli* durchgeführt.

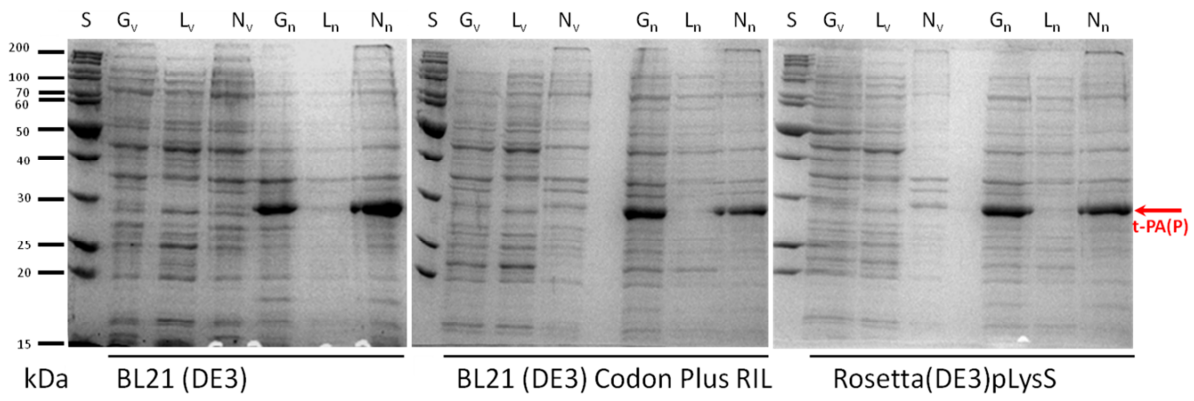

Abbildung 3.10: Expressionstest des t-PA(P)-Fusionsproteins.

SDS-PAGE verschiedener Proben einer Expression bei 18 °C der E. coli-Stämme BL21 (DE3), BL21 (DE3) Codon Plus RIL und Rosetta (DE3) pLysS, welche das Plasmid pET-tPA(P_N) enthielten. Es wurden je 5 µl Gesamtlysat (G), lösliche Fraktion (L) und nichtlösliche Fraktion (N) sowohl vor (v), als auch nach (n) der Induktion mit 0,1 mM IPTG aufgetragen. Zum Vergleich wurden je 5 µl Proteinstandard (S, PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) mitgeführt.

Weiterführend wurde die Expression ausschließlich mit dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3) bei 37 °C und einer Induktionskonzentration von 0,1 mM IPTG genutzt, um t-PA(P) aus den entstandenen Einschlusskörpern zu solubilisieren und durch Rückfaltung in seine aktive Form zu überführen. Nach der Expression wurden die Zellen geerntet und wie in 2.3.2 beschrieben präpariert, um die Einschlusskörper zu isolieren und zu solubilisieren.

Das in der dialysierten IB-Lösung enthaltene, denaturierte t-PA(P) wurde vor der Rückfaltung gereinigt. Zur Reinigung wurde eine immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) gewählt. Das Fusionsprotein sollte mittels seines Hexahistidin-Tags an die Säulenmatrix binden, so dass andere Proteine und sonstige Verunreinigungen abgetrennt werden können. Hierfür wurde die Proteinlösung auf eine mit Ni^{2+} beladene HisTrap FF-Säule (5 ml) geladen und mit Ladepuffer, welcher 20 mM Imidazol enthielt, gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder nahezu Null war. Danach wurden die Proteine mit einem linearen Gradient (von 20 mM bis 500 mM Imidazol) über 20 Säulenvolumina eluiert und das Eluat in 1 ml-Fraktionen getrennt (Abbildung 3.11).

Die verschiedenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt bzw. auf die Reinheit des Zielproteins überprüft. Diese Reinigungsstrategie erwies sich jedoch als ungenügend (Abbildung 3.11). Zum einen waren noch Verunreinigungen enthalten, welche durch eine leichte Erhöhung der Imidazolkonzentration im Ladepuffer bzw. mit einem zusätzlichen Waschschritt verringert werden könnten. Zum anderen eluierte das Zielprotein bei einer Imidazolkonzentration von ca. 100-300 mM, über einen relativ großen Volumenbereich, was zu einer starken Verdünnung der Probe führte. Aus diesen Gründen wurde die Reinigung von t-PA(P) weiter optimiert.

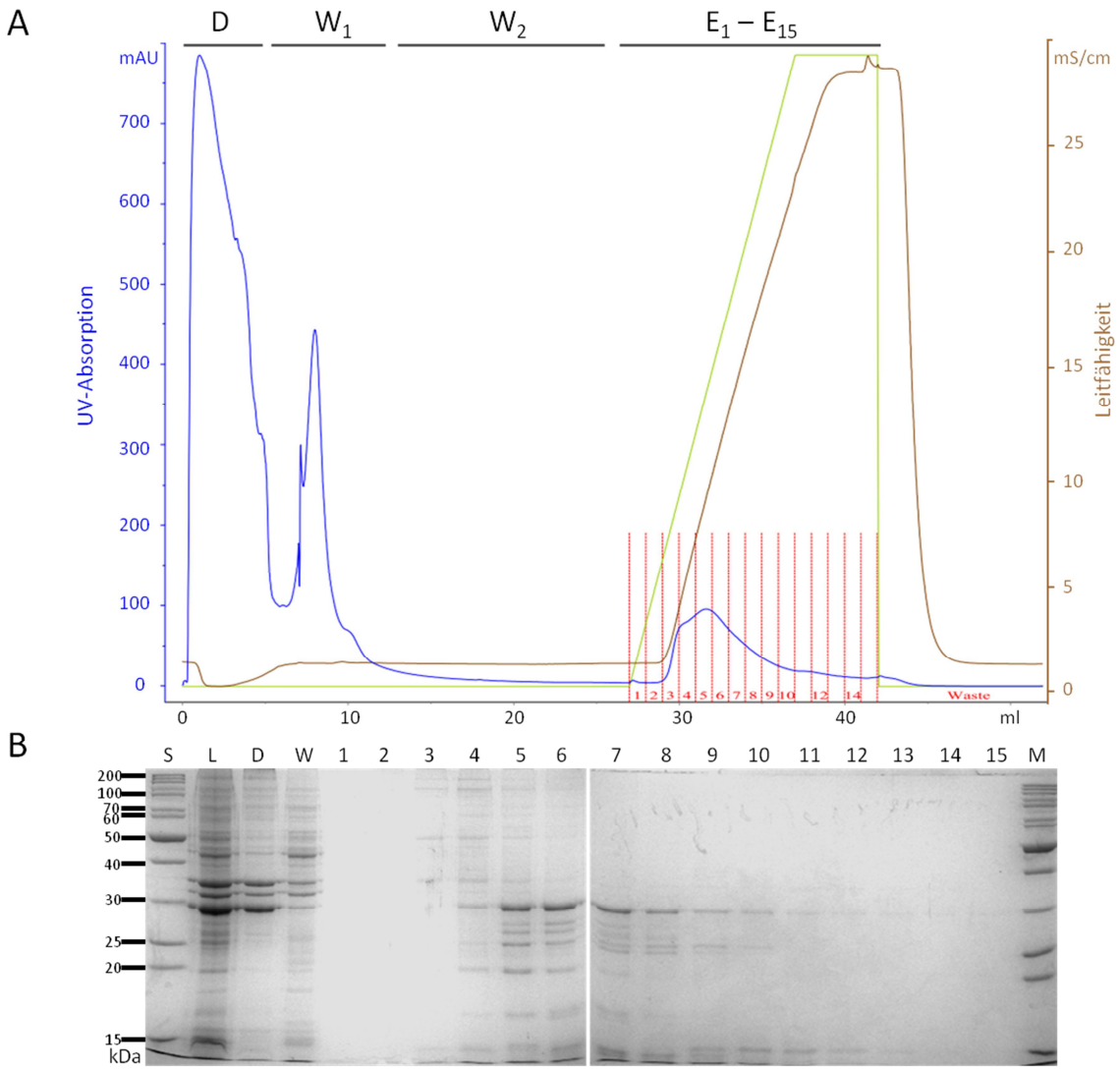

Abbildung 3.11: Reinigung des t-PA(P)-Fusionsproteins mit linearem Imidazolgradient.

*(**A**) Chromatogramm der Reinigung von t-PA(P): Absorption bei 280 nm (blau), relativer Anteil des Elutionspuffers (grün), Leitfähigkeit (braun), Elutionsfraktionen (rot). (**B**) SDS-PAGE-Analyse der verschiedenen Fraktionen: Proteinstandard (S), Ladefraktion (L), Durchlauf (D), Waschfraktionen 1 und 2 (W), Elutionsfraktionen 1-15 (E).*

Als effiziente Elutionsmethode erwies sich ein Imidazolstufengradient. Das an die HisTrap FF-Säule gebundene Protein wurde zunächst mit 6,5 % IMAC-Puffer B (entsprechend einer Imidazolkonzentration von ca. 50 mM in der Waschlösung) über 50 Säulenvolumina gewaschen und anschließend mit 100 % IMAC-Puffer B (entsprechend einer Imidazolkonzentration von 500 mM) über 4 Säulenvolumina eluiert. Es wurden zwei Fraktionen zu je 5 ml, welche den Elutionspeak umfassten, separat gesammelt. Wie die Untersuchung der Fraktionen im Hinblick auf die Reinheit des Zielproteins mittels SDS-PAGE zeigt, konnte auf diese Weise t-PA(P) ohne signifikante Verdünnung effektiv gereinigt werden (Abbildung 3.12).

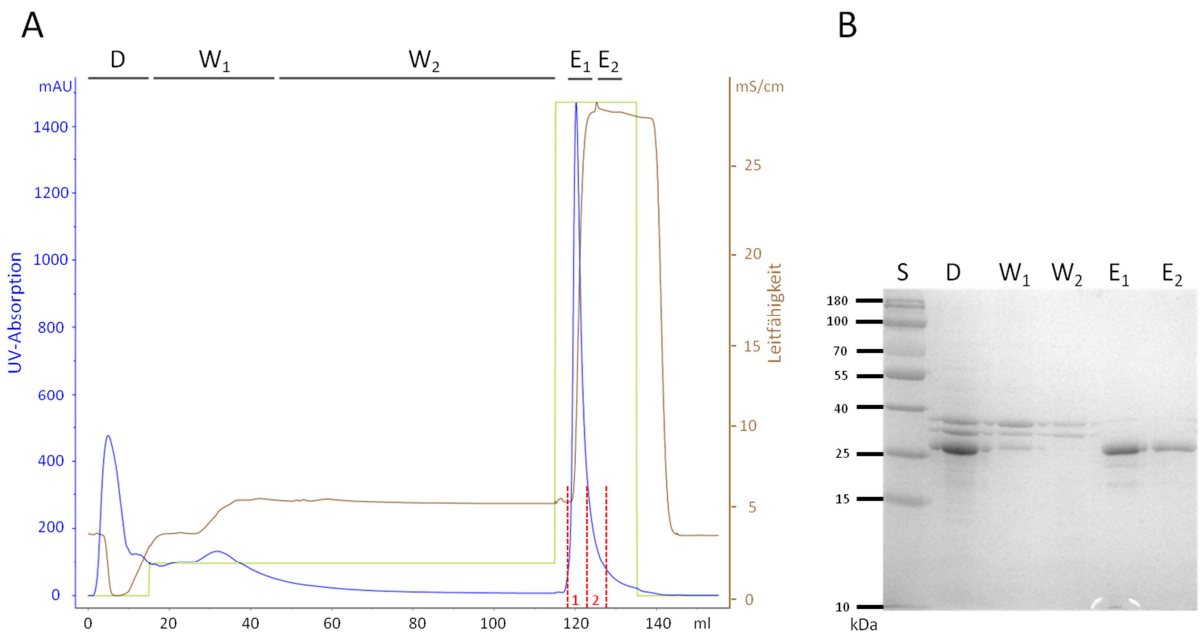

Abbildung 3.12: Reinigung des t-PA(P)-Fusionsproteins mit Imidazolstufengradient.
*(**A**) Chromatogramm der Reinigung von t-PA(P): Absorption bei 280 nm (blau), relativer Anteil des Elutionspuffers (grün), Leitfähigkeit (braun), Elutionsfraktionen (rot). (**B**) SDS-PAGE-Analyse der verschiedenen Fraktionen: Proteinstandard (S), Durchlauf (D), Waschfraktionen 1 und 2 (W), Elutionsfraktionen 1 und 2 (E).*

Die Charakterisierung der in den Gelbanden enthaltenen Proteine wurde mittels enzymatischer Proteolyse im Gel und Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS durchgeführt. Für beide Fusionsproteine mit *C*- bzw. *N*-terminalem His-*Tag*, t-PA(P_C) und t-PA(P_N), konnte die gewünschte Aminosäuresequenz (Abbildung 3.13) bestätigt werden.

t-PA(P_C) – Sequenzabdeckung: 70,29 %

```
1   MGSTCGLRQY SQPQFRIKGG LFADIASHPW QAAIFAKHRR SPGERFLCGG ILISSCWILS AAHCFQERFP
71  PHHLTVILGR TYRVVPGEEE QKFEVEKYIV HKEFDDDTYD NDIALLQLKS DSSRCAQESS VVRTVCLPPA
141 DLQLPDWTEC ELSGYGKHEA LSPFYSERLK EAHVRLYPSS RCTSQHLLNR TVTDNMLCAG DTRSGGPQAN
211 LHDACQGDSG GPLVCLNDGR MTLVGIISWG LGCGQKDVPG VYTKVTNYLD WIRDNMRPLE HHHHHH
```

t-PA(P_N) – Sequenzabdeckung: 96,17 %

```
1   MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MSTCGLRQYS QPQFRIKGGL FADIASHPWQ AAIFAKHRRS PGERFLCGGI
71  LISSCWILSA AHCFQERFPP HHLTVILGRT YRVVPGEEEQ KFEVEKYIVH KEFDDDTYDN DIALLQLKSD
141 SSRCAQESSV VRTVCLPPAD LQLPDWTECE LSGYGKHEAL SPFYSERLKE AHVRLYPSSR CTSQHLLNRT
211 VTDNMLCAGD TRSGGPQANL HDACQGDSGG PLVCLNDGRM TLVGIISWGL GCGQKDVPGV YTKVTNYLDW
281 IRDNMRP
```

Abbildung 3.13: Aminosäuresequenzen der t-PA(P)-Fusionsproteine.
Aminosäuresequenz des t-PA(P_C)-Fusionsproteins (oben) und des t-PA(P_N)-Fusionsproteins (unten). Start und Verbindungsregionen sind in orange, die Thrombinschnittstelle in grün und Hexahistidintag in blau dargestellt. Die Sequenzbereiche, die massenspektrometrisch bestätigt wurden, sind rot unterstrichen.

Das gereinigte, denaturierte Protein wurde anschließend dialysiert, gepulst in den Rückfaltungspuffer getropft und für 48 h bei 4 °C inkubiert. Bei der erhaltenen Proteinlösung sollte noch ein Pufferaustausch erfolgen, um Verunreinigungen für weiterführende Untersuchungen mittels chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie zu entfernen. Der verwendete Rückfaltungspuffer enthält Amingruppen (Tris-Puffer), welche mit dem aminreaktiven Quervernetzungsreagenz BS^2G reagieren und damit die gewünschte Quervernetzung zwischen den Proteinen verhindern würde. Für den Pufferaustausch wurden verschiedene Optionen überprüft (FPLC mittels HiTrap desalt-Säule, Zentrifugation mit Amicon ultra 15- oder Vivaspin 20-Filtern), von denen sich die chromatographische Variante mit Entsalzungssäule als am besten geeignet herausstellte. Um die korrekte Faltung des Proteins zu überprüfen, wurde ein Aktivitätstest (Tissue type Plasminogen Activator Human Chromogenic Activity Assay Kit) durchgeführt. Das Testprinzip beruht darauf, dass t-PA spezifisch inaktives Plasminogen in die aktive Protease Plasmin umwandelt, welches ein chromogenes Substrat spaltet und para-Nitroanilin (pNA) freisetzt. Dieses kann durch Messung der Absorption bei 405 nm detektiert werden [108]. Im Vergleich zum Volllängenprotein (WHO-Standard) zeigte t-PA(P_C) nur knapp 20 %, t-PA(P_N) nur 18 % Aktivität. Die vergleichsweise geringen Aktivitäten der exprimierten t-PA(P)-Varianten lassen darauf schließen, dass die Rückfaltung des Proteins vermutlich nicht vollständig

stattgefunden hat und die Proteine nicht oder zumindest nicht ausschließlich in ihre native Form überführt wurden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die isolierte Proteasedomäne von t-PA keine volle Aktivität aufweist. Daher wurde zusätzlich eine Variante des t-PA (t-PA(K2P)), bestehend aus der Kringel 2- und der Proteasedomäne (als aktives Therapeutikum bekannt als Reteplase, Abbildung 1.4), kloniert und exprimiert (Kapitel 3.2.1.2 und 3.2.3).

3.2.3 Expression und Reinigung von t-PA(K2P)

Mit dem Plasmid pS_C-K2P transformierte *E.coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL-Zellen wurden bei 37 °C in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 5,0–0,6 kultiviert und mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 37 °C für 18 h über Nacht. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und die Zellpellets analog den t-PA(P)-Varianten gemäß Einschlusskörperpräparation nach Rudolph *et al.* bearbeitet und das Zielprotein rückgefaltet [106] (Kapitel 2.3.3). Lediglich der Reinigungsschritt erfolgte im Gegensatz zu t-PA(P) nach der Rückfaltung (Abbildung 3.14).

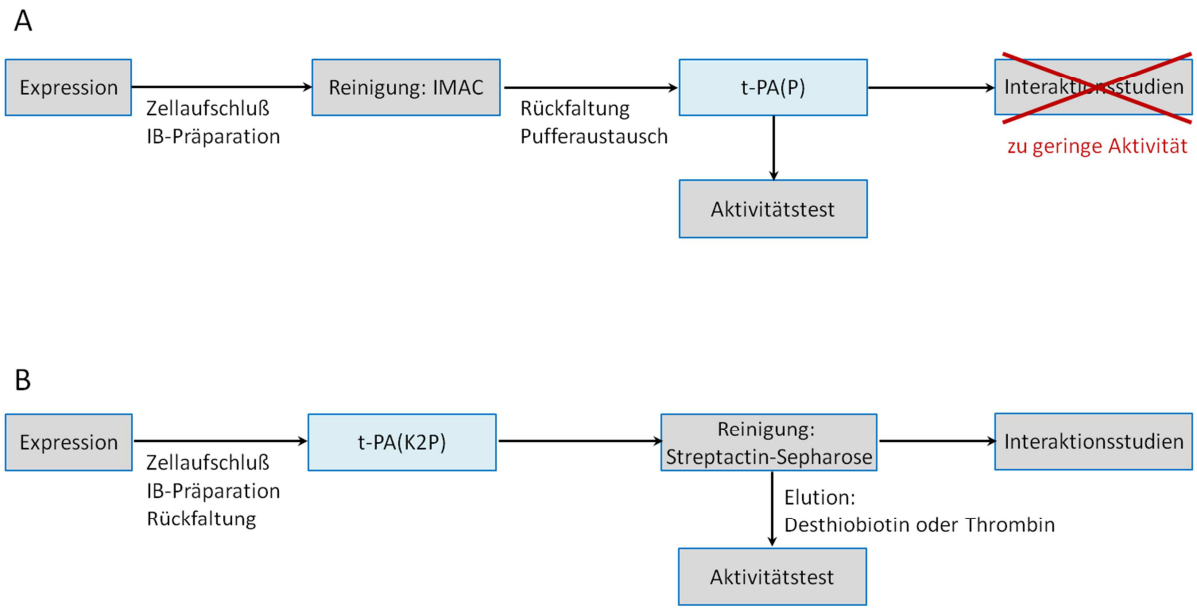

Abbildung 3.14: Übersicht zur Aufarbeitung von t-PA.

(A) Gewinnung der t-PA(P)-Fusionsproteine, der Reinigungsschritt erfolgte vor der Rückfaltung. (B) Gewinnung des t-PA(K2P)-Fusionsproteins, die Reinigung erfolgte nach der Rückfaltung.

Das t-PA(K2P)-Fusionsprotein enthält *C*-terminal einen doppelten Strep-*Tag* II, welcher durch das zur Elution benötigte Desthiobiotin blockiert würde. Somit wäre eine für die *Pulldown*-Strategie benötigte erneute Affinitätsanreicherung nicht mehr möglich gewesen. Daher wurde das Fusionsprotein nach der Rückfaltung im sogenannten *Batch*-Verfahren gereinigt und die gewünschte Aminosäuresequenz massenspektrometrisch bestätigt (Abbildung 3.15).

t-PA(K2P) – Sequenzabdeckung 94,36 %

```
1   MGNSDCYFGN GSAYRGTHSL TESGASCLPW NSMILIGKVY TAQNPSAQAL GLGKHNYCRN PDGDAKPWCH
71  VLKNRRLTWE YCDVPSCSTC GLRQYSQPQF RIKGGLFADI ASHPWQAAIF AKHRRSPGER FLCGGILISS
141 CWILSAAHCF QERFPPHHLT VILGRTYRVV PGEEEQKFEV EKYIVHKEFD DDTYDNDIAL LQLKSDSSRC
211 AQESSVVRTV CLPPADLQLP DWTECELSGY GKHEALSPFY SERLKEAHVR LYPSSRCTSQ HLLNRTVTDN
281 MLCAGDTRSG GPQANLHDAC QGDSGGPLVC LNDGRMTLVG IISWGLGCGQ KDVPGVYTKV TNYLDWIRDN
351 MRPGSLVPRG SAWSHPQFEK GGGSGGGSGG GSWSHPQFEK
```

Abbildung 3.15: Aminosäuresequenz des t-PA(K2P)-Fusionsproteins

Verbindungsregionen sind in orange, die Thrombinschnittstelle in grün und der Streptag II in blau dargestellt. Die Aminosäuren 2-5 entsprechen den natürlich vorkommenden Aminosäuren der Verbindungsregion zwischen Kringel 1- und Kringel 2-Domänen von t-PA. Die Sequenzbereiche, die massenspektrometrisch bestätigt wurden, sind rot unterstrichen.

Beim *Batch*-Verfahren wurden zunächst 30 µg rückgefaltetes t-PA(K2P)-Fusionsprotein auf eine sich in Zentrifugeneinheiten befindliche Streptactin-Sepharose-Matrix geladen, inkubiert, gewaschen und mit Desthiobiotin eluiert (Kapitel 2.3.4.2). Die Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE dokumentiert (Abbildung 3.16). Für die Elutionsfraktion, welche das gereinigte Protein enthielt, wurden eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford und ein Aktivitätstest analog t-PA(P) durchgeführt.

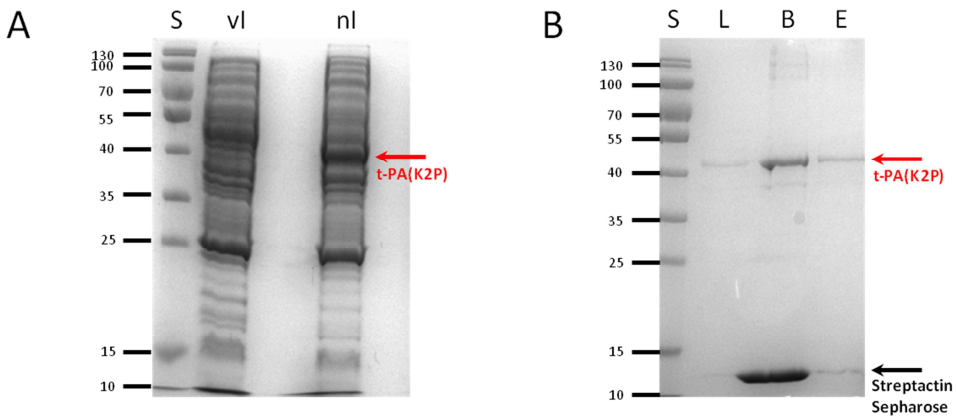

Abbildung 3.16: Expression und Reinigung des t-PA(K2P)-Fusionsproteins.
*(**A**) SDS-PAGE-Analyse des E. coli-Gesamtlysats vor (vI) und nach (nI) der Induktion mit 0,1 mM IPTG. (**B**) SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsschritte von t-PA(K2P) mittels Streptactin-Sepharose. Proteinstandard (S), Ladefraktion (L), t-PA(K2P) gebunden an Streptactin-Sepharose-Material (B) und Elutionsfraktion (E).*

Für das t-PA(K2P)-Fusionsprotein konnte eine Aktivität von 78–86 % im Vergleich zum Volllängenprotein (WHO-Standard) nachgewiesen werden (Abbildung 3.17). Die Diskrepanz der Aktivität im Vergleich zum Volllängenprotein lässt sich mit einer nicht vollständigen Rückfaltung des Proteins, dem möglichen Einfluss der fehlenden Domänen (Fingerdomäne, EGF-ähnliche Domäne und Kringel 1-Domäne) auf die Aktivität sowie durch Messungenauigkeiten begründen. Mit dem erfolgreich exprimierten, aktiven Protein wurden weiterführende Untersuchungen bezüglich potentieller t-PA-Interaktionspartner im NSCLC-Sekretom mittels chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie in *Pulldown*-Experimenten durchgeführt.

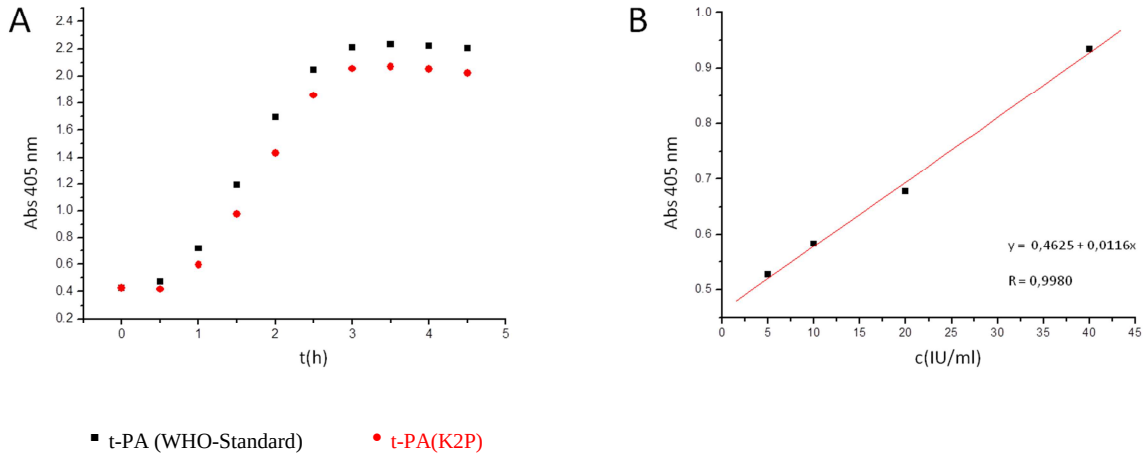

Abbildung 3.17: Aktivitätsbestimmung des t-PA(K2P)-Fusionsproteins.

*(**A**) Zeitverlauf zur Bestimmung der t-PA-Aktivität des rekombinant hergestellten t-PA(K2P)-Fusionsproteins (rot) im Vergleich zum Volllängenprotein (WHO-Standard, schwarz) bei einer Konzentration von 0,04 µg/µl (entsprechend 20 IU/ml). (**B**) Regressionsgerade, ermittelt aus den Messwerten verschiedener t-PA-Konzentrationen (0-40 IU/ml) nach einer Stunde Reaktionszeit bei 37 °C.*

3.3 Identifizierung von t-PA-Interaktionspartnern im NSCLC-Sekretom

3.3.1 Proteinidentifizierung mittels Quervernetzung und MS

Bei t-PA handelt es sich um einen etablierten Biomarker für Brustkrebs, welcher auch im Zusammenhang mit bestimmten Aspekten der Karzinogenese diskutiert wird. Allerdings ist t-PA diesbezüglich längst nicht so gut charakterisiert, wie z. B. sein Urokinase-spezifisches Analogon u-PA (Kapitel 4). Daher sollte t-PA in weiterführenden Experimenten genauer charakterisiert werden [57]. T-PA wies bei den in dieser Arbeit durchgeführten SILAC-Experimenten die deutlichste differentielle Regulation zwischen PC9- und PC9ER-Zellen mit einer Hochregulation um den Faktor 10 in PC9ER-Zellen auf. Im Speziellen sollten Bindungspartnerstudien mit den PC9- bzw. PC9ER-Sekretomen und der aktiven t-PA(K2P)-Variante durchgeführt werden, welche erfolgreich kloniert und in *E. coli* exprimiert wurde (Kapitel 3.2.1.2 und 3.2.3). So sollten Signaltransduktionswege des t-PA und dessen Rolle in der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika, wie den Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Erlotinib, aufgeklärt werden.

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von t-PA wurde eine *Pulldown*-Strategie mit Affinitätsanreicherung und chemischer Quervernetzung gewählt. Zunächst wurde das t-PA(K2P)-Fusionsprotein wie unter 2.5.1 beschrieben an eine Streptactin-Sepharose-Matrix gebunden und gewaschen. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit konzentrierten Zellüberständen der PC9- bzw. der PC9ER-Zellen inkubiert und mit dem aminreaktiven Quervernetzungsreagenz BS^2G versetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden bei 4 °C wurde die Reaktion mit Ammoniumbicarbonatlösung abgestoppt, bevor das Protein mit Thrombin eluiert, in-Lösung proteolytisch gespalten und die Peptidmischung mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie analysiert wurde. Zum Vergleich wurden die Experimente ohne chemische Quervernetzung sowie ohne t-PA und chemische Quervernetzung durchgeführt. Diese Kontrollexperimente dienten dazu, unspezifische Bindungen an die Matrix zu identifizieren und damit „falsch positive“ Ergebnisse zu eliminieren. Eine Übersicht der Versuchsdurchführung ist in Abbildung 3.18 gegeben. Die Interaktionsstudien des t-PA-Fusionsproteins wurden mit Sekretomen der PC9-Zellen und PC9ER-Zellen in je drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten durchgeführt.

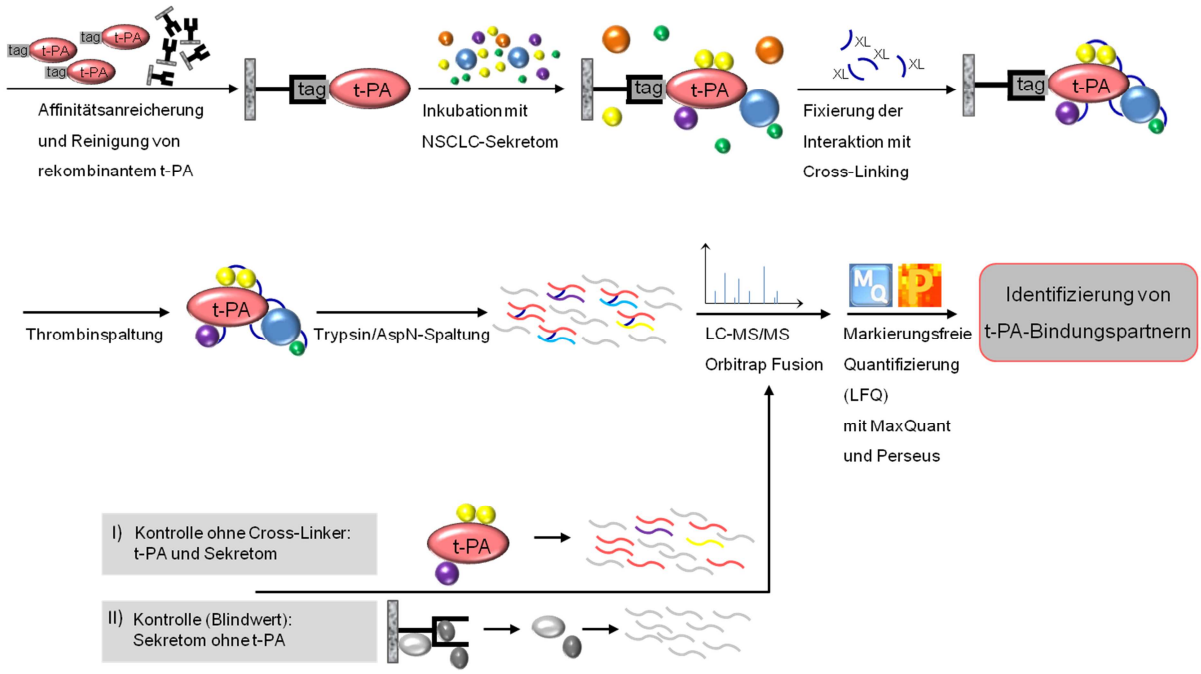

Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der chemischen Quervernetzungsexperimente.
Nach Expression in E. coli und anschließender Proteinextraktion wurde t-PA mittels Affinitätsanreicherung von Verunreinigungen befreit. Anschließend wurde t-PA mit verschiedenen NSCLC-Sekretomen inkubiert und mit chemischer Quervernetzung und anschließender Nano-HPLC/Nano-ESI- Orbitrap-Massenspektrometrie bezüglich möglicher Bindungspartner analysiert. Als Kontrolle dienten Reaktionen, welche analog durchgeführt wurden, aber I) kein Quervernetzungsreagenz oder II) weder t-PA noch Quervernetzungsreagenz enthielten. Um mögliche Bindungspartner zu identifizieren, wurden die massenspektrometrischen Daten der Proben und der Kontrollen gleichzeitig mit der MaxQuant Software prozessiert und anschließend mittels der Perseus Software statistisch evaluiert.

Diese Strategie sollte es ermöglichen, t-PA(K2P) im Komplex mit seinen durch chemische Quervernetzung fixierten Interaktionspartnern anzureichern. Um die einzelnen Schritte der Experimente nachzuvollziehen, wurden während des Versuchsverlaufs Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.19 (PC9ER-Zellen) und A.1 (PC9-Zellen)).

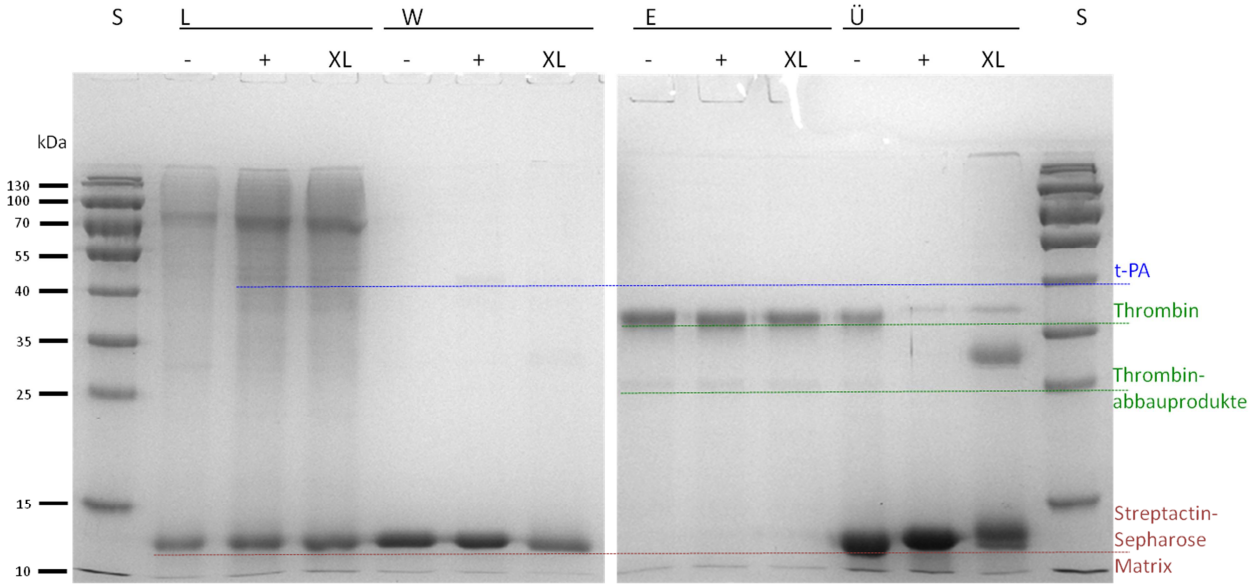

Abbildung 3.19: T-PA(K2P)-PC9ER-Crosslinking-Experiment — SDS-PAGE-Analyse.
Während des Experiments (vgl. Abbildung 3.18) wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Zum Vergleich wurde Proteinstandard (S) aufgetragen. Ladefraktionen (L), Waschfraktionen (W), Elutionsfraktionen (E) und verbleibende Überstände nach Thrombinspaltung (Ü) wurden aufgetragen. Alle drei Ansätze des Experiments (Kontrolle ohne t-PA(K2P) und Quervernetzungsreagenz (-), Kontrolle mit t-PA, aber ohne Quervernetzungsreagenz (+) und Probe mit t-PA(K2P) und mit Quervernetzungsreagenz (XL)) sind einander gegenübergestellt.

Die SDS-PAGE-Analysen, hier exemplarisch für den PC9ER-Zellüberstand dargestellt (Abbildung 3.19), deuten auf keine Auffälligkeiten im Versuchsablauf hin. Die drei verschiedenen Ladefraktionen (L), entsprechen den Proben, welche mit NSCLC-Sekretom versetzt wurden. Nachdem t-PA (gilt nicht für die Matrixkontrolle) an die Streptactin-Sepharose-Matrix gebunden und gewaschen wurde, zeigen die Proben ein vergleichbares Bild. Die Waschfraktionen (W) weisen jedoch zu erwartende Unterschiede auf. So ist in der Waschfraktion der Matrixkontolle (-) lediglich das Streptactin-Sepharose-Material im Bereich von 12 kDa sichtbar, während in der gleichen Fraktion der Kontrolle ohne Quervernetzungsreagenz (+) zusätzlich eine schwache Proteinbande im Bereich zwischen 40 und 50 kDa zu sehen ist. Bei dieser Bande handelt es sich um das Zielprotein t-PA(K2P), das ein Molekularewicht von ca. 43 kDa aufweist. In der Waschfraktion der quervernetzten Probe (XL) ist die t-PA(K2P)-Bande nicht mehr zu erkennen, dafür sind jedoch diffuse Signale über die gesamte Spur verteilt, welche mit quervernetzten Komplexen von t-PA(K2P) mit Proteinen des NSCLC-Sekretoms erklärbar sind. Die Elutionsfraktionen der drei Ansätze

ergeben ein vergleichbares Bild. Es sind deutlich die Proteinbanden von Thrombin bei ca 38 kDa zu erkennen sowie eine schwache Bande bei ca. 25 kDa, welche vermutlich durch abgebautes Thrombin oder durch herstellungsbedingte Verunreinigungen des Thrombins zu erklären sind. Diese Proteine dienten bei der folgenden massenspektrometrischen Analyse als Hintergrundsignale für die markierungsfreie Quantifizierung (LFQ) mittels MaxQuant. Auch bei den Überständen ist das Streptactin-Sepharose-Material im Bereich von 12 kDa sichtbar. Bei der quervernetzten Probe traten analog zur Waschfraktion diffuse Signale auf, welche von der Signalverschiebung durch die chemische Quervernetzung des Zielproteins t-PA(K2P) mit Sekretomproteinen und der Matrix, also spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen, stammen. Vergleichbare Resultate wurden für alle Replikate sowohl mit PC9- als auch mit PC9ER-Zellüberständen gefunden.

Die Elutionsfraktionen wurden für die vergleichende Beurteilung in der Lösung proteolytisch gespalten und folgend, wie unter 2.5 beschrieben, massenspektrometrisch analysiert. Anschließend wurden die Daten prozessiert und statistisch evaluiert (Kapitel 2.5.4.). So konnten aus den Bindungspartnerstudien von t-PA(K2P) mit dem PC9-Zellsekretom 22 angereicherte Proteine in den Proben mit BS^2G und 7 in denen ohne BS^2G bestimmt werden (Tabelle 3.3, A.2 und A.3). Für die Studien mit dem PC9ER-Zellsekretom wurden 34 bzw. 6 angereicherte Proteine gefunden (Tabelle 3.4, A.4 und A.5). Als mögliche Interaktionspartner von t-PA wurden nur die angereicherten Proteine in Betracht gezogen, welche in allen biologischen und technischen Replikaten mit mindestens zwei einzigartigen Peptiden identifiziert wurden. Dieses zusätzliche Auswahlkriterium reduzierte die Anzahl der möglichen t-PA-Bindungspartner auf 14, von denen vier ausschließlich in Experimenten mit PC9-Zellen und zwei ausschließlich in denen mit PC9ER-Zellen identifiziert wurden. Insgesamt acht Proteine konnten sowohl in Studien mit PC9-Zellen als auch mit PC9ER-Zellen als mögliche Interaktionspartner von t-PA verifiziert werden.

Tabelle 3.3: Angereicherte Proteine – PC9-Zellen.

Auflistung der Proteine und ihrer durchschnittlichen Anzahl einzigartiger Peptide, welche im Vergleich zur Matrixkontrolle (-) in den Quervernetzungsexperimenten (XL) des t-PA(K2P)-Fusionsproteins mit PC9-Zellüberständen als angereichert identifiziert wurden. Zum Vergleich wurde auch die in den t-PA-Proben ohne Quervernetzungsreagenz (+) gefundene, durchschnittliche Anzahl einzigartiger Peptide mit angegeben. Fettgedruckte Proteine wurden in den relevanten Proben aller Replikate (drei biologische und je zwei technische Replikate) mit mindestens zwei einzigartigen Peptiden identifiziert und gelten als potentielle Bindungspartner von t-PA. Die grau hinterlegten Einträge wurden sowohl in den Experimenten mit PC9-Zellüberständen als auch in den mit PC9ER-Zellüberständen als Bindungspartner identifiziert. Die vollständigen Auflistung der einzigartigen Peptide aller Replikate befinden sich im Anhang (Tabelle A.2)

Genname	Proteinname	-	+	XL
ABHD14B	Alpha/beta-Hydrolasedomäneenthaltendes Protein 14B	1	1	1
ACTN4	**Alpha-Aktinin-4**	**5**	**6**	**18**
C3	**Komplement C3**	**3**	**4**	**7**
CALU	Calumenin	0	1	2
CDCP1	CUB-Domäneenthaltendes Protein 1	0	1	1
CFD	**Komplementfaktor D**	**3**	**4**	**8**
CPPED1	Serin/Threonin-Proteinphosphatase CPPED1	1	1	1
FBLN1	**Fibulin-1**	**2**	**3**	**4**
FUCA2	Plasma alpha-L-Fukosidase	0	0	1
ISG15	Ubiquitinartiges Protein ISG15	1	1	1
LAMB3	**Laminin-332**	**1**	**2**	**6**
LGALS3BP	Galectin-3-bindendes Protein	2	2	3
OLFML3	**Olfaktomedinartiges Protein 3**	**8**	**8**	**15**
PAFAH1B3	Plättchenaktivierender-Faktor Acetylhydrolase IB Untereinheit gamma	0	1	2
PLAT	**Plättchenstämmiger-Plasminogenaktivator (t-PA)**	**1**	**35**	**25**
QSOX1	**Quiescin-Sulfhydryloxidase 1**	**22**	**27**	**33**
RCN1	ABC-Transporter G Familienmitglied-5	1	1	2
SRSF1	**Serin-/Argininreicher Splicingfaktor 1**	**2**	**2**	**6**
STC2	**Stanniocalcin-2**	**7**	**8**	**9**
TINAGL1	**Tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1**	**11**	**11**	**19**
TMEM132A	**Transmembranprotein 132A**	**1**	**4**	**5**
YBX3	**Y-Box-Bindeprotein 3**	**3**	**4**	**5**

Wie erwartet, ist bei den in Tabelle 3.3 aufgeführten Proteinen, welche in Experimenten mit dem PC9-Zellsekretom angereicherten Proteine darstellen, auch das Zielprotein t-PA zu finden. T-PA wurde mit 35 bzw. 25 einzigartigen Peptiden in allen relevanten Proben ((+) und (XL)) sicher identifiziert.

Bei den acht sowohl für PC9- als auch PC9ER-Zellen angereicherten Proteinen (grau unterlegt in Tabelle 3.3 undTabelle 3.4), welche als potentielle t-PA-Interaktionspartner identifiziert wurden, handelt es sich um Alpha-Aktinin-4 (ACTN4), Komplement C3 (C3), Komplementfaktor D (CFD), Fibulin-1 (FBLN1), Laminin-332 (LAMB3), Quiescin-Sulfhydryloxidase 1 (QSOX1), Stanniocalcin-2, tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1 (TINAGL1) und Y-Box-Bindeprotein 3 (YBX3). Für alle acht Proteine wurde ein Zusammenhang mit einigen Krebsarten oder Chemoresistenzentwicklung gegen übliche Therapeutika berichtet, was in Kapitel 4.3 ausführlicher diskutiert wird.

In den *Pulldown*-Experimenten von t-PA(K2P) mit den PC9-Zellüberständen wurden auch vier Proteine angereichert, welche in den Experimenten mit PC9ER-Zellüberständen nicht angereichert wurden. Dabei handelt es sich um Komplement C3 (C3), das olfaktomedinartige Protein 3 (OLFML3), den Serin-/Argininreichen Splicingfaktor 1 (SRSF1) und das Transmembranprotein 132A (TEMEM132A). Die drei erstgenannten Proteine wurden bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Tumorarten studiert. Für das wenig charakterisierte Protein TEMEM132A wurden bislang keine Zusammenhänge in Bezug auf Krebsentstehung, Entwicklung oder Chemoresistenz berichtet. Bei den weiteren acht in der Tabelle 3.3 aufgeführten Proteinen handelt es sich um Proteine, welche in den *Pulldown*-Experimenten zwar angereichert wurden, jedoch in den relevanten Proben nicht immer mit mindestens zwei einzigartigen Peptiden identifiziert wurden. Da deshalb diese Proteine nicht eindeutig als Interaktionspartner von t-PA verifiziert werden konnten, wurden sie nicht auf die Kandidatenliste der t-PA-Bindungspartner aufgenommen.

Analog zu PC9-Zellen sind in Tabelle 3.4 die angereicherten Proteine aus den chemischen Quervernetzungsexperimenten mit den PC9ER-Zellüberständen und t-PA aufgelistet. Auch hier wurde das Zielprotein t-PA(K2P) mit einer hohen Anzahl (31 bzw. 22) an einzigartigen Peptiden sicher identifiziert. Von den insgesamt 34 angereicherten Proteinen erfüllten 23 nicht das Kriterium, mit mindestens zwei einzigartigen Peptiden in allen Messungen identifiziert worden zu sein. Diese 23 Proteine wurden daher nicht als t-PA-Bindungspartner in Betracht gezogen.

Tabelle 3.4: Angereicherte Proteine – PC9ER-Zellen.

Auflistung der Proteine und ihrer durchschnittlichen Anzahl einzigartiger Peptide, welche im Vergleich zur Matrixkontrolle (-) in den Quervernetzungsexperimenten (XL) des t-PA(K2P)-Fusionsproteins mit PC9ER-Zellübeständen als angereichert identifiziert wurden. Zum Vergleich wurde auch die in den t-PA-Proben ohne Quervernetzungsreagenz (+) gefundene, durchschnittliche Anzahl einzigartiger Peptide mit angegeben. Fettgedruckte Proteine wurden in allen relevanten Proben mit mindestens zwei einzigartigen Peptiden identifiziert und gelten als potentielle Bindungspartner von t-PA. Grau hinterlegte Einträge wurden in den Experimenten mit PC9ER- und PC9-Zellüberständen als Bindungspartner identifiziert. Die vollständige Liste der Anzahl einzigartiger Peptide aller Replikate befindet sich im Anhang (Tabelle A.4)

Genname	Proteinname	-	+	XL
ACTN1	**Alpha-Aktinin-1**	**2**	**4**	**10**
ACTN4	**Alpha-Aktinin-4**	**5**	**6**	**24**
ANXA3	Annexin A3	**1**	**1**	**2**
ARG1	Arginase-1	**1**	**2**	**2**
AXIN1	Axin-1	**0**	**0**	**1**
CALR	Calretikulin	**0**	**1**	**2**
CASP14	Caspase-14	**0**	**0**	**1**
CAT	Katalase	**2**	**3**	**2**
CFD	**Komplementfaktor D**	**3**	**3**	**7**
CPPED1	Serin/Threonin-Proteinphosphatase CPPED1	**1**	**1**	**2**
EHD1	EH-Domäneenthaltendes Protein 1	**0**	**0**	**0**
FBLN1	**Fibulin-1**	**2**	**3**	**4**
FN1	Fibronektin	**1**	**2**	**2**
GPC1	Glypikan-1	**1**	**1**	**2**
GPI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase	**0**	**0**	**2**
JUP	Junction Plakoglobin	**1**	**0**	**0**
KRT2	Keratin, Typ II cytoskeletal 2 epidermal	**3**	**2**	**4**
LAMB3	**Laminin-332**	**1**	**2**	**4**
LYPD3	Ly6/PLAUR-Domäneenthaltendes Protein 3	**2**	**3**	**2**
LYPD6B	Ly6/PLAUR-Domäneenthaltendes Protein 6B	**1**	**1**	**1**
NUMA1	Nukleäres Mitotischer-Apparat-Protein 1	**1**	**1**	**1**
PAFAH1B3	Plättchenaktivierender-Faktor Acetylhydrolase IB Untereinheit gamma	**0**	**1**	**2**
PLAT	**Plättchenstämmiger-Plasminogenaktivator (t-PA)**	**3**	**31**	**22**
QSOX1	**Quiescin-Sulfhydryloxidase 1**	**21**	**24**	**27**
RTFDC1	Protein-RTF2-Homolog	**0**	**0**	**0**
S100A8	Protein S100-A8	**1**	**1**	**1**
SDC4	**Syndecan 4**	**8**	**8**	**17**
SOD1	Superoxiddismutase [Cu-Zn]	**0**	**1**	**3**
SPP1	Osteopontin	**4**	**3**	**3**
STC2	**Stanniocalcin-2**	**8**	**8**	**12**
TINAGL1	**Tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1**	**11**	**8**	**15**
VASN	Vasorin	**0**	**0**	**2**
VWA1	von-Willebrandfaktor-A-Domäneenthaltendes Protein 1	**2**	**3**	**3**
YBX3	**Y-Box-Bindeprotein 3**	**1**	**4**	**5**

Auch in den Experimenten mit PC9ER-Zellen wurden unterschiedliche Proteine als in Experimenten mit PC9-Zellen angereichert. Es handelt sich um Alpha-Aktinin-1 (ACTN1) und Syndecan 4 (SDC4), welche beide schon bezüglich ihrer Rolle bei einigen Tumorarten studiert wurden (Kapitel 4.3). Auch bei diesen beiden Proteinen stellt sich die Frage, ob ihre Interaktion mit t-PA für die Chemoresistenzentwicklung gegenüber Erlotinib von Bedeutung ist.

3.3.2 Auswertung der Ergebnisse

Zur Visualisierung wurden die Ergebnisse der *Pulldown*-Experimente in sogenannten *Volcano Plots* dargestellt. Hierfür wurden die aus dem mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % durchgeführten t-Test ermittelten p-Werte gegen die Testdifferenzen aufgetragen. Auf diese Weise konnten die in den verschiedenen Experimenten angereicherten Proteine verglichen werden. Es wurden *Volcano Plots* der Quervernetzungsproben im Vergleich zu Kontrollproben für die unterschiedlichen Zelllinien angefertigt (Abbildung 3.20). Wie in Tabelle 3.3Tabelle 3.4 gezeigt, untermauern diese Plots, dass das Zielprotein t-PA, wie erwartet, am stärksten angereichert wurde. T-PA zeigt im Vergleich zu den anderen Proteinen den mit Abstand größten p-Wert. In den *Volcano Plots* können auch „abgereicherte“ Proteine identifiziert werden. Als „abgereichert“ werden die Proteine betrachtet, die einen signifikanten p-Wert besitzen, aber eine negative t-Testdifferenz aufweisen. Wie in Abbildung 3.20 zu sehen, werden sowohl für die Kontrollen ohne BS^2G (+), als auch für die Proben mit BS^2G (XL) „abgereicherte“ Proteine angezeigt. Dies lässt sich damit begründen, dass bei den Quervernetzungsproben und den Positivkontollen im Vergleich zu den Matrixkontrollen unspezifische Bindungen weniger häufig anzufinden sind, da die Matrix bereits das Zielprotein t-PA(K2P) gebunden hat. Bei den Quervernetzungsproben werden im Verhältnis zu den Positivkontrollen relativ viele „abgereicherte“ Proteine gefunden, da durch das chemische Quervernetzungsreagenz auch Interaktionen zwischen Proteinen fixiert werden, in die t-PA nicht involviert ist. Somit werden mögliche Bindungsstellen für die Matrix blockiert oder unspezifische Bindungen durch die Proteinkomplexbildung unter sanften Waschbedingungen leichter entfernt. Möglicherweise lässt sich die Anzahl der „abgereicherten“ Proteine durch harschere Waschbedingungen bei den *Pulldown*-Experimenten deutlich reduzieren.

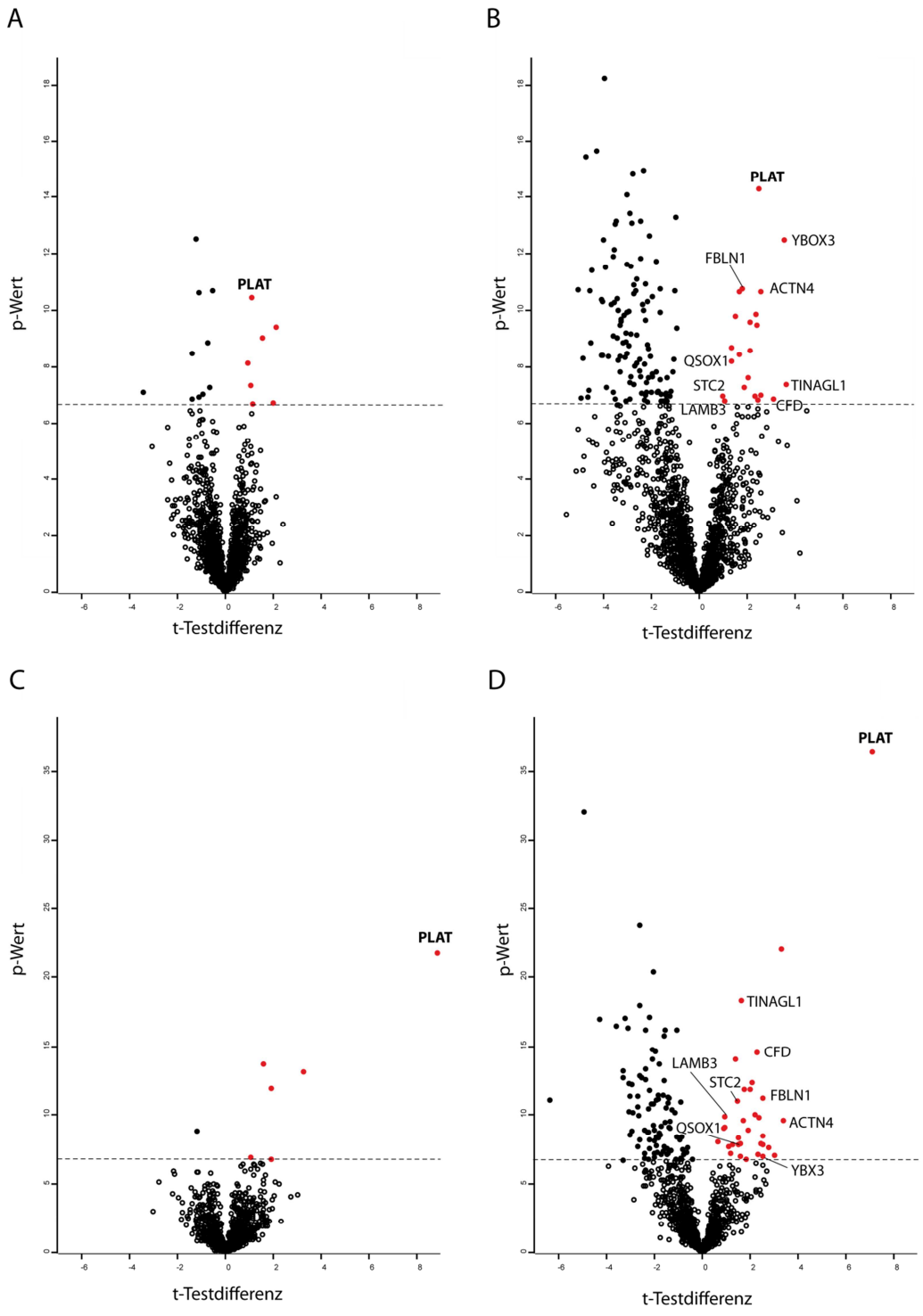

Abbildung 3.20: Volcano Plots der Crosslinking-Experimente.

*Darstellung der angereicherten Proteine (rot). Links: angereicherte Proteine mit t-PA(K2P) als Zielprotein, ohne Quervernetzungsreagenz. Rechts: angereicherte Proteine aus den Experimenten mit Quervernetzungsreagenz (bezogen auf die Matrixkontrolle). (**A**) und (**B**) stellen die Ergebnisse aus den Experimenten mit PC9-Zellüberständen, (**C**) und (**D**) die mit PC9ER-Zellüberständen dar. Die Proteine, welche alle unter 2.5.4 beschriebenen Kriterien erfüllen, wurden mit ihren Gennamen (z. B. PLAT für t-PA) gekennzeichnet. Die graue Linie markiert die Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %.*

Die *Pulldown*-Experimente wurden auch in Hinsicht auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und auf die prinzipielle Eignung für Bindungspartnerstudien analysiert. Hierfür wurden sogenannte *Venn*-Diagramme (Abbildung 3.21) erstellt, in denen die in den verschiedenen Proben identifizierten Proteine unter Berücksichtigung unterschiedlicher Gesichtspunkte miteinander verglichen wurden. In Abbildung 3.21 (A) wurden jeweils die identifizierten Proteine der drei unterschiedlichen Ansätze (Matrixkontrolle (-), Positivkontrolle (+), Quervernetzungsprobe (XL)) verglichen. Dabei wurden die Listen der Proteine, welche jeweils für alle Replikate identifiziert wurden, miteinander abgeglichen und auf gemeinsame Einträge durchsucht. Für die Ansätze mit PC9-Zellüberständen wurden insgesamt 1187 Proteine identifiziert, von denen 645 (~ 54 %) in allen drei Ansätzen gefunden wurden und nur 209 (~ 17,6 %) jeweils einem Ansatz. Für die PC9ER-Zellüberstände konnten insgesamt 952 Proteine, davon 620 (~ 65 %) übereinstimmend in allen drei Ansätzen und nur 118 (~ 12,4 %) spezifisch in den unterschiedlichen Ansätzen zugeordnet werden. Abbildung 3.21 (B) veranschaulicht die Reproduzierbarkeit der Matrixkontrollen. Es wurden jeweils die identifizierten Proteine der biologischen Replikate der Matrixkontrollen auf Gemeinsamkeiten überprüft. Es konnten insgesamt 1488 bzw. 1133 Proteine in den Ansätzen mit PC9- bzw. mit PC9ER-Zellen identifiziert werden. Von den identifizierten Proteinen wurden 965 (~ 64,9 %) in den Experimenten mit PC9-Zellen bzw. 845 (~ 74,6 %) bei den Experimenten mit PC9ER-Zellen übereinstimmend in allen drei biologischen Replikaten nachgewiesen werden. Nur 165 Proteine (~ 11,1 %) bzw. 128 (~ 11,3 %) wurden in einzelnen Replikaten gefunden, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der verwendeten Technik schließen lässt. In Abbildung 3.21 (C) wurden die Listen der angereicherten Proteine der verschiedenen Zelllinien miteinander verglichen. Bei den Positivkontrollen (+) findet sich unter den ohnehin nur wenigen angereicherten Proteinen lediglich eine Übereinstimmung, nämlich das Zielprotein t-PA. Bei den Quervernetzungsansätzen (XL) konnten von insgesamt 47 Proteinen neun, darunter auch t-PA, für beide Zelllinien identifiziert werden. Auch wenn der relative Anteil der übereinstimmenden Proteine zunächst gering wirkt, spiegelt dies ein gutes Ergebnis wider, wenn man die Detailinformationen betrachtet (Tabellen A.2-A.5) und die Anzahl der einzigartigen Peptide berücksichtigt. Dies bestätigt die Eignung der Affinitätsanreicherung kombiniert mit chemischer Quervernetzung und MS für die Suche nach Interaktionspartnern eines bekannten Proteins.

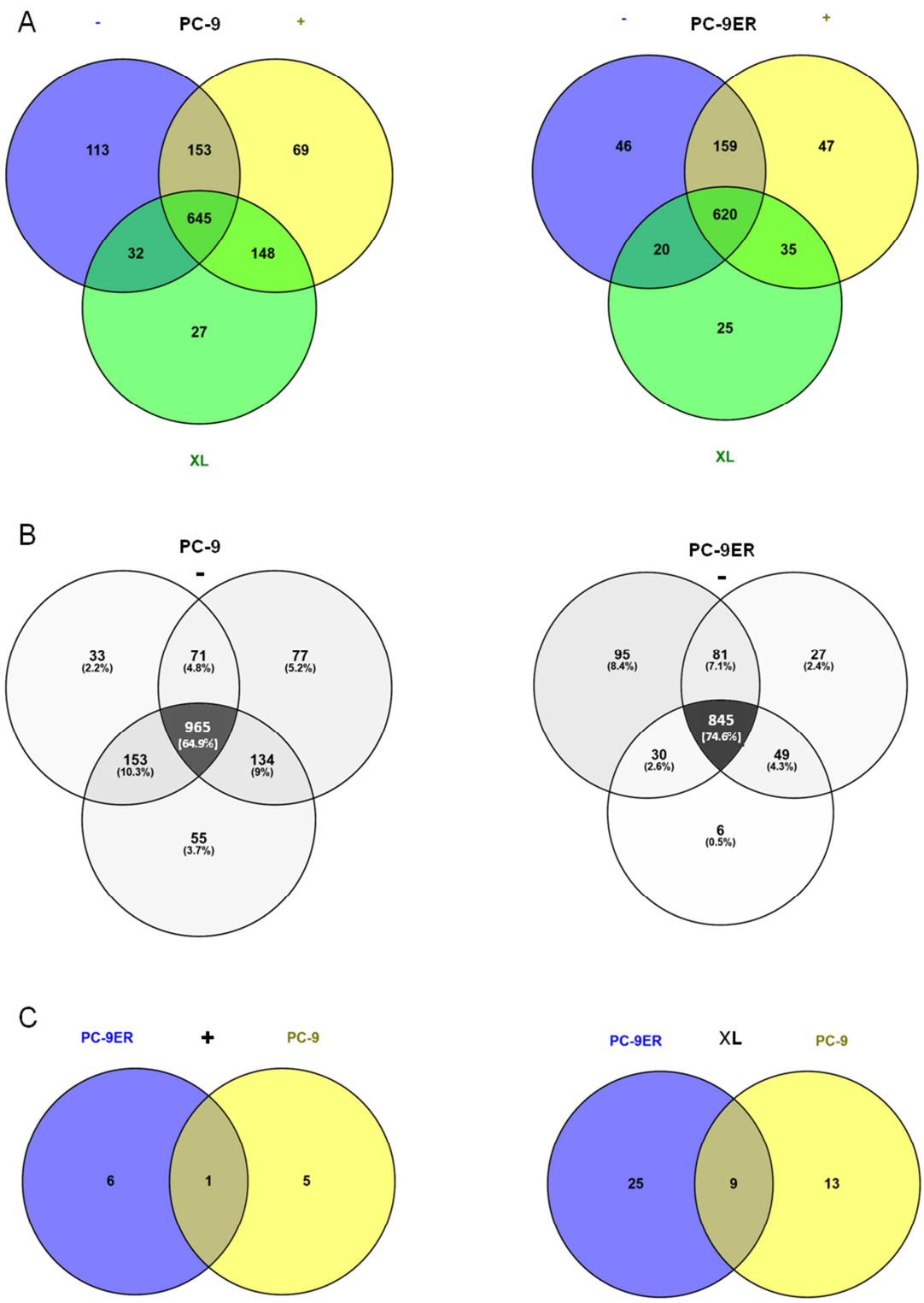

Abbildung 3.21: Venn-Diagramme der Pulldown-Experimente.

*(**A**) Venn-Diagramme der identifizierten Proteine der Matrixkontrolle (-), der Kontrolle ohne Quervernetzungsreagenz (+) und des Quervernetzungsansatzes (XL) für PC9-Zellen (links) und PC9ER-Zellen (rechts). (**B**) Venn-Diagramme der identifizierten Proteine der Matrixkontrollen für die drei biologischen Replikate der PC9-Zellen (links) und PC9ER-Zellen (rechts) zur Darstellung der Reproduzierbarkeit. (**C**) Venn-Diagramme der angereicherten Proteine von PC9- und PC9ER-Zellen für die Kontrollen ohne (links) und mit (rechts) Quervernetzungsreagenz.*

Zusammenfassend sind in Tabelle 3.5 alle 14 Proteine aufgelistet, welche in dieser Arbeit als potentielle Interaktionspartner von t-PA verifiziert wurden. Welche Rolle die einzelnen Proteine bzw. deren Wechselwirkung mit t-PA bei der Entstehung, Entwicklung und dem Wachstum verschiedener Krebsarten in NSCLC-Zellen sowie bei der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika, wie Erlotinib, spielen, soll im Kapitel 4.3 näher diskutiert werden.

Tabelle 3.5: Potentielle Interaktionspartner des t-PA.

Proteinname	Uniproteintrag	Genename	PC9	PC9ER
Alpha-Aktinin-4	O43707	ACTN4	x	x
Komplementfaktor D	P00746	CFD	x	x
Fibulin-1	P23142	FBLN1	x	x
Laminin-332	Q13751	LAMB3	x	x
Sulfhydryloxidase 1	O00391	QSOX1	x	x
Stanniocalcin-2	O76061	STC2	x	x
Tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1	Q9GZM7	TINAGL1	x	x
Y-Box-Bindeprotein 3	P16989	YBX3	x	x
Komplement C3	P01024	C3	x	
Olfaktomedinartiges Protein 3	Q9NRN5	OLFML3	x	
Serin-/Argininreicher Splicingfaktor 1	Q07955	SRSF1	x	
Transmembranprotein 132A	Q24JP5	TMEM132A	x	
Alpha-Aktinin-1	P12814	ACTN1		x
Syndecan 4	P31431	SDC4		x

3.3.3 Analyse von Quervernetzungsprodukten in t-PA/Protein-Komplexen

Die aus den *Pulldown*-Experimenten erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden prozessiert und in MGF-Dateien umgewandelt (Kapitel 2.5.5). Unter Nutzung des Programms StavroX wurden die experimentell bestimmten Massen mit einer Massenliste theoretisch möglicher Quervernetzungsprodukte abgeglichen. Die Übersichtsspektren und Fragmentionenspektren der potentiellen Quervernetzungsprodukte wurden anschließend manuell überprüft. Für keines der 14 Proteine, welche als potentielle t-PA-Bindungspartner identifiziert wurden (Tabelle 3.5), konnten allerdings spezifische Quervernetzungsprodukte mit t-PA gefunden werden. Dies könnte an der Komplexität der Proben liegen, wodurch die Spektren zu komplex werden und eine eindeutige Zuordnung der Fragmentionen nahezu unmöglich wird. Um die Interaktionesregionen zwischen t-PA und den seiner identifizierten potentiellen Bindungspartnern mittels chemischer Quervernetzung aufzuklären, empfiehlt sich nachfolgend die Durchführung von Quervernetzungsexperimenten mit gereinigten Proteinen.

4 DISKUSSION

4.1 Quantitative Sekretomanalyse mittels SILAC

Die SILAC-Methode ist ein möglicher Ansatz der massenspektrometriebasierten quantitativen Proteomik, welcher im Vergleich mit chemischen Markierungsmethoden oder markierungsfreien quantitativen Techniken der Proteomik die Vorteile von quantitativer Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aufweist [88]. Neuere Entwicklungen wie *spike-in* SILAC und Super-SILAC ermöglichten den Einzug der SILAC-Technologie in klinische Anwendungsgebiete zur quantitativen Untersuchung von Geweben und Körperflüssigkeiten [94, 95].

In dieser Arbeit wurde die SILAC-Technik genutzt, um die Sekretome zweier NSCLC-Zellinien (PC9, erlotinibsensitiv und PC9ER, erlotinibresistent) in Bezug auf Unterschiede in der Proteinregulation zu untersuchen. So sollten Informationen hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen dem Tumor und dem ihn umgebenden Gewebe erhalten werden. Da diese Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese und Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Therapiemethoden spielen, könnten neue Erkenntnisse, wie z. B. die Entdeckung neuer Resistenzmarker, Aufklärung der Mechanismen bei der Entstehung von Chemoresistenzen oder neue Therapieansätze, helfen, Veränderungen des Tumors frühzeitig zu erkennen, die individuelle Behandlung von NSCLC-Patienten zu optimieren und die bislang negativen Prognosen bei NSCLC zu verbessern.

Es wurden die zwei NSCLC-Zelllinien PC9 und PC9ER untersucht, welche sich lediglich hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Erlotinib unterscheiden. Da die beiden Zelllinien in Bezug auf Morphologie, Zellkultureigenschaften, Proliferation und Koloniebildung vergleichbar sind, wurden sie für die SILAC-Methode als geeignet betrachtet. Dabei konnte durch die genaue Bestimmung der Einbaurate von ^{13}C-markiertem Arginin und Lysin (Abbildung 3.2) sowie der Einhaltung bestimmter Zellkulturbedingungen eine nahezu vollständige Markierung der Proteine für beide Zelllinien sichergestellt werden.

Aufgrund der geringen Proteinkonzentration (ca. 0,16 mg/ml, Abbildung 3.3) in den Proben der Zellüberstände war es nötig, diese vor der weiteren Analyse zu konzentrieren. Durch die gezielte Optimierung der Methode zur Konzentrierung der Zellüberstände konnte ein Proteinverlust der Proben minimiert werden. Die Konzentrierung der Proben wurde nach Mischung der zu vergleichenden „schweren“ und „leichten“ Zellüberstände durchgeführt.

Daher kann man davon ausgehen, dass sich Fehler, welche möglicherweise im weiteren Verlauf der Experimente auftreten, gleichermaßen auf die „schweren“, als auch auf die „leichten“ Proteine auswirken.

Auch die Durchführung der Experimente in vier biologischen Replikaten reduzierte die Wahrscheinlichkeit von zufälligen und falsch-positiven Identifizierungen. Die Richtigkeit der Ergebnisse wurde durch die Analyse von Kontrollansätzen und je zwei technischen Replikaten pro Ansatz abgesichert (Tabelle 2.4 und Abbildung 3.5). Da in jedem biologischen Replikat beide Zelllinien sowohl „schwer“ als auch „leicht“ markiert und analysiert wurden, ergänzten sich die Ergebnisse durch ihre gegensätzliche Ausrichtung. Die Anwendung der SILAC-Technik nach optimierten und standardisierten Arbeitsprotokollen in vier biologischen Replikaten gewährleistete daher die Reproduzierbarkeit sowie die quantitative Genauigkeit der Analysen.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten erfolgreich 14 Proteine identifiziert werden, welche im Sekretom der PC9-Zellen im Vergleich zu dem der PC9ER-Zellen unterschiedlich reguliert sind (Tabelle 3.2). Mit Hilfe vorangegangener SILAC-Experimente in *E. coli* wurden rigorose Ausschlusskriterien ermittelt, um die Falschpositivrate bei der Identifizierung unterschiedlich regulierter Proteine zwischen den beiden Zelllinien zu minimieren. In Anbetracht dieser Kriterien, welche für die Zuordnung als „sicher differenziert reguliert“ zu erfüllen waren, sind falsch positive Ergebnisse nahezu auszuschließen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Protein, welches mit mindestens zwei einzigartigen Peptiden, einer *Decoy*-Analyse mit strikter Falschpositivrate von $p \leq 0{,}01$, mindestens zwei isotopenmarkierten Peptidpaaren, einer S/L-Variabilität von maximal 10 % und einem Regulationsunterschied von mindestens Faktor zwei, konstant in allen Replikaten vorgefunden wurde, aber ein falsch positives Ergebnis ist, konvergiert gegen Null. Die fünf als „sicher differenziert reguliert“ kategorisierten Proteine, gewebespezifischer Plasminogenaktivator (t-PA), urokinasespezifischer Plasminogenaktivator (u-PA), plättchenstämmiger Wachstumsfaktor D (PDGF-D), epidermaler Wachstums-faktorrezeptor (EGFR) und myeloidstämmiger Wachstumsfaktor (MYDGF), werden nachfolgend kurz vorgestellt und bezüglich ihrer Relevanz bei einigen Krebsarten diskutiert.

Der myeloidstämmige Wachstumsfaktor (MYDGF), auch C19orf10 genannt, ist ein bislang wenig charakterisiertes Protein. Es handelt sich um ein parakrin agierendes Protein, welches in knochenmarkstämmigen Monozyten produziert wird. Es fördert das Überleben herzmuskulärer Myozyten und die adaptive Angiogenese zum kardialen Schutz bzw. deren

Wiederherstellung nach myokardialem Infarkt [115]. Das homologe Mausprotein von C19orf10 wurde ursprünglich von knochenmarkstämmigen Bindegewebszellen kloniert und SF20 bzw. Interleukin 25 genannt, basierend auf seiner Fähigkeit, die lymphoide Zellproliferation zu verstärken [116]. Diese Annahme konnte in späteren Experimenten jedoch nicht bestätigt werden [117]. Anschließende Untersuchungen ergaben, dass MYDGF von murinen Fibroblasten während der adipozytären Differenzierung von humanen Synoviozyten und von kultivierten knochenmarkstämmigen Makrophagen sezerniert wird [118-120]. MYDGF fördert die endotheliale Zellproliferation und reguliert die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade durch Induktion der schnellen Phosphorylierung von MAPK1 und MAPK3 [115]. Hinsichtlich NSCLC oder anderen Tumorarten wurden bislang für MYDGF oder dessen Expressionsniveau noch keine Zusammenhänge dargelegt.

Beim epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) handelt es sich um ein membran-ständiges Protein, von dem auch sekretierte Isoformen existieren. Ungefähr 20 Jahre nach der Entdeckung des epidermalen Wachstumsfaktors im Jahr 1962, wurde auch dessen Rezeptor, EGFR, isoliert [121-123]. Später wurde die Wichtigkeit von EGFR bei der Phosphorylierung von Proteinen sowie der Tumorgenese nachgewiesen [121, 123-125]. EGFR ist bekannt für seine klassische Funktion als Rezeptor-Tyrosinkinase. Er ist auf der Plasmamembran lokalisiert und wird durch seine Liganden aktiviert. Der aktivierte EGF-Rezeptor rekrutiert eine Reihe verschiedener Signalmoleküle, was wiederum zur Aktivierung verschiedener Signalwege, unter anderem beim Tumorwachstum, führt [9, 126, 127]. Der EGFR-Signalweg ist einer der am häufigsten fehlregulierten Signalwege von humanen Krebsarten [128]. In den letzen Jahren wurden mehrere Tyrosinkinaseinhibitoren und therapeutische Antikörper zur Behandlung von Brustkrebs, kolorektalen Karzinomen, nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, adenosquamösen Karzinomen von Kopf und Nacken sowie Pankreaskrebs eingesetzt. Obwohl enorme Anstrengungen unternommen wurden, gezielte Therapien gegen EGFR zu entwickeln, wiesen die meisten nur mäßige Behandlungserfolge auf [13, 126, 129-131]. Eine Ausnahme stellt die gegen EGFR-gerichtete Therapie beim nicht-kleinzelligen Lungen-karzinom dar [132-135]. Jedoch entwickeln nahezu alle NSCLC-Patienten Resistenzen gegen EGFR-Kinaseinhibitoren, wie z. B. Erlotinib [136, 137]. Dies zeigt die hohe Bedeutung, Resistenzmechanismen genauer zu verstehen, um die Resistenzproblematik bei Therapieansätzen zur Krebsbehandlung zu überwinden [138].

Der plättchenstämmige Wachstumsfaktor D (PDGF-D) gehört zu einer Familie von Wachstumsfaktoren, deren Mitglieder diverse zelluläre Funktionen in Zellen und Geweben regulieren. PDGF-D spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation der embryonalen Entwicklung, Zellproliferation, Zellmigration und Chemotaxis [139, 140]. Das Protein wird vor allem in der Niere, Herz, Pankreas, Ovarien, Fettgewebe, Magen, Blase, Trachea, Testikeln und Brustdrüsen exprimiert [141-143]. Es ist bekannt, dass PDGF-D mit dem PDGF-Rezeptor β interagiert, so den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert und auf diese Weise Tumorentwicklung und -wachstum positiv beeinflusst [142]. Eine verstärkte Expression von PDGF-D wurde im Zusammenhang mit Prostata-, Lungen-, Nieren-, Eierstock-, Hirn- und Pankreastumoren beobachtet [144-147]. PDGF-D wird durch u-PA aktiviert wird, dessen Expression und Aktivität wiederum unter anderem von PDGF-D reguliert wird [145]. Dies lässt darauf schließen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen u-PA- und PDGF-D-vermittelten Signalwegen gibt, wenn auch der exakte molekulare Mechanismus noch ungeklärt ist. Dies lassen auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse vermuten.

Die Rolle von u-PA, seinem Rezeptor (u-PAR) und dem Plasminogenaktivator-Inhibitor PAI1 bezüglich Zellmigration und Invasion wurde sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Gesichtspunkten ausführlich studiert [148-150]. Das u-PA-System spielt eine Rolle bei der Tumormigration, Invasion und Angiogenese und wurde bereits für zahlreiche Krebsarten untersucht [151-153]. U-PA wird als inaktives Proenzym Pro-u-PA freigesetzt und durch limitierte Proteolyse in aktives u-PA umgesetzt [154]. Sowohl u-PA als auch sein Proenzym binden an einen spezifischen Rezeptor (u-PAR) auf der Zelloberfläche [155]. Aktives u-PA ermöglicht die Umwandlung des Zymogens Plasminogen in Plasmin. Seine Aktivität kann durch die Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI1 und PAI2 unterdrückt werden [156]. In den meisten malignen Tumoren ist der u-PA-Spiegel signifikant höher als in gesunden Geweben oder benignen Tumoren des gleichen Typs [122, 157]. Es konnten sogar Zusammenhänge zwischen dem Gehalt an u-PA, u-PAR, PAI1 und PAI2 in einigen malignen Tumoren und Patientenprognosen festgestellt werden [122, 151, 153, 158, 159]. Auch beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom konnten erhöhte Expressionsniveaus im u-PA-System im Vergleich zu gesundem Lungengewebe nachgewiesen werden, jedoch konnten keine Beziehungen zu Überlebensraten ermittelt werden [124, 125, 160]. Dennoch stellt u-PA einen vielversprechenden Angriffspunkt bei der Prävention der NSCLC-Progression dar [161, 162].

Auch t-PA, eine Serinprotease, welche aus fünf Domänen (F, E, K1, K2 und P) besteht, wurde schon im Zusammenhang mit bestimmten Krebsarten, wie Brust-, Lungen- Pankreas- und Kolonkrebs beschrieben [5, 54-56]. T-PA ist ein etablierter Tumormarker für Brustkrebs [57], doch im Gegensatz zu seinem Urokinase-spezifischen Analogon (u-PA) ist t-PA bezüglich Krebsentstehung und Entwicklung längst nicht so umfassend charakterisiert. Da t-PA den größten Regulationsunterschied (bis zu Faktor zehn) zwischen PC9- und PC9ER-Zellen aufwies und in Bezug auf Krebs, im Speziellen für die Chemoresistenzentwicklung gegen Erlotinib bei NSCLC, bislang eher wenig studiert ist, wurden in dieser Arbeit weiterführende Experimente mit t-PA angestrebt. Es wurden Strategien zur Klonierung, Expression und Reinigung verschiedener t-PA-Varianten sowie für Bindungspartnerstudien mittels Affinitätsanreicherung und chemischer Quervernetzung/Massenspektrometrie entwickelt und erfolgreich umgesetzt. Auf diese Weise sollten die Signaltransduktionswege von t-PA sowie dessen Rolle bei der Chemoresistenzentwicklung in NSCLC-Zellen gegen Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z. B. Erlotinib, besser charakterisiert werden.

4.2 Klonierung, Expression und Reinigung der t-PA-Varianten

Im Zuge dieser Arbeit sollten weiterführende Bindungspartnerstudien mit t-PA und dem Sekretom der NSCLC-Zelllinien PC9 und PC9ER mittels chemischer Quervernetzung kombiniert mit Massenspektrometrie durchgeführt werden. Da es sich beim Sekretom um eine hochkomplexe Proteinmischung handelt, sollte t-PA in möglichst reiner Form vorliegen. Es wurden zwei t-PA-Varianten für die Bindungspartnerstudien gewählt, die als Fusionsproteine in *E. coli*, wie von Lee *et al.* beschrieben, löslich exprimiert werden sollten [114]. Durch Subklonierung der codonoptimierten DNA-Sequenz der t-PA-Proteasedomäne in den Klonierungsvektor pET28a(+), wurden zwei Plasmide zur Expression von zwei t-PA(P)-Fusionsproteinen generiert, um das Protein mit *N*- und *C*-terminalem His_6-*Tag* herzustellen. Eine lösliche Expression der t-PA(P)-Fusionsproteine konnte nicht erreicht werden, unabhängig davon, welcher *E. coli*-Stamm (BL21 (DE3), BL21 (DE3) Codon Plus RIL oder Rosetta (DE3) pLysS) oder welche Expressionsbedingungen (37 °C, 18 °C, 1 mM IPTG oder 0,1 mM IPTG) gewählt wurden (Kapitel 3.2.2). In Anbetracht der zahlreichen Disulfidbrücken von t-PA (17 Disulfidbrücken im Vollängenprotein, davon 6 in der Proteasedomäne) ist dies nicht verwunderlich. In Eukaryoten werden Disulfidbrücken im Endoplasmatischen Retikulum ausgebildet, doch in *E.coli* ist dies nicht möglich, da sie kein Endoplasmatisches Retikulum besitzen. Wird das Protein ins Cytosol translatiert, können

keine Disulfidbrücken entstehen, so dass die Faltung des Proteins gestört ist. Daher kommt es häufig zur Proteinaggregation und zur Bildung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*). Dabei ist der Einschlusskörper in seinem Inneren vor Reduktion geschützt und bildet deshalb willkürlich Disulfidbrücken aus. Sowohl die Fehlfaltung als auch die Bildung von Einschlusskörpern machen weitere Arbeitsschritte bei der Reinigung des Proteins erforderlich. In dieser Arbeit wurde auf eine etablierte Expression und anschließende Rückfaltung des Proteins aus Einschlusskörpern nach Rudolph *et al*. zurückgegriffen [106]. Doch die Aufarbeitung aus Einschlusskörpern mit anschließender Rückfaltung lieferte nur in begrenztem Umfang funktionelles Protein. Im Vergleich zum Volllängenprotein (WHO-Standard) zeigten die gereinigten Fusionsproteine der Proteasedomäne von t-PA mit *C*- bzw. *N*-terminalem His_6-*Tag*, t-PA(P_C) und t-PA(P_N), nur knapp 20 % bzw. 18 % Aktivität. Die vergleichsweise geringen Aktivitäten der exprimierten t-PA(P)-Varianten lassen darauf schließen, dass die Rückfaltung des Proteins nicht vollständig oder fehlerhaft stattgefunden hat und die Proteine nicht komplett in ihre nativen Formen überführt wurden. Ebenfalls möglich ist, dass die Proteasedomäne von t-PA nicht die volle Aktivität des Volllängen-t-PA aufweist. Für die Interaktionsstudien mit NSCLC-Sekretomen sollte daher zusätzlich eine längere Variante des t-PA, bestehend aus den Kringel 2- und Proteasedomänen (als aktives Therapeutikum bekannt als Reteplase), kloniert und exprimiert werden.

Da trotz intensiver Optimierung der Reinigung (Kapitel 3.2.2) die t-PA(P)-Fusionsproteine nicht in ausreichender Reinheit zu gewinnen waren, sollte für die t-PA(K2P)-Fusionsproteine ein anderer *Tag* benutzt werden. Statt des His_6-*Tags* wurde ein doppelter Strep-*Tag* II gewählt, um unspezifische Bindungen während der nachfolgenden Affinitätsreinigung zu minimieren und damit eine größere Reinheit des Zielproteins zu gewährleisten. Auch für die t-PA-Kringel 2- und Proteasedomänen wurde zunächst die Klonierung zweier Expressions-plasmide zur Expression der Fusionsproteine mit *C*- und *N*-terminalem *Tag* angestrebt. Es gelang die erfolgreiche Herstellung des Expressionsplasmids für das t-PA-Fusionsprotein mit *C*-terminalem *Tag*. Die spätere Analyse der Sequenzierung des für die Subklonierung des Expressionsvektors für t-PA(K2P) mit *N*-terminalem *Tag* nötigen PCR-Produktes ergab, dass die Restriktionsschnittstelle des Enzyms *Hind*III nicht vorhanden war und damit auch keine intakten Ligationsprodukte entstehen konnten. Da die Primer hinsichtlich ihrer Sequenz und Eignung vorher eingehend geprüft worden waren, bleibt unklar, warum die gewünschte *Hind*III-Restriktionsschnittstelle nicht amplifiziert wurde. Im weiteren Verlauf wurde nur mit der t-PA-Variante mit *C*-terminalem, doppeltem Strep*Tag* II gearbeitet.

Für das erfolgreich exprimierte und gereinigte t-PA(K2P)-Fusionsprotein konnte eine Aktivität von 78–86 % im Vergleich zum Volllängenprotein (WHO-Standard) nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.3). Die Diskrepanz der Aktivität im Vergleich zum Volllängenprotein lässt sich eventuell mit einer nicht vollständigen oder partiell fehlerhaften Rückfaltung des Proteins in seinen nativen Zustand begründen. Weitere Erklärungen stellen der mögliche Einfluss der fehlenden Domänen (Fingerdomäne, EGF-ähnliche Domäne und Kringel 1-Domäne) auf die Aktivität sowie geräte- und methodenbedingte Messungenauigkeiten dar.

Da das t-PA(K2P)-Insert des pS_C-K2P-Expressionsplasmids nicht für *E. coli* codonoptimiert war, wurde für die Expression der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) Codon Plus RIL verwendet. Das t-PA(K2P)-Insert enthält zwölf Codons für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin und Leucin, die von *E. coli* natürlicherweise nur selten verwendet werden. Damit ist die Wahrscheinlichkeit eines Abbruchs der Translation während der Genexpression relativ hoch. Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) Codon Plus RIL enthält zusätzliche tRNAs für die humanen Codons von Arginin, Isoleucin und Leucin. Auf diese Weise konnten in dieser Arbeit ausreichende Mengen des humanen t-PA(K2P)-Fusionsproteins in *E. coli* exprimiert werden.

Die Reinigung von t-PA(K2P) erfolgte, im Unterschied zu den t-PA(P)-Fusionsproteinen, erst nach Rückfaltung (Kapitel 2.3.4.2). Das t-PA(K2P)-Fusionsprotein war mit einem doppelten Strep-*Tag* II versehen, welcher durch die zur Elution benötigte Interaktion mit Desthiobiotin blockiert und damit eine für die *Pulldown-S*trategie benötigte erneute Affinitätsanreicherung verhindern würde. Aus diesem Grund wurde t-PA(K2P) nach der Rückfaltung direkt im Zuge der Interaktionsstudien für die Aktivitätsbestimmung gereinigt und die gewünschte Aminosäuresequenz anschließend massenspektrometrisch bestätigt.

4.3 *Pulldown*-Experimente der Interaktionspartnerstudien

Zur Identifizierung möglicher Protein-Interaktionspartner von t-PA wurde eine *Pulldown*-Strategie mit Affinitätsanreicherung und chemischer Quervernetzung gewählt, wie von Herzog *et al*. beschrieben [90]. Diese Strategie sollte es ermöglichen, das Zielprotein mit seinen durch chemische Quervernetzung fixierten Interaktionspartnern anzureichern. Zum Vergleich wurden die Experimente zusätzlich ohne chemische Quervernetzung und als Kontrolle ohne t-PA und chemische Quervernetzung (also nur mit den sekretierten Proteinen) durchgeführt. Diese Kontrollexperimente dienten dazu, unspezifische Bindungen an die Matrix zu identifizieren und damit „falsch positive“ Ergebnisse zu eliminieren.

In den *Pulldown*-Experimenten mit chemischer Quervernetzung konnten fünfzehn Proteine angereichert werden. Von den fünfzehn Proteinen wurde, wie erwartet, das Zielprotein t-PA am stärksten angereichert (Abbildung 3.20). Jedes andere Ergebnis hätte auf Fehler in der Durchführung der Experimente gedeutet. Neben t-PA konnten somit vierzehn potentielle t-PA-Interaktionspartner angereichert werden. Insgesamt wurden zwar 48 Proteine angereichert (Abbildung 3.20), aber aufgrund des Ausschlusskriteriums, jedes Protein anhand von mindestens zwei einzigartigen Peptiden zu identifizieren, reduzierte sich die Zahl auf fünfzehn. Weiterhin stellte die Durchführung der Experimente in je drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten und eine tiefgehende statistische Evaluierung die Richtigkeit der Ergebnisse sicher. Von den vierzehn potentiellen t-PA-Interaktionspartnern wurden acht für beide NSCLC-Zelllinien identifiziert (Tabelle 3.5). Zwei Proteine (Alpha-Aktinin-1 und Syndecan 4) wurden ausschließlich in den Experimenten mit PC9ER-Zellen angereichert, vier Poteine (Komplement C3, olfaktomedinartiges Protein 3, Serin-/Arginin-reicher Splicingfaktor 1 und Transmembranprotein 132A) ausschließlich in den Experimenten mit PC9-Zellen. Ob und welche Rolle diese Verteilung für die in den jeweiligen Zellen identifizierten t-PA-Interaktionen im Hinblick auf die Resistenzentwicklung von NSCLC-Zellen hat, ist noch unklar.

Die *Pulldown*-Experimente wurden auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und damit ihre prinzipielle Eignung für Bindungspartnerstudien analysiert (Kapitel 3.3.1, Abbildung 3.21). Der Vergleich der biologischen Replikate der Matrixkontrollen in Bezug auf die identifizierten Proteine zeigte eine Übereinstimmung von 64,9 % bei den PC9-Zellen bzw. 74,6 % bei den PC9ER-Zellen in allen drei Replikaten (Abbildung 3.21B). Bei den Proteinen, die in mindestens zwei Replikaten vorgefunden wurden, steigt die Quote sogar auf 88,9 % bzw. 88,7 %. Lediglich 11,1 % bzw. 11,3 % der Proteine wurden isoliert in einzelnen Replikaten vorgefunden. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Analysen der biologischen Replikate der Positivkontrollen (ohne Quervernetzungsreagenz) sowie der Quervernetzungsansätze (Anhang Abbildung A.7). Die *Pulldown*-Experimente zeichnen sich also durch eine gute Reproduzierbarkeit aus.

Der Vergleich der Positivkontrollen im Vergleich zu den Quervernetzungsansätzen macht den Nutzen der der kovalenten Fixierung der t-PA-Bindungspartner deutlich (Abbildung 3.20 undAbbildung 3.21C). Ohne Quervernetzungsreagenz konnte lediglich das Zielprotein t-PA in allen Proben signifikant angereichert werden. Das chemische Quervernetzungsreagenz BS^2G gewährleistete jedoch die kovalente Bindung von t-PA und den im Sekretom der

NSCLC-Zellen vorhandenen Interaktionspartnern. Auf diese Weise konnten neben t-PA interagierende Proteine angereichert und identifiziert werden. Eine Affinitätsanreicherung kombiniert mit chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie stellt somit eine geeignete Methode dar, Interaktionspartner von Proteinen zu identifizieren. Zur Aufklärung der Interaktions-regionen empfiehlt es sich, weiterführende Experimente in weniger komplexen Mischungen mit den gereinigten Proteinen durchzuführen. Die chemische Quervernetzung von t-PA mit jeweils einem möglichen Bindungspartner in geeignetem Puffer wäre eine Möglichkeit, die hier gefundenen Wechselwirkungen zu bestätigen und detaillierte Informationen über die Interaktionsregionen zwischen t-PA und seinen Bindungspartnern zu erhalten.

4.4 Chemische Quervernetzungsexperimente

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, erlaubt die chemische Quervernetzung kombiniert mit MS die Untersuchung von Protein-Proteininteraktionen, da neben kovalenten Wechselwirkungen auch transiente Interaktionen sowie dynamische Strukturänderungen registriert werden können. Etablierte Methoden, wie die NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie, können zwar nicht ersetzt, dafür aber sinnvoll ergänzt werden. Besonders die im Vergleich zu anderen Methoden der Strukturanalyse benötigten geringen Proteinmengen machen diese Technik so attraktiv.

In dieser Arbeit wurde das homobifunktionelle aminreaktive Reagenz BS^2G eingesetzt, mit dem innerhalb weniger Minuten Quervernetzungen zwischen Lysinseitenketten eingeführt und auf diese Weise Proteinstrukturen fixiert werden. So können mit einem *Tag* versehene Proteine und ihre Interaktionskomplexe kovalent gebunden und mittels Affinitätsanreicherung konzentriert werden [90].

In dieser Arbeit wurde eine 1:1-Mischung des nicht-deuterierten und vierfach-deuterierten BS^2G eingesetzt, um die Identifizierung der Quervernetzungsprodukte anhand ihrer charakteristischen Isotopenmuster im Massenspektrum zu erleichtern. Die Verwendung isotopenmarkierter Quervernetzungsreagenzien ist eine gut etablierte Methode [163, 164]. Allerdings kann durch die Aufteilung der Gesamtintensität eines Signals auf zwei Isotopenspezies (D_0/D_4) die Identifizierung gering abundanter Quervernetzungsprodukte erschwert werden. Häufig werden die untersuchten Proteine meist nur zu einem kleinen Teil quervernetzt. Dies hat zur Folge, dass die Signale der linearen, nicht vernetzten Peptide der

Proteine die Massenspektren dominieren und die Signale der Quervernetzungsprodukte überlagern. Die Anwendung von MS/MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenzien wäre eine alternative Methode, um Quervernetzungsprodukte anhand ihrer charakteristischen Fragmentionenmuster in MS/MS-Spektren zu identifizieren, ohne dass die Signalintensität der ohnehin schon nieder abundanten, quervernetzten Peptide reduziert wird [165].

Eine weitere Herausforderung stellt das enorme Datenvolumen der hochauflösenden massenspektrometrischen Analyse dar. Die erzeugten Datensätze sind zu groß (durchschnittlich 2 GB und bis zu 95.000 Spektren), um sie manuell bewältigen zu können. Eine gute Softwarelösung (wie StavroX) ist also unabdingbar [55]. Durch den Abgleich experimenteller und theoretischer Massen von Vorläufer- und zugehörigen Fragmentionen können Quervernetzungsprodukte automatisch identifiziert werden. Eine nachfolgende manuelle Überprüfung der Identifizierungen ist im Moment jedoch unerlässlich. Weiterentwicklungen und stetige Verbesserungen im Bereich der Softwareentwicklung werden in Zukunft eine vollautomatische Auswertung von Quervernetzungsprodukten, auch zur Charakterisierung therapeutisch relevanter Proteine, ermöglichen.

4.5 Identifizierte t-PA-Interaktionspartner

Nahezu alle Proteine, die in dieser Arbeit als potentielle t-PA-Interaktionspartner identifiziert wurden, sind im Zusammenhang mit der Entstehung bzw. Entwicklung von NSCLC oder anderen Krebsarten bereits bekannt. Einige von ihnen, wie Fibulin 1 oder Komplement C3, wurden schon als prognostische Marker vorgestellt [166, 167]. Von den vierzehn potentiellen t-PA-Interaktionspartnern wurden acht für beide NSCLC-Zelllinien identifiziert, zwei Proteine wurden spezifisch in den Experimenten mit PC9ER-Zellen und vier Poteine spezifisch in den Experimenten mit PC9-Zellen angereichert (Tabelle 3.5).

4.5.1 t-PA-Bindungspartner aus dem Sekretom von PC9- und PC9ER-Zellen

Sowohl in PC9- als auch in PC9ER-Zellen wurden die acht Proteine Alpha-Aktinin-4 (ACTN4), Komplement C3 (C3), Komplementfaktor D (CFD), Fibulin-1 (FBLN1), Laminin-332 (LAMB3), Quiescin-Sulfhydryloxidase 1 (QSOX1), Stanniocalcin-2, tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1 (TINAGL1) und Y-Box-Bindeprotein 3 (YBX3) angereichert.

Alpha-Aktinine sind Proteine, welche für die Organisation des Zytoskeletts und der Zelladhäsion verantwortlich sind. Bei Säugerzellen unterscheidet man vier verschiedene Alpha-Aktinine, welche in zwei Klassen eingeteilt werden. Alpha-Aktinin-1 und -4 (ACTN1, ACTN4) sind calciumsensitiv und werden ubiquitär exprimiert, wohingegen Alpha-Aktinin-2 und -3 calciumunabhängig und muskelspezifisch sind [168]. ACTN4 ist im Zusammenhang mit Zellmotilität und Metastasierung bekannt [9, 169]. Bei NSCLC ist ACTN4 nach seiner Sekretion Teil der Zellmigration und moduliert die Tumorumgebung für die weitere Krebsentwicklung [169]. Außerdem wurde ACTN4 als transkriptionaler Co-Aktivator beschrieben, welcher die proteinassoziierte Metastasierung und Zellmotilität bei Lungenkrebs aktiviert oder verstärkt [126]. Eine Überexpression des Proteins ACTN4 und eine verstärkte Genamplifizierung wurden als Biomarker diskutiert, mit denen die Metastasierung bei Krebspatienten abgeschätzt werden kann [170].

In Bezug auf Zellmigration könnten auch Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) von Interesse sein, welche in dieser Arbeit identifiziert wurden, wie Fibulin1, Laminin-332, Quiescin-Sulfhydryloxidase 1 und das Tubulointerstitielle Nephritis Antigenartige Protein 1. Fibulin 1 (FBLN1) ist ein kleines Protein der ECM, welches die Kommunikation zwischen Zelle und Matrix reguliert sowie die supramolekulare Organisation der ECM unterstützt, was für Zellmorphologie, Zellwachstum, Zelladhäsion und Zellmotilität von Bedeutung ist [171]. FBLN1 wird mit diversen Krebsarten, wie Blasenkrebs, Magenkrebs, kolorektalen Tumoren, Brustkrebs, Speiseröhrenkrebs, Prostatakrebs, Eierstockkrebs und Osteosarkomen in Beziehung gebracht. Auf der einen Seite reduziert FBLN1 die Tumorangiogenese und fördert die Apoptose von Tumorzellen, auf der anderen Seite fördert es die Chemoresistenz von Brustkrebszellen [131, 172]. Neuere Studien berichten über den Zusammenhang der FBLN1-Expression und Prognosen für Patienten mit Magenkrebs [166].

Ein weiteres Protein der ECM, welches in dieser Arbeit als potentieller Interaktionspartner von t-PA identifiziert wurde, ist Laminin-332 (LAMB3, auch bekannt als Laminin-β3 oder nach alter Annotation als Laminin-5). LAMB3 fördert die Chemoresistenz verschiedener Krebsarten [173-175]. So antagonisiert LAMB3 dosisabhängig die Wachstumsinhibition, welche durch den Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib hervorgerufen wird [175]. Laminine werden an der invasiven Front von Tumorclustern gebildet und positioniert. Speziell LAMB3 wird von invasiven, malignen Zellen humaner Karzinome exprimiert und stellt einen Marker der Invasivität von Tumoren dar [176, 177]. In neueren Studien wurde die Expression von

Laminin-332 als prädiktiver Marker der Chemoresistenz bei Patienten mit Kolonkrebs vorgestellt [178].

Quiescin-Sulfhydryloxidas 1 (QSOX1) ist ein Enzym mit disulfidmodulierenden Eigenschaften, das in zahlreichen Tumorarten überexprimiert wird. Es fördert Wachstum und Invasion von Tumorzellen und verändert die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix [179, 180]. Im direkten Zusammenhang wurde QSOX1 bei vielen Krebsarten erörtert, z. B. Nierenkrebs, Pankreaskrebs und Neuroblastomen [138, 181]. Beim Brustkrebs wird sogar von einer direkten Korrelation zwischen der Expression von QSOX1 und Patientenprognosen ausgegangen [182]. Dieses Protein entwickelt sich zu einem neuen Angriffspunkt in der Tumorbiologie. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die Invasion von Krebszellen unterdrückt werden kann, wenn man die enzymatische Aktivität von QSOX1 inhibiert [138].

Das Tubulointerstitielle Nephritis Antigenartige Protein 1 (TINAGL1), auch bekannt als adrenocortaler Zonierungsfaktor 1 oder Lipocalin 7, interagiert mit strukturgebenden Matrixproteinen ebenso wie mit Rezeptoren der Zelloberfläche und fördert so Zelladhäsion [183]. Es ist Bestandteil der Basallamina sowie der Reichertsmembran und bekannt für seine Rolle bei der Reproduktion [184-187]. TINAGL1 ist zudem ein potentieller Angriffspunkt zur Unterdrückung der Metastasierung bei NSCLC und anderen Tumorarten [143, 188].

Neben Proteinen der extrazellulären Matrix wurden auch Proteine des Komplementsystems, wie der Komplementfaktor D (CFD), als potentielle Bindungspartner von t-PA identifiziert. Der Komplementfaktor D, auch bekannt als Adipsin, ist ein Mitglied der Chymotrypsinfamilie von Serinproteasen und reguliert den Schlüsselschritt bei der Aktivierung des alternativen Komplementsignalwegs [189, 190]. Die Hauptquelle von CFD ist das Fettgewebe [191]. CFD wird aber auch in anderen Geweben und Zelltypen exprimiert. CFD wurde bislang noch nie im Zusammenhang mit NSCLC oder anderen Lungenkrebsarten berichtet. Bei Prostatatumoren konnte allerdings eine bis zu zehnfach erhöhte Expression von CFD im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe oder Gewebe der benignen Prostatahyperplasie beobachtet werden [192].

Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine Interaktion von t-PA mit dem Glykoprotein Stanniocalcin 2 (STC2) identifiziert. Das sezernierte Glykoproteinhormon STC2 ist in die Calcium- und Phosphathomöostase involviert und wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert [193]. Die Expressionsniveaus von STC2 wurden für verschiedene Krebsarten untersucht, einschließlich Neuroblastomen, Magenkrebs, Brustkrebs, Kolonkrebs,

Prostatakrebs, Lungenkrebs, Nasopharynxkarzinomen, Speiseröhrenkrebs und Leberzellkarzinomen. Die Berichte über die Effekte von Stanniocalcin 2 auf die Tumorprogression gehen allerdings in unterschiedliche Richtungen. In einigen Studien wurde eine Förderung der Zellproliferation beobachtet, wohingegen andere Studien inhibitorische Effekte diskutieren [194-198]. Bezüglich Lungenkrebs wurde für STC2 ein positiver Einfluss auf die Metastasierung und Tumorprogression nachgewiesen, da es die Zellproliferation, Migration und Invasion fördert [197].

Ebenso wie für STC2 sind auch die Aussagen über das Y-Box-Bindeprotein 3 (YBX3) im Zusammenhang mit Krebs widersprüchlich. YBX3 ist auch bekannt unter den Bezeichnungen Kälteschockdomänenprotein, DNA-bindendes Protein oder Zonula Occludens 1-assoziiertes nukleinsäurebindendes Protein A. Es ist ein facettenreiches, epithelspezifisches Protein. Das Mitglied der Y-Box-Bindeproteinfamilie ist ein Transkriptionsfaktor und reguliert die Stabilität der mRNA [152]. YBX3 moduliert u.a. Prozesse wie die Kontrolle der Zelldichte, der Proliferation und der Differenzierung. Studien schildern einen Zusammenhang zwischen der Expression von YBX3 und der Tumorentwicklung bei unterschiedlichen Krebsarten [142, 151, 152, 199]. Eine erhöhte Expression scheint sich dabei einerseits positiv auf die Pathogenese, Zellinvasion und Chemoresistenz bei Magenkrebs auszuwirken, zeichnet sich andererseits durch antionkogene Effekte aus, wie vermindertes Tumorwachstum und Metastasierung bei squamösen Zellkarzinomen [155, 200].

4.5.2 t-PA-Bindungspartner aus dem Sekretom von PC9-Zellen

Ausschließlich im Sekretom der PC9-Zellen wurden die vier Proteine Komplement C3 (C3), das olfaktomedinartige Protein 3 (OLFML3), den Serin-/Argininreichen Splicingfaktor 1 (SRSF1) und das Transmembranprotein 132A (TEMEM132A) angereichert.

Das als potentieller t-PA-Interaktionspartner identifizierte Protein Komplement C3 (C3) gehört wie Komplementfaktor D zu den Proteinen des Komplementsystems. Das Komplementsystem ist von Bedeutung für die Immunität und die körpereigene Krebsabwehr [201]. In vielen Tumoren ist die Expression membrangebundener Komplementinhibitoren hochreguliert, während die Zellen einiger Tumore gleichzeitig eine verstärkte Expression und Oberflächenbindung von löslichen Komplementregulatoren aufweisen [202, 203]. Außerdem sezernieren Tumorzellen Proteine des Komplementsystems, um das Tumorwachstum mittels autokriner Effekte zu stimulieren [204]. In Studien konnte belegt werden, dass C3-defiziente

Mäuse ein signifikant verringertes Tumorwachstum zeigen [205]. Dies deutet auf einen tumorfördernden Effekt des Proteins C3 hin. In Bezug auf NSCLC wurde C3 als prognostischer Faktor und mögliche Angriffspunkt neuer Therapien charakterisiert [167].

Das olfaktomedinartige Protein 3 (OLFML3) ist ein Mitglied der Olfaktomedinfamilie, einer Gruppe extrazellulärer Glykoproteine, welche eine wichtige Rolle bei der Embryogenese von Wirbeltieren spielen [156, 206]. Es ist ein proangiogener Faktor, dessen Hemmung in endothelialen Tumorzellen und Perizyten die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum deutlich reduziert [157]. Neuere Untersuchungen zeigen Zusammenhänge der Expression von OLFML3 und krebsassoziierten Fibroblasten in einigen Krebsarten [207]. Außerdem wurde das Protein als selektiver Biomarker für Kolonkrebs bestätigt [208].

Der Splicingfaktor SRSF1 (SRSF1) ist ein Onkogen, das in Tumoren der Schilddrüse, Niere, Lunge, Leber, Pankreas, Brust, Kolon und Dünndarm überexprimiert wird und bei Lungenadenokarzinomen zu invasiveren Phänotypen führt [150, 209]. Gleichermaßen wird SRSF1 auch bei NSCLC überexprimiert und fördert die Expression des anti-apoptotischen Proteins Survinin [210]. SRSF1 fungiert als Splicingregulator, dessen Aktivität von seinem relativen Expressionsniveau im Vergleich zu anderen antagonistischen Splicingfaktoren und seinen posttranslationalen Modifikationen abhängt [211]. SRSF1 reguliert das RNA-Splicing von Caspase 9, was für die synergistischen Effekte von Daunorubicin und Erlotinib verantwortlich ist [212].

Die einzige Ausnahme in Bezug auf einen Zusammenhang mit Krebsentstehung stellt das bislang wenig studierte Transmembranprotein 132A (TMEM132A) dar. TMEM132A wurde zunächst aus dem Gehirn von Ratten isoliert [158]. Es wird angenommen, dass es in der Kultivierung von Zellen beim Überleben von Zellen eine Rolle spielt, welche serumfrei kultiviert werden, da es in diesen verstärkt exprimiert wird [213]. In neueren Studien wird davon ausgegangen, dass TMEM132A extrazelluläre Signale erkennt oder Teil der interzellulären Kommunikation ist, da die Expression von TMEM132A in der Entwicklung und unter pathophysiologischen Bedingungen reguliert wird [214].

4.5.3 t-PA-Bindungspartner aus dem Sekretom von PC9ER-Zellen

Ausschließlich im Sekretom der PC9ER-Zellen wurden die Proteine Alpha-Aktinin-1 (ACTN1) und Syndecan 4 (SDC4) angereichert.

Zu den vorher beshrieben Alpha-Aktininen, welche u.a. für die Zelladhäsion verantwortlich sind, gehört Alpha-Aktinin-1 (ACTN1). Im Gegensatz zu ACTN4 wurd ACTN1 bislang nicht so umfassend für verschiedene Krebsarten diskutiert. ACTN1 besitzt in Adenokarzinomzellen eine nachgewiesene Lokalisation an Matrixkontaktstellen und scheint für die Klassifizierung verschiedener Tumorstadien, Lymphknotenmetastasen, vaskulärer Permeation und dem Verlust der Basalmembran von Bedeutung zu sein [215]. Außerdem ist ein ACTN1-abhängiger Signalweg bekannt, welcher die Adhäsion von Kolonkrebszellen *in vitro* stimuliert [159].

Die Zelladhäsion wird auch von Syndecanen organisiert. Syndecane sind eine Familie von vier Heparinsulfatproteoglykanen, welche ubiquitär auf der Zelloberfläche und der ECM vorkommen. Sie regulieren zelluläres Verhalten, wie die Antwort auf externe Stimuli, Wachstumsfaktoren oder Ligandenbindung [216]. Es wird diskutiert, ob eine Verbindung von Syndecanen und $\alpha 6\beta 4$-Integrin eine Rolle bei der Zellmigration und Tumorgenese spielt. Syndecan 4 (SDC4) bindet an $\alpha 6\beta 4$-Integrin und vermittelt die EGFR-aktivierte Zellmotilität [217, 218]. Hauptsächlich wurde SDC4 in benignen Tumoren identifiziert. Dort wird eine verminderte SDC4-Expression mit verbesserten Patientenprognosen in Verbindung gebracht [162].

5 AUSBLICK

Die Behandlung von NSCLC entwickelt sich immer mehr in Richtung einer individualisierten Therapie. Sowohl die Untersuchung diagnostischer als auch prognostischer Marker gewinnt zunehmend an Bedeutung bei der Auswahl geeigneter Therapien. Die in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen Studien der Sekretome von erlotinibsensitiven und -resistenten NSCLC-Zelllinien erlaubten die eindeutige Identifizierung von fünf unterschiedlich regulierten Proteinen. Die stärkste Regulation wurde für den bereits etablierten Brusttumormarker t-PA beobachtet. Die Möglichkeit, das Expressionsniveau von t-PA zur Klassifizierung von erlotinibsensitiven bzw. erlotinibresistenten NSCLC-Patienten zu nutzen und damit die Therapien besser individualisieren zu können, sollte durch klinische Studien geprüft werden.

In weiterführenden Interaktionsstudien zwischen t-PA und den Sekretomen aus erlotinibsensitiven und -resistenten NSCLC-Zelllinien, konnten vierzehn potentielle Bindungspartner des t-PA identifiziert werden. Nahezu alle identifizierten Interaktionspartner sind bereits für die Charakterisierung oder Diagnostik des NSCLC und anderer Tumorarten bekannt, unabhängig davon, ob sie in beiden NSCLC-Zelllinien oder nur in einer Zelllinie angereichert wurden. Die identifizierten Proteine sind verantwortlich für Zelladhäsion und Zellmigration (wie die Proteine der ECM), für die Immunabwehr oder spielen eine Rolle bei der Transkription und haben einen Einfluss auf die Tumorangiogenese, Tumorprogression sowie Tumorinvasion und Metastasierung. Der genaue Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen t-PA und seinen Protein-Bindungspartnern sowie ihre Rolle bei der Entwicklung der Erlotinibresistenz sind noch unklar. Daher sind weiterführende Untersuchungen unerlässlich. Jedoch stellen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse einen wichtigen Schritt zum Verständnis der Resistenzentwicklung gegen Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Erlotinib, dar. Die Bedeutung von t-PA als möglichem Resistenzmarker bei NSCLC sowie die Identifizierung seiner Bindungspartner im Sekretom von Tumorzellen eröffnen neue Möglichkeiten, die Mechanismen der Resistenzentwicklung besser zu verstehen und verbesserte Ansätze für die Therapie des NSCLC zu entwickeln.

A ANHANG

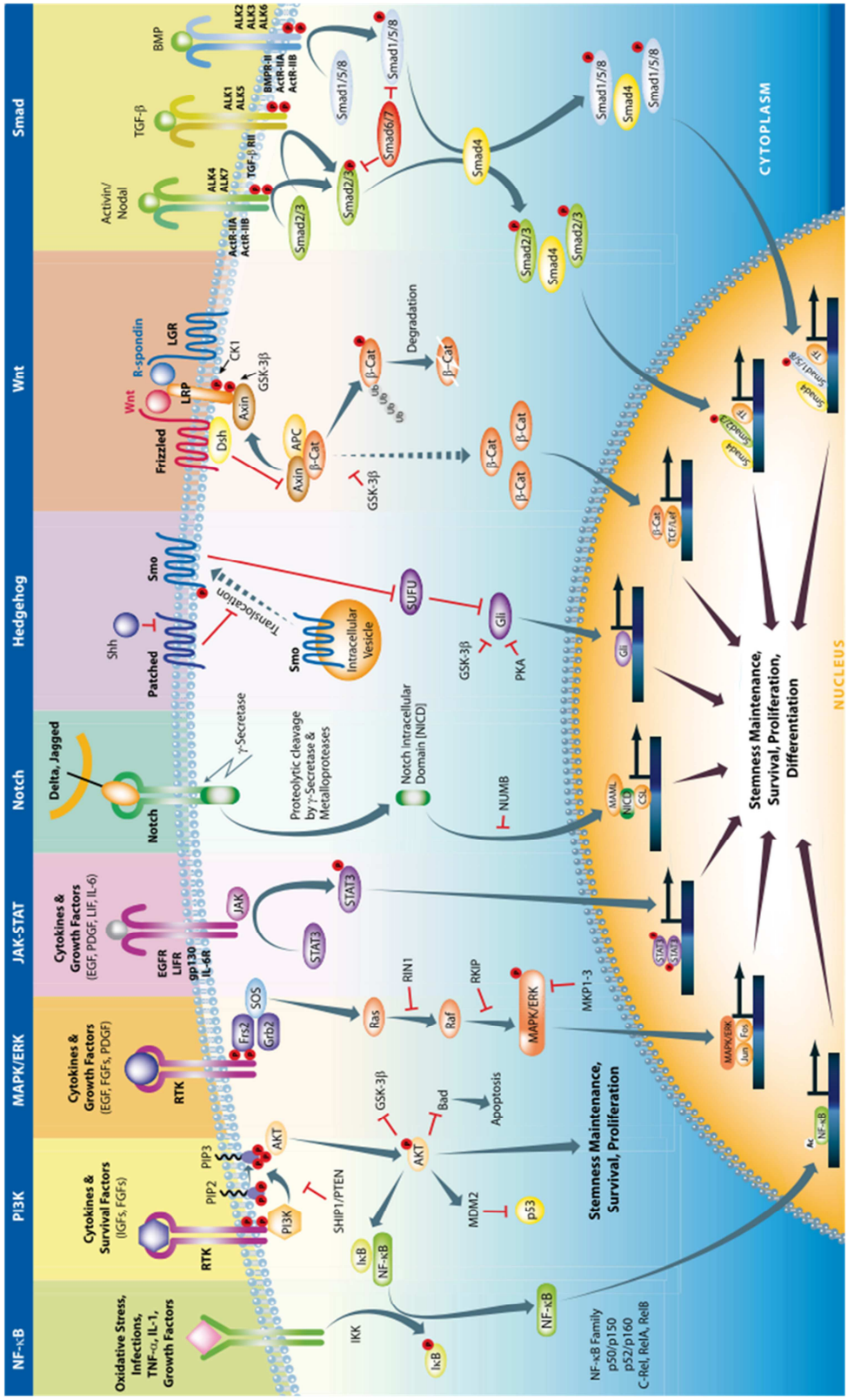

Abbildung A.1: Übersicht der Signalwege einer Zelle bei Krebserkrankung.

[www.AdipoGen.com].

Tabelle A.1: Potentiell unterschiedlich regulierte Proteine und ihre S/L-Verhältnisse.

		S/L-Verhältnis							
Uniproteintrag	**Genname**	**P1.1**	**P1.2**	**P2.1**	**P2.2**	**P3.1**	**P3.2**	**P4.1**	**P4.2**
P00750	**TPA**	4,63	0,26	6,67	0,12	4,5	0,23	7,66	0,17
Q9UI42	**CBPA4**	0,21	5,37	0,25	-	0,28	0,99	0,27	6,22
P43251	**BTD**	0,46	1,94	0,66	2,14	0,5	2,33	0,53	1,86
Q9BTY2	**FUCO2**	0,67/0,49	2,2	0,71	2,31/1,51	0,53	2,21	0,49/0,69	1,68
P00749	**UROK**	0,43	3,41	0,42	5,81	0,28	2,98	0,36	2,76
Q9GZP0	**PDGFD**	0,42	2,18	0,36	2,66	0,4	2,36	0,48	3,55
P26022	**PTX3**	-	3,78	0,66	3,49	0,32	1,45	0,4	1,85/0,89
Q9UM22	**EPDR1**	0,47	2,65	0,55	2,64	0,26/0,72	2,41	0,26/0,42	1,95
P19957	**ELAF**	-	3,32	0,97	4,21	0,75	1,75/2,62	0,84	1,87/1,06
O00468	**AGRIN**	-	2,78	0,95	2,93	0,79	1,47/2,13	1,04	0,96/1,52
Q08380	**LG3BP**	-	2,24	0,7	2,57	0,52/0,71	1,98/2,39	0,47/0,65	1,48
Q13162	**PRDX4**	-	2,3	0,72	2,65	0,34	4,33	0,54	2,78
P02786	**TFR1**	0,7	2,62	0,62/1,35	2,43	0,33/0,50	2,45	0,51	2,01
P13987	**CD59**	-	3,14	-	2,85	-	1,73	0,69	1,24
P00533	**EGFR**	0,33	2,66	0,41	2,52	0,33	2,35	0,34	3,07
Q16787	**LAMA3**	0,5	-	0,65	2,97	0,56	2,11	0,69	1,52
P02751	**FINC**	0,49	0,85	0,52	0,99	0,53	2,21	0,38/0,58	1,58
Q92626	**PXDN**	-	1,73	0,72	1,83	0,56/0,90	2,42	0,62	1,75/2,12
O75882	**ATRN**	-	1,47	0,77	1,49	0,59	2,04	0,67	1,36
Q8NBP7	**PCSK9**	-	1,72	0,69	1,71/2,27	0,42/0,72	2,23	0,81	1,50/2,20
P28799	**GRN**	0,58/0,48	2,04	0,52	2,53	0,52	2,16	0,62	1,59
P06744	**G6PI**	-	0,79	0,78	-	0,4	3,35	0,36/0,48	2,11
P09603	**CSF1**	-	1,75	0,45	1,96	0,6	2,94	0,74	2,08/1,17
Q9Y5X9	**LIPE**	-	-	-	-	0,87	2,04	0,83	1,45
P55058	**PLTP**	-	1,65	1,06	1,95	0,54/0,61	3,44	0,74	1,79
Q9BWS9	**CHID1**	-	0,95	0,66	0,97	0,57	2,41	0,69	1,69
Q8WUA8	**TSK**	-	1,02	0,8	-	0,56	2,93	0,68	1,95
O60218	**AK1BA**	-	0,68	1,51	1,01	0,47/0,55	2,42	0,57	1,51
Q92820	**GGH**	-	1,79	0,22/0,78	2,29	0,59	2,8	0,43/0,70	1,1
Q8NCW5	**AIBP**	-	0,91	0,64	-	0,39	3	0,39	1,88
P31947	**1433S**	-	0,89	0,42/0,70	1,16	0,45	2,95	0,6	1,8
P00746	**CFAD**	-	-	0,9	1,19	-	2,03	-	1,66
Q969H8	**MYDGF**	0,45	2,06	0,66	2,65	0,48	3,48	0,47	2,32
P14174	**MIF**	-	0,95	0,93	1,23	0,31	3,51	0,97	2,2
P10599	**THIO**	-	0,92	0,66	1,26	0,35/0,51	3,1	0,52	1,97
Q99584	**S10AD**	-	-	-	-		2,71	-	2,26
Q03169	**TNAP2**	0,48	-	0,37	3,77	0,25	-	0,21	2,93
P55145	**MANF**	0,73	-	-	1,78	0,44	4,12	0,2	2,34
P01036	**CYTS**	-	0,9	3,72	0,74		0,26	-	0,21
O95965	**ITGBL**	0,59	2,51	0,78	2,85	0,69	2,04	0,76	1,51
P12109	**CO6A1**	0,67	2,67	0,88	2,62	0,57	1,91	0,5	1,11
Q9NRN5	**OLFL3**	1,76	0,73	2,5	0,87	2,55	0,46	2,64	0,33
P02750	**A2GL**	0,1	-	0,1	14,09	0,11	-	0,11	8,69
O76061	**STC2**	1,96	0,55/0,96	2,9	0,82/0,56	1,65	0,56/0,82	2,37	0,35
Q9HB40	**RISC**	0,47	-	0,74	2,5	0,34/0,51	3,82	-	2,12
O43240	**KLK10**	1,08	0,51	1,59	0,6	1,33	0,53	2	0,39
P35625	**TIMP3**	1,02	0,55	-	0,88	0,35	1,19/3,24	2,27	1,13
P07478	**TRY2**	1,5	0,37	1,46	0,51	2,45	1,75	3,08	1,18
P07910	**HNRPC**	0,95	0,57/2,44	0,38/0,83	0,75/2,05	0,23	1,78/7,39	-	1,12/4,63
P49788	**TIG1**	0,95	0,59	1,21	0,55	2,29	0,45	2,18	0,37

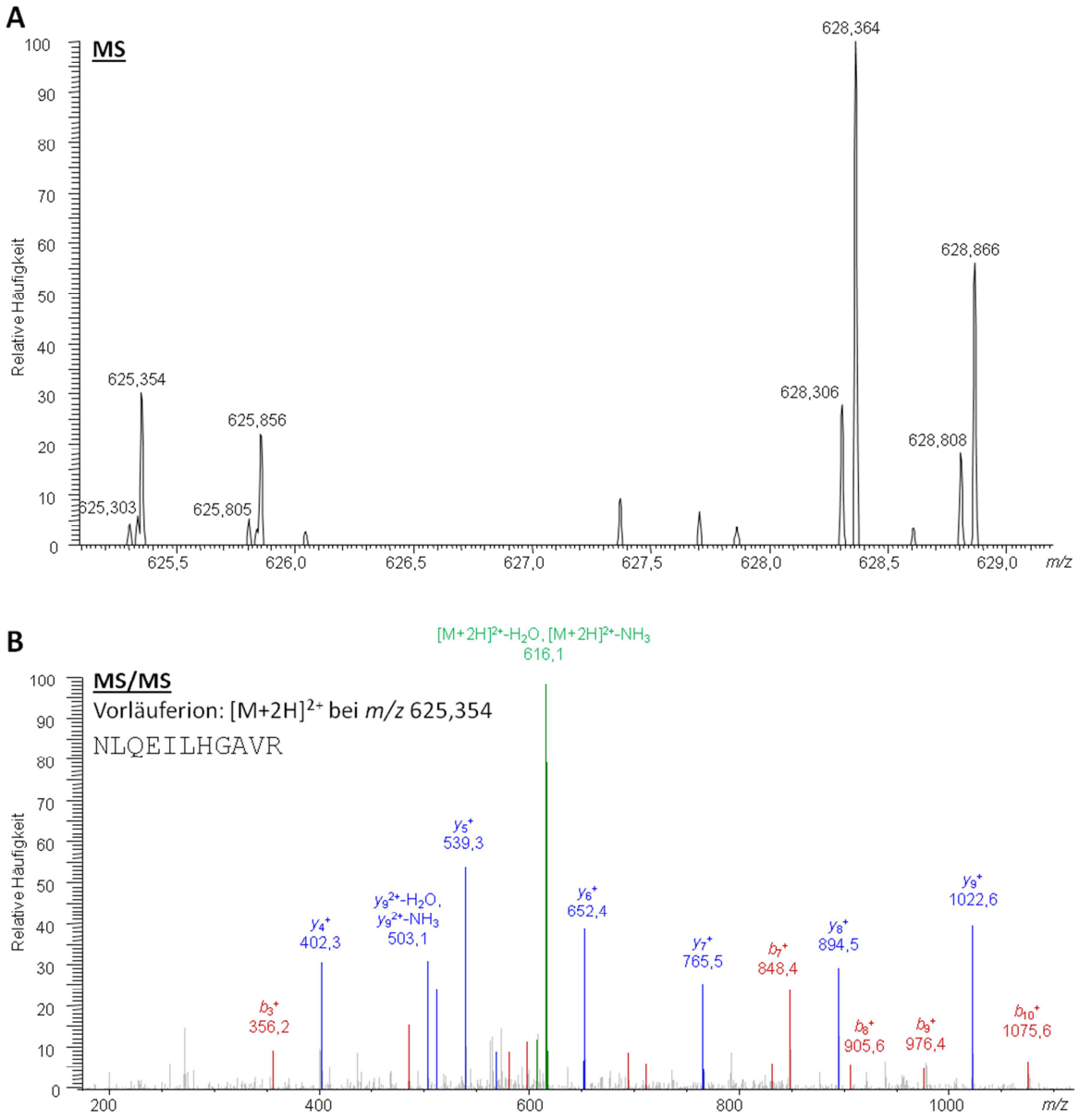

Abbildung A.2: ESI-Massenspektren eines EGFR-Peptids.

*(**A**) Massenspektrum eines tryptischen Spaltpeptids (aus EGFR), welches von „schweren“ PC9ER- (^{13}C-Arg, ^{13}C-Lys) und „leichten“ PC9-Zellen (^{12}C-Arg, ^{12}C-Lys) stammten. Das ausgewählte Isotopenmuster spiegelt ein S/L-Verhältnis von 3:1 wider. (**B**) Fragmentionenmassenspektrum eines Signals bei m/z 625,354 des EGFR-Peptids NLQEILHGAVR.*

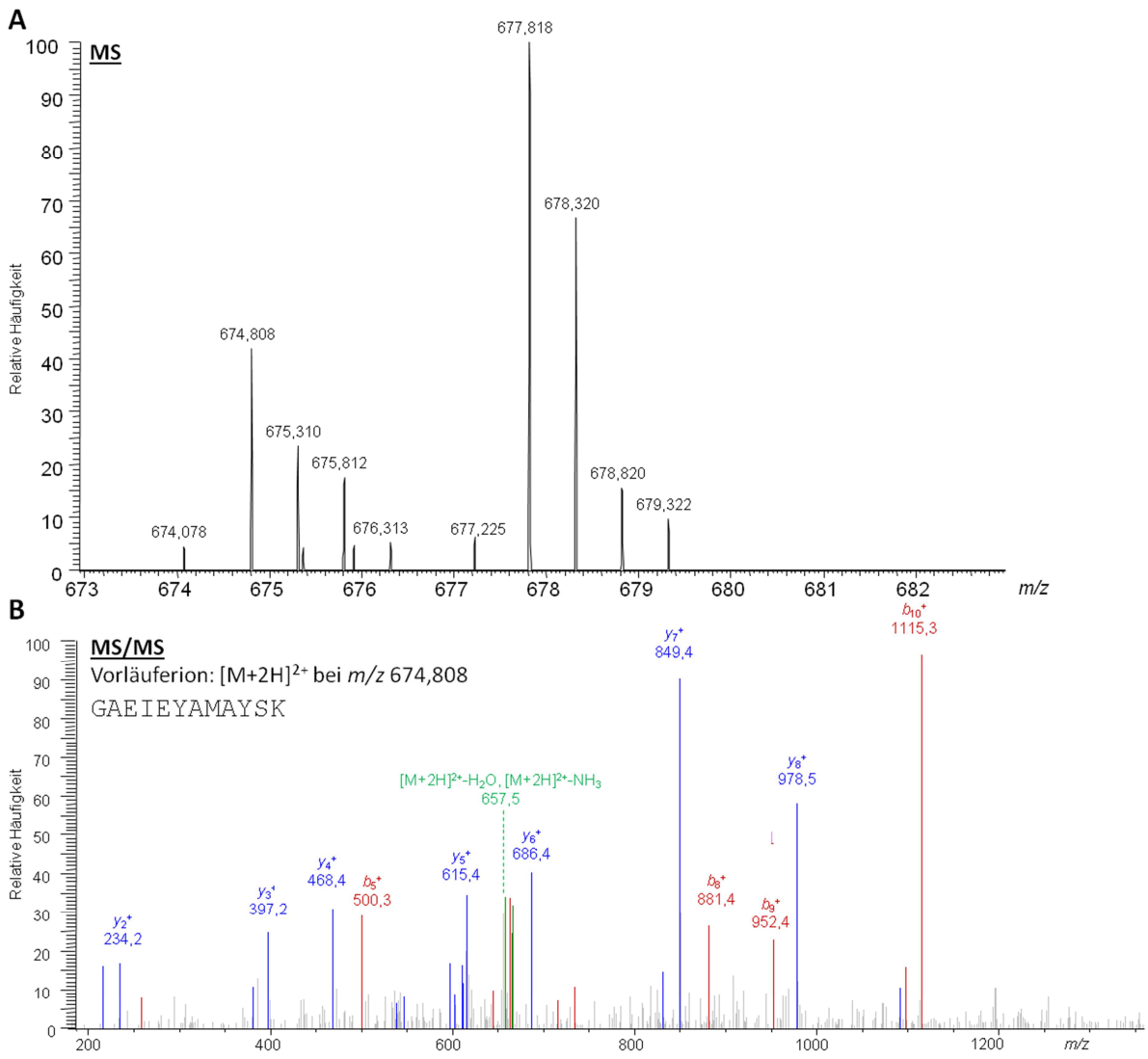

Abbildung A.3: ESI-Massenspektren eines MYDGF-Peptids.

*(**A**) Massenspektrum eines tryptischen Spaltpeptids (aus MYDGF), welche von „schweren“ PC9ER- (^{13}C-Arg, ^{13}C-Lys) und „leichten“ PC9-Zellen (^{12}C-Arg, ^{12}C-Lys) stammten. Das ausgewählte Isotopenmuster spiegelt ein S/L-Verhältnis von 2,2:1 wider. (**B**) Fragmentionenmassenspektrum eines Signals bei m/z 674,808 des MYDGF-Peptids GAEIEYAMAYSK.*

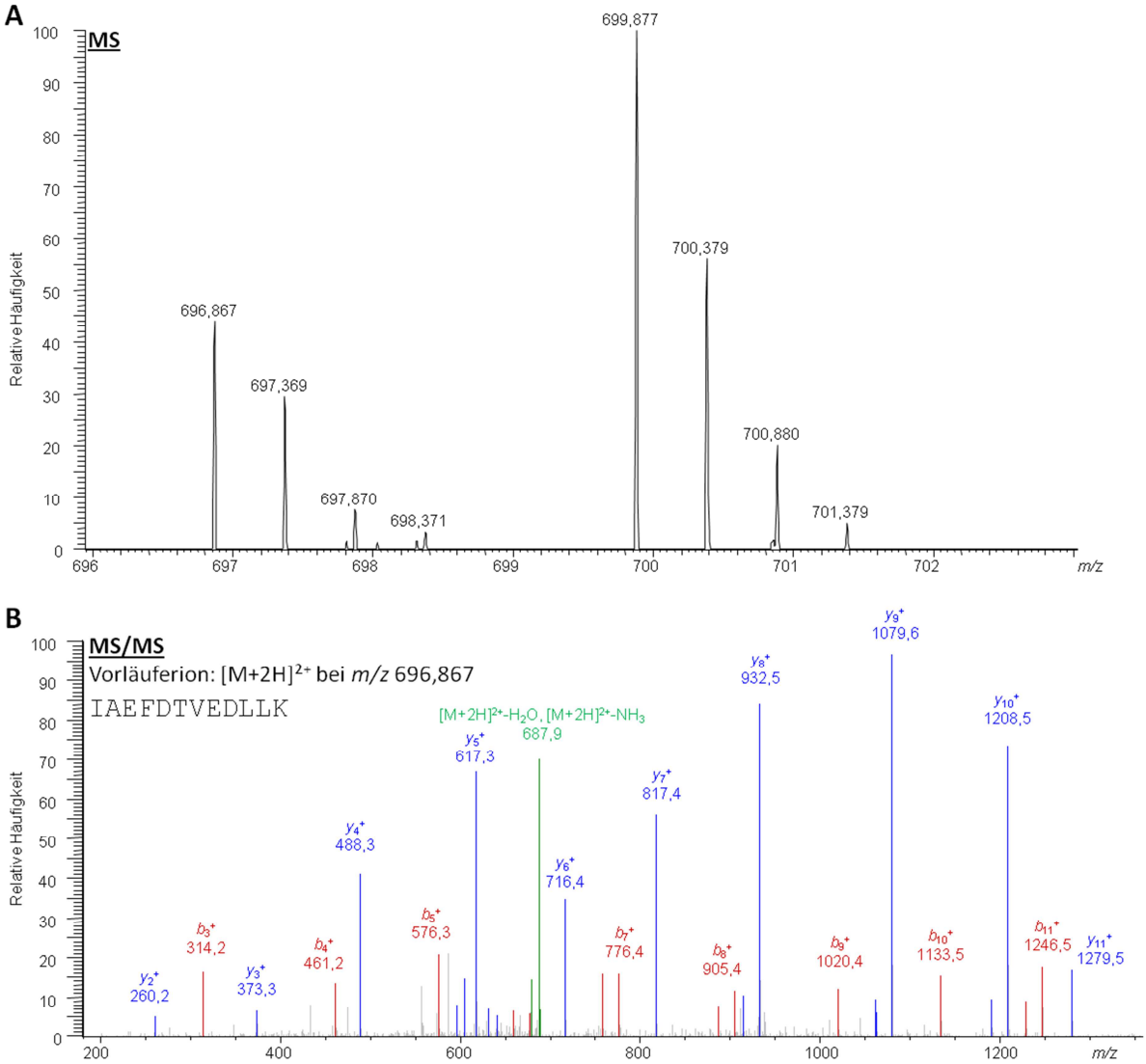

Abbildung A.4: ESI-Massenspektren eines PDGF-D-Peptids.

*(**A**) Massenspektrum eines tryptischen Spaltpeptids (aus PDGF-D), welche von „schweren“ PC9ER- (^{13}C-Arg, ^{13}C-Lys) und „leichten“ PC9-Zellen (^{12}C-Arg, ^{12}C-Lys) stammten. Das ausgewählte Isotopenmuster spiegelt ein S/L-Verhältnis von 2,2:1 wider. (**B**) Fragmentionenmassenspektrum eines Signals bei m/z 696,867 des PDGF-D-Peptids IAEFDTVEDLLK.*

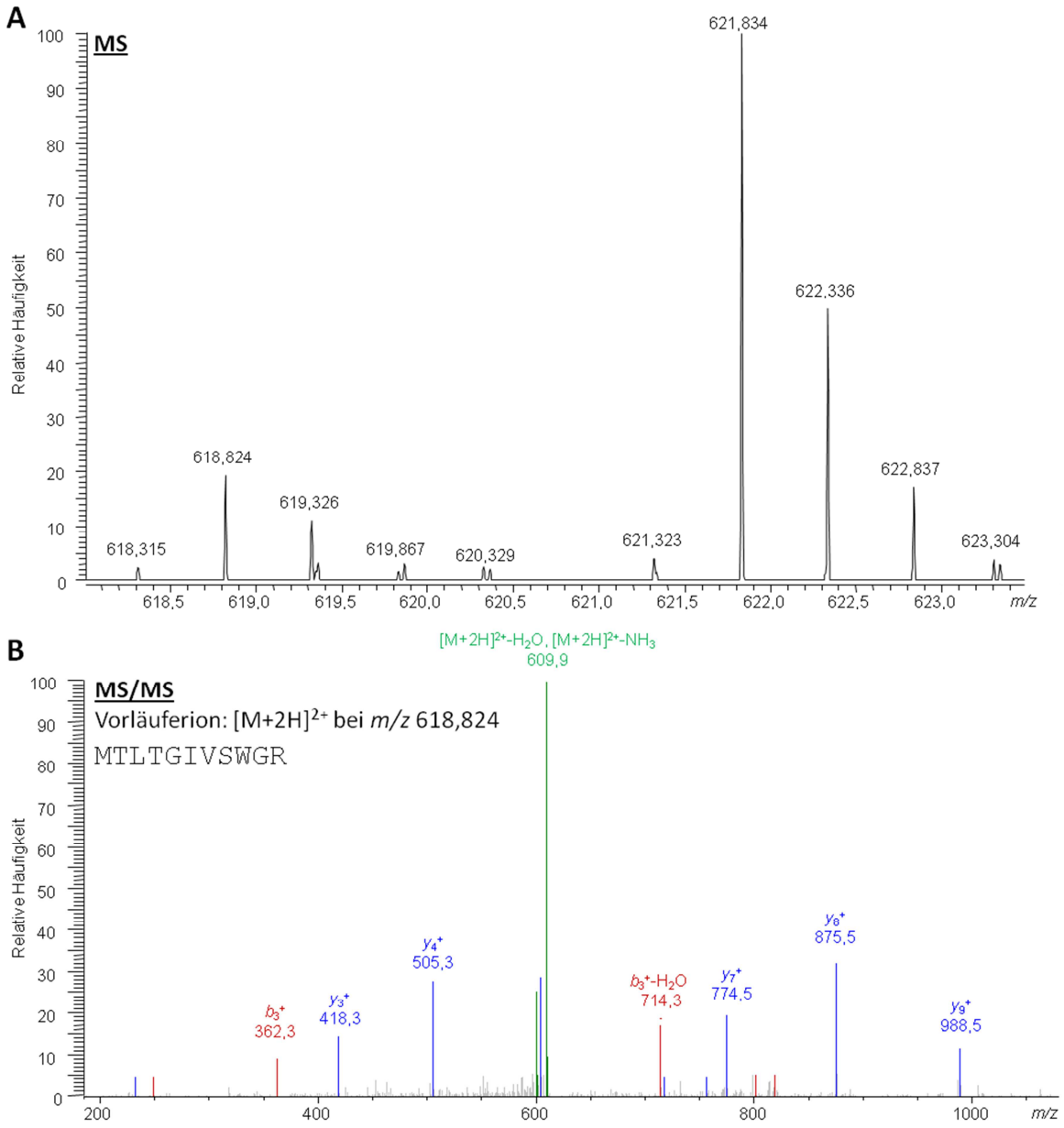

Abbildung A.5: ESI-Massenspektren eines u-PA-Peptids.

*(**A**) Massenspektrum eines tryptischen Spaltpeptids (aus u-PA), welche von „schweren“ PC9ER- (^{13}C-Arg, ^{13}C-Lys) und „leichten“ PC9-Zellen (^{12}C-Arg, ^{12}C-Lys) stammten. Das ausgewählte Isotopenmuster spiegelt ein S/L-Verhältnis von 5:1 wider. (**B**) Fragmentionenmassenspektrum eines Signals bei m/z 618,824 des u-PA-Peptids MTLTGIVSWGR.*

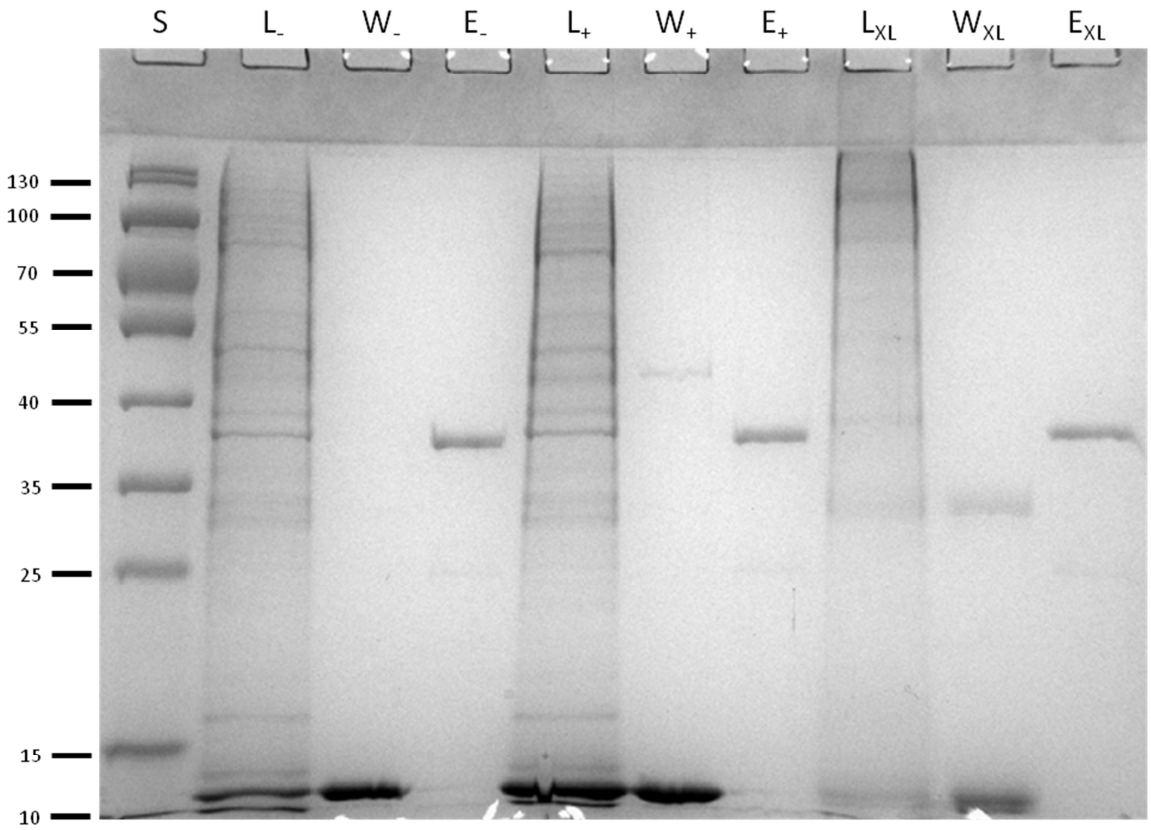

Abbildung A.6: T-PA(K2P)-PC9-Pulldown-Experiment — SDS-PAGE-Analyse.

Es wurden mehrere Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Zum Vergleich wurde Proteinstandard (S) aufgetragen. Es wurden die Ladefraktionen (L), die Waschfraktionen (W) und die Elutionsfraktionen (E) aufgetragen. Alle drei Ansätze des Pull-Down-Experimentes: (-) Kontrolle ohne t-PA und Quervernetzungsreagenz, (+) Kontrolle mit t-PA, aber ohne Quervernetzungsreagenz und Probe mit t-PA und mit Quervernetzungsreagenz (XL) sind gegenübergestellt.

Tabelle A.2: Anzahl einzigartiger Peptide– PC9, angereichert mit Quervernetzung.

Auflistung der Gennamen der angereicherten Proteine und ihrer Anzahl einzigartiger Peptide, welche im Vergleich zur Matrixkontrolle (-) in den Quervernetzungsexperimenten (XL) des t-PA(K2P)-Fusionsproteins mit PC9-Zellübeständen als angereichert identifiziert wurden. Zum Vergleich wurde die in den t-PA-Proben ohne Quervernetzungsreagenz (+) gefundene Anzahl einzigartiger Peptide angegeben. Dabei geben die Spaltennummerierungen 1-3 das jeweilige biologische Replikat mit je 2 (a und b) technischen Replikaten an. Das Zielprotein ist grau hinterlegt.

Genname	**Proteinname**	**# einzigartiger Peptide**																				
		(-)							**(+)**							**(XL)**						
		1a	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**	**1a**	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**	**1a**	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**
ABHD14B	Alpha/beta-Hydrolasedomäneenthaltendes Protein 14B	0	0	1	1	1	0	**1**	0	0	0	1	0	5	**1**	1	1	0	2	1	2	**1**
ACTN4	**Alpha-Aktinin-4**	3	0	10	9	1	5	**5**	1	1	5	2	1	25	**6**	15	7	32	30	14	12	**18**
C3	**Komplement C3**	4	0	2	2	4	3	**3**	2	2	2	3	5	9	**4**	4	3	9	12	7	8	**7**
CALU	Calumenin	0	2	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	6	**1**	0	0	3	4	2	1	**2**
CDCP1	CUB-Domäneenthaltendes Protein 1	0	2	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	6	**1**	0	0	3	0	2	1	**1**
CFD	**Komplementfaktor D**	3	0	3	3	5	6	**3**	2	3	3	2	6	9	**4**	5	7	8	9	9	8	**8**
CPPED1	Serin/Threonin-Proteinphosphatase CPPED1	0	0	2	2	2	0	**1**	0	0	1	1	0	6	**1**	1	1	2	2	1	1	**1**
FBLN1	**Fibulin-1**	1	0	2	2	2	3	**2**	4	1	2	2	3	3	**3**	6	6	3	4	3	3	**4**
FUCA2	Plasma alpha-L-Fukosidase	0	0	0	1	0	0	**0**	0	0	1	0	1	0	**0**	1	2	0	2	0	2	**1**
ISG15	Ubiquitinartiges Protein ISG15	0	0	1	2	1	1	**1**	1	1	2	1	1	1	**1**	1	1	2	2	1	1	**1**
LAMB3	**Laminin-332**	0	0	7	0	0	0	**1**	1	0	0	1	0	11	**2**	3	3	9	13	4	2	**6**
LGALS3BP	Galectin-3-bindendes Protein	3	0	3	3	2	2	**2**	1	2	3	3	1	3	**2**	3	2	3	4	1	2	**3**
OLFML3	**Olfaktomedinartiges Protein 3**	8	0	8	11	8	11	**8**	5	4	6	5	10	19	**8**	10	13	20	21	12	12	**15**
PAFAH1B3	Plättchenaktivierender-Faktor Acetylhydrolase IB Untereinheit γ	0	0	1	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	4	**1**	0	0	2	4	2	1	**2**
PLAT	**Plättchenstämmiger-Plasminogenaktivator (t-PA)**	1	0	1	0	4	1	**1**	42	37	40	38	28	26	**35**	33	31	22	25	21	15	**25**
QSOX1	**Quiescin-Sulfhydryloxidase 1**	29	0	26	28	25	25	**22**	26	25	22	26	24	37	**27**	37	30	34	36	29	29	**33**
RCN1	ABC-Transporter G Familienmitglied-5	0	0	1	1	0	1	**1**	0	1	0	0	0	2	**1**	1	3	3	2	0	0	**2**

Fortsetzung Tabelle A.2: Anzahl einzigartiger Peptide– PC9, angereichert mit Quervernetzung.

Genname	Proteinname	# einzigartiger Peptide																				
		(-)							(+)							(XL)						
		1a	1b	2a	2b	3a	3b	Ø	1a	1b	2a	2b	3a	3b	Ø	1a	1b	2a	2b	3a	3b	Ø
SRSF1	**Serin-/Argininreicher Splicingfaktor 1**	1	0	4	1	2	1	**2**	0	1	1	0	2	6	**2**	9	7	5	1	8	6	**6**
STC2	**Stanniocalcin-2**	8	0	8	8	8	9	**7**	6	12	4	4	5	15	**8**	9	12	9	8	9	9	**9**
TINAGL1	**Tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1**	10	0	17	16	10	11	**11**	10	11	14	12	8	12	**11**	19	21	23	22	16	10	**19**
TMEM132A	**Transmembranprotein 132A**	0	0	3	2	0	0	**1**	0	0	3	3	0	15	**4**	5	4	4	9	2	4	**5**
YBX3	**Y-Box-Bindeprotein 3**	3	0	5	5	3	2	**3**	3	6	3	1	4	5	**4**	5	5	4	5	5	4	**5**

Tabelle A.3: Anzahl einzigartiger Peptide – PC9, angereichert ohne Quervernetzung

Auflistung der Proteine und ihrer Anzahl einzigartiger Peptide, welche im Vergleich zur Matrixkontrolle (-) in den Experimenten ohne Quervernetzungsreagenz (+) des t-PA(K2P)-Fusionsproteins mit PC9-Zellübeständen als angereichert identifiziert wurden. Zum Vergleich wurde die in den t-PA-Proben mit Quervernetzungsreagenz (XL) gefundene Anzahl einzigartiger Peptide angegeben. Dabei geben die Spaltennummerierungen 1-3 das jeweilige biologische Replikat mit je 2 (a und b) technischen Replikaten an. Der grau hinterlegte Eintrag kennzeichnet das angereicherte Zielprotein.

Genname	**Proteinname**	**# einzigartiger Peptide**																				
		(-)							**(+)**							**(XL)**						
		1a	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**	**1a**	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**	**1a**	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**
ESYT1	Erweitertes Synaptotagmin-1	1	2	0	1	1	2	**1**	0	0	0	1	0	5	**1**	0	0	1	0	2	0	**1**
FIP1L1	Pre-mRNS 3`Ende-prozessierender Faktor FIP1	0	3	1	1	2	0	**1**	0	0	1	0	1	0	**0**	1	1	2	1	1	1	**1**
HSPA4L	Hitzeschock-70-kDa-Protein 4L	2	2	0	1	1	2	**1**	1	1	2	2	1	1	**1**	1	1	0	2	1	2	**1**
LGALS3BP	Galectin-3-bindendes Protein	3	0	3	3	2	2	**2**	1	2	3	3	1	3	**2**	3	2	3	4	1	2	**3**
NCKAP1	Nck-assoziiertes Protein 1	3	3	1	3	1	2	**2**	0	1	0	3	0	2	**1**	2	0	0	1	0	5	**1**
PLAT	**Plättchenstämmiger-Plasminogenaktivator**	1	0	1	0	4	1	**1**	42	37	40	38	28	26	**35**	33	31	22	25	21	15	**25**
RPS17L;RPS17	40S-ribosomales Protein S17	2	3	1	1	2	2	**2**	0	0	3	4	2	1	**2**	1	3	3	2	0	0	**2**

Tabelle A.4: Anzahl einzigartiger Peptide – PC9ER, angereichert mit Quervernetzung.

Auflistung der Anzahl einzigartiger Peptide für die im Vergleich zur Matrixkontrolle (-) in den Quervernetzungsexperimenten (XL) des t-PA(K2P)-Fusionsproteins mit PC9ER-Zellübeständen angereicherten Proteine. Zum Vergleich wurde die in den t-PA-Proben ohne Quervernetzungsreagenz (+) gefundene Anzahl einzigartiger Peptide angegeben. Dabei geben die Spaltennummerierungen 1-3 das jeweilige biologische Replikat mit je 2 (a und b) technischen Replikaten an. Das Zielprotein ist grau hinterlegt.

Genname	**Proteinname**	**# einzigartiger Peptide**																				
		(-)							**(+)**							**(XL)**						
		1a	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**	**1a**	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**	**1a**	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**
ACTN1	**Alpha-Aktinin-1**	5	5	1	0	0	1	**2**	7	11	1	0	2	0	**4**	9	12	13	10	5	8	**10**
ACTN4	**Alpha-Aktinin-4**	14	13	1	1	0	0	**5**	12	20	0	0	3	1	**6**	13	16	20	10	80	4	**24**
ANXA3	Annexin A3	1	1	0	0	0	1	**1**	2	3	0	0	1	0	**1**	1	5	1	1	1	1	**2**
ARG1	Arginase-1	1	1	0	1	1	0	**1**	1	2	2	0	3	1	**2**	2	2	3	2	1	2	**2**
AXIN1	Axin-1	0	0	0	1	0	0	**0**	0	0	1	0	1	0	**0**	1	2	0	2	0	2	**1**
CALR	Calretikulin	0	0	0	0	0	0	**0**	0	5	0	0	0	0	**1**	2	1	5	3	0	0	**2**
CASP14	Caspase-14	0	1	0	0	0	1	**0**	0	0	1	0	1	0	**0**	1	1	1	0	0	0	**1**
CAT	Katalase	1	0	2	2	2	3	**2**	4	1	2	2	3	3	**3**	2	1	3	4	1	3	**2**
CFD	**Komplementfaktor D**	5	5	2	1	2	2	**3**	6	6	3	3	0	2	**3**	9	9	8	7	5	3	**7**
CPPED1	Serin/Threonin-Proteinphosphatase CPPED1	1	1	1	1	1	1	**1**	1	3	1	1	1	0	**1**	3	4	1	1	1	1	**2**
EHD1	EH-Domäneenthaltendes Protein 1	0	0	1	0	0	0	**0**	0	2	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	0	**0**
FBLN1	**Fibulin-1**	2	2	2	2	2	1	**2**	3	2	4	3	2	2	**3**	5	2	3	4	3	5	**4**
FN1	Fibronektin	1	1	0	1	1	0	**1**	1	2	2	0	3	1	**2**	2	1	3	2	0	2	**2**
GPC1	Glypikan-1	0	0	2	2	0	1	**1**	0	0	1	1	2	0	**1**	2	1	1	2	2	1	**2**
GPI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase	0	0	0	0	0	0	**0**	0	1	0	0	1	0	**0**	2	2	5	3	1	0	**2**
JUP	Junction Plakoglobin	0	0	1	1	0	1	**1**	0	0	1	1	0	0	**0**	1	0	0	0	1	0	**0**
KRT2	Keratin, Typ II cytoskeletal 2 epidermal	4	4	3	3	2	1	**3**	2	4	1	1	2	1	**2**	4	4	4	3	4	3	**4**
LAMB3	**Laminin-332**	3	2	0	0	1	1	**1**	4	5	0	0	0	1	**2**	7	4	2	2	3	4	**4**

Fortsetzung Tabelle A.4: Anzahl einzigartiger Peptide – PC9ER, angereichert mit Quervernetzung.

Genname	Proteinname	# einzigartiger Peptide																				
		(-)							(+)							(XL)						
		1a	1b	2a	2b	3a	3b	Ø	1a	1b	2a	2b	3a	3b	Ø	1a	1b	2a	2b	3a	3b	Ø
LYPD3	Ly6/PLAUR-Domäneenthaltendes Protein 3	1	1	1	1	3	3	**2**	3	4	2	1	3	3	**3**	4	1	3	2	1	2	**2**
LYPD6B	Ly6/PLAUR-Domäneenthaltendes Protein 6B	1	1	1	1	1	1	**1**	1	1	1	1	1	1	**1**	1	1	2	1	1	2	**1**
NUMA1	Nukleäres Mitotischer-Apparat-Protein 1	2	1	0	1	2	0	**1**	1	0	0	1	0	3	**1**	0	1	1	2	1	1	**1**
PAFAH1B3	Plättchenaktivierender-Faktor Acetylhydrolase 1B Untereinheit γ	1	0	0	0	0	0	**0**	0	3	0	0	0	0	**1**	5	2	1	1	0	0	**2**
PLAT	**Plättchenstämmiger-Plasminogenaktivator (t-PA)**	5	3	3	3	1	1	**3**	33	32	29	32	33	29	**31**	19	18	24	22	24	25	**22**
QSOX1	**Quiescin-Sulfhydryloxidase 1**	29	26	19	17	20	17	**21**	32	34	18	19	20	20	**24**	27	26	29	27	32	23	**27**
RTFDC1	Protein-RTF2-Homolog	0	0	1	0	0	0	**0**	0	0	0	1	0	0	**0**	0	0	0	0	0	0	**0**
S100A8	Protein S100-A8	0	0	1	1	1	0	**1**	0	0	0	1	0	4	**1**	1	1	0	2	1	2	**1**
SDC4	**Syndecan 4**	8	0	8	11	8	11	**8**	5	4	6	5	10	19	**8**	16	13	20	21	14	17	**17**
SOD1	Superoxiddismutase [Cu-Zn]	0	0	0	0	0	0	**0**	1	3	1	1	1	0	**1**	4	3	4	2	2	1	**3**
SPP1	Osteopontin	2	5	3	1	6	4	**4**	3	7	2	1	1	4	**3**	3	1	1	2	6	3	**3**
STC2	**Stanniocalcin-2**	16	16	5	6	2	4	**8**	18	18	2	1	6	3	**8**	18	13	14	13	8	5	**12**
TINAGL1	**Tubulointerstitielle Nephritis Antigenartiges Protein 1**	16	16	9	7	8	9	**11**	13	12	3	5	8	8	**8**	18	18	14	11	13	13	**15**
VASN	Vasorin	0	2	0	0	0	0	**0**	0	1	0	0	0	0	**0**	3	4	3	1	0	0	**2**
VWA1	von-Willebrandfaktor-A-Domäneenthaltendes Protein 1	3	1	3	3	2	2	**2**	4	8	2	2	2	2	**3**	1	3	6	5	1	2	**3**
YBX3	**Y-Box-Bindeprotein 3**	0	0	0	2	0	1	**1**	3	2	7	4	5	3	**4**	3	4	5	3	7	6	**5**

Tabelle A.5: Anzahl einzigartiger Peptide – PC9ER, angereichert ohne Quervernetzung.

Auflistung der Proteine und ihrer Anzahl einzigartiger Peptide, welche im Vergleich zur Matrixkontrolle (-) in den Experimenten ohne Quervernetzungsreagenz (+) des t-PA(K2P)-Fusionsproteins mit PC9ER-Zellübeständen als angereichert identifiziert wurden. Zum Vergleich wurde die in den t-PA-Proben mit Quervernetzungsreagenz (XL) gefundene Anzahl einzigartiger Peptide angegeben. Dabei geben die Spaltennummerierungen 1-3 das jeweilige biologische Replikat mit je 2 (a und b) technischen Replikaten an. Der grau hinterlegte Eintrag kennzeichnet das angereicherte Zielprotein.

Genname	**Proteinname**	**# einzigartiger Peptide**																				
		(-)							**(+)**							**(XL)**						
		1 a	**1 b**	**2 a**	**2 b**	**3 a**	**3 b**	**Ø**	**1a**	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**	**1a**	**1b**	**2a**	**2b**	**3a**	**3b**	**Ø**
PLAT	**Plättchenstämmiger-Plasminogenaktivator (t-PA)**	5	3	3	3	1	1	**3**	33	32	29	32	33	29	**31**	19	18	24	22	24	25	**22**
PRDM7	Mutmaßliche Histon-Lysin-N-Methyltransferase PRDM7	2	2	0	1	3	1	**2**	2	1	2	1	1	2	**2**	1	1	0	2	1	2	**1**
PXDN	Peroxidasehomolog	1	3	2	5	1	1	**2**	3	1	0	2	2	2	**2**	4	1	2	1	0	3	**2**
SUCLG1	Succinyl-CoA-Ligase[ADP/GDP-formierend]-Untereinheit α	1	1	1	1	1	1	**1**	1	1	2	1	2	2	**2**	2	2	1	2	1	1	**2**
TNFRSF21	Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilienmitglied 21	2	1	3	1	3	2	**2**	2	3	0	1	3	0	**2**	2	2	4	1	1	0	**2**
YBX3	Y-Box-Bindeprotein 3	0	0	0	2	0	1	**1**	3	2	7	4	5	3	**4**	3	4	5	3	7	6	**5**

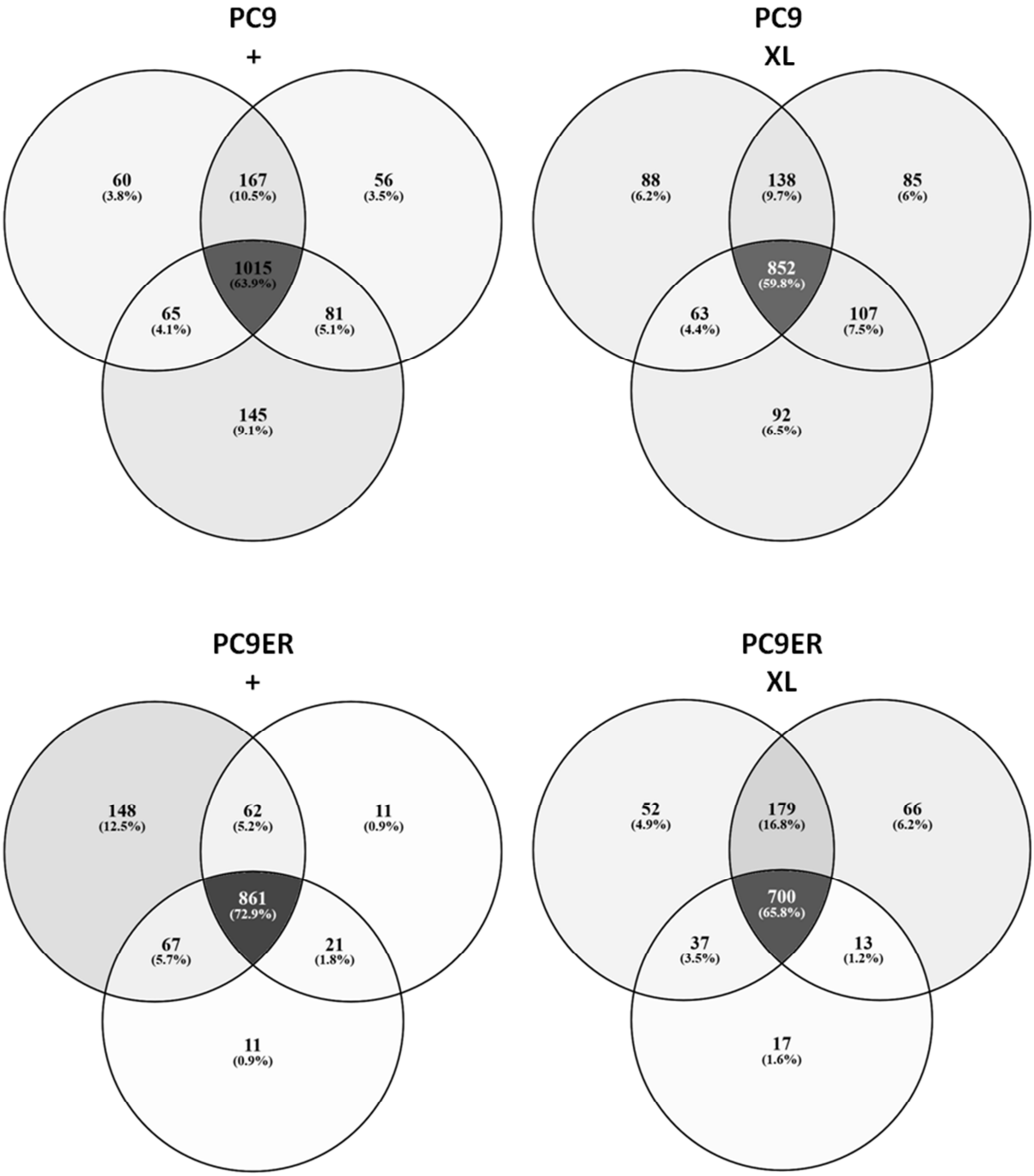

Abbildung A.7: Venn-Diagramme der Pulldown-Experimente.

Oben: Venn-Diagramme der identifizierten Proteine der Positivkontrollen (+) und der Quervernetzungsansätze (XL) für die drei biologischen Replikate der PC9-Zellen. Unten: Venn-Diagramme der identifizierten Proteine der Positivkontrollen (+) und der Quervernetzungsansätze (XL) für die drei biologischen Replikate der PC9ER-Zellen.

Literaturreferenzen

[1] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., *et al.*, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2015.

[2] Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., *et al.*, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 2013.

[3] Duffy, M. J., O'Grady, P., Devaney, D., O'Siorain, L., *et al.*, Tissue-type plasminogen activator, a new prognostic marker in breast cancer. *Cancer research* 1988.

[4] Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., Haber, D. A., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews. Cancer* 2007.

[5] Heidtmann, H. H., Hofmann, M., Jacob, E., Erbil, C., *et al.*, Synthesis and secretion of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in cell lines of different groups of human lung tumors. *Cancer research* 1989.

[6] Razik, E., Kobierzycki, C., Grzegrzolka, J., Podhorska-Okolow, M., *et al.*, Plasminogen Activation System in Rectal Adenocarcinoma. *Anticancer research* 2015.

[7] Piotrowska, Z., Sequist, L. V., Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Cancer: New Drugs, New Resistance Mechanisms, and Future Treatment Options. *Cancer Journal* 2015.

[8] Yarden, Y., The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European journal of cancer* 2001.

[9] Yarden, Y., Shilo, B. Z., SnapShot: EGFR signaling pathway. *Cell* 2007.

[10] Shostak, K., Chariot, A., EGFR and NF-kappaB: partners in cancer. *Trends in molecular medicine* 2015.

[11] Fukui, T., Mitsudomi, T., Mutations in the epidermal growth factor receptor gene and effects of EGFR-tyrosine kinase inhibitors on lung cancers. *General thoracic and cardiovascular surgery* 2008.

[12] Berg, M., Soreide, K., EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discovery Medicine* 2012.

[13] Russo, A., Franchina, T., Ricciardi, G. R., Picone, A., *et al.*, A decade of EGFR inhibition in EGFR-mutated non small cell lung cancer (NSCLC): Old successes and future perspectives. *Oncotarget* 2015.

[14] Nguyen, K. S., Neal, J. W., Wakelee, H., Review of the current targeted therapies for non-small-cell lung cancer. *World journal of clinical oncology* 2014.

[15] Hata, Y., Takai, Y., Takahashi, H., Takagi, K., *et al.*, Complete response of 7 years' duration after chemoradiotherapy followed by gefitinib in a patient with intramedullary spinal cord metastasis from lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic disease* 2013.

[16] Massarelli, E., Varella-Garcia, M., Tang, X., Xavier, A. C., *et al.*, KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007.

[17] Mulloy, R., Ferrand, A., Kim, Y., Sordella, R., *et al.*, Epidermal growth factor receptor mutants from human lung cancers exhibit enhanced catalytic activity and increased sensitivity to gefitinib. *Cancer research* 2007.

[18] Ng, K. P., Hillmer, A. M., Chuah, C. T., Juan, W. C., *et al.*, A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* 2012.

[19] Wilson, T. R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., *et al.*, Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012.

[20] Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., *et al.*, Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012.

[21] Kentsis, A., Reed, C., Rice, K. L., Sanda, T., *et al.*, Autocrine activation of the MET receptor tyrosine kinase in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2012.

[22] Pao, W., Chmielecki, J., Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nature reviews. Cancer* 2010.

[23] Chong, C. R., Janne, P. A., The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med* 2013.

[24] Sos, M. L., Koker, M., Weir, B. A., Heynck, S., *et al.*, PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer research* 2009.

[25] Ludovini, V., Bianconi, F., Pistola, L., Chiari, R., *et al.*, Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2011.

[26] Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., *et al.*, MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007.

[27] Guix, M., Faber, A. C., Wang, S. E., Olivares, M. G., *et al.*, Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *The Journal of clinical investigation* 2008.

[28] Zhou, B. B., Peyton, M., He, B., Liu, C., *et al.*, Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer cell* 2006.

[29] Lin, Y., Wang, X., Jin, H., EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies. *American journal of cancer research* 2014.

[30] Nicholl, S. M., Roztocil, E., Davies, M. G., Plasminogen activator system and vascular disease. *Current vascular pharmacology* 2006.

[31] McMahon, B., Kwaan, H. C., The Plasminogen Activator System and Cancer. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 2007.

[32] Gurman, P., Miranda, O. R., Nathan, A., Washington, C., *et al.*, Recombinant Tissue Plasminogen Activators (rtPA): A Review. *Clin Pharmacol Ther* 2015.

[33] Cesarman-Maus, G., Hajjar, K. A., Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology* 2005.

[34] Castellino, F. J., Ploplis, V. A., Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thrombosis and haemostasis* 2005.

[35] Kunamneni, A., Abdelghani, T. T., Ellaiah, P., Streptokinase--the drug of choice for thrombolytic therapy. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 2007.

[36] Flemmig, M., Melzig, M. F., Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis. *J Pharm Pharmacol* 2012.

[37] Rijken, D. C., Wijngaards, G., Zaaldejong, M., Welbergen, J., Purification and Partial Characterization of Plasminogen Activator from Human Uterine Tissue. *Biochimica et biophysica acta* 1979.

[38] Rijken, D. C., Wijngaards, G., Welbergen, J., Relationship between Tissue Plasminogen-Activator and the Activators in Blood and Vascular Wall. *Thrombosis research* 1980.

[39] Docagne, F., Parcq, J., Lijnen, R., Ali, C., Vivien, D., Understanding the Functions of Endogenous and Exogenous Tissue-Type Plasminogen Activator During Stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2015.

[40] Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., *et al.*, Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli. *Nature* 1983.

[41] Matsuo, O., Rijken, D. C., Collen, D., Thrombolysis by human tissue plasminogen activator and urokinase in rabbits with experimental pulmonary embolus. *Nature* 1981.

[42] van Zonneveld, A. J., Veerman, H., Pannekoek, H., On the interaction of the finger and the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. Inhibition of kringle-2 binding to fibrin by epsilon-amino caproic acid. *The Journal of biological chemistry* 1986.

[43] Emeis, J. J., Regulation of the acute release of tissue-type plasminogen activator from the endothelium by coagulation activation products. *Ann N Y Acad Sci* 1992.

[44] Oliver, J. J., Webb, D. J., Newby, D. E., Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005.

[45] Shi, G. Y., Hau, J. S., Wang, S. J., Wu, I. S., *et al.*, Plasmin and the regulation of tissue-type plasminogen activator biosynthesis in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 1992.

[46] Renatus, M., Engh, R. A., Stubbs, M. T., Huber, R., *et al.*, Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *The EMBO journal* 1997.

[47] Collen, D., Stump, D. C., Gold, H. K., Thrombolytic Therapy. *Annu Rev Med* 1988.

[48] Kruithof, E. K., Dunoyer-Geindre, S., Human tissue-type plasminogen activator. *Thrombosis and haemostasis* 2014.

[49] Melchor, J. P., Strickland, S., Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thrombosis and haemostasis* 2005.

[50] Ortolano, S., Spuch, C., tPA in the central nervous system: relations between tPA and cell surface LRPs. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery* 2013.

[51] Akassoglou, K., Kombrinck, K. W., Degen, J. L., Strickland, S., Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *The Journal of cell biology* 2000.

[52] Jiang, X., Wang, Y., Hand, A. R., Gillies, C., *et al.*, Storage and release of tissue plasminogen activator by sympathetic axons in resistance vessel walls. *Microvascular research* 2002.

[53] Wang, Y., Jiang, X., Hand, A. R., Gilles, C., *et al.*, Additional evidence that the sympathetic nervous system regulates the vessel wall release of tissue plasminogen activator. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 2002.

[54] Chernicky, C. L., Yi, L., Tan, H., Ilan, J., Tissue-type plasminogen activator is upregulated in metastatic breast cancer cells exposed to insulin-like growth factor-I. *Clinical breast cancer* 2005.

[55] Gotze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., *et al.*, StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2012.

[56] Nielsen, V. G., Matika, R. W., Ley, M. L., Waer, A. L., *et al.*, Tissue-type plasminogen activator-induced fibrinolysis is enhanced in patients with breast, lung, pancreas and colon cancer. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 2014.

[57] Verheijen, J. H., Nieuwenhuizen, W., Wijngaards, G., Activation of plasminogen by tissue activator is increased specifically in the presence of certain soluble fibrin(ogen) fragments. *Thrombosis research* 1982.

[58] Gross, J. A., *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch.*, Springer, Berlin Heidelberg 2013.

[59] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M., Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 1989.

[60] Karas, M., Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 1988.

[61] Baldwin, M. A., Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered. *Mol Cell Proteomics* 2004.

[62] Aebersold, R., Goodlett, D. R., Mass spectrometry in proteomics. *Chemical reviews* 2001.

[63] Yates, J. R., Ruse, C. I., Nakorchevsky, A., Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual review of biomedical engineering* 2009.

[64] Horning, E. C., Horning, M. G., Carroll, D. I., Dzidic, I., Stillwel.Rn, New Picogram Detection System Based on a Mass-Spectrometer with an External Ionization Source at Atmospheric-Pressure. *Analytical Chemistry* 1973.

[65] Yamashita, M., Fenn, J. B., Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. *J Phys Chem-Us* 1984.

[66] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Molecular Beams of Macroions. *J Chem Phys* 1968.

[67] Taylor, G., Disintegration of Water Drops in Electric Field. *Proc R Soc Lon Ser-A* 1964.

[68] Kebarle, P., Tang, L., From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* 1993.

[69] Nemes, P., Marginean, I., Vertes, A., Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays. *Analytical Chemistry* 2007.

[70] Rayleigh, L., On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses Charged With Electricity. *London, Edinburgh, Dublin Phil Mag J Sci* 1882.

[71] Konermann, L., A Simple Model for the Disintegration of Highly Charged Solvent Droplets during Electrospray Ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2009,.

[72] Mack, L. L., Kralik, P., Rheude, A., Dole, M., Molecular Beams of Macroions .2. *J Chem Phys* 197.

[73] Thomson, B. A., Iribarne, J. V., Field-Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric-Pressure. *J Chem Phys* 1979.

[74] Iribarne, J. V., Thomson, B. A., Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *J Chem Phys* 1976.

[75] Lottspeich, F. u. Z., H., *Bioanalytik. 1. Auflage,*, Spektrum Akad Verl, Heidelberg 1998.

[76] Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Baischun, W., *et al.*, Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry* 2006.

[77] Senko, M. W., Remes, P. M., Canterbury, J. D., Mathur, R., *et al.*, Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates. *Analytical Chemistry* 2013.

[78] Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., *et al.*, The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry : JMS* 2005.

[79] Kingdon, K. H., A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Phys. Rev.* 1923.

[80] Levsen k., S. H., Collisonal activation mass-spectrometry - a new probe for determining the structure of ions in the gas phase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1976.

[81] Mclafferty, F. W., Kornfeld, R., Haddon, W. F., Levsen, K., *et al.*, Application of Collisional Activation Spectra to Elucidation of Organic Ion Structures. *J Am Chem Soc* 1973.

[82] Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., *et al.*, Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nature Methods* 2007.

[83] Syka, J. E., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004.

[84] Wiesner, J., Premsler, T., Sickmann, A., Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics* 2008.

[85] Roepstorff, P., Fohlman, J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry* 1984.

[86] Biemann, K., Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomedical & environmental mass spectrometry* 1988.

[87] Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M., Kuster, B., Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem* 2012.

[88] Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B., Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2007.

[89] Chen, X., Wei, S., Ji, Y., Guo, X., Yang, F., Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics* 2015.

[90] Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., *et al.*, Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002.

[91] Kruger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievessen, I., *et al.*, SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 2008.

[92] Ong, S. E., Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* 2005.

[93] Sury, M. D., Chen, J. X., Selbach, M., The SILAC Fly Allows for Accurate Protein Quantification in Vivo. *Mol Cell Proteomics* 2010.

[94] Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J. R., Mann, M., Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nature Methods* 2010.

[95] Geiger, T., Wisniewski, J. R., Cox, J., Zanivan, S., *et al.*, Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics. *Nat Protoc* 2011.

[96] Sinz, A., Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass spectrometry reviews* 2006.

[97] Garman, E. F., Developments in x-ray crystallographic structure determination of biological macromolecules. *Science* 2014.

[98] Marion, D., An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol Cell Proteomics* 2013.

[99] Borek, F., A new two-stage method for cross-linking proteins. *Nature* 1961.

[100] Sinz, A., Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *Journal of mass spectrometry : JMS* 2003.

[101] Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Elsvier LTD, Oxford 2013.

[102] LeDuc, R. D., Taylor, G. K., Kim, Y. B., Januszyk, T. E., *et al.*, ProSight PTM: an integrated environment for protein identification and characterization by top-down mass spectrometry. *Nucleic acids research* 2004.

[103] Zamdborg, L., LeDuc, R. D., Glowacz, K. J., Kim, Y. B., *et al.*, ProSight PTM 2.0: improved protein identification and characterization for top down mass spectrometry. *Nucleic acids research* 2007.

[104] Herzog, F., Kahraman, A., Boehringer, D., Mak, R., *et al.*, Structural probing of a protein phosphatase 2A network by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Science* 2012.

[105] Sambrook, J., and Russell, D. W., Molecular cloning: A laboratory manual. 2001.

[106] Rudolph, R., Lilie, H., In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1996.

[107] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976.

[108] Verheijen, J. H., Mullaart, E., Chang, G. T., Kluft, C., Wijngaards, G., A simple, sensitive spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma. *Thrombosis and haemostasis* 1982.

[109] Kohnert, U., Rudolph, R., Verheijen, J. H., Weening-Verhoeff, E. J., *et al.*, Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022. *Protein engineering* 1992.

[110] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970.

[111] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988.

[112] Simpson, R. J., Rapid coomassie blue staining of protein gels. *Cold Spring Harbor protocols* 2010.

[113] Ong, S. E., Mann, M., A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* 2006.

[114] Lee, H. J., Im, H., Soluble Expression and Purification of Human Tissue-type Plasminogen Activator Protease Domain. *B Korean Chem Soc* 2010.

[115] Korf-Klingebiel, M., Reboll, M. R., Klede, S., Brod, T., *et al.*, Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat Med* 2015.

[116] Tulin, E. E., Onoda, N., Nakata, Y., Maeda, M., *et al.*, SF20/IL-25, a novel bone marrow stroma-derived growth factor that binds to mouse thymic shared antigen-1 and supports lymphoid cell proliferation (Retracted Article. See vol 170, pg 1593, 2003). *J Immunol* 2001.

[117] Tulin, E. E. e. a., Letter of retraction. *J Immunol* 2003.

[118] Wang, P., Mariman, E., Keijer, J., Bouwman, F., *et al.*, Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2004.

[119] Weiler, T., Du, Q. J., Krokhin, O., Ens, W., *et al.*, The identification and characterization of a novel protein, c19orf10, in the synovium. *Arthritis Res Ther* 2007.

[120] Bailey, M. J., Lacey, D. C., de Kok, B. V., Veith, P. D., *et al.*, Extracellular proteomes of M-CSF (CSF-1) and GM-CSF-dependent macrophages. *Immunology and cell biology* 2011.

[121] Cohen, S., Carpenter, G., King, L., Jr., Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *The Journal of biological chemistry* 1980.

[122] Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C., Chinkers, M., A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *The Journal of biological chemistry* 1982.

[123] Cohen, S., Fava, R. A., Sawyer, S. T., Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982.

[124] Cohen, S., Carpenter, G., King, L., Jr., Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. *Progress in clinical and biological research* 1981.

[125] Sporn, M. B., Todaro, G. J., Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *The New England journal of medicine* 1980.

[126] Lo, H. W., EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. *Current molecular pharmacology* 2010.

[127] Lo, H. W., Hung, M. C., Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *British journal of cancer* 2006.

[128] Han, W., Lo, H. W., Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer letters* 2012.

[129] van den Bent, M. J., Brandes, A. A., Rampling, R., Kouwenhoven, M. C., *et al.*, Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009.

[130] Brand, T. M., Iida, M., Wheeler, D. L., Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer biology & therapy* 2011.

[131] Reardon, D. A., Desjardins, A., Vredenburgh, J. J., Gururangan, S., *et al.*, Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *Journal of neuro-oncology* 2010.

[132] Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., *et al.*, EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004.

[133] Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., *et al.*, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* 2004.

[134] Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., *et al.*, Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 2010.

[135] Nguyen, K. S., Neal, J. W., First-line treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer: the role of erlotinib and other tyrosine kinase inhibitors. *Biologics : targets & therapy* 2012.

[136] Bonanno, L., Jirillo, A., Favaretto, A., Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and new therapeutic perspectives in non small cell lung cancer. *Current drug targets* 2011.

[137] Nguyen, K. S., Kobayashi, S., Costa, D. B., Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clinical lung cancer* 2009.

[138] Lo, H. W., EGFR-targeted Cancer Therapy: Promise, Problems and Potential Solutions. *Translational Medicine* 2011.

[139] Reigstad, L. J., Varhaug, J. E., Lillehaug, J. R., Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *Febs J* 2005.

[140] Wang, Z., Ahmad, A., Li, Y., Kong, D., *et al.*, Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression. *Biochimica et biophysica acta* 2010.

[141] Zhuo, Y., Zhang, J., Laboy, M., Lasky, J. A., Modulation of PDGF-C and PDGF-D expression during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol-Lung C* 2004.

[142] Bergsten, E., Uutela, M., Li, X. R., Pietras, K., *et al.*, PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 2001.

[143] LaRochelle, W. J., Jeffers, M., McDonald, W. F., Chillakuru, R. A., *et al.*, PDGFD, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol* 2001.

[144] Ustach, C. V., Taube, M. E., Hurst, N. J., Bhagat, S., *et al.*, A potential oncogenic activity of platelet-derived growth factor D in prostate cancer progression. *Cancer research* 2004.

[145] Ustach, C. V., Kim, H. R. C., Platelet-derived growth factor D is activated by urokinase plasminogen activator in prostate carcinoma cells. *Molecular and cellular biology* 2005.

[146] Wang, Z. W., Kong, D. J., Banerjee, S., Li, Y. W., *et al.*, Down-regulation of platelet-derived growth factor-D inhibits cell growth and angiogenesis through inactivation of notch-1 and nuclear factor kappa B signaling. *Cancer research* 2007.

[147] Xu, L., Tong, R., Cochran, D. M., Jain, R. K., Blocking platelet-derived growth factor-D/platelet-derived growth factor receptor beta signaling inhibits human renal cell carcinoma progression in an orthotopic mouse model. *Cancer research* 2005.

[148] Schafer, B. M., Maier, K., Eickhoff, U., Todd, R. F., Kramer, M. D., Plasminogen Activation in Healing Human Wounds. *American Journal of Pathology* 1994.

[149] McMahon, B., Kwaan, H. C., The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 2008.

[150] Kroon, M. E., Koolwijk, P., van der Vecht, B., van Hinsbergh, V. W. M., Urokinase receptor expression on human microvascular endothelial cells is increased by hypoxia: implications for capillary-like tube formation in a fibrin matrix. *Blood* 2000.

[151] Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L., Duffy, M. J., The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *International Journal of Cancer* 1997.

[152] Chapman, H. A., Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 1997.

[153] Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., *et al.*, Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapy. *Thrombosis and haemostasis* 1997.

[154] Petersen, L. C., Lund, L. R., Nielsen, L. S., Dano, K., Skriver, L., One-Chain Urokinase-Type Plasminogen-Activator from Human Sarcoma-Cells Is a Proenzyme with Little or No Intrinsic Activity. *Journal of Biological Chemistry* 1988.

[155] Ellis, V., Pyke, C., Eriksen, J., Solberg, H., Dano, K., The Urokinase Receptor - Involvement in Cell-Surface Proteolysis and Cancer Invasion. *Ann Ny Acad Sci* 1992.

[156] Andreasen, P. A., Georg, B., Lund, L. R., Riccio, A., Stacey, S. N., Plasminogen-Activator Inhibitors - Hormonally Regulated Serpins. *Molecular and cellular endocrinology* 1990.

[157] Duffy, M. J., Urokinase-Type Plasminogen-Activator and Malignancy. *Fibrinolysis* 1993.

[158] Malinowsky, K., Wolff, C., Berg, D., Schuster, T., *et al.*, uPA and PAI-1-Related Signaling Pathways Differ between Primary Breast Cancers and Lymph Node Metastases. *Translational oncology* 2012.

[159] Gorantla, B., Asuthkar, S., Rao, J. S., Patel, J., Gondi, C. S., Suppression of the uPAR-uPA system retards angiogenesis, invasion, and in vivo tumor development in pancreatic cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* 2011.

[160] Salden, M., Splinter, T. A. W., Peters, H. A., Look, M. P., *et al.*, The urokinase-type plasminogen activator system in resected non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 2000.

[161] Tong, Y., Yue, J., Mao, M., Liu, Q. Q., *et al.*, Recombinant nematode anticoagulant protein c2 inhibits cell invasion by decreasing uPA expression in NSCLC cells. *Oncol Rep* 2015.

[162] Asuthkar, S., Stepanova, V., Lebedeva, T., Holterman, A. L., *et al.*, Multifunctional roles of urokinase plasminogen activator (uPA) in cancer stemness and chemoresistance of pancreatic cancer. *Molecular biology of the cell* 2013.

[163] Muller, D. R., Schindler, P., Towbin, H., Wirth, U., *et al.*, Isotope-tagged cross-linking reagents. A new tool in mass spectrometric protein interaction analysis. *Analytical Chemistry* 2001.

[164] Seebacher, J., Mallick, P., Zhang, N., Eddes, J. S., *et al.*, Protein cross-linking analysis using mass spectrometry, isotope-coded cross-linkers, and integrated computational data processing. *J Proteome Res* 2006.

[165] Muller, M. Q., Dreiocker, F., Ihling, C. H., Schafer, M., Sinz, A., Cleavable cross-linker for protein structure analysis: reliable identification of cross-linking products by tandem MS. *Analytical Chemistry* 2010.

[166] Feng, L., Yao, C., Li, P., Feng, Y., *et al.*, Low expression of fibulin-1 correlates with unfavorable prognosis in gastric cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2016.

[167] Lin, K., He, S., He, L., Chen, J., *et al.*, Complement component 3 is a prognostic factor of nonsmall cell lung cancer. *Molecular medicine reports* 2014.

[168] Lek, M., North, K. N., Are biological sensors modulated by their structural scaffolds? The role of the structural muscle proteins alpha-actinin-2 and alpha-actinin-3 as modulators of biological sensors. *FEBS Letters* 2010.

[169] Wang, M. C., Chang, Y. H., Wu, C. C., Tyan, Y. C., *et al.*, Alpha-actinin 4 is associated with cancer cell motility and is a potential biomarker in non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology* 2015.

[170] Honda, K., The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell & bioscience* 2015.

[171] Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G., Chu, M. L., Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2003.

[172] Kostka, G., Giltay, R., Bloch, W., Addicks, K., *et al.*, Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice. *Molecular and cellular biology* 2001.

[173] Yang, X. H., Flores, L. M., Li, Q., Zhou, P., *et al.*, Disruption of laminin-integrin-CD151-focal adhesion kinase axis sensitizes breast cancer cells to ErbB2 antagonists. *Cancer research* 2010.

[174] Govaere, O., Wouters, J., Petz, M., Vandewynckel, Y. P., *et al.*, Laminin-332 sustains chemoresistance and quiescence as part of the human hepatic cancer stem cell niche. *Journal of hepatology* 2016.

[175] Giannelli, G., Azzariti, A., Fransvea, E., Porcelli, L., *et al.*, Laminin-5 offsets the efficacy of gefitinib ('Iressa') in hepatocellular carcinoma cells. *British journal of cancer* 2004.

[176] Tani, T., Lumme, A., Linnala, A., Kivilaakso, E., *et al.*, Pancreatic carcinomas deposit laminin-5, preferably adhere to laminin-5, and migrate on the newly deposited basement membrane. *The American journal of pathology* 1997.

[177] Pyke, C., Salo, S., Ralfkiaer, E., Romer, J., *et al.*, Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer research* 1995.

[178] Fukazawa, S., Shinto, E., Tsuda, H., Ueno, H., *et al.*, Laminin beta3 expression as a prognostic factor and a predictive marker of chemoresistance in colorectal cancer. *Japanese journal of clinical oncology* 2015.

[179] Ilani, T., Alon, A., Grossman, I., Horowitz, B., *et al.*, A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. *Science* 2013.

[180] Lake, D. F., Faigel, D. O., The emerging role of QSOX1 in cancer. *Antioxidants & redox signaling* 2014.

[181] Araujo, D. G., Nakao, L., Gozzo, P., Souza, C. D., *et al.*, Expression level of quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) in neuroblastomas. *European journal of histochemistry : EJH* 2014.

[182] Katchman, B. A., Ocal, I. T., Cunliffe, H. E., Chang, Y. H., *et al.*, Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2013,.

[183] Wang, Z., Kong, D., Li, Y., Sarkar, F. H., PDGF-D signaling: a novel target in cancer therapy. *Current drug targets* 2009.

[184] Igarashi, T., Tajiri, Y., Sakurai, M., Sato, E., *et al.*, Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 is expressed in extraembryonic tissues and interacts with laminin 1 in the Reichert membrane at postimplantation in the mouse. *Biology of reproduction* 2009.

[185] Sakurai, M., Sato, Y., Mukai, K., Suematsu, M., *et al.*, Distribution of tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 and structural matrix proteins in mouse embryos during preimplantation development in vivo and in vitro. *Zygote* 2014.

[186] Tajiri, Y., Igarashi, T., Li, D., Mukai, K., *et al.*, Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 is expressed in the uterus and binds with integrins in decidualized endometrium during postimplantation in mice. *Biology of reproduction* 2010.

[187] Takahashi, A., Rahim, A., Takeuchi, M., Fukui, E., *et al.*, Impaired female fertility in tubulointerstitial antigen-like 1-deficient mice. *The Journal of reproduction and development* 2016.

[188] Korpal, M., Ell, B. J., Buffa, F. M., Ibrahim, T., *et al.*, Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med* 2011.

[189] Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., Collins, V. P., Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992.

[190] Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N., Shibuya, M., A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Japanese journal of cancer research : Gann* 1990.

[191] Cook, K. S., Groves, D. L., Min, H. Y., Spiegelman, B. M., A Developmentally Regulated Messenger-Rna from 3t3 Adipocytes Encodes a Novel Serine Protease Homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985.

[192] Ribeiro, R., Monteiro, C., Silvestre, R., Castela, A., *et al.*, Human periprostatic white adipose tissue is rich in stromal progenitor cells and a potential source of prostate tumor stroma. *Experimental biology and medicine* 2012.

[193] Chang, A. C., Reddel, R. R., Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2. *Molecular and cellular endocrinology* 1998.

[194] Wang, Y., Gao, Y., Cheng, H., Yang, G., Tan, W., Stanniocalcin 2 promotes cell proliferation and cisplatin resistance in cervical cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 2015.

[195] Wang, H., Wu, K., Sun, Y., Li, Y., *et al.*, STC2 is upregulated in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation and migration in vitro. *BMB reports* 2012.

[196] Raulic, S., Ramos-Valdes, Y., DiMattia, G. E., Stanniocalcin 2 expression is regulated by hormone signalling and negatively affects breast cancer cell viability in vitro. *The Journal of endocrinology* 2008.

[197] Na, S. S., Aldonza, M. B., Sung, H. J., Kim, Y. I., *et al.*, Stanniocalcin-2 (STC2): A potential lung cancer biomarker promotes lung cancer metastasis and progression. *Biochimica et biophysica acta* 2015.

[198] Hou, J., Wang, Z., Xu, H., Yang, L., *et al.*, Stanniocalicin 2 suppresses breast cancer cell migration and invasion via the PKC/claudin-1-mediated signaling. *PloS one* 2015, *10*, e0122179.

[199] Yasen, M., Obulhasim, G., Kajino, K., Mogushi, K., *et al.*, DNA binding protein A expression and methylation status in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. *Int J Oncol* 2012.

[200] Wang, G. R., Zheng, Y., Che, X. M., Wang, X. Y., *et al.*, Upregulation of human DNA binding protein A (dbpA) in gastric cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2009.

[201] Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L. T., Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in immunology* 2015.

[202] Varela, J. C., Imai, M., Atkinson, C., Ohta, R., *et al.*, Modulation of protective T cell immunity by complement inhibitor expression on tumor cells. *Cancer research* 2008.

[203] Mignatti, P., Rifkin, D. B., Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion. *Physiol Rev* 1993.

[204] Cho, M. S., Vasquez, H. G., Rupaimoole, R., Pradeep, S., *et al.*, Autocrine effects of tumor-derived complement. *Cell reports* 2014.

[205] Markiewski, M. M., DeAngelis, R. A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S. K., *et al.*, Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nature immunology* 2008.

[206] Zeng, L. C., Han, Z. G., Ma, W. J., Elucidation of subfamily segregation and intramolecular coevolution of the olfactomedin-like proteins by comprehensive phylogenetic analysis and gene expression pattern assessment. *FEBS letters* 2005.

[207] Duffy, M. J., Proteases as prognostic markers in cancer. *Clinical Cancer Research* 1996.

[208] Offersen, B. V., Pfeiffer, P., Andreasen, P., Overgaard, J., Urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in nonsmall-cell lung cancer: Relation to prognosis and angiogenesis. *Lung Cancer* 2007.

[209] Gout, S., Brambilla, E., Boudria, A., Drissi, R., *et al.*, Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PloS one* 2012.

[210] Ezponda, T., Pajares, M. J., Agorreta, J., Echeveste, J. I., *et al.*, The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small cell lung cancer survival by enhancing survivin expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010.

[211] Goncalves, V., Jordan, P., Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology. *BioMed research international* 2015.

[212] Shultz, J. C., Goehe, R. W., Murudkar, C. S., Wijesinghe, D. S., *et al.*, SRSF1 regulates the alternative splicing of caspase 9 via a novel intronic splicing enhancer affecting the chemotherapeutic sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* 2011.

[213] Oh-hashi, K., Imai, K., Koga, H., Hirata, Y., Kiuchi, K., Knockdown of transmembrane protein 132A by RNA interference facilitates serum starvation-induced cell death in Neuro2a cells. *Molecular and cellular biochemistry* 2010.

[214] Oh-Hashi, K., Sone, A., Hikiji, T., Hirata, Y., *et al.*, Transcriptional and post-transcriptional regulation of transmembrane protein 132A. *Molecular and cellular biochemistry* 2015.

[215] Hirooka, S., Akashi, T., Ando, N., Suzuki, Y., *et al.*, Localization of the invadopodia-related proteins actinin-1 and cortactin to matrix-contact-side cytoplasm of cancer cells in surgically resected lung adenocarcinomas. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 2011.

[216] Tkachenko, E., Rhodes, J. M., Simons, M., Syndecans: new kids on the signaling block. *Circulation research* 2005.

[217] Wang, H., Jin, H., Rapraeger, A. C., Syndecan-1 and Syndecan-4 Capture Epidermal Growth Factor Receptor Family Members and the alpha3beta1 Integrin Via Binding Sites in Their Ectodomains: novel synstatins prevent kinase capture and inhibit alpha6beta4-integrin-dependent epithelial cell motility. *The Journal of biological chemistry* 2015.

[218] Wang, H., Jin, H., Beauvais, D. M., Rapraeger, A. C., Cytoplasmic domain interactions of syndecan-1 and syndecan-4 with alpha6beta4 integrin mediate human epidermal growth factor receptor (HER1 and HER2)-dependent motility and survival. *The Journal of biological chemistry* 2014.

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Andrea Sinz für die Möglichkeit bedanken, im Rahmen des EU-Projekts LUNGTARGET in ihrer Arbeitsgruppe promovieren zu können. Vor allem danke ich ihr, für die intensive Betreuung mit viel Raum für selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten, für anregende Diskussionen und ein immer offenes Ohr für Fragen.

Prof. Dr. Elisabeth Schwarz danke ich, für die zur Verfügung Stellung des Plasmids pA27fd7 zur Subklonierung der t-PA(K2P)-Varianten und für die hilfreichen Tipps und Ratschläge zur Rückfaltung von t-PA.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Gary Sawers dafür danken, dass er mir den *E. coli*-Stamm MG 1655 für meine ersten SILAC-Experimente zur Verfügung stellte und auch für die erkenntnisbringenden Diskussionen zu den *E. coli*-Experimenten zu Beginn meiner Promotion.

Ich möchte allen Mitgliedern der AG Sinz danken, da sie für ein angenehmes Arbeitsklima, viele konstruktive Diskussionen und die ein oder andere erheiternde Ablenkung am Arbeitsplatz sorgten. Besonders danke ich Dr. Christian Ihling für die praktische Einführung in die Massenspektrometrie und die hilfreichen Tipps zu meinen Experimenten. Ich bedanke mich bei Knut, Matthias, Jens und Jens die mir den Einstieg in die Arbeitsgruppe so leicht machten und ich bedanke mich bei Björn, Christoph, Dirk und Philip, die dafür sorgten, dass das Arbeiten in der Arbeitsgruppe auch immer angenehm blieb. Besonders danke ich den Mädels: Sabine, Romy und Christine für ihre Unterstützung bei der Experimentenplanung sowie bei IT- und Formatierungsfragen. Ich bedanke mich bei Christian Arlt für die „Hilfe zu Selbsthilfe“ und bei Rico Schwarz für immerwährende gute Laune und „konstruktives Zuhören“. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Mannd und bei Frau Herbrich-Peters für die familiäre Atmosphäre und die tatkräftige Unterstützung bei der Bearbeitung der Datenflut und im Labor.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seufferlein für die Zusammenarbeit am EU-Projekt „LUNGTARGET“. Im Speziellen danke ich Silvia Haneder, für die Kooperation und Unterstützung bei der Zellkultur für die SILAC-Experimente.

Ich bedanke mich bei Dr. Frank Erdmann, zum einen für die technische und praktische Unterstützung bei der Pflege der NSCLC-Zelllinien und Gewinnung der Zellüberstände für die Interaktionsstudien, zum anderen für die hilfreichen Tipps und geduldiges Zuhören.

Vielen Dank auch an Michael Götze für die enorm hilfreiche Unterstützung in Form der StavroX Software und der ausdauernden Betreuung bei allen Nutzerproblemen.

Ich danke meinen Wahlpflichtfachstudenten Isabell, Kathleen und Laura, die an der Klonierung der Expressionsplasmide mitgearbeitet haben.

Vielen Dank an Sabine Herbst und Franziska Förster für die Korrektur dieser Arbeit.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die schöne Zeit abseits der Arbeit und die enorme Unterstützung und den stetigen Ansporn zur Selbstverwirklichungen über all die Jahre. Ich danke euch sehr für finanzielle Hilfestellungen und noch viel mehr für die emotionale Unterstützung und bei der Hilfe im Familienmanagement auf so vielfältige Art und Weise. Nicht nur, aber ganz besonderer Dank gilt dabei natürlich meinen Eltern.

Ich danke meinem Mann und meiner Tochter dafür, dass sie mein Leben um so vieles reicher machen und dass sie mit mir so geduldig sind. Ich hab euch lieb!

Publikationen und Tagungsbeiträge

Originalarbeiten

Konstanze Bosse, Silvia Haneder, Christian Arlt, Christian Ihling, Thomas Seufferlein, Andrea Sinz
"Mass Spectrometry-Based Secretome Analysis of Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines"
Proteomics, 2016, 16(21), 2801-2814

Michael Götze, Jens Pettelkau, Sabine Schaks, **Konstanze Bosse**, Christian H. Ihling, Fabian Krauth, Romy Fritzsche, Uwe Kühn, Andrea Sinz
"StavroX—A Software for Analyzing Crosslinked Products in Protein Interaction Studies"
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2012, 23, 76-87

Stefan Kalkhof #, **Konstanze Witte** #, Christian H. Ihling , Mathias Q. Müller , Manuel V. Keller , Sebastian Haehn , Neil Smyth , Mats Paulsson, Andrea Sinz
"A Novel Disulfide Pattern in Laminin-Type Epidermal Growth Factor-like (LE) Modules of Laminin β1 and γ1 Chains"
Biochemistry, 2010, 49, 8359–8366,
geteilte Erstautorenschaft

Vorträge

"Secretome Profiling in Therapy Sensitive and Resistant EGFR-mutant NSCL Cell Lines"
First Annual LUNGTARGET Meeting , Leuven, Belgien 30.11.-01.12.2011

"Mass Spectrometric Analysis of a Novel Disulfide Pattern in Laminin-Type Epidermal Growth Factor-Like Modules of Laminin β1" (Postervortrag)
Summer School "Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine" (MSBM), Dubrovnik, Kroatien 03.07.-09.07.2011

„Massenspektrometrische Untersuchungen des Disulfidbrückenmusters eines N-terminalen Lamininfragmentes"
44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Dortmund 27.02.-02.03.2011

Poster

Konstanze Bosse, Silvia Paulick, Christian H. Ihling , Thomas Seufferlein, Andrea Sinz
"SILAC Based Secretome Analysis of Non Small Cell Lung Cancer Cell Lines"
5th Symposium on Structural Proteomics, Halle 2015

Konstanze Bosse, Silvia Paulick, Christian H. Ihling , Thomas Seufferlein, Andrea Sinz
"SILAC Based Secretome Analysis of Non Small Cell Lung Cancer Cell Lines"
48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS),Wuppertal 2015

Konstanze Bosse, Silvia Paulick, Christian H. Ihling , Thomas Seufferlein, Andrea Sinz
"SILAC Based Secretome Analysis of NSCLC Cell Lines"
DPhG-Tagung "Frontiers in Medicinal Chemistry", Tübingen 2014

Konstanze Bosse, Silvia Paulick, Christian H. Ihling , Thomas Seufferlein, Andrea Sinz
"SILAC Based Secretome Analysis of NSCLC Cell Lines"
Joint Conference of German Mass Spectrometry Society and Polish Mass Spectrometry Society, Poznań, Polen 2012

Konstanze Witte, Stefan Kalkhof, Christian H. Ihling, Mats Paulsson and Andrea Sinz
"Mass Spectrometric Analysis of a Novel Disulfide Pattern in Laminin-Type Epidermal Growth Factor-Like Modules of Laminin β1"
Summer School "Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine" (MSBM), Dubrovnik, Kroatien 2011

Konstanze Witte, Stefan Kalkhof, Christian H. Ihling , Mathias Q. Müller , Manuel V. Keller, Sebastian Haehn , Neil Smyth , Mats Paulsson and Andrea Sinz
"Mass Spectrometric Analysis of a Novel Disulfide Pattern in Laminin-Type Epidermal Growth Factor-Like Modules of Laminin β1 Chain"
Second International GRK Meeting "Conformational Transitions in Macromolecular Interactions", Halle 2011

Konstanze Witte, Manuel V. Keller, Christian H. Ihling, Mats Paulsson und Andrea Sinz
„Massenspektrometrische Untersuchungen des Disulfidbrückenmusters eines N-terminalen Lamininfragmentes"
43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Halle 2010

Lebenslauf

Konstanze Bosse (geb. Witte), geboren am 17.01.1983 in Eisleben, verheiratet, ein Kind

Schulbildung

1993-2002 Abitur, Martin-Luther-Gymnasium Eisleben

Studium

10/02-09/05 Studium im Fach Mathematik

10/05-10/09 Studium im Fach Pharmazie (Approbation)
Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg

11/09-04/10 Diplomarbeit zum Thema: „Massenspektrometrische Untersuchungen des Disulfidbrückenmusters eines N-terminalen Lamininfragmentes“
bei Prof. Dr. A. Sinz, Abteilung für Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

05/10-10/10 Praktische pharmazeutische Ausbildung
Apotheke an der Vogelweide, Halle

12/10 Approbation als Apothekerin

Promotion

01/11-03/16 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Abteilung für Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik,
Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

01/13-12/13 Elternzeit

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen genutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, bei der Herstellung des Manuskripts, sowie bei der geistigen Herstellung der vorgelegten Arbeit waren keine anderen Personen beteiligt. Insbesondere wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorgelegte Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Halle (Saale), den 10. Januar 2017 Konstanze Bosse