

Aus dem Institut für Immunologie der Universität Rostock

(gesch. führ. Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Thiesen)

**Vergleichende Proteomanalyse synovialer Gewebe von  
Patienten mit rheumatoider Arthritis versus Osteoarrose**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Andreas Francke

geboren am 03.06.1977 in Rostock

aus Stuttgart

Rostock, 2008

- |  |   |
|--|---|
| 1. Gutachter: Prof. Dr. Michael O. Glocker | Universität Rostock                       |
| 2. Gutachter: Prof. Dr. Jörn Kekow         | Otto v. Guericke Universität<br>Magdeburg |
| 3. Gutachter: Dr. Saleh. Ibrahim           | Universität Rostock                       |

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17. Dezember 2008



Für Tanja und Mattis

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Geschichte.....	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese .....	2
1.1.3 Klinik .....	4
1.1.4 Therapie.....	7
1.2 Osteoarthrose .....	8
1.3 Proteom und Proteomanalyse.....	9
1.4 Zielsetzung.....	12
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
2.1 Verwendete Materialien .....	13
2.2 Proben .....	15
2.3 Proteinextraktion .....	16
2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	17
2.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	17
2.4.1 Isoelektrische Fokussierung - Die erste Dimension .....	18
2.4.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese - Die 2. Dimension.....	20
2.5 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250.....	22
2.6 Computergestützte Auswertung.....	23
2.7 Proteinidentifizierung.....	23
2.7.1 Spotpicking .....	23
2.7.2 Automatischer Verdau .....	24
2.7.3 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Massenspektrometrie.....	25
2.7.4 Computergestützte Proteinidentifizierung .....	28
2.8 Immunanalytik.....	28
2.8.1 Westernblot.....	29
2.8.2 Statistik .....	35
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>36</b>
3.1 Globale Proteomanalyse.....	36
3.2 Differenzielle Analyse rheumatoider Arthritis versus Osteoarthrose .....	45

3.2.1	Heat-Shock-Proteine.....	49
3.2.2	Peptidasen .....	54
3.2.3	Protein-Disulfid-Isomerasen.....	58
3.2.4	Zelluläres Immunsystem .....	61
3.2.5	Tetranectin .....	64
3.3	Immunanalytik.....	66
3.4	Proteinstrukturcharakterisierung des Endoplasmins .....	67
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>74</b>
4.1	Limitierungen der 2D-Gel-basierten Proteomanalyse .....	74
4.2	Diskussion zu Funktion und Vorkommen der differentiell exprimierten Proteine .....	75
4.2.1	Heat-Shock-Proteine.....	75
4.2.2	Peptidasen .....	76
4.2.3	Protein-Disulfid-Isomerasen.....	78
4.2.4	Zelluläres Immunsystem .....	79
4.2.5	Tetranectin .....	80
4.3	Validierung der Ergebnisse mit Hilfe der Immunanalytik .....	81
4.4	Zusammenfassung.....	82
<b>5</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>THESEN.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>101</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Rheumatoide Arthritis

#### 1.1.1 Epidemiologie und Geschichte

Untersuchungen zur Häufigkeit der rheumatoiden Arthritis (RA) ergeben, dass weltweit ca. 0,5 bis 1% der Bevölkerung an dieser Krankheit leiden [1]. In Deutschland rechnet man mit ca. 800.000 Erkrankten, wobei Frauen ca. 3 x häufiger betroffen sind als Männer [2]. Auftreten kann die Erkrankung in jedem Lebensalter, am häufigsten zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr [3]. Sie ist bis zum heutigen Tage nicht heilbar und hat eine schlechte Langzeitprognose. 80% der Betroffenen sind nach 20 Jahren behindert und die Lebenserwartung ist um etwa 7 bis 10 Jahre verkürzt [4].

Bei 800.000 Erkrankten allein in Deutschland hat die Erkrankung auch eine große volkswirtschaftliche Bedeutung. Eine Untersuchung der AOK-Niedersachsen und der KV Niedersachsen kommt zu dem Ergebnis, dass die direkten Kosten pro Patient und Jahr bei im Schnitt bei 3.815 Euro liegen. Dazu kommen noch einmal 8.358 Euro pro Jahr und Patient durch Arbeitsunfähigkeit [5].

Nach Erkenntnissen der Paläontologen trat die RA erstmals (> 1500 vor Christus) bei Indianern auf, die am Green River, im westlichen Kentucky, westlich des Tennessee Flusses und im Nordwesten von Alabama lebten. An den entdeckten Skeletten wurden Veränderungen gefunden, die typisch für die RA sind [6]. Nach einer interessanten Hypothese wurde die Krankheit durch eingewanderte Engländer, Franzosen, Holländer und Spanier danach in die angrenzende „Neue Welt“ und später in die „Alte Welt“ gebracht. Diese Entwicklung lässt eine überträgergebundene Verbreitung vermuten [7]. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass die RA bis zum Ende des 18. Jahrhunderts in Europa völlig unbekannt war [8]. Im August 1800 beschrieb Augustin Jakob Lantré-Beauvais in seiner Dissertation „Doit-on admettre une nouvelle espèce de goutte sous la dénomination de goutte asthénique primitive?“ eine Krankheit, die der heute bekannten RA entspricht [9].

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Erhebliche Anstrengungen wurden in den letzten Jahren unternommen, um die Pathogenese der RA und der Faktoren, die dabei eine Rolle spielen, aufzuklären. Verschiedene Tiermodelle (Collagen-induzierte Arthritis, CIA) und neue molekularbiologische Methoden haben zwar zu einem besseren Verständnis der Prozesse geführt, die für die Entstehung der RA relevant sind, jedoch ist die Genese auch bis heute noch weitgehend unbekannt [10].

Nach heutigen Vorstellungen handelt es sich bei der rheumatoiden Arthritis um eine polyätiologische Erkrankung, bei der es auf Grundlage einer genetischen Veranlagung im Zusammenhang mit exogenen oder endogenen Einflüssen zu einer dauerhaften Aktivierung des Immunsystems mit autoaggressivem Verhalten kommt. Für die Entstehung der Autoimmunität wurden verschiedene Modelle entwickelt. Zum einen werden als Auslöser Fremdantigene, wie Viren oder u. a. Mikroorganismen diskutiert, deren Oberflächenstrukturen mit körpereigenen Antigenen Strukturähnlichkeiten aufweisen und dadurch Kreuzreaktionen bedingen (molekulares Mimikry) [11]. Zum anderen kommen Autoantigene aus Zellbestandteilen, Kollagen oder Immunglobuline als Auslöser in Betracht. Die Vielfalt der ätiopathogenetischen Möglichkeiten könnte Voraussetzung für die Heterogenität der klinischen Verlaufsformen sein, so dass das äußere Erscheinungsbild der rheumatoiden Arthritis als die gemeinsame „Endstrecke“ aufgefasst werden kann [12].

Nach derzeitigen Erkenntnissen sind für die Auslösung einer rheumatoiden Arthritis Störungen in der immunologischen Verarbeitung von bislang nicht eindeutig identifizierten exogenen oder auch endogenen antigenwirksamen Substanzen verantwortlich. Diese führen bei Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis zu den beobachteten pathologischen Veränderungen der Gelenke, die sich durch drei Phänomene beschreiben lassen: a) synoviale Hyperplasie, b) Entzündung und c) abnormale humorale und zelluläre Immunreaktionen. Diese Veränderungen führen im Spätstadium oft zur vollständigen Zerstörung der betroffenen Gelenke. Wie dieser Vorgang im einzelnen funktioniert, ist bis heute nur teilweise verstanden.

Eine der Möglichkeiten wäre, dass ein unbekanntes Antigen, das über die Blutbahn in die Synovialis gelangt, durch antigenpräsentierende Zellen, z.B. Makrophagen, phagozytiert wird. Diese präsentieren das Antigen über den MHC II Rezeptor

ortsständigen CD4+ T-Lymphozyten und führen darüber zu deren Aktivierung. Die Gene der MHC-II-Rezeptoren befinden sich auf Chromosom 6 und werden in drei Isotypen eingeteilt: HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR. Bestimmte Subtypen wie DRB<sup>\*</sup>0401, DRB<sup>\*</sup>0404, DRB<sup>\*</sup>0101 and DRB<sup>\*</sup>1402 werden bei etwa 70% der Patienten mit RA gefunden aber auch bei etwa 30% Gesunden sind diese HLA-Typen nachweisbar. Damit ist das Vorhandensein dieser HLA-Merkmale der wichtigste genetische Risikofaktor [13]. Diese HLA-Typen kodieren für MHC-II-Rezeptoren welche für die Antigenpräsentation zuständig sind. In der dritten hypervariablen Region der DR-Kette all dieser HLA-Moleküle findet sich eine verwandte Sequenz von 5 Aminosäuren (Glutamin, Lysin, Arginin, Alanin, Alanin QKRAA oder QRRAA), das sogenannte „shared epitope“. Studien konnten zeigen, dass das Vorhandensein des „shared epitope“ die Schwere und Progression der Gelenkzerstörung negativ beeinflusst [14]. Die genaue Bedeutung des „shared epitope“ ist bis heute nicht geklärt. Eine Möglichkeit besteht in der Beeinflussung der Antigenbindung und – präsentation des MHC-II-Rezeptors und damit der Aktivierung von T-Lymphozyten. Da aber nicht alle Aminosäuren zum antigenbindenden Teil des HLA-Moleküls gehören, ist die genaue Funktion für die Antigenpräsentation und damit die Initiation autoreaktiver Prozesse unklar [15, 16].

Eine Analyse der Subpopulation der CD4+ T-Lymphozyten zeigt ein Vorherrschen von Th1-Lymphozyten. Th1-Lymphozyten führen mit ihrem proinflammatorischen Zytokinspektrum aus Interleukin-2 und Interferon- $\gamma$  zu einer Aktivierung von Makrophagen, B-Zellen und zytotoxischen T-Zellen. Die Aktivierung der B-Zellen führt zu einer Produktion von Antikörpern, die zu einer Komplementaktivierung und damit zu einer Chemokinfreisetzung führen. Dies führt wiederum zu einem weiteren Einwandern von Entzündungszellen in das Gelenk.

Das Zytokinmuster der Th2-Lymphozyten aus Interleukin-4 und Interleukin-10 hat antiinflammatorische Eigenschaften. Die Th2-Zellen haben damit eine regulatorische Funktion in der Immunreaktion [17]. Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass T-Lymphozyten hauptsächlich an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt sind. Eine Untersuchung der Zytokinaktivität zeigte erstaunlicherweise aber relativ geringe Mengen an T-Zell-spezifischen Zytokinen wie Interleukin-2 oder Interferon- $\gamma$ . Diese Ergebnisse verstärkten die Suche nach T-Zell-unabhängigen Faktoren. Dadurch rückten die Zellen der Synovialmembran in den Fokus der Forschung.

Die Synovialmembran wird gelenkseits durch eine 1–2 Zellen dicke Schicht begrenzt. Die Synovialzellen lassen sich aufgrund ihrer Oberflächenmarker und ihres Zellinhaltes in Synovialzellen Typ A (makrophagenähnlich) und Typ B (fibroblastenähnlich) unterscheiden. Unterhalb dieser Zellschicht, in der Subintima, findet sich ein zellarmes Bindegewebe. Die RA führt zu spezifischen Veränderungen der Synovialis. Im Rahmen der Entzündung kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation der A- und B-Synoviozyten, sowie zu einem Infiltrat von mononukleären Zellen, vor allem T- und B-Zellen, Makrophagen und Plasmazellen. Durch die Ausschüttung von bestimmten Stimulatoren der Angiogenese wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) kommt es zur Neubildung von Gefäßen. Die Synoviozyten sind durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 und TNF- $\alpha$  an der Aufrechterhaltung und Verstärkung der Synovitis beteiligt. Gleichzeitig wird durch diese Zytokine die Ausschüttung von matrixabbauenden Enzymen wie Matrix-Metalloproteinasen oder Cathepsinen gefördert. Die fibroblastenähnlichen Synoviozyten zeigen darüber hinaus auch ein autonomes invasives Wachstum. Dies zeigt sich in einer Expression von Adhäsionsmolekülen und Hochregulation von verschiedenen Protoonkogenen, was zu einer zytokinunabhängigen Proliferation und Invasion von Knorpel führt [18]. Man vermutet aktuell, dass eher die reduzierte Apoptose der synovialen Zellen für die Hyperplasie verantwortlich ist. Auch eine Mutation des Tumorsuppressorgenes p53 wird diskutiert [19]. Diese Veränderungen führen zur Bildung des Pannusgewebes, welches durch infiltratives Wachstum maßgeblich an der Zerstörung der Gelenke beteiligt ist.

### 1.1.3 Klinik

Die rheumatoide Arthritis, auch chronische Polyarthritis genannt, ist eine chronische Systemerkrankung, die sich vor allem an den Gelenken manifestiert und durch eine progressive Destruktion der betroffenen Gelenke charakterisiert ist. In der deutschsprachigen Bezeichnung „chronische Polyarthritis“ spiegeln sich wichtige Charakteristika der Erkrankung wider. „Chronisch“ steht für eine lange Zeitdauer der Erkrankung, „Arthritis“ bedeutet Gelenkentzündung und „Poly“ eine Vielzahl von (betroffenen) Gelenken.

Die Erkrankung zeigt einen individuell unterschiedlichen Verlauf. Die RA beginnt oft mit unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit und Müdigkeit. Charakteristisch ist ein schubweiser Verlauf mit symmetrischem Befall der proximalen Interphalangeal- und Metakarpophalangealgelenke sowie der Handgrundgelenke. Der fortschreitende Verlauf führt durch Gelenkdestruktion zu typischen Deformitäten wie Ulnardeviation, Knopfloch- und Schwanenhalsdeformität. Im weiteren Verlauf werden oft mehr und mehr Gelenke befallen.

Im Labor findet sich häufig neben einer beschleunigten Blutsenkung auch ein erhöhter Gehalt an C-reaktivem Protein (CRP). Typisch für die RA ist auch das Auftreten von Rheumafaktoren (RF) und Rheumaknoten. Bei den RF handelt es sich um Autoantikörper, die gegen das Fc-Fragment von Immunglobulin G gerichtet sind und von B-Lymphozyten produziert werden. Nachgewiesen wurden sie erstmals 1940 von Waaler [20]. Sie gehören allen Immunglobulinklassen an, besonders IgM und IgG, seltener IgA, IgE und IgD. RF finden sich bei 70-80% der Patienten aber auch bei 5% der gesunden Bevölkerung oder Patienten mit verschiedenen Infektionen oder mit anderen Autoimmunerkrankungen [21].

Neben den Rheumafaktoren gibt es eine weitere Anzahl von Antikörpern, die mit der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören Antikörper gegen Heat-Shock-Proteine wie das 78 kDa glucose-regulated Protein, gegen Kollagen oder antinukleäre Antikörper. Von besonderem Interesse sind Antikörper gegen zyklische citrullinierte Peptide (Anti-CCP). Dabei handelt es sich um Antikörper gegen die seltene Aminosäure Citrullin, die durch Desaminierung von Arginin entsteht und ein wesentlicher Bestandteil der antigenen Epitope ist. Antikörper gegen CCP haben eine ähnliche Sensitivität wie RF aber eine deutlich besseren Spezifität. Sie liegt bei etwa 97%. Anti-CCP werden sehr früh im Verlauf der Erkrankung beobachtet und haben einen hohen prognostischen Wert. Patienten mit Anti-CCP entwickeln signifikant mehr radiologisch nachweisbare Gelenkschädigungen als Anti-CCP-negative Patienten [22]

Rheumaknoten sind derbe, verschiebbliche Knoten, die sich subkutan, wahrscheinlich durch vaskulitische Prozesse, an druckbelasteten Sehnen bilden können. Meistens treten sie an den Strecksehnen der Fingergelenke, Ellenbogengelenke und an der Achillessehne auf.

Des weiteren können extraartikuläre Beteiligungen in Form von chronischer Anämie, Herz-, Lungen-, Augen- und Gefäßbeteiligung vorhanden sein. Außerdem existiert

noch eine Vielzahl von Sonderformen. Beispielhaft seien das Felty-Syndrom und das Still-Syndrom erwähnt, besonders schwere Verlaufsformen im Erwachsenen- bzw. Kindesalter [21].

Der Verlauf der RA ist sehr variabel. Rund 15–20% der Patienten haben einen intermittierenden Krankheitsverlauf mit Exazerbationen und einer relativ guten Prognose. Meistens verläuft die RA jedoch, mehr oder weniger rasch, progredient. Noch immer werden bei ca. 10% der Betroffenen maligne Verlaufsformen mit rascher Progredienz, hoher Entzündungsaktivität, extraartikulären Organmanifestationen und starker Behinderung beobachtet. Die rheumafaktorneegative RA hat häufigere Remissionen und einen günstigeren Verlauf. Allgemein besteht ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der Entwicklung irreversibler Schäden am Bewegungssystem [23].

Die Diagnose erfolgt anhand der Kriterien des American College of Rheumatology (ACR), die die Klinik sowie radiologische und laborchemische Befunde berücksichtigen [24]. Von sieben Kriterien (Tabelle 1) müssen mindestens vier für die Diagnose einer RA erfüllt sein, wobei die ersten vier seit wenigstens sechs Wochen bestehen müssen.

**Abbildung 1-1:** Diagnosekriterien der RA. Für die Diagnose müssen 4 der 7 Kriterien erfüllt sein, die Kriterien 1 bis 4 müssen für mindestens 6 Wochen bestanden haben.

Rheumatoide Arthritis, Diagnostische Kriterien
1. Morgensteifigkeit von wenigstens einer Stunde
2. Gelenkschwellungen an > 3 von 14 möglichen Gelenkregionen (rechte und linke Fingermittel-, Fingergrund- und Handgelenke, Ellenbogen, Knie, obere Sprunggelenke, Zehengrundgelenke)
3. wenigstens eine Schwellung im Bereich der genannten Handregionen
4. symmetrischer Befall von Gelenkregionen
5. Rheumaknoten
6. Rheumafaktor im Serum
7. typische radiologische Veränderungen im Bereich der Hände (wenigstens unzweifelhafte gelenknahe Osteoporose)

Mit diesem Schema kann aber nur eine bereits etablierte RA sicher identifiziert werden. Wie verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, ist jedoch ein frühzeitiges Erkennen und Behandeln der RA von entscheidender Bedeutung für den weiteren

Verlauf der Erkrankung. Die Diagnose einer Früharthritis erfolgt unabhängig von den ACR-Kriterien. Ist die Diagnose einer Früharthritis gestellt, sollte unverzüglich mit der medikamentösen Therapie begonnen werden. Optimal sollte die Therapie spätestens 12 Wochen nach Symptombeginn beginnen [25].

#### **1.1.4 Therapie**

Die medikamentöse Therapie der rheumatoïden Arthritis stützt sich auf drei Gruppen von Substanzen, die auf Grund ihrer Eigenschaften mit unterschiedlichen Indikationen eingesetzt werden. Von entscheidender Bedeutung für die Prognose der Erkrankung ist der frühzeitige Einsatz von DMARD's (disease modifying antirheumatic drugs), die als einzige Substanzen in der Lage sind, die durch die Erkrankung drohende Gelenkzerstörung zu verhindern und eine Remission zu erreichen. Zusätzlich können nichtsteroidale Antiphlogistika zur Reduktion der Gelenkschmerzen und zur Entzündungshemmung eingesetzt werden. Daneben haben Glukokortikoide einen festen Platz in der Therapie der rheumatoïden Arthritis - nicht nur in Akut- und Schubsituationen sondern auch in niedriger Dosierung in der Langzeitanwendung [26].

Die Gruppe der DMARD's ist eine heterogene Gruppe verschiedener Substanzen u.a. Methotrexat (MTX), Sulfasalazin, Hydroxychloroquin, Leflunomid, Azathioprin, Cyclosporin A, Mycophenolat, Cyclophosphamid und Tacrolimus. Neben ihrer unterschiedlichen Potenz bezüglich der Hemmung der Aktivität der RA und des jeweils individuellen Nebenwirkungsspektrums weisen sie alle die Langzeitimmunsuppression als Gemeinsamkeit auf. Der bedeutendste Vertreter aus dieser Gruppe ist jedoch das MTX, das am häufigsten eingesetzt wird. Es ist der „Goldstandard“ bei der Behandlung der aktiven rheumatoïden Arthritis. MTX beeinflusst entzündliche Prozesse auf unterschiedliche Weise, wobei die Hemmung der Lymphozytenproliferation durch Störung des Folsäurestoffwechsels vermutlich eine wichtige Rolle spielt. Aufgrund der Nebenwirkungen wie Blutbildveränderungen oder Anstieg von Leber- und Nierenwerten ist eine regelmäßige Kontrolle der Laborwerte notwendig. Bei unzureichender Wirkung ist auch eine Kombination mit anderen DMARD's möglich oder eine Kombination mit einem „Biological“ indiziert.

Durch das zunehmend bessere Verständnis der Pathogenese der rheumatoïden Arthritis konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Medikamente entwickelt

werden. Der Nachweis, dass Tumornekrosefaktors  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) zu den wichtigsten proentzündlichen Zytokinen bei der RA gehören, führte in den vergangenen Jahren zur Einführung von „biologischen“ Hemmstoffen gegen TNF- $\alpha$  und IL-1.

Diese neuen, als Biologicals bezeichneten Medikamente, stellen eine neue Option in der Therapie der rheumatoiden Arthritis dar. Die ersten Biologicals, die zur Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wurden, waren Hemmer des Tumornekrosefaktors  $\alpha$ . Die klinische Wirkung konnte in mehreren Studien belegt werden, wobei vor allem die Kombination mit MTX zu einer deutlichen Hemmung der Röntgenprogression bis hin zu leichtem Knochenaufbau führte [27]. Eine weitere Option in der Modulierung der Zytokinaktivität ist die Neutralisierung von Interleukin-1b durch einen rekombinanten IL-1-Rezeptor-Antagonisten [28]. 2006 wurde das aus der Lymphomtherapie bekannte Rituximab zur Therapie der rheumatoiden Arthritis zugelassen. Dabei handelt es sich um einen Antikörper gegen CD20, der zu einer passageren, in der Regel etwa ein halbes Jahr anhaltenden, Depletion der B-Zellen im peripheren Blut führt [29]. Weitere Ansätze sind die Neutralisation von IL-6 und IL-15 sowie Co-Stimulations-Blocker, die die Aktivierung von T-Zellen bremsen und somit die zerstörende Immunreaktion an den Gelenken hemmen sollen [30]. Eine weitere Möglichkeit bei therapierefraktärer rheumatoider Arthritis ist die Apherese. Dabei wurde für die Immunadsorption an Staphylokokkenprotein-A-Silikatgel (Prosorba®) in einer Scheinapherese-kontrollierten Untersuchung bei therapierefraktärer rheumatoider Arthritis eine signifikante Entzündungshemmung und Verbesserung der Schmerzfreiheit in Gelenken gefunden [31]. Diese Therapieform wird jedoch derzeit nicht mehr angeboten. Weitere nichtmedikamentöse Verfahren sind die Radiosynoviothese sowie die Synovektomie [32, 33].

## 1.2 Osteoarthrose

Bei der Osteoarthrose (OA) handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung, bei der es zu einer fortschreitenden Knorpel- und Knochendestruktion kommt. Sie ist ein Resultat des Ungleichgewichts der physikochemischen Eigenschaften und der mechanischen Belastung des Knorpels. Das führt zu einem Versagen und einer Zerstörung der extrazellulären Matrix als funktionales Element des Knorpels. Der für die Arthrose charakteristische Verlust an hyalinem Gelenkknorpel bildet sich

radiologisch durch eine Gelenkspaltverminderung ab, wird von einer fibrotischen Umwandlung der Synovialmembran, Sklerosierung des subchondralen Knochens sowie der Ausbildung von Osteophyten an den Gelenkrändern begleitet und kann bis zum vollständigen Funktionsverlust des Gelenks führen. Dabei scheinen mechanischer Abrieb sowie die enzymatisch bedingte Degradation eine wichtige Rolle im Krankheitsgeschehen zu spielen. Bei der OA handelt es sich wie bei der RA um eine polyätiologische Erkrankung. Vermutet werden biomechanische und biochemische Veränderungen im Knorpel und im subchondralen Knochengewebe. Im Blickpunkt der Arthroseforschung stehen die Chondrozyten. Sie sind für den Aufbau und Erhalt der extrazellulären Matrix verantwortlich. In der Arthrose kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Matrixsynthese und Abbau, zur verstärkten Produktion von matrixabbauenden Enzymen sowie zu einer Apoptose von Chondrozyten. Daneben scheinen verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der Arthrose eine wichtige Rolle zu spielen.

Im Gegensatz zur RA findet sich der Ursprung der OA nicht in der entzündeten Synovialmembran. Vielmehr ist die auftretende Begleitsynovitis ein sekundäres Phänomen in der OA. Durch die degenerative Erosion des Gelenkknorpels werden Knorpelpartikel im Gelenk freigesetzt, die die Begleitsynovitis verursachen. Dies führt zu einer Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Proteasen, die wiederum zu einer Verstärkung der Knorpeldestruktion führen [34-36].

### **1.3 Proteom und Proteomanalyse**

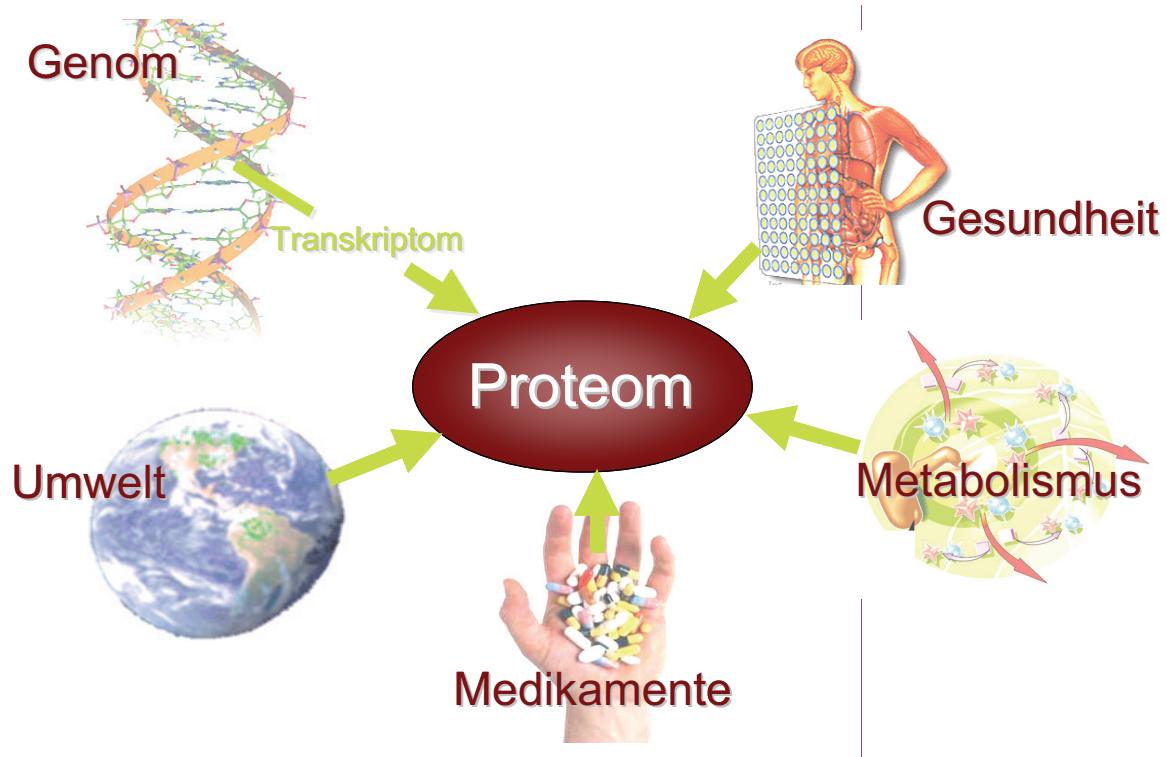
Der Begriff „Proteom“ wurde erstmals von Marc Wilkins und Keith Williams geprägt und bezeichnet die Gesamtheit der Proteine, die von einem Genom, in Abhängigkeit einer Umgebung und eines Zeitpunktes, exprimiert werden [37]. Damit stellt die Proteomanalyse die eingefrorene Momentaufnahme eines aktuellen Stoffwechselzustandes dar.



**Abbildung 1-2:** Am Beispiel des Schwalbenschwanz (*Papilio machaon*) sieht man den Einfluss der Proteomveränderung sehr gut. Während in beiden Ausprägungen das Genom identisch ist, kommt es aufgrund unterschiedlicher Proteome zu einer deutlich unterschiedlichen Morphologie. (Wikipedia)

Anders als das zeitlich konstante Genom ist das Proteom, in Abhängigkeit von inneren und äußeren Parametern, eine dynamische und flexible Größe. Es ist bekannt, dass ein Gen häufig durch alternatives Spleißen der prä-mRNA für viele verschiedene Genprodukte kodiert. Durch zusätzliche Einführung von posttranslationalen Modifizierungen wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Acetylierungen, Methylierungen oder kontrollierter Proteolyse ergibt sich ein komplexes Proteinmuster. Aus einem Gen können somit mehrere Proteine mit verschiedenen Funktionen und strukturellen Formen entstehen. Ebenso lässt die Menge der vorhandenen mRNA keine Rückschlüsse auf die Quantität des exprimierten Proteins zu, da diese nicht nur von der Proteinbiosynthese abhängt, sondern auch von der Degradation der jeweiligen Proteine [38]. Weiterhin können Proteine verschiedene funktionelle Komplexe bilden, die aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung viele verschiedenen Funktionen in der Zelle übernehmen. Als Beispiel sei der Proteasomkomplex erwähnt, welcher eine wichtige Rolle beim Abbau von Proteinen spielt [39].

Im Gegensatz zum statischen Genom unterliegt das Proteom einer Vielzahl innerer und äußerer Einflusse, die zu einer Veränderung des Proteoms führen können. Es reicht demnach nicht zum Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge aus, das Genom eines Organismus zu kennen. Vielmehr müssen auch die Proteine und ihre komplizierten Interaktionsnetzwerke erfasst und verstanden werden.



**Abbildung 1-3:** Verschiedene Einflussgrößen auf das Proteom. Im Gegensatz zum statischen Genom unterliegt das Proteom einer Vielzahl innerer und äußerer Einflüsse, die zu einer Veränderung des Proteoms führen können. (Proteom-Zentrum Rostock)

In der differenziellen Proteomanalyse ist es durch einen Vergleich verschiedener Proteome von bestimmten Zuständen eines Zelltyps, eines Gewebes oder eines Organismus möglich, wichtige Informationen über das charakteristische Proteinmuster des jeweiligen Zustands zu erhalten. So können im Falle eines Vergleichs des Proteoms von krankem und gesundem Gewebe direkt potenzielle Zielproteine, die für diese Krankheit spezifisch sind, detektiert werden. Außerdem kann der Einfluss äußerer Parameter wie Medikamente auf das Proteinmuster der Zelle ermittelt und dadurch hervorgerufene Veränderungen analysiert werden.

Eine der Schlüsseltechnologien der modernen Proteomanalyse ist derzeit die hochauflösende zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Sie wurde erstmals 1975 von O`Farrell und Klose beschrieben und gehört heute zu den Standardmethoden in der Proteomforschung [40, 41]. Sie kombiniert eine isoelektrische Fokussierung in der ersten und einer SDS-PAGE in der zweiten Dimension. Dabei werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Masse getrennt. Anschließend können die Proteine mit Hilfe verschiedener Färbemethoden dargestellt werden. Mit Unterstützung von Computerprogrammen ist ein semiquantitativer Vergleich der Proteinspots möglich. Zur Identifizierung werden

die Spots aus dem Gel ausgeschnitten, einem tryptischen Verdau unterzogen und die Peptidfragmente anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Durch den Abgleich der erhaltenen Fragmentmassen mit einer Proteindatenbank kann der Proteinspot identifiziert werden.

#### **1.4 Zielsetzung**

Ziele dieser Arbeit waren:

1. Identifizierung krankheitsassozierter Unterschiede in der Proteinexpression mit Hilfe der vergleichenden Proteomanalyse zwischen Pannusgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis und synovialem Gewebe von Patienten mit Osteoarrose
2. Analyse der differentiell exprimierten Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie
3. Validierung eines Teils der Ergebnisse mit Hilfe der Immunanalytik

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### Chemikalien:

Acetonitril (ACN)	Sigma
Acrylamid 30% Fertiglösung	Roth
Agarose	Serva
Ameisensäure	Sigma
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	BioRad
Bromphenolblau	Sigma
CHAPS	Serva
Complete Proteaseinhibitor Cocktail	Roche
Coomassie -Brilliant-Blue R250	Serva
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (CHCA)	Sigma
Dry Strip Cover Fluid	Pharmacia
Dithiothreitol (DTT)	Serva
EDTA	Roth
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol	Roth
Glycerol	Merck
Glycin	Merck
IPG-Puffer pH 4-7	Pharmacia
Isopropanol	J.T. Baker
Iodacetamid (IAA)	Merck
Methanol	Roth
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_5$ )	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
PAGE Ruler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas
PAGE Ruler Unstained Protein Ladder	MBI Fermentas
Phosphorsäure	Merck
Ponceau S	Sigma

Salzsäure (HCl)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Sulfosalicylsäure	Sigma
TEMED	Biorad
Thimerosal	Sigma
Thioharnstoff	ICN BIOMEDICALS
Trichloressigsäure	Roth
Trifluoressigsäure	Roth
TRIS	Roth
Trypsin	Promega
Tween 20	Merck
Harnstoff	Merck

Hilfsmittel und Geräte:

96-Wellplates	Genomic Solutions
Blotkammer Trans-Blot SD	BioRad
Einmalpipetten 10 ml	Greiner
Elektrophoresekammer Hoefer DALT	Pharmacia
Elektrophoresekammer PROT-RESOLV MINI-LC	PHASE
Filterpapier	Whatman
Flexys Proteomics Picker	Genomic Solutions
Investigator ProGest Protein Digester	Genomic Solutions
IPG DryStrip pH 4-7	Pharmacia
IPGphor Strip Holder	Pharmacia
IPGphor-Elektrophoresegerät	Pharmacia
Massenspektrometer Reflex III	Bruker
Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Microvials	Alltech
Multiple Gel System	Hoefer
Paper Wicks	Pharmacia
Pipetierroboter MAP II	Bruker
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia
Pipetten	Eppendorf, Gilson
PVDF-Membran	Millipore

Reaktionsgefäß 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Scanner Mirage II	Umax
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Stahltarget	Bruker
SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrat	Pierce
Vakuumzentrifuge Speed Vac	Savant
Vortexer	Heidolph, Vortex Genie
Zentrifugen	Hettich, Heraeus

**Antikörper:**

Ly-GDI (sc-6047)	Santa Cruz
Rho GDI $\alpha$ (sc-360)	Santa Cruz
GRP 94 (sc-11402)	Santa Cruz

**2.2 Proben**

Die untersuchten Proben stammen aus dem Institut für Pathologie der Universität Leipzig. Dabei handelt es sich um Operationsresekte der Synovialmembran von Patienten, die an rheumatoider Arthritis bzw. Osteoarrose leiden und sich einem operativen Eingriff am Kniegelenk unterzogen haben. Die Resekte wurden durch Prof. Dr. med. Stiehl histologisch untersucht und der RA bzw. OA zugeordnet.

**Tabelle 2-1** Patientendaten der 4 untersuchten Patienten

Patienten-Nummer	RA 1 (K55)	RA2 (K59)	OA 1 (K57)	OA 2 (K42)
Diagnose	RA	RA	OA	OA
CRP in mg/l	17,4	49,5	< 5	< 5
Therapie	Knieendoprothese	Knieendoprothese	Synovektomie	Knieendoprothese
OP-Datum	06.08.96	12.12.96	26.08.96	27.03.96
Alter	57 Jahre	55 Jahre	55 Jahre	61 Jahre
Geschlecht	weiblich	männlich	männlich	weiblich

## 2.3 Proteinextraktion

Idealerweise sollte eine gelungene Probenvorbereitung für die 2D-Elektrophorese dazu führen, dass die Proteine des Ausgangsmaterials komplett gelöst, deaggregiert, denaturiert und reduziert vorliegen. Des weiteren ist von Bedeutung, dass die Aufbereitung möglichst ohne Zerstörung von Proteinen durch freiwerdende Enzyme geschieht. Dazu ist es wichtig, die Kühlkette stets einzuhalten, um ein Auftauen der Probe und eine Aktivierung von Enzymen zu verhindern. Zusätzlich können Proteaseinhibitoren eingesetzt werden.

Die Proteinextraktion der bei –80 °C tiefgefrorenen Gewebestückchen erfolgte in einem in flüssigem Stickstoff stehenden Mörser. Mit Hilfe eines Pistills wurden die Gewebestücke vorsichtig zerrieben. Je 50 mg Material wurden mit 500 µl Lysepuffer TU2CD und 1x *Complete* als gefrorene Kugel vermischt. Anschließend wurde das Gemisch in ein in flüssigem Stickstoff gekühltes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dann wurde die Probe unter häufigem Vortexen möglichst schnell aufgetaut und mit Hilfe eines Magnetrührstäbchens für 15 min. im Kühlraum bei 6 °C gemixt. Danach wurde die Probe erneut für 30 sec gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Prozedur aus Auftauen und Mixen wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde das Gemisch 20 min. bei 13000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Am Ende bildete der Überstand den Pannusextrakt für die weitere Analyse. Dieser wurde zu mehreren 100 µl Aliquots aufgeteilt und nach kurzem Vortexen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren [42].

Lysepuffer TU2CD:

- 2 M Thioharnstoff
- 8 M Harnstoff
- 2% CHAPS
- 20 mM DTT

Proteaseinhibitor:

- Stammlösung 100 x *Complete* mit EDTA in Reinstwasser

Geräte:

- Eppendorf-Gefäße 2 ml
- Zentrifuge
- Vortexer
- Mörser
- Pistill
- Spatel

### **2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Im Mittelpunkt des nach seinem Erfinder benannten Assays steht die Veränderung des Absorptionsmaximums des blauen Säurefarbstoffs Coomassie-Brilliant Blue R250. In Verbindung mit Proteinen und einem sauren Milieu kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Diese Veränderung kann gemessen werden und ist proportional zur vorhandenen Proteinmenge.

Für die Bestimmung wurden 797 µl Reinstwasser und 3 µl Probenlösung miteinander vermischt. Anschließend wurden 200 µl Bradfordreagenz hinzugegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Messung. Für jede Probe wurde der Ansatz zweimal hergestellt und vermessen. Die Umrechnung in mg/ml Protein erfolgte mit Hilfe einer vorher angefertigten Eichkurve.

Bradfordreagenz:

- 0,01% Coomassie-Brilliant-Blue R250
- 5% Ethanol
- 10% Phosphorsäure 85%ig

Geräte:

- Einmalküvetten
- Photometer

### **2.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine leistungsstarke analytische Methode zur Auftrennung von komplexen Proteingemischen. Dabei

bedient man sich der Kombination aus zwei unterschiedlichen Trennverfahren. Zum einen der isoelektrischen Fokussierung und zum anderen der Natrium(Sodium)dodecylsulfat -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [43].

#### **2.4.1 Isoelektrische Fokussierung - Die erste Dimension**

In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Entscheidend für die Wanderung ist die Tatsache, dass Proteine aus Aminosäuren mit unterschiedlich geladenen Seitengruppen bestehen. Deren Ladungszustand ist in wässriger Lösung pH-abhängig. Das bedeutet zum Beispiel, dass bei niedrigem pH-Wert die Carboxylgruppe der Aminosäure protoniert wird und somit ladungsneutral ist. Die Aminogruppen dagegen sind im sauren Milieu protoniert, tragen also positive Ladungen, so dass auch für das Protein eine positive Nettoladung resultiert. Bei Erhöhung des pH-Wertes dissoziiert das Proton von der Carboxylgruppe und auch von der Aminogruppe. Die Aminogruppe ist nun neutral und die Carboxylgruppe negativ geladen, woraus sich für das Protein eine insgesamt negative Nettoladung ergibt. Im elektrischen Feld wandern die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladungen in einer Matrix mit einem bestimmten pH-Gradienten bis zu dem Punkt, der dem für sie charakteristischen pI-Wert entspricht. Nun erscheinen sie nach außen neutral und ihre Wanderungsgeschwindigkeit beträgt null.

Die pH-Gradienten werden durch sogenannte Ampholyte erzeugt. Das sind Moleküle, die positive und negative Ladungen besitzen. Kommt eine Mischung von Ampholyten mit einem weiten Bereich von isoelektrischen Punkten in ein elektrisches Feld, so verteilen sie sich in der gegebenen Matrix, und es entsteht der gewünschte pH-Gradient [44]. Leider sind so erzeugte pH-Gradienten nicht zeitstabil und wandern in Abhängigkeit von der Fokussierungszeit unter Platauausbildung in Richtung der Kathode. Dies führt nicht nur zum Verlust der basischen Proteine, sondern zudem zum Verlust der Linearität des pH-Gradienten. Diese von O'Farrell verwendete Technik wurde Ende der 80iger Jahre durch die von Görg *et al.* entwickelte 2D-Gel-Elektrophorese mit immobilisierten pH Gradienten (IPG) wesentlich verbessert [45] und hat die Reproduzierbarkeit deutlich erhöht. Dabei handelt es sich im vorliegenden Fall um Polymere mit zahlreichen Amino- und Carboxylgruppen. Diese Technik wird heute in weitaus größerem Maße verwendet.

## Rehydratisierung

Für die IEF wurden 18 cm lange IPG-Strips mit einem linearen pH-Bereich von 4-7 verwendet. Vor der eigentlichen IEF müssen die IPG-Strips aber noch rehydratisiert werden. Dazu wurden 400 µg Proteingemisch mit Rehydratisierungspuffer auf eine Gesamtmenge von insgesamt 350 µl gemischt. Zusätzlich wurden 1,8 µl IPG-Puffer pH 4-7 und 2 µl Bromphenolblau dazu gegeben. Anschließend wurde die Lösung gleichmäßig in die IPGphor Strip Holder pipettiert. Danach wurden die rehydratisierten Gelstrips in die Lösung eingelegt und mit 1 ml Dry Strip Cover Fluid bedeckt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Zum Schluss wurde der IPGphor Strip Holder noch mit einem Deckel verschlossen. Die IPGphor Strip Holder wurden nebeneinander und der Polung entsprechend auf das IPGphor-Elektrophoresegerät gelegt. Die Rehydratisierung erfolgte für 12 Stunden bei 30 Volt.

## Isoelektrische Fokussierung

Vor dem Start der Fokussierung wurde angefeuchtetes Filterpapier (Paper Wicks IPGphor™) an beiden Enden der Strips aufgelegt, um eventuell in den Proben enthaltene Salze aufzunehmen.

Danach wurde die IEF nach folgendem Programm durchgeführt:

**Tabelle 2-2:** Einzelne Programmschritte der IEF

Stufe	Spannung in Volt	Zeit in Stunden	Art
1	500	0,5	Gradient
2	500	0,5	Step-n-hold
3	2000	0,5	Gradient
4	2000	0,5	Step-n-hold
5	8000	1	Gradient
6	8000	4	Step-n-hold
7	50	12	Step-n-hold

Nach der IEF wurden die Streifen entweder sofort in die 2. Dimension überführt oder bei -80 °C gelagert.

Rehydratisierungspuffer:

- 2 M Thioharnstoff
- 8 M Harnstoff
- 2% CHAPS
- 20 mM DTT
- Proteaseinhibitor: Complete mit EDTA
- IPG-Puffer, pH 4-7
- Bromphenolblau

Geräte:

- IPGphor Strip Holder
- IPG DryStrips, pH 4-7
- IPGphor-Elektrophoresegerät
- Paper Wicks

#### **2.4.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese - Die 2. Dimension**

In der zweiten Dimension wird die Eigenladung der Proteine mit SDS „maskiert“.

SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstant negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen [46]. Eine elektrophoretische Trennung der Polypeptide erfolgt nun ausschließlich aufgrund der Siebwirkung der Polyacrylamid-Matrix, das heißt nach Größe bzw. Molekulargewicht. Kleinere Proteine wandern durch die geringere Reibung schneller als größere Proteine.

#### **Äquilibrierung der Gelstreifen**

Die Äquilibrierung der IPG-Strips erfolgte unmittelbar vor der SDS Gel-Elektrophorese. Dazu wurden die IPG-Strips für 10 Minuten in 15 ml Äquilibrierungspuffer 1 (Reduktion der Proteine) äquilibriert. Dieselbe Prozedur wurde dann mit dem Äquilibrierungspuffer 2 (Carboxamidomethylierung der Proteine) wiederholt.

Äquilibrierungspuffer 1:

- 6 M Harnstoff
- 30% Glycerol
- 2% SDS
- 50 mM TRIS/HCl, pH 8,8
- 10 mM DTT

Äquilibrierungspuffer 2:

- 6 M Harnstoff
- 30% Glycerol
- 2% SDS
- 50 mM TRIS/HCl, pH 8,8
- 10 mM Iodacetamid (IAA)

Geräte:

- Einmalpipetten 10 ml
- Schüttler

**SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Die für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese benötigten Gele hatten eine Acrylamidkonzentration von 12,5%. Die Gele sind 25 cm breit, 20 cm hoch und 1,5 mm dick. Sie wurden in einem Hoefer DALT Multiple Gel System gegossen. Die Gellösung wurde möglichst luftfrei in das Hoefer System eingefüllt. Danach wurden die Gele mit 1 ml Butanol überschichtet, um eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Die Gele mussten mindestens 4 Stunden polymerisieren. Anschließend wurden die aquilibrierten IPG-Strips mit Laufpuffer gespült und horizontal auf die fertigen Gele gelegt und danach mit 1%iger Agaroselösung luftblasenfrei überschichtet.

Die Glaskassetten mit den fertig vorbereiteten Gelen wurden in die Hoefer DALT-Elektrophoresekammer gestellt. Vorher wurde die Elektrophoresekammer mit etwa 20 Liter 10 °C kaltem Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 100 Volt. Beendet wurde die Elektrophorese sobald die Lauffront, sichtbarmach durch Bromphenolblau, sich ca. 1 cm vor dem Trenngelende

befand. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus den Glaskassetten entfernt und für 2 Stunden in Fotoschalen mit Fixierlösung gegeben.

Gellösung für 12 Gele 12,5%:

- Acrylamid Stock 30% 513 ml
- 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8 321 ml
- 10% SDS-Lösung 13 ml
- 10% APS-Lösung 13 ml
- TEMED 182 µl

Laufpuffer 2 Liter 10-fach konzentriert:

- 0,25 M TRIS Base
- 1,92 M Glycin
- 1% SDS

Agarose:

- 1% Low melting Agarose
- 100 ml Laufpuffer
- Bromphenolblau

Fixierlösung:

- 50% Ethanol
- 10% Essigsäure

Geräte:

- Hoefer DALT Multiple Gel System
- Hoefer DALT-Elektrophoresekammer

## 2.5 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250

Coomassie Brilliant Blue ist ein organischer Farbstoff, der sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren anlagert und die Proteine unspezifisch anfärbt. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei etwa 100 ng [46]. Die zu färbenden Gele wurden für 24 Stunden unter leichtem Schwenken in die Coomassie

Färbelösung gegeben. Anschließend wurden die Gele in Reinstwasser gespült und solange in der Entfärbelösung inkubiert, bis der Gelhintergrund farblos war. Die Entfärbelösung wurde mehrfach gewechselt. Danach wurden die Gele in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert [43].

Färbelösung:

- 50% Methanol
- 10% Essigsäure
- 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärbelösung:

- 5% Isopropanol
- 7% Essigsäure

## 2.6 Computergestützte Auswertung

Die Gele wurden nach der Färbung mit einem Umax Mirage II Scannner und der Software Magic Scan 4.3 eingescannt. Die Auflösung betrug 200 dpi bei einer Farbtiefe von 16 Bit. Die Imagedateien wurden im TIF-Format gespeichert.

Die Auswertung der Gelbilder erfolgte mit der Software Phoretix 6.01. Zuerst wurde eine automatische Spoterkennung durchgeführt. Da die Spoterkennung nicht alle vorhandenen Spots eindeutig erkannte, wurden nicht erkannte Spots per Hand hinzugefügt bzw. falsche gelöscht. Auch der anschließende automatische Vergleich der unterschiedlichen Gele machte eine manuelle Nachbearbeitung notwendig. Mit Hilfe der Software kann die optische Dichte der einzelnen Spots gemessen und verglichen werden. Sie korreliert in einem gewissen Bereich mit der Menge an Protein. So lassen sich Unterschiede in den einzelnen Gelen verifizieren [47].

## 2.7 Proteinidentifizierung

### 2.7.1 Spotpicking

Die zu analysierenden Spots wurden mit Hilfe des Flexys Proteomics Picker aus den Gelen ausgestochen. Dazu wurde das zu untersuchende Gel aus der Folie

entnommen und in eine Fotoschale gelegt und für eine halbe Stunde in Reinstwasser leicht geschüttelt. Danach wurde das Gel auf die Glasplatte des Flexys Proteomics Picker gelegt. Mit Hilfe einer Kamera wird ein Bild des Gels erstellt. Nach Markierung der zu analysierenden Spots, erfolgt die automatische Ausstechung der Spots. Die gestochenen Spots wurden in rosa 96er Wellplates pipettiert.

**Geräte und Material:**

- Flexys Proteomics Picker
- 96-Wellplates rosa
- 2D-Elektrophoresegele
- Reinstwasser

**2.7.2 Automatischer Verdau**

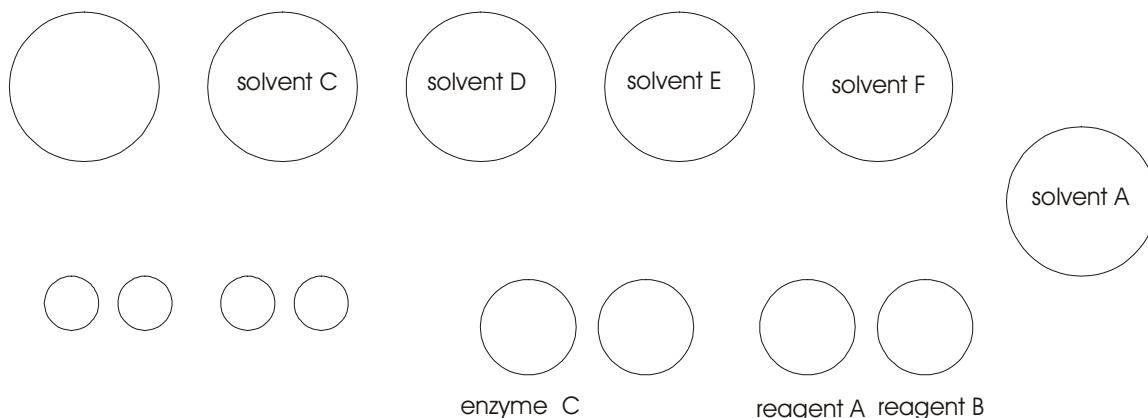
Um die ausgestochenen Proteinspots weiter analysieren zu können, müssen sie zuerst entfärbt und anschließend mit Hilfe von Trypsin in Peptide aufgespalten werden. Trypsin gehört zu den Endopeptidasen und spaltet die Proteine spezifisch nach Argenin und Lysin in Peptide. Diese Fragmente können dann im nächsten Schritt mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert werden [43].

Die Entfärbung und der Verdau wurden automatisch mit Hilfe der Investigator ProGest Protein Digest-Station durchgeführt.

**Geräte und Materialien:**

- Investigator ProGest Protein Digest-Station
- Vakuumzentrifuge Speed Vac
- 96er Wellplate rosa mit ausgestochenen Proteinspots
- 96er Wellplate blau
- Solvent A: Acetonitril
- Solvent C: 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )
- Solvent D: 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- Solvent E: 10% Ameisensäure
- Solvent F: 30 ml Reinstwasser
- Reagenz A: 10 mM DTT in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (15.4 mg DTT in 10 ml Puffer)
- Reagenz B: 100 mM IAA in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (185 mg IAA in 10 ml Puffer)

- Enzym C: 1 Vial Trypsin (20 µg) + 300 µl Resuspensionspuffer (= 50 mM Essigsäure)



**Abbildung 2-1:** Bestückung des Digesters mit den verschiedenen Lösungen

Am Ende des Verdauvorganges wurden die Peptide eluiert und in eine blaue 96er Wellplate überführt. Anschließend wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und danach mit einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac®) lyophilisiert.

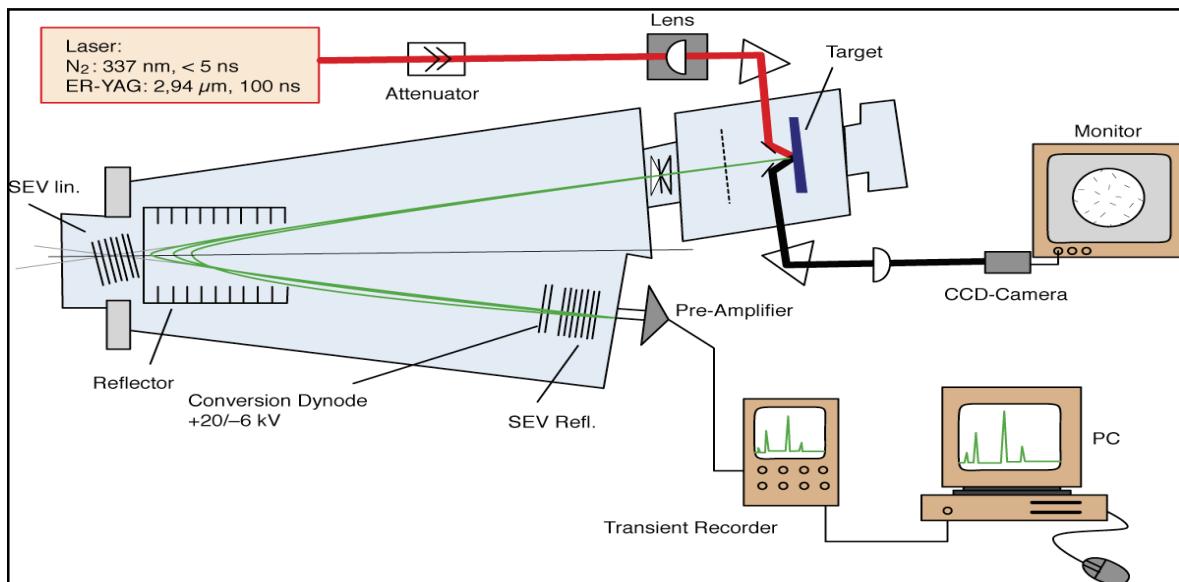
### 2.7.3 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Massenspektrometrie

Die Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Massenspektrometrie (MALDI-ToF-MS) ist eine Analysenmethode zur Bestimmung der Molekülmassen von Ionen im Hochvakuum. Dazu werden Probenmoleküle in eine Matrixsubstanz mit hohem UV-Absorptionsvermögen kokristallisiert (üblicherweise  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure oder 2,5-Dihydroxy-benzoesäure). Durch gepulsten Laserbeschuss kommt es zur Übertragung der Lichtenergie von den Matrixmolekülen auf die Peptide der Probe, die daraufhin in einem Schritt ionisiert und aus dem Kokristallisat desorbiert werden. Beim Vorgang der Desorption/Ionisation werden hauptsächlich einfach geladene Molekülionen erzeugt, welche in die Gasphase übertreten. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld mit gleicher kinetischer Energie beschleunigt und durchfliegen anschließend eine feldfreie Driftstrecke.

Nahezu alle kommerziell erhältlichen MALDI-Massenspektrometer sind Flugzeitmassenspektrometer (time of flight, TOF). Aus der Ionenflugzeit zwischen Quelle und Detektor lässt sich direkt die Masse des Analyten berechnen. Für TOF-Analysatoren gibt es zwei Konstruktionsprinzipien:

- lineare TOF-Instrumente, bei denen die Ionen nach ihrer Beschleunigung auf einer geraden Flugbahn eine feldfreie Driftstrecke von der Quelle zum Detektor durchlaufen.
- Reflektor-TOF (reTOF) Instrumente, bei denen die Ionen auf ihrer Flugstrecke in den Detektor (mindestens einmal) reflektiert werden.

Das Reflektorsystem führt zu einer Fokussierung der Ionen und somit zu einer erhöhten Auflösung der Massenspektren (FWHM ca. 20.000), sowie zu einer höheren Präzision der Massenbestimmung (< 50 ppm).[48]



**Abbildung 2-2:** Schematische Darstellung eines Flugzeitmassenspektrometers. Der Laserimpuls (roter Weg) desorbiert die Probe vom Probenteller und startet über die Photodiode die Zeitmessung. Die Videokamera erlaubt die optische Betrachtung des Targets (schwarzer Weg). Je nach Schaltung können die Ionen (grüner Weg) einmal im Linear-Modus (Detektor SEV lin.) oder im Reflektor-Modus (Detektor-Modus: SEV Refl.) detektiert werden. SEV = Sekundärelektronenverstärker (Bioanalytik, 1998)

## Targetpräparation

Die Präparation des Stahltargets erfolgte automatisch mit Hilfe eines Pipettierroboters (MAP II). Dabei werden die lyophilisierten Proben aus dem Digester zuerst resolubilisiert und anschließend mit der Matrix rekristallisiert [42].

### Geräte und Material:

- MAP II
- Vortexer
- Zentrifuge

- CHCA
- 35% ACN/0.1% TFA Lösung
- 60% ACN/0.1% TFA Lösung
- Kalibrantenmischung
- Stahltarget
- Microvials

Zur Herstellung der CHCA-Lösung wurde eine Spatelspitze HCCA in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt und danach 1 ml einer 35% ACN/0,1% TFA-Lösung dazugegeben. Das Gemisch wurde anschließend gevortext und für 5 min in ein Ultraschalbad gestellt. Danach wurde das Gemisch kurz abzentrifugiert, für 15 min. stehengelassen und dann für 3 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf- Gefäß überführt. Für den Pipettievorgang wurden folgende Lösungen in Microvials vorbereitet und in den Roboter gestellt:

1. 60% ACN, 0.1% TFA
2. CHCA
3. Kalibrantenmischung

Nach etwa 1 Stunde waren die Targets fertig und wurden anschließend sofort der Massenspektrometrie zugeführt.

### **Massenspektrometrie**

Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Das verwendete Massenspektrometer war ein Reflex III-Instrument (Bruker). Das Gerät ist mit einem Stickstofflaser ( $\lambda = 337$  nm) und einer Ionenquelle mit verzögerter Extraktionstechnologie („delayed extraction“) ausgestattet. Die Analyse der Peptidgemische erfolgte im Reflektormodus. Die Beschleunigungsspannung betrug 25 kV. Es wurden ausschließlich positiv geladene Ionen analysiert. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden 100 bis 200 Einzelschussspektren aufsummiert. Die aufsummierten Spektren wurden anschließend mit der Software Biotools (Bruker) vollautomatisch prozessiert [49].

#### 2.7.4 Computergestützte Proteinidentifizierung

Die gemessenen Massen der einzelnen Peptide sind spezifisch für das zugrundeliegende Protein (Peptide Mass Fingerprinting). Die experimentell bestimmten Datensätze können mit simulierten Daten aus Sequenzdatenbanken verglichen und auf diese Weise die dazugehörigen Proteine identifiziert werden.

Die Datenbanksuche erfolgte mit Biotools. Als Datenbanken dienten SwissProt und MSDB.

Folgende Einstellungen wurden für die Datenbanksuche verwendet:

*taxonomy* : Homo sapiens

*enzyme* : Trypsin

*missed cleavage* : 2

*fixed modification* : Carbamidomethyl (C)

*variable modification* : Oxidation (M)

*peptide tolerance* : 80 ppm

Eine positive Identifizierung war erreicht, wenn der Score über 80 lag und die meisten dominanten Signale zugeordnet werden konnten. Die Zuordnung und Bezeichnung der Proteine (ID, Accesion-Nr.) erfolgten nach der SwissProt-Datenbank.

#### 2.8 Immunanalytik

Um die Unterschiede in den Expressionsmustern der Proteomanalyse zwischen RA und OA zu validieren, wurden die Expressionsunterschiede mit Hilfe der Immunanalytik untersucht. Dazu wurden zwei als unterschiedlich exprimiert ermittelte Proteine erneut untersucht. Bei diesen Proteinen handelte es sich um Endoplasmic und Rho GDP-dissociation Inhibitor 2.

### **2.8.1 Westernblot**

Western-Blotting ist eine hochempfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen. Mittels Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine werden anschließend über Kapillartransfer oder Elektrotransfer auf einen geeigneten Träger, z.B. Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF), übertragen. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf der Membran immobilisiert werden. Anschließend kann man die transferierten Proteine mit geeigneten Antikörpern nachweisen. [50]

### **Herstellung des Proteinextraktes**

Bei dem für die Proteinextraktgewinnung verwendeten Material handelte es sich um Synovia von Patienten, die sich einem operativen Eingriff am Knie oder Handgelenk unterzogen haben. Die Proben wurden im Institut für Pathologie der Universität Leipzig von Prof. Dr. med. Stiehl untersucht und eindeutig der RA bzw. OA zugeordnet. Insgesamt wurden 8 Rheumapatienten und 8 Osteoarthrosepatienten untersucht. Die Daten der einzelnen Patienten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

**Tabelle 2-3:** Patientendaten: Die schwarz unterlegten Proben wurden auch für die Proteomanalyse verwendet.

Patienten-Nummer	Alter in Jahren	Geschlecht	CRP [mg/l]	Diagnose
K41	42	weiblich	76,8	RA
K48	55	weiblich	62,2	RA
<b>K55</b>	<b>57</b>	<b>weiblich</b>	<b>17,4</b>	<b>RA</b>
<b>K59</b>	<b>55</b>	<b>männlich</b>	<b>49,5</b>	<b>RA</b>
R46	46	männlich	15,9	RA
R47	58	männlich	24,9	RA
R48	23	weiblich	5,3	RA
R51	49	weiblich	4,7	RA
K40	69	weiblich	12,2	OA
<b>K42</b>	<b>61</b>	<b>weiblich</b>	<b>&lt; 5</b>	<b>OA</b>
K54	65	männlich	< 5	OA
<b>K57</b>	<b>56</b>	<b>männlich</b>	<b>&lt; 5</b>	<b>OA</b>
R41	71	weiblich	7,2	OA
R42	81	männlich	6,1	OA
R43	67	weiblich	< 5	OA
R44	65	männlich	< 5	OA

Die Proteinextraktion der bei minus –80°C tiefgefrorenen Gewebestückchen erfolgte in einem in flüssigem Stickstoff stehenden Mörser. Mit Hilfe eines Pistills wurden die Gewebestücke vorsichtig zerrieben. Pro 100 mg Gewebe wurden 0,6 ml Lysepuffer dazugegeben. Der Gewebestaub wurde in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und 0,1 g Stahlkügelchen dazugegeben. Danach wurden die Eppendorf-Gefäße für 10 Sekunden in ein 90°C Wasserbad gehalten und anschließend gevortext. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt und die Probe anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dieser Vorgang wurde anschließend wiederholt. Dann wurden die Proben für 20 min bei 13000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der im Überstand enthaltene Proteinextrakt wurde für den Westernblot genommen. Zum Schluss erfolgte die Proteinbestimmung mit dem Micro BCA™ Kit der Firma Pierce.

**Geräte:**

- Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit
- Photometer
- Zentrifuge
- Mörser
- Eppendorf Gefäße, 2 ml

**Lysepuffer:**

- 10 mM TRIS pH7.4
- 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
- 1% SDS
- 1 mM EDTA
- Proteaseinhibitor: Complete mit EDTA

**SDS-Polyacrylamidgelektrophorese**

Für die Elektrophorese wurden 60 µg Protein pro Patient verwendet. Pro Probe wurden noch 28 µl Reinstwasser und 7 µl 5fach konzentrierter SDS-Probenpuffer dazugegeben.

Für die Elektrophorese wurde ein 10% SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Zu den Proteinen wurden zusätzlich noch zwei Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

Die Elektrophoresekammer (PROT-RESOLV MINI-LC) wurde mit einem Liter Laufpuffer gefüllt. Bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA und einer Spannung von 120 V wurden die Proteine im Gel aufgetrennt.

**Tabelle 2-2:** Zusammensetzung der Gele

	<b>Trenngel (10%)</b>	<b>Sammelgel (4.5%)</b>
Acrylamid	7 ml	1,5 ml
Reinstwasser	5 ml	7 ml
TRIS/HCl, pH 6.8	-	1,25 ml
TRIS/HCl, pH 8.9	8 ml	-
10% SDS	216 µl	100 µl
10% APS	160 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

**Geräte:**

- Elektrophoresekammer, PROT-RESOLV MINI-LC

**Laufpuffer (10fach konzentriert):**

- 0,25 M TRIS pH 8,9
- 1% SDS
- 1,92 M Glycin

**SDS-Probenpuffer (5fach konzentriert):**

- 312,5 mM TRIS/HCl pH 6.8
- 10% SDS
- 325 mM DTT
- 0,08 g Bromphenolblau
- 50% Glycerin

**Molekulargewichtsmarker:**

- Page Ruler Unstained Protein Ladder
- Page Ruler Prestained Protein Ladder

**Proteintransfer**

Semi Dry Blot nach Kyse-Anderson [51]

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und für 30 Minuten in  $\epsilon$ -Puffer inkubiert.

Die Blotkammer bestand aus einer platinbeschichteten Anode. Auf diese wurden 6 Lagen mit High-TRIS (HT) Puffer angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Darauf folgten 3 Lagen in Low TRIS (LT) Puffer angefeuchtetes Filterpapier. Dann wurde die PVDF-Membran, die vorher mit Isopropanol und Reinstwasser inkubiert wurde, aufgelegt, und danach das zu blottende Gel. Anschließend folgten noch einmal 3 Mal drei Lagen Filterpapier die in  $\epsilon$ -Puffer befeuchtet wurden. Zum Schluss folgte die Stahlkatode, und der Elektroblot konnte gestartet werden. Der Blot wurde 2 Stunden bei einer Spannung von 25 Volt und einem Stromstärke von 200 mA durchgeführt. Nach Beendigung des Blottes wurde die PVDF-Membran mit Ponceau S gefärbt, um das Blotergebnis zu überprüfen.

ε-Puffer (pH 9,4):

- 40 mM ε-Aminocapronsäure
- 25 mM TRIS, pH 9,4
- 20% Methanol

HT-Puffer:

- pH 10,4
- 0,3 M TRIS
- 20% Methanol

LT-Puffer:

- pH 10,4
- 25 mM TRIS
- 20% Methanol

Ponceau S:

- 2% Ponceau S
- 30% Trichloressigsäure
- 30% Sulfosalicylsäure

Geräte:

- Blotkammer, Trans-Blot SD
- Filterpapier
- PVDF-Membran

**Immunfärbung**

Die PVDF-Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit Blocking-Puffer inkubiert, um freie Proteinbindestellen abzublocken. Danach wurde die PVDF-Membran für 2 Stunden mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran für 4 x 10 Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen und dann für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Danach folgte ein zweiter Waschschritt von 4 x 10 Minuten. Nun wurde der tertiäre Antikörper hinzugegeben und die Membran eine Stunde lang inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt von 4 x 10 Minuten

wurde das Chemiluminescence Substrat dazugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Mittels Röntgenfilm wurde das entstehende Licht gemessen. Der entwickelte Film wurde gescannt und mit der Software Phoretix 6.0.1 densitometrisch ausgewertet.

TBS:

- 50 mM TRIS/HCl pH 7.4
- 150 mM NaCl

Waschpuffer:

- TBS
- 0.05% Tween 20
- 0.1% BSA
- 0.02% Thimerosal

Blocking-Puffer:

- TBS
- 5% Milchpulver
- 1% BSA
- 0.02 % Thimerosal

Primärer Antikörper gegen Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 (1:200):

- Ly-GDI (sc-6047)
- Blocking-Puffer

Primärer Antikörper gegen Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 (1:200):

- Rho GDI $\alpha$  (sc-360)
- Blocking-Puffer

Primärer Antikörper gegen Endoplasmin (1:200):

- GRP 94 (sc-11402)
- Blocking-Puffer

Sekundärer Antikörper (1:20000)

- Biotin-goat anti-rabbit IgG
- Blocking-Puffer

Tertiärer Antikörper (1:10000):

- Streptavidin-Peroxidase
- Blocking-Puffer

Chemiluminescence Substrat:

- SuperSignal West Pico

### **2.8.2 Statistik**

Der statistische Unterschied zwischen den einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Studentischen t-Test's ermittelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Globale Proteomanalyse

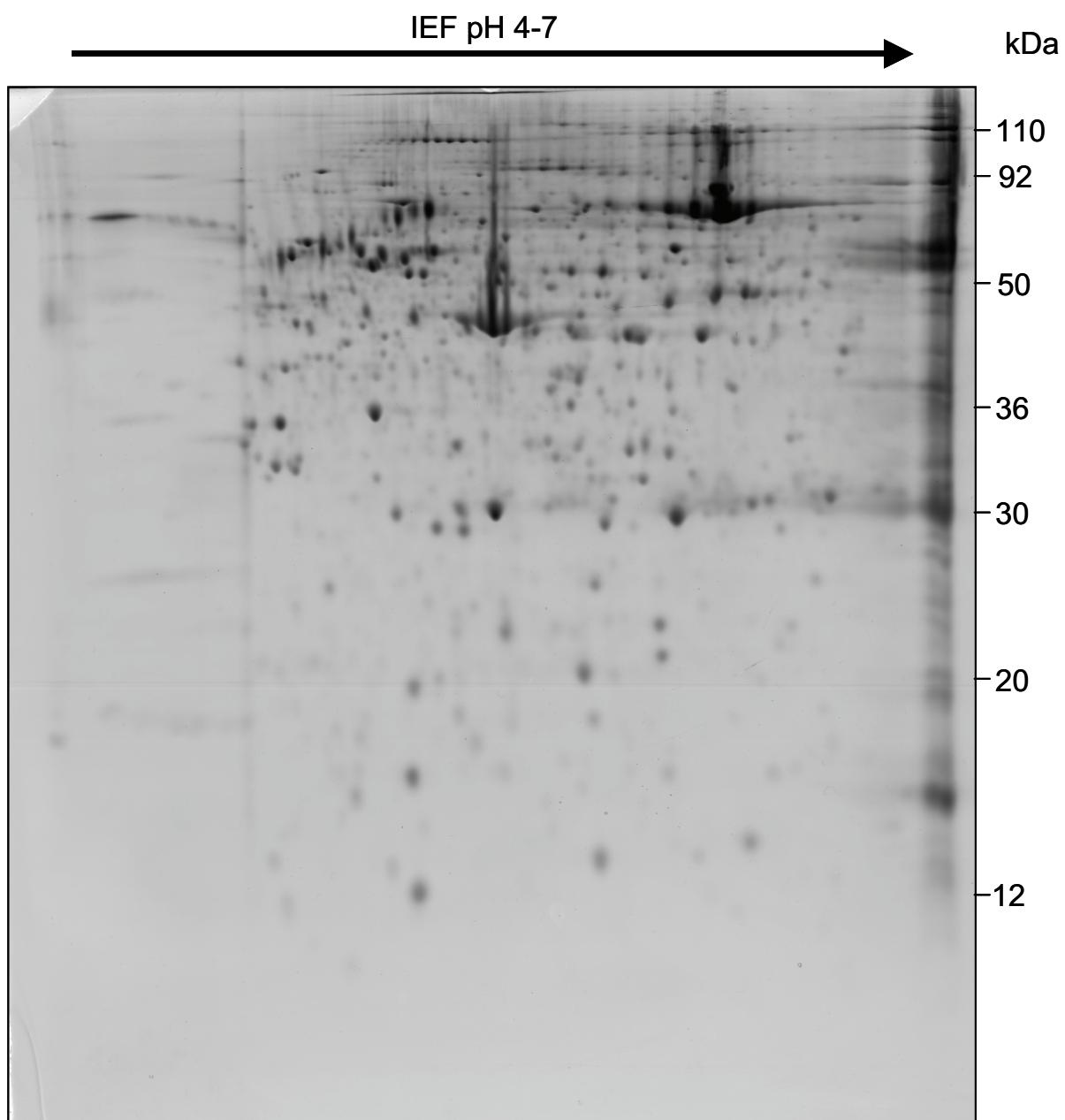
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden, mit Hilfe der Proteomanalyse, die Variationen der Proteinexpression bei einer häufigen autoimmunen Erkrankung, der rheumatoiden Arthritis (RA) untersucht. Als Vergleichskollektiv wurden Proben von Patienten mit Osteoarrose (OA) verwendet (siehe Abschnitt 2.1.).

Für die Arbeit wurden Synovialgewebe von 4 Patienten untersucht. Je zwei Proben stammen von Patienten mit rheumatoider Arthritis bzw. Osteoarrose. Die Proben stammen von OP-Resektaten aus Leipzig. Die Proben wurden von Prof. Dr. med. Stiehl pathologisch untersucht und eindeutig der RA bzw. OA zugeordnet.

In den Rheumageweben war laut pathologischem Befund etwa 1/3 Synovialisoberfläche exulceriert. Es war eine Vielzahl von Entzündungszellen wie Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und Plasmazellen nachweisbar. In der synovialen Adventita fanden sich vermehrt Kapillaren sowie Primär-Lymphfolikel.

In den Osteoarrosepräparaten war die synoviale Intima intakt. Es sind nur wenige Entzündungszellen zu sehen, was für eine leichte unspezifische Begleitsynovialitis spricht.

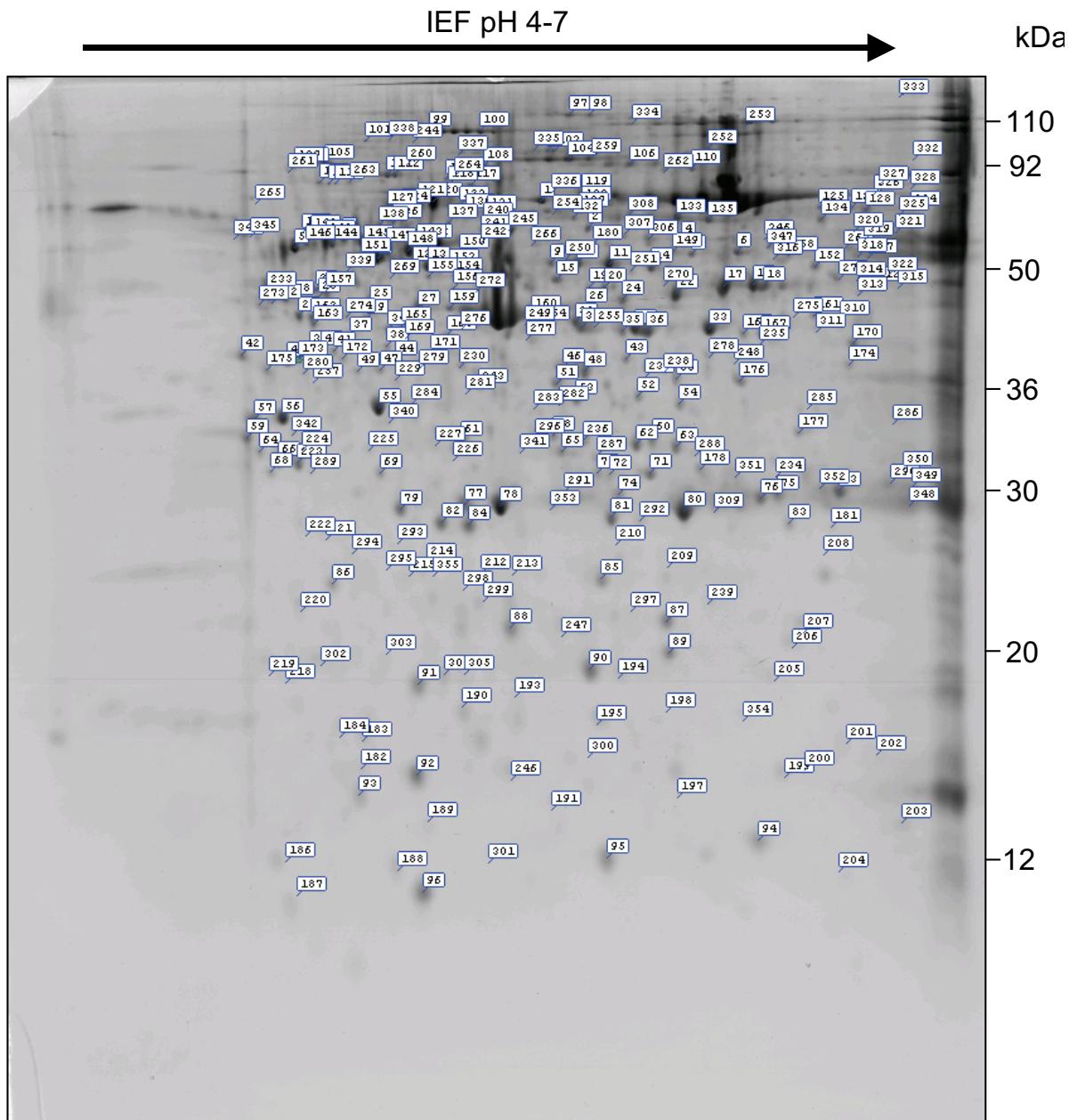
Es wurden je zwei 2D-Gele pro Patientenprobe erstellt. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt. Pro Gel waren rund 800 Spots erkennbar.



**Abbildung 3-1:** 2D-Gel von Proteinen aus Pannus eines Rheumapatienten, pH 4-7, Färbung: Coomassie Blue R 250.

Von den insgesamt acht Gelen wurden 659 Proteinspots ausgestochen, einem tryptischen Verdau unterzogen und die resultierenden Peptidgemische anschließend massenspektrometrisch untersucht. Von den 659 Spots konnten in 565 Spots Proteine mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden.

Ein Teil der 659 Spots stammte von identischen Spots aus verschiedenen Gelen. Dadurch konnte das „Matching“, also die Zuordnung von Spots in überlagerten Gelabbildungen kontrolliert und festgestellt werden, dass Spots, die an derselben Stelle, jedoch in unterschiedlichen Gelen auftraten, dasselbe Protein beinhalteten.



**Abbildung 3-2:** Referenzgel mit 336 markierten Spots. Die in diesen Spots identifizierten Protein sind in Tabelle 3-1 gelistet.

Insgesamt ergaben sich so 336 unterscheidbare Spots, die in einem Referenzgel (Abb. 3-2) zusammengefasst wurden und zu denen parallele massenspektrometrische Proteinidentifizierungsergebnisse mit guter Übereinstimmung vorliegen.

Insgesamt wurden 380 Proteine in den 336 Spots identifiziert. Da ein und dasselbe Protein teils in mehreren Spots auftaucht, handelte es sich letztlich um 205 unterschiedliche, nicht-redundante Proteine. In 44 Spots war mehr als ein Protein vorhanden.

**Tabelle 3-1:** Liste der Spots mit den massenspektrometrisch identifizierten Proteinen und der jeweiligen Accession-Nr.

Spot Nr.	Accession-Nr.	Proteinname	Spot Nr.	Accession-Nr.	Proteinname
1	P11142 ; P38606	Heat shock cognate 71 kDa protein ; Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	168	P07237	Protein disulfide-isomerase
2	P50990	T-Complex protein 1, theta subunit	169	Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein
3	P01009 ; P08670	Alpha-1-antitrypsin ; Vimentin	170	P02675	Fibrinogen beta chain
4	P30101	Protein-disulfide-isomerase A3	171	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1
5	P14625	Endoplasmin	172	P10909	Clusterin
6	P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial p	173	P14625	Endoplasmin
7	Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	174	P53004	Biliverdin reductase A
8	P05218	Class I beta tubulin	175	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain
9	P02768	Serum albumin	176	P11021	78 kDa glucose-regulated protein
10	P02768	Serum albumin	177	P78417 ; P02768	Glutathione transferase omega 1 ; Serum albumin
11	P02768	Serum albumin	178	P30040	Endoplasmic reticulum protein ERp29
12	P06576	ATP synthase beta chain, mitochondrial	180	P08254	Stromelysin-1
13	Q15084	Protein-Disulfid-Isomerase A6	181	Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
14	P32391 ; P02768	Actin-like protein 3 ; Serum albumin	182	P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A
15	Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	183	P02768	Serum albumin
16	P02768	Serum albumin	184	P02768	Serum albumin
17	P02768	Serum albumin	186	Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3
18	P02768	Serum albumin	187	P02652	Apolipoprotein A-II
19	P02768	Serum albumin	188	P26447	Protein S100-A4
20	P31930	Ubiquinol-cytochrome C reductase	189	P58546	Myotrophin
21	P08670	Vimentin	190	P02768	Serum albumin
22	P02768	Serum albumin	191	P02647	Apolipoprotein A-I
23	P02768	Serum albumin	194	P13073	Cytochrome-c oxidase
24	P02768	Serum albumin	195	P02766	Transthyretin
25	P00738	Haptoglobin	197	P06702	Calgranulin B
26	P06727	Apolipoprotein A-IV	198	P55008	Allograft inflammatory factor 1
27	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	199	P15090	Fatty acid-binding protein, adipocyte

Ergebnisse

---

28	P11021	78 kDa glucose-regulated protein	201	Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal
29	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	203	P61769	Beta-2-microglobulin
30	P02768	Serum albumin	204	P68871	Hemoglobin subunit beta
31	P02675	Fibrinogen beta chain	205	P01024	Complement C3
32	P02675	Fibrinogen beta chain	206	P01009	Alpha-1-antitrypsin
33	P02675	Fibrinogen beta chain	207	P00738	Haptoglobin
34	P14625	Endoplasmin	208	Q99497	Protein DJ-1
35	P26038	Moesin	209	P07203	Glutathione peroxidase 1
36	P02675	Fibrinogen beta chain	210	P22352	Plasma glutathione peroxidase
37	P14625	Endoplasmin	212	O75947	ATP synthase D chain
38	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	213	P02753	Plasma retinol-binding protein
39	P06748	Nucleophosmin	214	Q04760	Lactoylglutathione lyase
40	P06748	Nucleophosmin	215	P07355	Annexin A2
41	P61421	Vacuolar proton pump subunit d 1	218	O14950	Myosin regulatory light chain
42	P06468	Tropomyosin beta chain	220	P28065	Proteasome subunit beta type 9
43	P05388	60S acidic ribosomal protein P0	221	P83916	Chromobox protein homolog 1
44	P20774 ; P07910	Osteoinductive factor ; Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	222	Q9UBQ5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K
45	P14625	Endoplasmin	223	P31946	14-3-3 protein beta/alpha
46	Q9UBR2	Cathepsin Z	224	P61981	14-3-3 protein gamma
47	P29692	Elongation factor 1-delta	225	P07237	Protein disulfide-isomerase
48	P62879	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	226	P00738	Haptoglobin
49	P29692	Elongation factor 1-delta	227	Q9D8Y0	EF-hand domain-containing protein 2
50	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	229	O43396	Thioredoxin-like protein 1
51	P07437	Tubulin beta-1 chain	230	P55735	Protein SEC13 homolog
52	P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2	232	P08670	Vimentin
53	P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1	233	P13489 ; P08670	Ribonuclease inhibitor ; Vimentin
54	P09525	Annexin A4	234	P30084	Enoyl-CoA hydratase
55	P08758	Annexin v	235	P40121	Macrophage-capping protein
56	P12324	Tropomyosin, cytoskeletal type	236	P60709	Actin
57	P07226	Tropomyosin, fibroblast non-muscle type	237	Q9UBR2	Cathepsin Z
58	Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2	238	O00764	Pyridoxine kinase
59	P62258	14-3-3 protein epsilon	239	P15531Z	Nucleoside diphosphate kinase A
60	P07339	Cathepsin D	240	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
61	O00299	Chloride intracellular channel protein 1	241	P02774	Vitamin D-binding protein

Ergebnisse

---

62	P47756	F-actin-capping protein subunit beta	242	P02774	Vitamin D-binding protein
63	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	243	P54920	Alpha-soluble NSF attachment protein
64	P27348	14-3-3 protein theta	244	P01009	Alpha-1-antitrypsin
65	P40261	Nicotinamide N-methyltransferase	245	P10809	60 kDa heat shock protein
66	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	246	O75368	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein
68	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	247	P00738	Haptoglobin
69	P04632	Calpain small subunit 1	248	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
70	P02743	Serum amyloid P-component	249	P00738	Haptoglobin
71	Q13162	Peroxiredoxin-4	250	P02679 ; P02768	Fibrinogen gamma chain ; Serum Albumin
72	O75489	NADH-ubiquinone oxidoreductase	251	P48637	Glutathione synthetase
73	P02768	Serum Albumin	252	Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB
74	P04792	Heat shock protein beta-1	253	P12110	Collagen alpha-2(VI) chain
75	P04792	Heat shock protein beta-1	254	Q03252	Lamin-B2
76	P02768	Serum albumin	255	P02768 ; P00738	Serum Albumin ; Haptoglobin
77	P02647	Apolipoprotein A-I	257	Q96FW1	Ubiquitin thioesterase OTUB1
78	P02647	Apolipoprotein A-I	259	P02679	Fibrinogen gamma chain
79	P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	260	Q32P28	Prolyl 3-hydroxylase 1
80	P02768	Serum albumin	261	Q14974	Importin subunit beta-1
81	P09211	Glutathione S-transferase P	262	P02768 ; P06396	Serum Albumin ; Gelsolin
82	P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	263	Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1
83	P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase , mitochondrial	264	P08670 ; P04217	Vimentin ; Alpha-1B-glycoprotein
84	P07858	Cathepsin B	265	P07226	Tropomyosin, fibroblast non-muscle type
85	P32119	Peroxiredoxin 2	266	P08670	Vimentin
86	P13693	Translationally-controlled tumor protein	267	P78371 ; P50395	T-complex protein 1 subunit beta ; Rab GDP dissociation inhibitor beta
87	P00738	Haptoglobin	268	P02675	Fibrinogen beta chain
88	P02794	Ferritin heavy chain	269	P01009	Alpha-1-antitrypsin
89	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	270	P36955 ; P02768	Pigment epithelium-derived factor ; Serum albumin
90	P02792	Ferritin light chain	271	P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta
91	P02768	Serum albumin	272	O60664	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1
92	P09382	Galectin-1	273	Q96D15	Reticulocalbin-3;

Ergebnisse

93	P10599	Thioredoxin	274	P25311 ; P04196	Zinc-alpha-2-glycoprotein ; Histidine-rich glycoprotein
94	P31949	Protein S100-A11	275	Q9BXN1	Asporin
95	P26447	Protein S100-A4	276	Q9NYL9	Tropomodulin-3
96	P06703	Protein S100-A6	277	Q9P1B0	Glutaredoxin-3
97	P02679	Fibrinogen gamma chain	278	P50213 ; P02768	Isocitrate dehydrogenase ; Serum albumin
98	P02679	Fibrinogen gamma chain	279	P20774	Osteoinductive factor
99	P12109	Collagen alpha 1(VI) chain	280	P01009	Alpha-1-antitrypsin
100	P12109	Collagen alpha 1(VI) chain	281	P02452	Collagen alpha-1(I) chain
101	P12109 ; P01009	Collagen alpha 1(VI) chain ; Alpha-1-antitrypsin	282	P20774 ; P02649	Osteoinductive factor ; Apolipoprotein E
102	P02679	Fibrinogen gamma chain	283	P02461	Collagen alpha-1(III) chain
103	Q14764	Major vault protein	284	P08758	Annexin V
104	P02679	Fibrinogen gamma chain	285	P23396	40S ribosomal protein S3
105	P14625	Endoplasmin	286	P25786	Proteasome subunit alpha type-1
106	P02679	Fibrinogen gamma chain	287	P35232	Prohibitin
107	Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	288	O95336	6-phosphogluconolactonase
108	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	289	P15374	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
109	Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	290	P30041	Peroxiredoxin-6
110	P02768 ; P06396	Serum albumin ; Gelsolin	291	P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1
111	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	292	P28070	Proteasome subunit beta type-4
112	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	293	P02647	Apolipoprotein A-I
113	P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	294	P28072	Proteasome subunit beta type-6
114	P14317 ; P51884	Hematopoietic lineage cell-specific protein ; Lumican	295	Q04760	Lactoylglutathione lyase
115	P14317 ; P51884	Hematopoietic lineage cell-specific protein ; Lumican	296	P07339	Cathepsin D
116	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	297	P05452	Tetranectin
117	P04217	Alpha-1-B-glycoprotein	298	P02794	Ferritin heavy chain
118	P04217 ; P08670	Alpha-1-B-glycoprotein ; Vimentin	299	P00738	Haptoglobin
119	P02790	Hemopexin	300	P29373	Cellular retinoic acid-binding protein 2
120	P08670	Vimentin	301	P26447	Protein S100-A4
121	P08670	Vimentin	302	P24844	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform

Ergebnisse

---

122	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1	303	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
123	P20700 ; P08670	Lamin-B1 ; Vimentin	304	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
124	P08670	Vimentin	306	P30101	Protein disulfide-isomerase A3
125	P02768	Serum albumin	307	Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2
126	P02545 ; P49368	Lamin-A/C ; T-complex protein 1 subunit gamma	308	P13797	Plastin-3
127	P08670	Vimentin	309	P02768	Serum albumin
128	Q16555 ; P02545	Dihydropyrimidinase-related protein 2 ; Lamin-A/C	310	Q9BXN1	Asporin
129	P08107 ; P13797 ; P13796	Heat shock 70 kDa protein 1 ; Plastin-3 ; Plastin-2	311	P51570	Galactokinase
130	P13796	Plastin-2	312	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4
131	P13796	Plastin-2	313	O00495	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11
132	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	314	P06733	Alpha-enolase
133	P02768	Serum albumin	315	P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III
134	P02768	Serum albumin	316	Q07960	Rho GTPase-activating protein 1
135	P02768	Serum albumin	317	P02768 ; P02790	Serum albumin ; Hemopexin
136	P30153 ; P08670	Serine/threonine protein phosphatase 2A ; Vimentin	318	P02675	Fibrinogen beta chain
137	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	319	P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1
138	P14625	Endoplasmin	320	P02749	Beta-2-glycoprotein I
139	P07237	Protein disulfide-isomerase	321	P02749 ; P02675	Beta-2-glycoprotein I ; Fibrinogen beta chain
140	P07237	Protein disulfide-isomerase	322	P26641 ; P02787	Elongation factor 1-gamma ; Serotransferrin
141	P08670	Vimentin	323	P02768	Serum albumin
142	Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	324	P02545	Lamin-A/C
143	P08670 ; Q71U36	VIMENTIN ; Tubulin alpha-1A chain	325	P02545	Lamin-A/C
144	P08670 ; P14625	Vimentin ; Endoplasmin	326	P02787	Serotransferrin

Ergebnisse

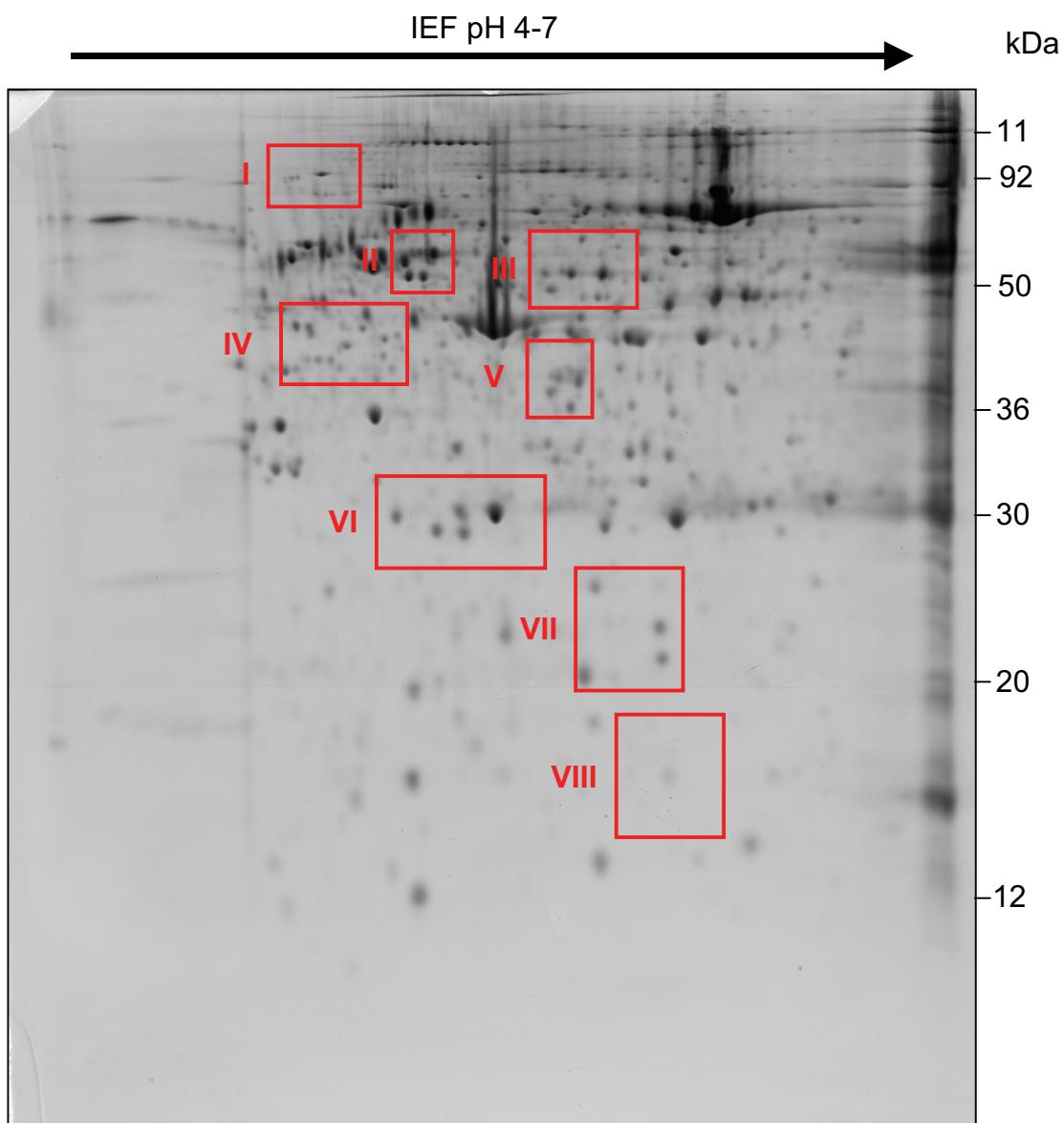
145	P01009	Alpha-1-antitrypsin	327	P02545 ; P26038	Lamin-A/C ; Moesin
146	P08670 ; P07237	Vimentin ; Protein disulfide-isomerase	328	P02545 ; P26038	Lamin-A/C ; Moesin
147	P01009 ; P08670	Alpha-1-antitrypsin ; Vimentin	332	P02787	Serotransferrin
148	P01009 ; P08670	Alpha-1-antitrypsin ; Vimentin	334	P12110	Collagen alpha-2(VI) chain
149	P02768	Serum albumin	335	Q14764	Major vault protein
150	P01009	Alpha-1-antitrypsin	336	P02790	Hemopexin
151	Q13885	Tubulin beta-2A chain	337	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4
152	P02768	Serum albumin	338	P01009 ; P08670	Alpha-1-antitrypsin ; Vimentin
153	Q13561	Dynactin subunit 2	339	P01009 ; P08670	Alpha-1-Antitrypsin ; Vimentin
154	P17980	26S protease regulatory subunit 6A	340	O14579	Coatomer subunit epsilon
155	P50502	Hsc70-interacting protein	341	Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4
156	O60664	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1	342	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain
157	P08670	Vimentin	344	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein
158	P08670	Vimentin	345	P08670 ; P02765	Vimentin ; Alpha-2-HS-glycoprotein
159	P06727 ; P60709	Apolipoprotein A-IV ; Actin	346	P30101	Protein disulfide-isomerase A3
160	P60709	Actin	347	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase
161	Q9UBS4 ; Q9BXN1	DnaJ homolog subfamily B member 11 ; Asporin	349	P02768	Serum albumin
162	P08865	40S RIBOSOMAL PROTEIN SA	350	P60900	Proteasome subunit alpha type-6
163	P01024	Complement C3	352	P02768	Serum albumin
164	P02768	Serum albumin	353	P30041 ; P02647	Peroxiredoxin-6 ; Apolipoprotein A-I
165	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1	354	P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
166	P40121	Macrophage-capping protein	355	P30626	Sorcin
167	P40121	Macrophage-capping protein			

### 3.2 Differenzielle Analyse rheumatoider Arthritis *versus* Osteoarthrose

Die Proteomanalyse zwischen RA und OA wurde mit je zwei Patienten pro Gruppe durchgeführt. Für den Vergleich der Proteinexpression wurden insgesamt 8 Gele erstellt, 2 pro Patient. Da ein Gel von Osteoarthrosepatient OA 2 qualitativ deutlich schlechter ausgefallen war, wurde dieses Gel nicht für die differenzielle Analyse verwendet.

Mit Hilfe der Software Phoretix wurden die Gele miteinander verglichen, um die Bereiche mit unterschiedlich exprimierten Proteinspots zu finden. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Gelen zu verbessern, wurden nur die normalisierten Volumina der einzelnen Spots miteinander verglichen. Das Volumen des einzelnen Spots als normalisiertes Volumen wurde berechnet, indem man es ins Verhältnis zur Summe des Volumens aller Spots des Gels setzte. Dieses normalisierte Volumen ist unabhängig von individuellen Abweichungen des Gels in Färbeintensität etc.

Um die Unterschiede in den Expressionsmustern zu ermitteln, wurde der Durchschnitt der normalisierten Volumina der gematchten Spots zwischen RA und OA errechnet. Spots, deren Abundanz sich um den Faktor 4 unterschied, wurden als differentiell exprimiert betrachtet und weiter analysiert. Weiterhin wurden nur solche Spots in die Analyse einbezogen, in denen nur ein Protein identifiziert wurde, da eine Quantifizierung zwischen den einzelnen Proteinen innerhalb eines Spots nicht möglich ist. Weitere Einschlusskriterien waren, dass erstens der Spot in allen Gelen der jeweiligen Patientengruppe vorhanden sein musste, zweitens übereinstimmend in der ganzen Patientengruppe fehlen musste und drittens in beiden Patientengruppen vorhanden, aber unterschiedlich stark (oder schwach) ausgeprägt sein musste. Wenn mehr als ein Spot pro Protein gefunden wurde, wurden die Durchschnittswerte aller zugehörigen Spots berücksichtigt.



**Abbildung 3-3:** 2D-Proteinmuster eines Rheumapatienten. Die farblich markierten Regionen zeigen die Bereiche, in denen Unterschiede in der Proteinexpression im Vergleich der Gele der RA-Gruppe mit der OA-Gruppe gefunden wurden.

Insgesamt 26 Proteinspots (14 Proteine) erfüllten die oben genannten Bedingungen. Diese sind geordnet nach ihren Eigenschaften bzw. Funktion in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Von den 14 Proteinen sind in der rheumatoiden Arthritis 13 stärker und eines schwächer exprimiert worden.

**Tabelle 3-2:** Auflistung der unterschiedlich exprimierten Proteine. Die schwarz unterlegten Spotnummern sind für den Vergleich verwendet worden. In den nicht unterlegten Spots war mehr als ein Protein vorhanden.

Proteinname	Gelregion	Spot Nr.	Veränderung RA/OA	Funktion/Zuordnung/ Eigenschaft
78 kDa glucose-regulated Protein	IV	<b>28, 176</b>	22,8	Heat-Shock-Protein 70 Familie
Hypoxia up-regulated Protein 1	I	<b>107, 109</b>	In OA nicht zu finden	Heat-Shock-Protein 70 Familie
Heat shock cognate 71 kDa Protein	IV	<b>1, 29, 38</b>	7,2	Heat-Shock-Protein 70 Familie.
Endoplasmin	IV	<b>5, 34, 37, 45, 105, 138, 144, 173</b>	4,4	Heat-Shock-Protein 90 Familie
Cathepsin Z	V	<b>46, 237</b>	18	Peptidase C1 Familie
Cathepsin B	VI	<b>84</b>	9,4	Peptidase C1 Familie
Stromelysin-1	III	<b>180</b>	In OA nicht vorhanden	Peptidase M10A Familie
Protein-Disulfid-Isomerase A6	II	<b>13</b>	4,4	Protein-Disulfid-Isomerase Familie
Thioredoxin domain-containing Protein 5	III	<b>15</b>	5,1	Protein-Disulfid-Isomerase Familie
Calgranulin-B	VIII	<b>197</b>	In OA nicht vorhanden	S-100 Familie
RHO GDP-dissociation Inhibitor 2	VI	<b>82</b>	4,5	Rho GDI Familie
Hematopoietic lineage cell-specific Protein	I	<b>114, 115</b>	In OA nicht vorhanden	Antigenrezeptor Signalkaskade
Tetranectin	VIII	<b>297</b>	0,1	Plasmaprotein

Nach ihren Eigenschaften konnten die Proteine bestimmten Funktionen bzw. Gruppen zugeordnet werden (Tabelle 3-3). Nachfolgend werden die differentiell exprimiert gefundenen Proteine geordnet nach Funktion bzw. Gruppenzugehörigkeit einzeln aufgeführt.

**Tabelle 3-3:** Einordnung der unterschiedlich exprimierten Proteine in funktionelle Gruppen

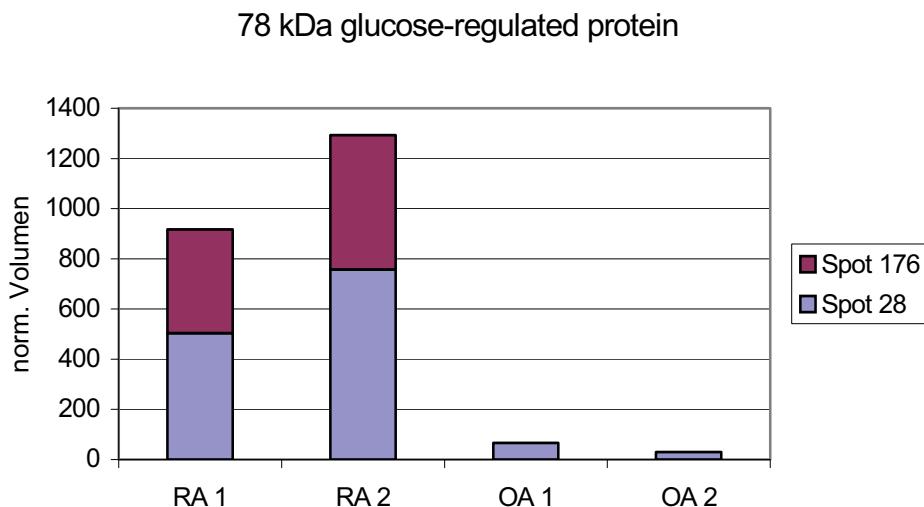
Funktion	Proteinname	Accession-Nr.
Heat-Shock Protein	- 78 kDa glucose-regulated Protein - Hypoxia up-regulated Protein 1 - Heat shock cognate 71 kDa Protein - Endoplasmic	P11021 Q9Y4L1 P11142 P14625
Peptidase	- Cathepsin Z - Cathepsin B - Stromelysin-1	Q9UBR2 P07858 P08254
Protein-Disulfid-Isomerase	- Protein-Disulfid-Isomerase A6 - Thioredoxin domain-containing Protein 5	Q15084 Q8NBS9
Zelluläres Immunsystem	- Calgranulin B - Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 - Hematopoietic lineage cell-specific Protein	P06702 P52566 P14317
Plasmaprotein	- Tetranectin	P05452

### 3.2.1 Heat-Shock-Proteine

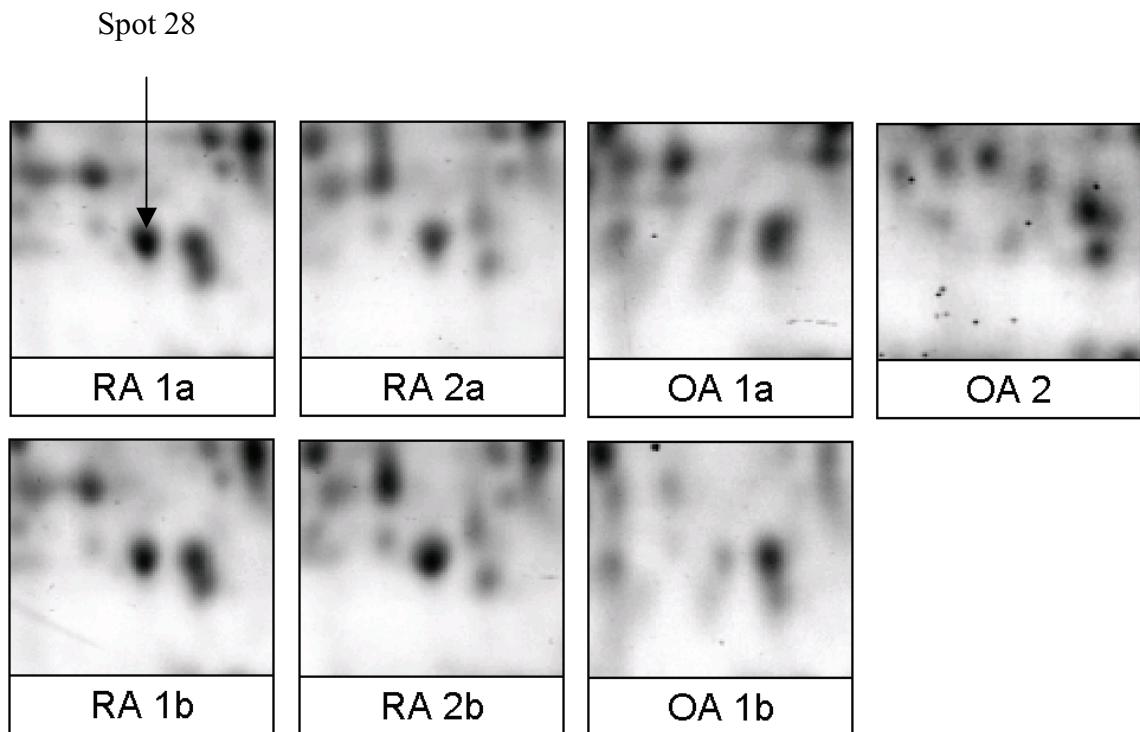
Heat-Shock-Proteine sind hochgradig konservierte Proteine. Sie kommen ubiquitär vor und werden durch eine Vielzahl von Stress- bzw. Umweltstimuli neu oder vermehrt synthetisiert. [52] Ihnen werden mehrere Funktionen zugeordnet. Die wichtigsten sind Faltungshilfe, Reparatur, Assistenz bei der Bildung von Proteinkomplexen, beim Proteintransfer zwischen Kompartimenten und beim Proteinabbau. Als molekulare Chaperone (engl. *chaperone*, Anstandsdame) verhindern sie falsche und fördern korrekte Faltungsschritte. Es gibt mehrere Gruppen von Heat-Shock-Proteinen, die nach der Molekülmasse ihrer häufigsten Vertreter benannt werden [53].

#### 78 kDa glucose-regulated Protein

Das 78 kDa glucose-regulated Protein gehört in die Heat-Shock-Protein 70 Gruppe. Es wurden zwei Spots mit diesem Protein identifiziert. Der Spot 28 konnte in allen Gelen gefunden werden, während der Spot 176 nur in den Rheumagelen vorhanden war. Der Quotient der normalisierten Volumina zwischen RA und OA beträgt 22,8. In der beispielhaften Detailansicht von Spot 28 in der Region IV ist der Intensitätsunterschied zwischen RA und OA deutlich zu erkennen.



**Abbildung 3-4:** Proteinexpression des 78 kDa glucose-regulated Proteins der RA- und OA-Patienten.

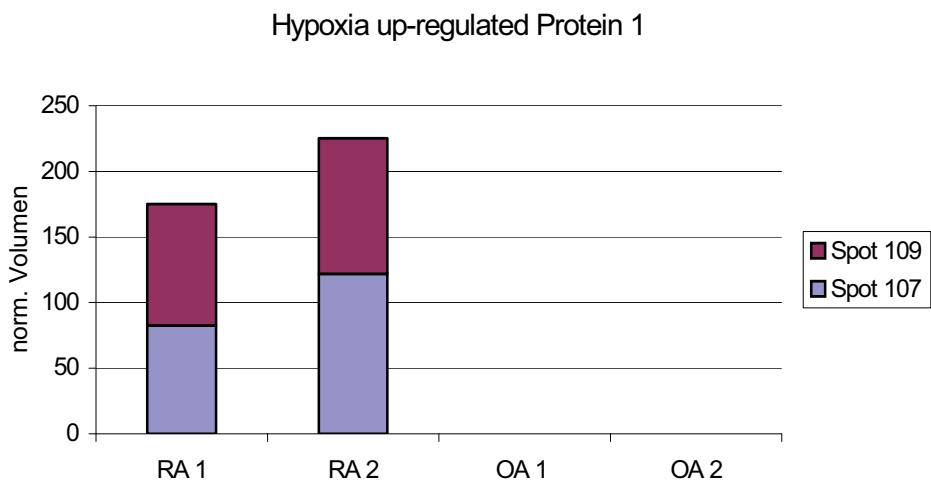


**Abbildung 3-5:** Detailansicht der Region IV in den verschiedenen Gelen, Spot 28 ist das 78 kDa glucose-regulated Protein.

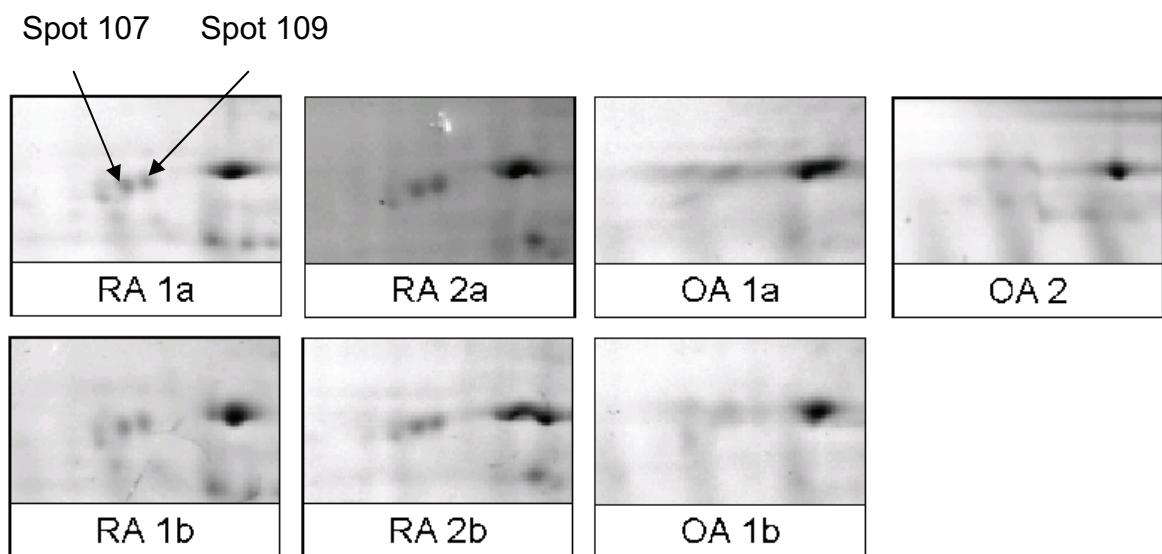
#### Hypoxia up-regulated Protein 1

Das Hypoxia up-regulated Protein 1 gehört ebenfalls in die Heat-Shock-Protein 70 Gruppe. Es wurden zwei Spots mit diesem Protein identifiziert. Die beiden Spots konnten nur in den Gelen der Rheumapatienten identifiziert werden. In den Gelen der Osteoarthrosepatienten waren die Spots nicht vorhanden.

In der Detailansicht der Region I sind die beiden Spots in den Rheumagelen gut zu erkennen, während sie in den Gelen der Ostoeoarthrosepatienten fehlen.



**Abbildung 3-6:** Proteinexpression des Hypoxia up-regulated Protein 1 der RA- und OA-Patienten.



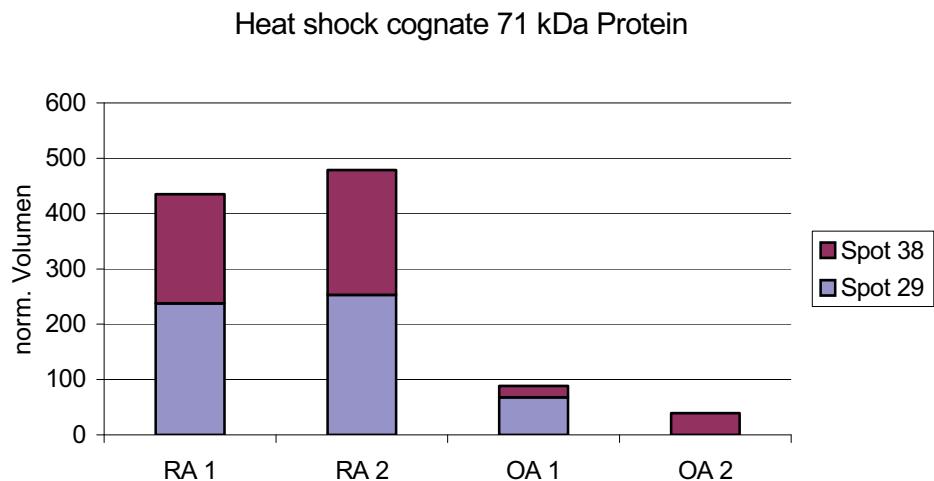
**Abbildung 3-7:** Detailansicht der Region I in den verschiedenen Gelen, Spot 107 und Spot 109 kennzeichnen das Hypoxia up-regulated Protein 1.

#### Heat-Shock cognate 71 kDa Protein

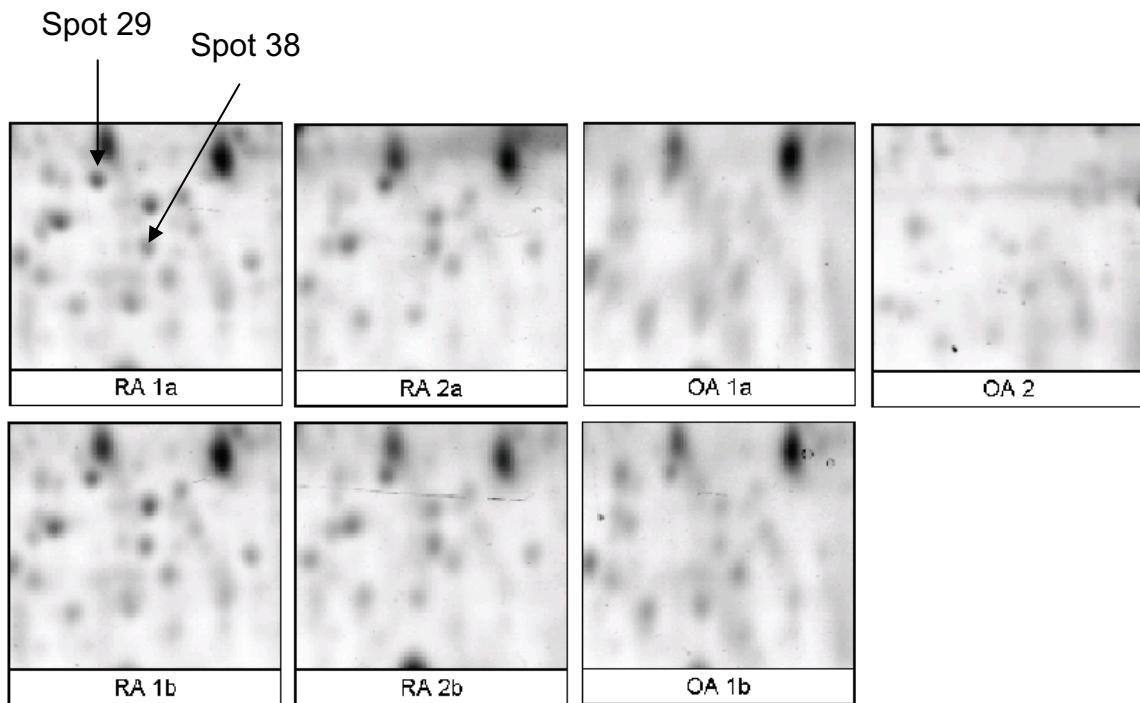
Das Heat-Shock cognate 71 kDa Protein gehört, wie der Name schon sagt, ebenfalls zur Heat-Shock-Protein 70 Gruppe. Das Protein wurde in insgesamt 3 Spots detektiert. In Spot 1 war aber noch ein zweites Protein nachweisbar, so dass Spot 1 nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde. Das Heat-Shock cognate 71 kDa

Protein war bei den Rheumapatienten im Vergleich zu den Osteoarthrosepatienten um den Faktor 7,2 erhöht.

In der Detailansicht der Region IV sind die beiden Spots in den Rheumagelen gut zu erkennen, während sie in den Osteoarthrosegelen deutlich schwächer bzw. gar nicht vorhanden sind.



**Abbildung 3-8:** Proteinexpression des Heat-Shock cognate 71 kDa Proteins der RA- und OA-Patienten.



**Abbildung 3-9:** Detailansicht der Region IV in den verschiedenen Gelen, Spot 29 und 38 kennzeichnen das Heat-Shock cognate 71 kDa Protein.

### Endoplasmin

Das Endoplasmin gehört in die Heat-Shock-Protein 90 Gruppe. Es wurden insgesamt 8 Spots mit dem Protein gefunden. In Spot 144 wurde noch ein weiteres Protein identifiziert, so dass dieser Spot nicht in die weitere Auswertung miteinbezogen wurde. Das Endoplasmin war bei den Rheumapatienten im Vergleich zu den Osteoarthrosepatienten um den Faktor 4,4 erhöht.

In der Detaillansicht der Region IV ist der Spot 37 beispielhaft für die anderen Spots dargestellt. Der Unterschied in der Spotintensität zwischen RA und OA ist deutlich zu erkennen.

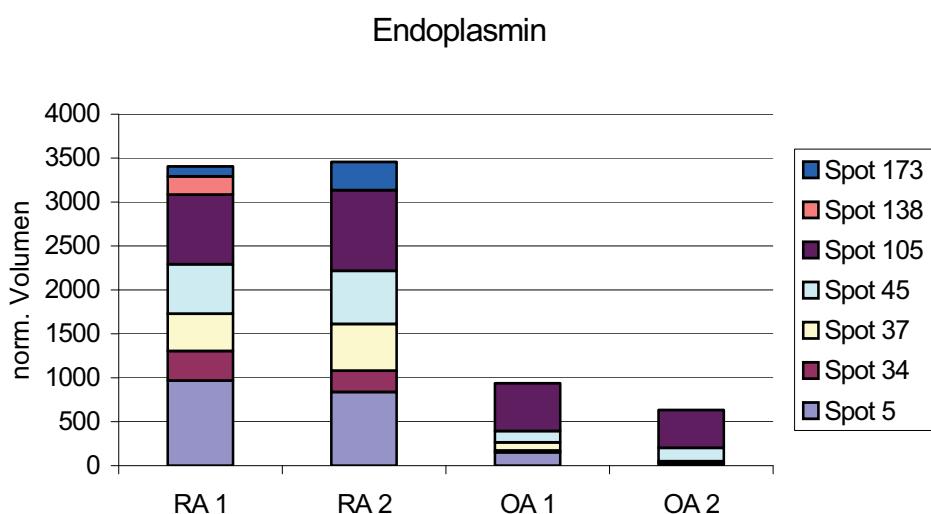


Abbildung 3-10: Proteinexpression von Endoplasmin der RA- und OA-Patienten.

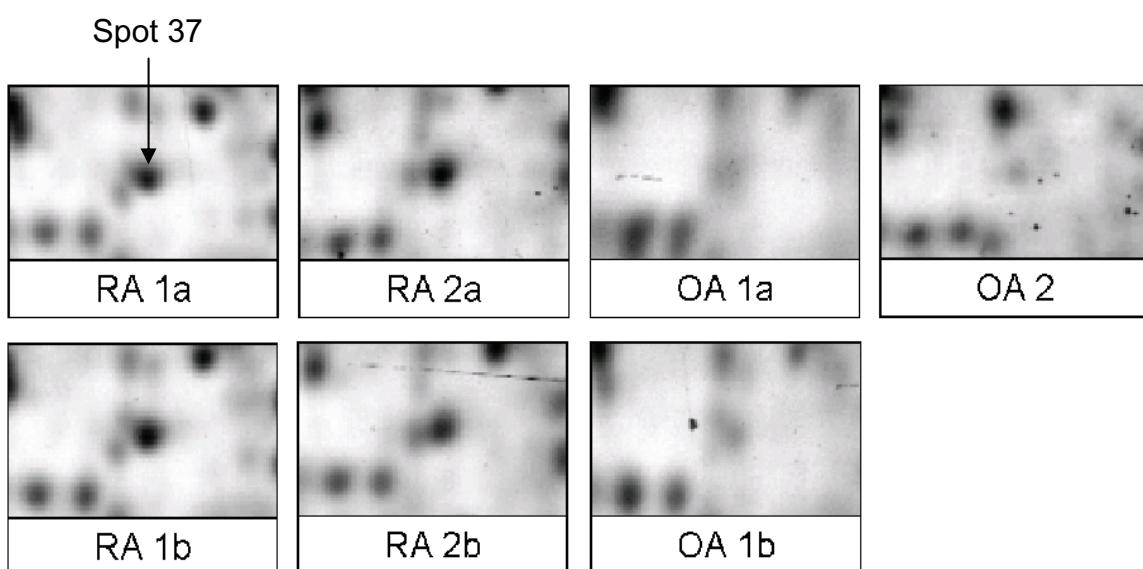


Abbildung 3-11: Detailansicht der Region IV in den verschiedenen Gelen, Spot 37 kennzeichnet Endoplasmin.

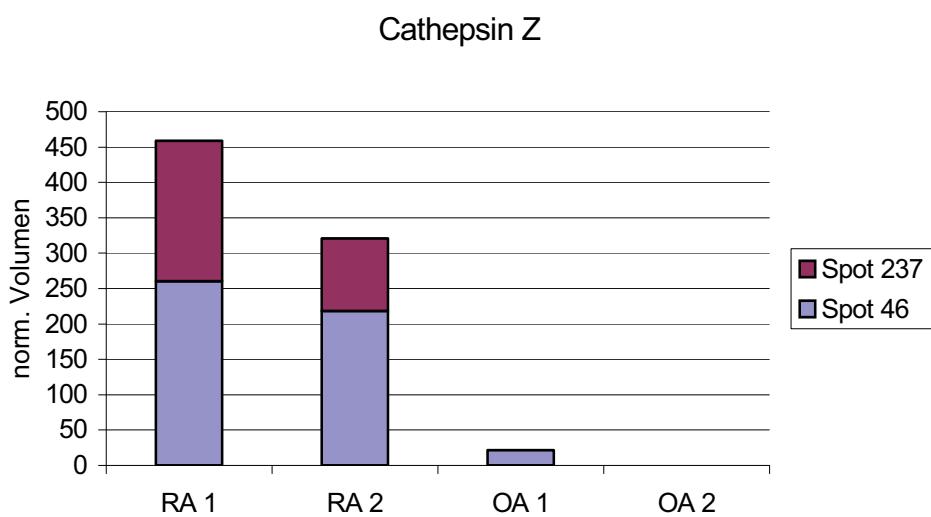
### 3.2.2 Peptidasen

Unter Peptidasen versteht man Enzyme, die Peptidbindungen unter Freisetzung kleinerer Peptide oder Aminosäuren hydrolytisch spalten können. Dabei werden Endopeptidasen, die eine Peptidbindung innerhalb einer Peptidkette spalten, von Exopeptidasen, die sie endständig angreifen, unterschieden [54].

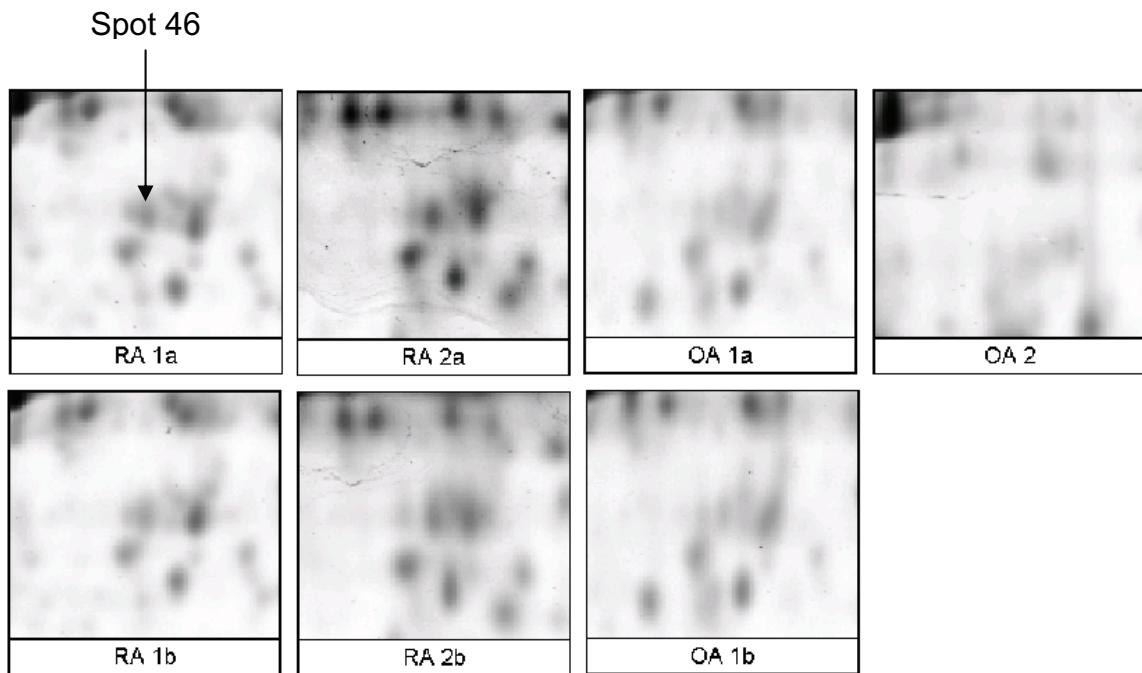
#### Cathepsin Z

Cathepsin Z ist eine ubiquitär vorkommende Cysteinpeptidase und gehört zur Gruppe der lysosomalen Enzyme [53]

Es wurden zwei Spots mit dem Protein gefunden. Die gefundenen Spots waren primär in den Rheumagelen vorhanden. Spot 46 wurde sehr schwach auch bei einem Osteoarthrosepatienten I (OA 1) gefunden. Das Cathepsin Z war bei den Rheumapatienten im Vergleich zu den Osteoarthrosepatienten um den Faktor 18 erhöht. In der Detailansicht der Region V ist Spot 46 exemplarisch dargestellt. In den Rheumagelen ist der Spot gut zu erkennen, während er in den Osteoarthrosegelen schwach bzw. gar nicht vorhanden ist.



**Abbildung 3-12:** Unterschied in der Proteinexpression von Cathepsin Z der RA- und OA-Patienten.



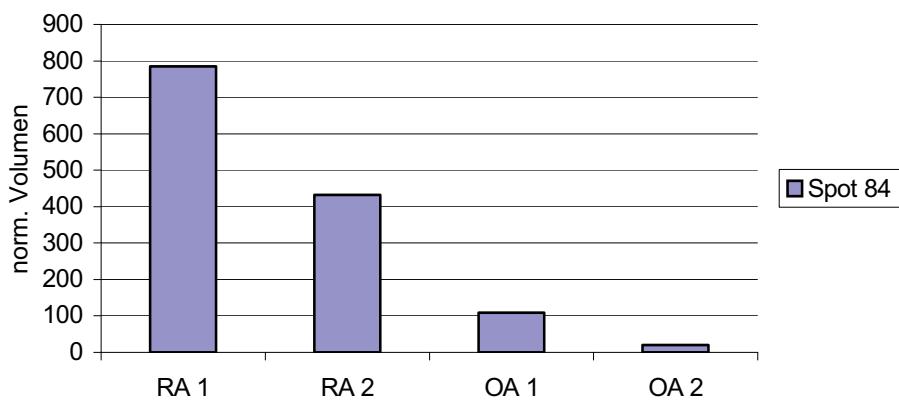
**Abbildung 3-13:** Detailansicht der Region V in den verschiedenen Gelenken, Spot 46 ist Cathepsin Z.

### Cathepsin B

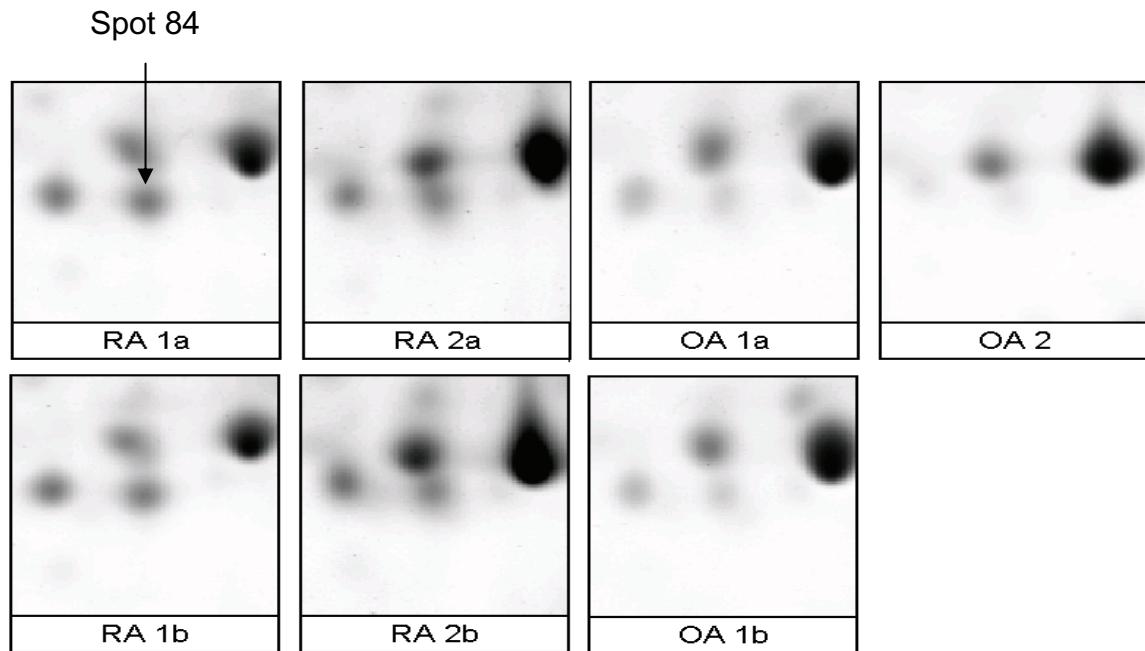
Cathepsin B ist ebenfalls eine ubiquitär vorkommende Cysteinpeptidasen und gehört in die Gruppe der lysosomalen Enzyme [53].

Es wurde ein Spot mit diesem Protein identifiziert. Das Cathepsin B war bei den Rheumapatienten im Vergleich zu den Osteoarthrosepatienten um den Faktor 9,4 erhöht. In der Detailansicht der Region VI ist der Unterschied in der Spotintensität deutlich zu erkennen.

Cathepsin B



**Abbildung 3-14:** Proteinexpression von Cathepsin B der RA- und OA-Patienten.



**Abbildung 3-15:** Detailansicht der Region VI in den verschiedenen Gelen, Spot 84 kennzeichnet Cathepsin B.

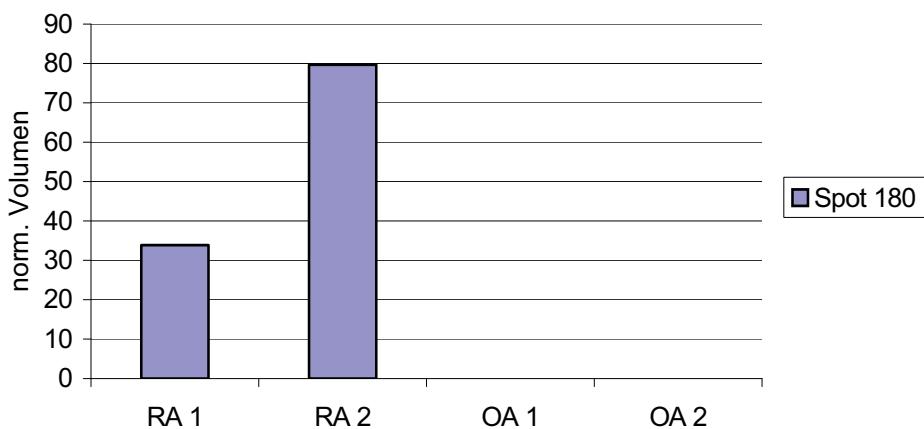
### Stromelysin-1

Stromelysin-1 (Matrix-Metalloproteinase-3) gehört in die Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen. Matrix-Metalloproteinasen werden von Fibroblasten, Endothelzellen und anderen Zellen gebildet. Sie sind an Um- und Abbauvorgängen der extrazellulären Matrix beteiligt [55].

Es wurde ein Spot mit Stromelysin-1 identifiziert. Die Peptidase ist nur in den Rheumagelen gefunden worden. In den Osteoarthrosegelen fehlt der Spot.

Wie man in der Detailansicht der Region III erkennen kann, ist der Spot 180 insgesamt schwach exprimiert, aber in allen Rheumagelen zu erkennen. In den Osteoarthrosegelen ist an dieser Stelle kein Spot zu sehen.

### Stromelysin-1



**Abbildung 3-16:** Proteinexpression von Stromelysin-1 der RA- und OA-Patienten.



**Abbildung 3-17:** Detailansicht der Region III in den verschiedenen Gelen, Spot 180 kennzeichnet Stromelysin-1.

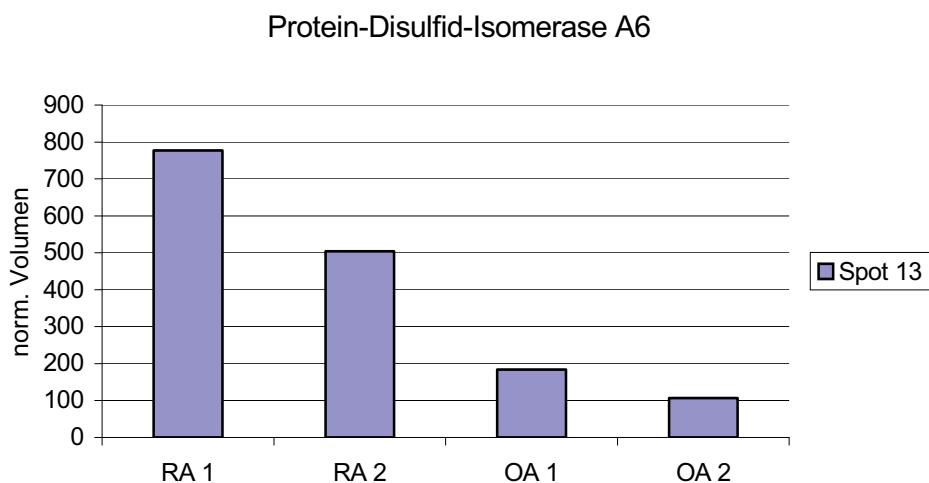
### 3.2.3 Protein-Disulfid-Isomerasen

Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) sind Enzyme, die spezifische Thiol-Gruppen enthalten. Sie sind imstande, mit Disulfidbrücken anderer Proteine zu reagieren, wobei gemischte Disulfide entstehen. Diese können unter Ausbildung neuer Disulfidbrücken im Protein und der Regenerierung der ursprünglichen Form der Protein-Disulfid-Isomerase umgelagert werden [55].

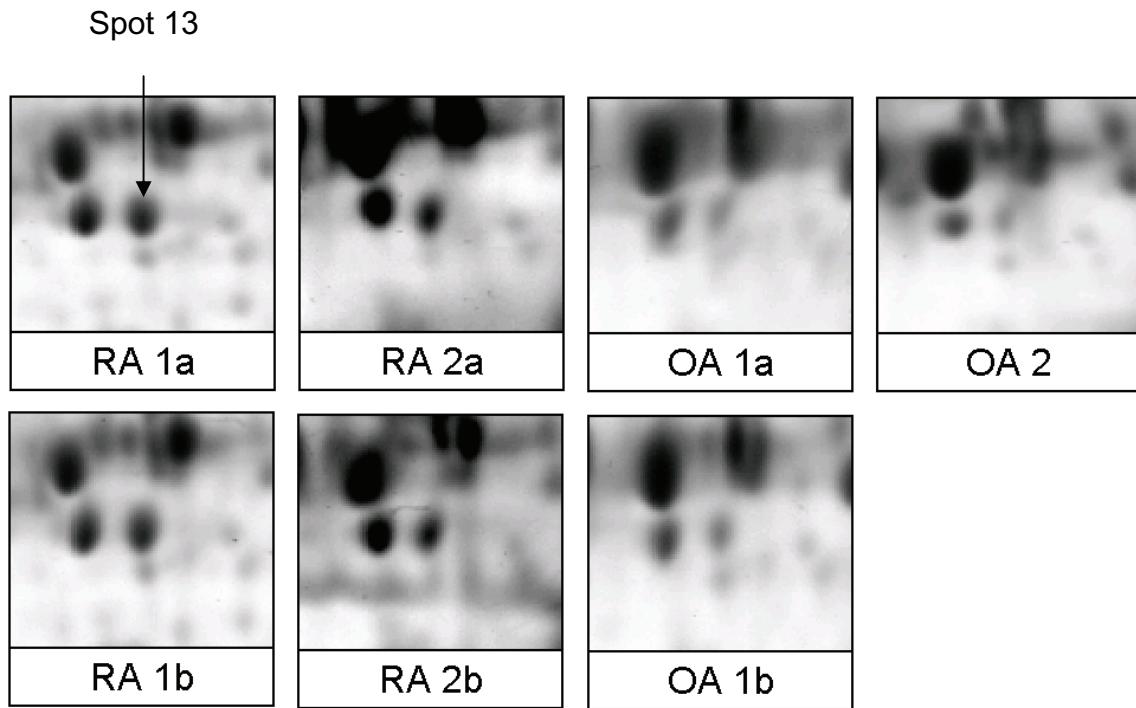
#### Protein-Disulfid-Isomerase A6

Die Protein-Disulfid-Isomerase A6 ist ein Protein im endoplasmatischen Retikulum [56]. Neben der Bildung von Disulfidbrücken hat es auch eine Bedeutung bei der Faltung von Proteinen[57].

Es wurde ein Spot mit diesem Protein bei allen Patienten identifiziert. Die Protein-Disulfid-Isomerase A6 war bei den Rheumapatienten im Vergleich zu den Osteoarthrosepatienten um den Faktor 4,4 erhöht. In der Detailansicht der Region II ist die unterschiedliche Spotintensität gut zu erkennen.



**Abbildung 3-18:** Proteinexpression der Protein-Disulfid-Isomerase A6 von RA- und OA-Patienten.



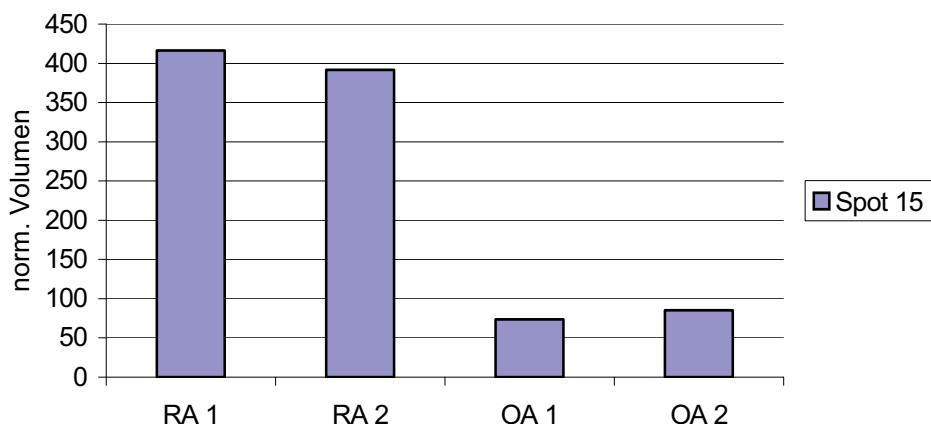
**Abbildung 3-19:** Detailansicht der Region II in den verschiedenen Gelen, Spot 13 kennzeichnet die Protein-Disulfid-Isomerase A6.

#### Thioredoxin domain-containing Protein 5

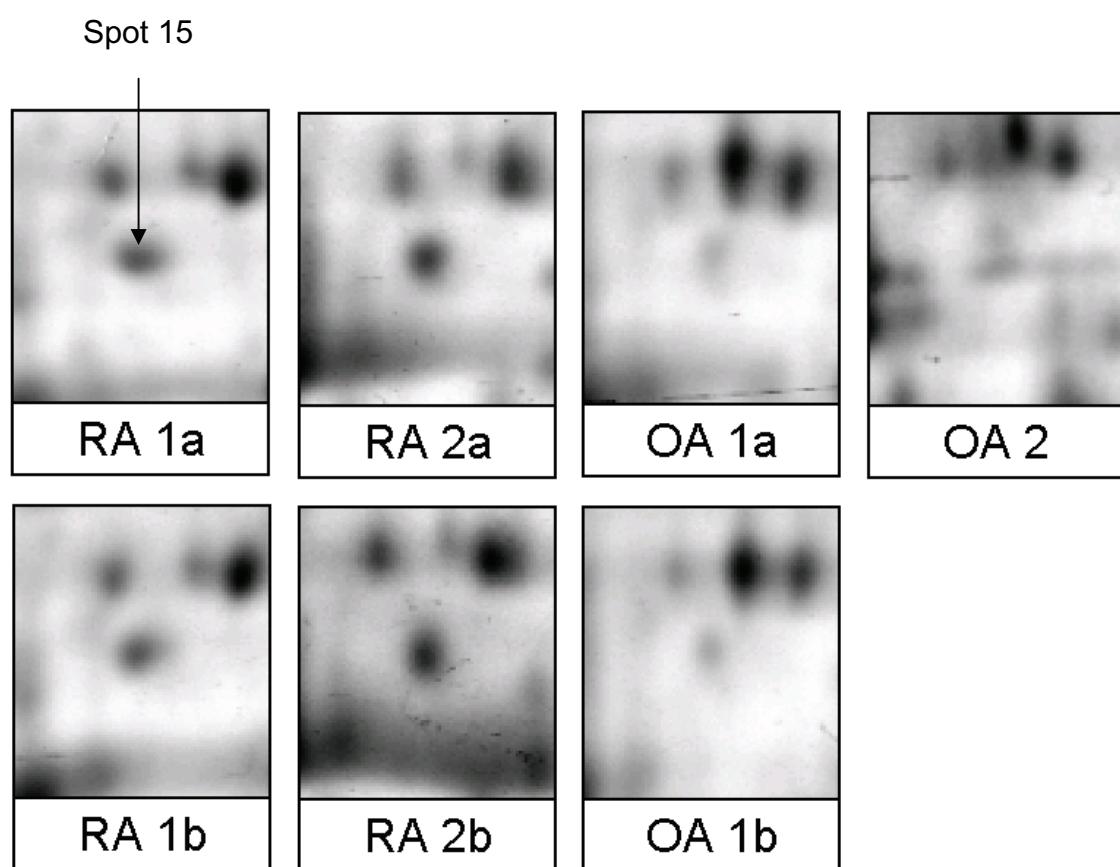
Das Thioredoxin domain-containing Protein 5 gehört ebenfalls zu den Isomerasen und zu den Enzymen des endoplasmatischen Retikulums [58].

Es wurde ein Spot mit diesem Protein bei allen Patienten identifiziert. Das Thioredoxin domain-containing Protein 5 war bei den Rheumapatienten im Vergleich zu den Osteoarthrosepatienten um den Faktor 5,1 erhöht. In der Detailansicht der Region I ist der Unterschied in der Spotintensität gut zu erkennen.

Thioredoxin domain-containing Protein 5



**Abbildung 3-20:** Proteinexpression des Thioredoxin domain-containing Proteins 5 von RA- und OA-Patienten.



**Abbildung 3-21:** Detailansicht der Region III in den verschiedenen Gelen, Spot 15 kennzeichnet das Thioredoxin domain-containing Protein 5

### 3.2.4 Zelluläres Immunsystem

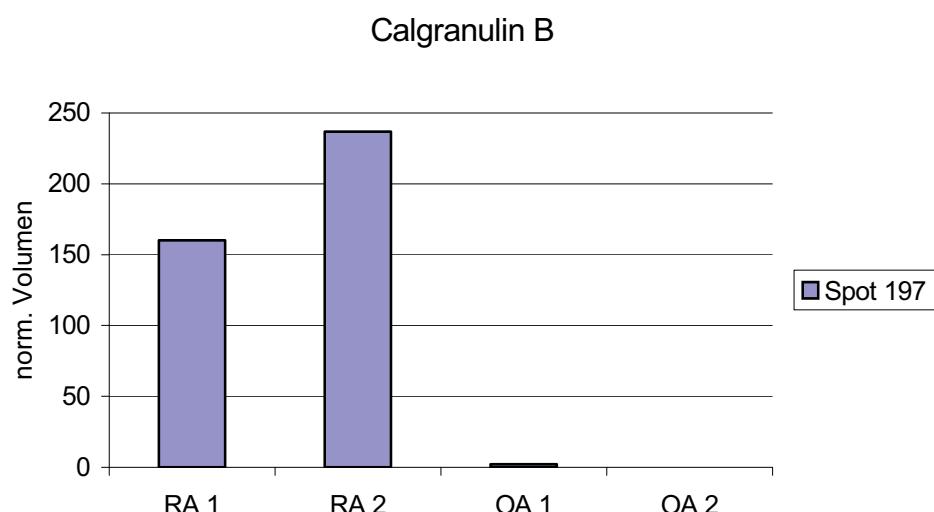
Unser Immunsystem besteht aus frei beweglichen Immunzellen, löslichen Serumbestandteilen und den lymphatischen Organen, die ein immunologisches Netzwerk im Organismus bilden.

Zu den Zellen des Immunsystems zählen insbesondere Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen sowie B- und T-Zellen [59].

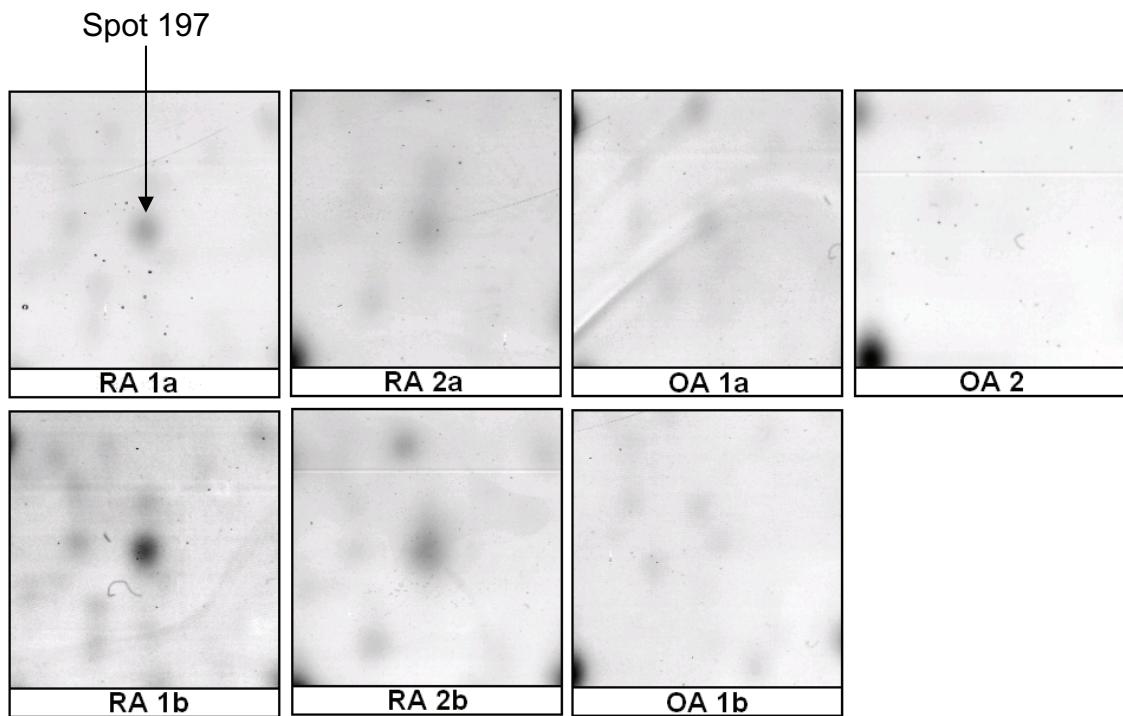
#### Calgranulin B

Calgranulin B gehört zu den S100 calcium-binding Proteinen. Zusammen mit Calgranulin A bildet es Calprotectin. Calgranulin A und B werden primär von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten gebildet [60].

Es wurde ein Spot mit diesem Protein identifiziert. Primär war Calgranulin B nur bei den Rheumapatienten zu finden. In der Detailansicht der Region VIII sind die Calgranulin B Spots in den Rheumagelen gut zu erkennen, während bei den Osteoarthrosepatienten dieses Protein höchstens in OA 1a ansatzweise zu erkennen ist.



**Abbildung 3-22:** Proteinexpression von Calgranulin B der RA- und OA-Patienten.



**Abbildung 3-23:** Detailansicht der Region VIII in den verschiedenen Gelen, Spot 197 kennzeichnet Calgranulin B.

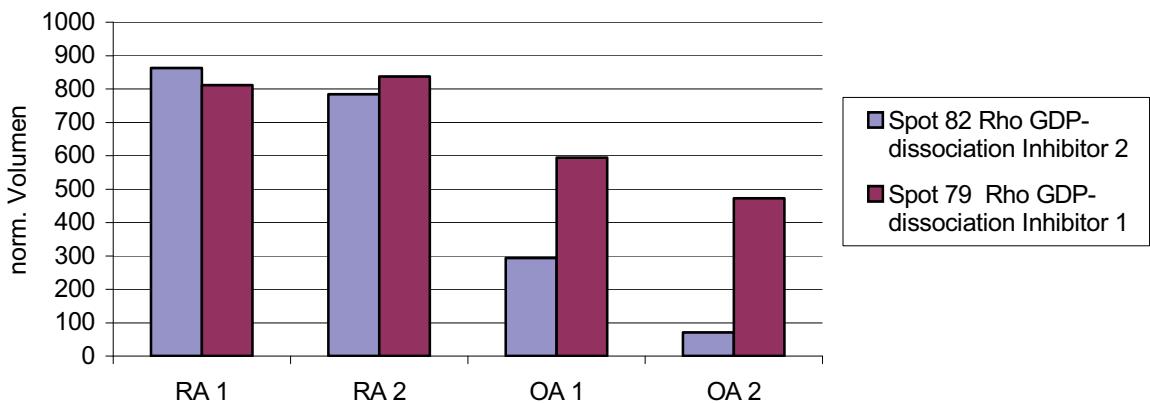
### Rho GDP-dissociation Inhibitor

Rho GDP-dissociation Inhibitor ist ein Regulator der Rho-GTPasen. Rho-GTPasen gehören zur Gruppe GTP-bindender Proteine. Rho GTPasen sind molekulare Schalter, die eine Vielzahl wichtiger zellulärer Funktionen steuern [61]. Rho GDP-dissociation Inhibitor bindet bevorzugt an die GDP-gebundene Form der Rho-GTPasen. Dadurch wird die Dissoziation des gebundenen GDPs gehemmt und die Rho-GTPase bleibt inaktiv [62].

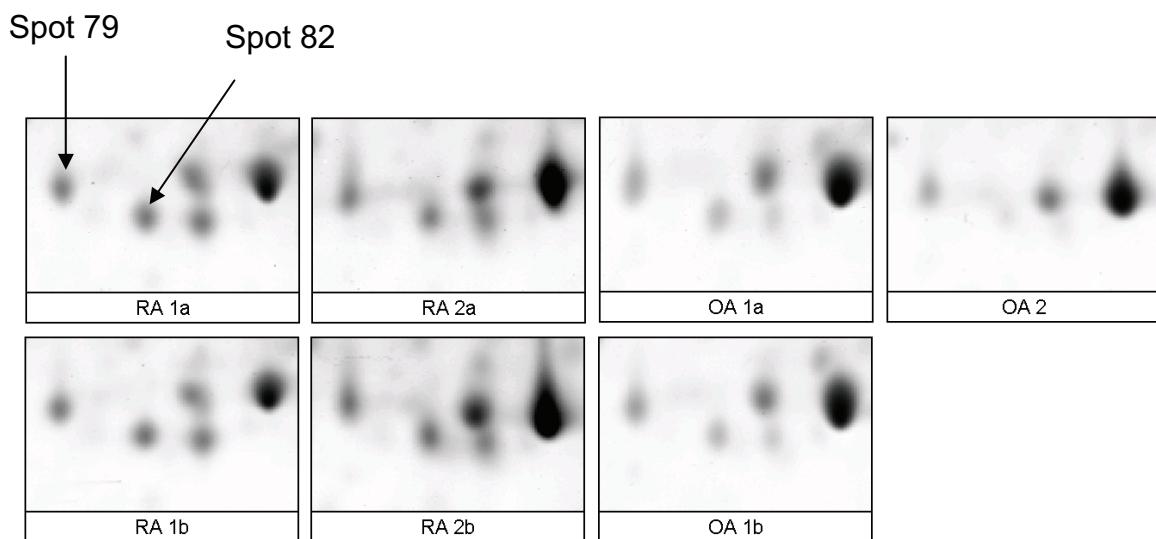
Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 ist bei allen Patienten etwa gleich stark vertreten, während Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 bei den Osteoarthrosepatienten deutlich reduziert ist.

Die Detailansicht der Region V zeigt die beiden Spots in den verschiedenen Gelen.

### Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 und 2



**Abbildung 3-24:** Proteinexpression der Rho GDP-dissociation Inhibitoren 1 und 2 der RA- und OA-Patienten.



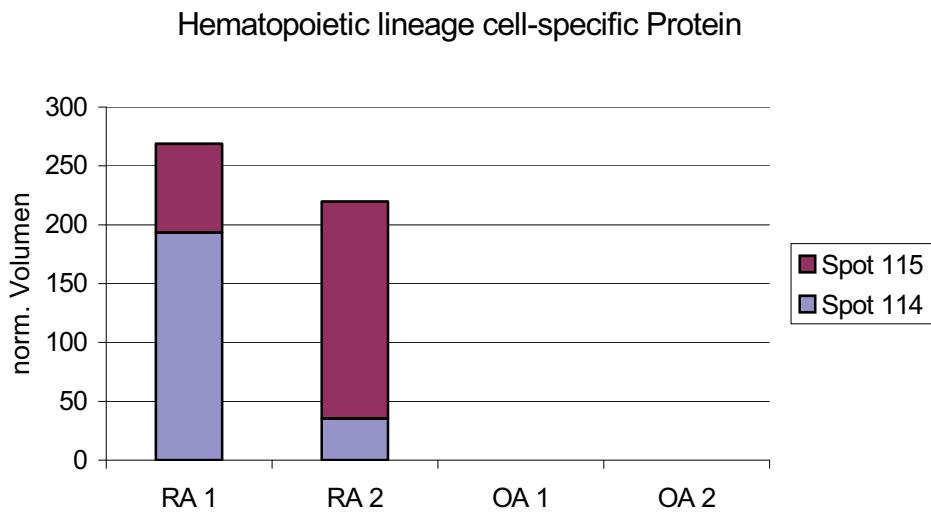
**Abbildung 3-25:** Detailansicht der Region VI in den verschiedenen Gelen, Spot 79 kennzeichnet den Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 und Spot 82 kennzeichnet den Rho GDP-dissociation Inhibitor 2.

### Hematopoietic lineage cell-specific Protein

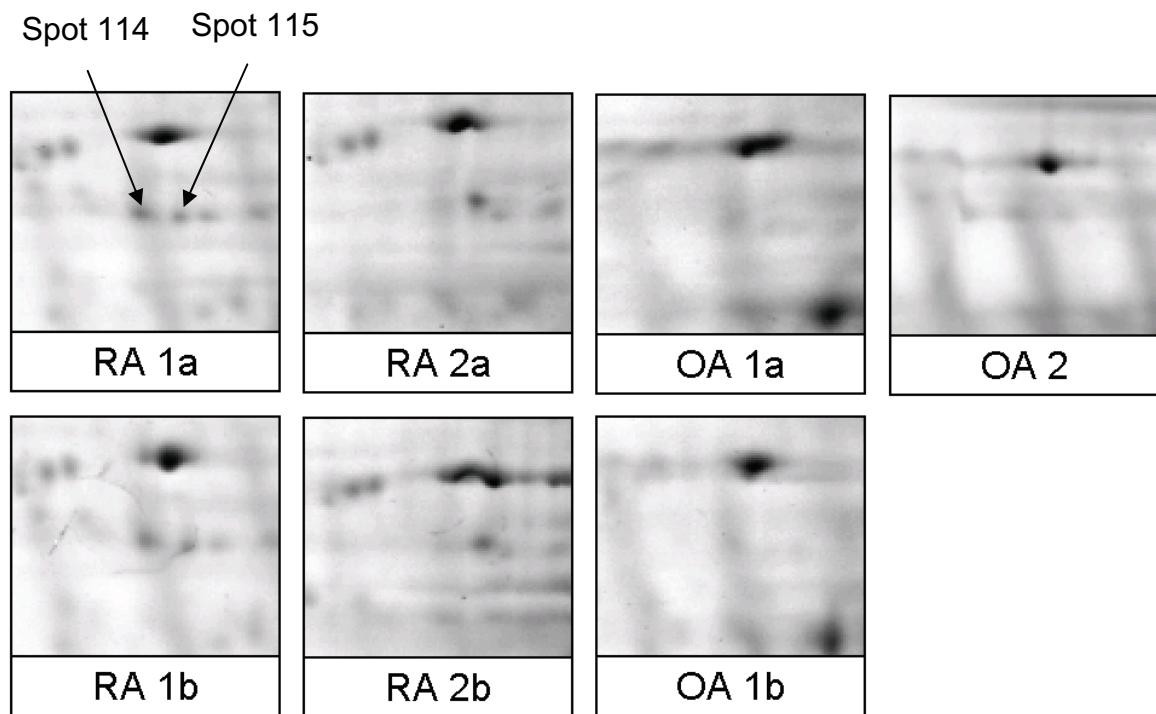
Das Hematopoietic lineage cell-specific Protein ist ein spezifisches Protein der hämopoetischen Zellen [63].

Es wurden zwei Spots mit diesem Protein identifiziert. Die beiden Spots konnten nur in den Gelen der Rheumapatienten identifiziert werden. In den Gelen der Osteoarthrosepatienten waren die Spots nicht vorhanden.

In der Detailansicht der Region I sind die beiden Spots in den Rheumagelen gut zu erkennen, während sie in den Ostoeoarthrosepatienten fehlen.



**Abbildung 3-26:** Proteinexpression des Hematopoietic lineage cell-specific Proteins der RA- und OA-Patienten.

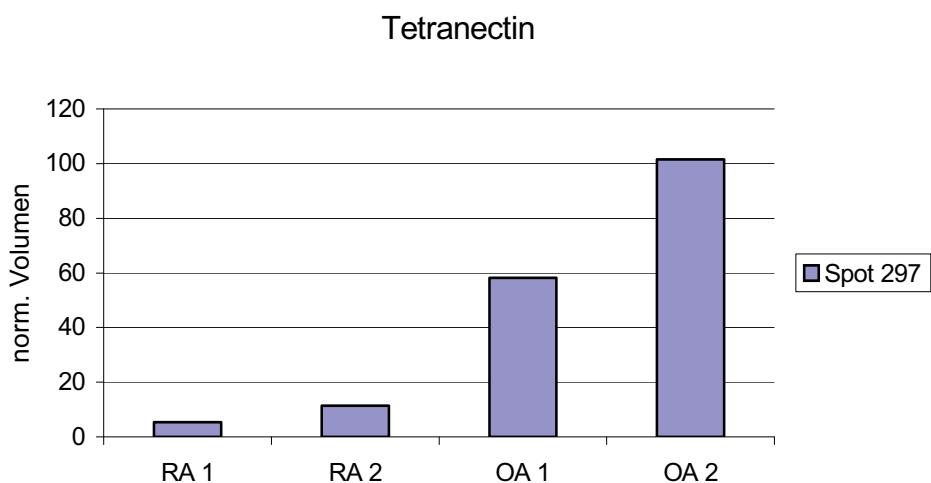


**Abbildung 3-27:** Detailansicht der Region I in den verschiedenen Gelen, Spot 114 und 115 kennzeichnen das Hematopoietic lineage cell-specific Protein.

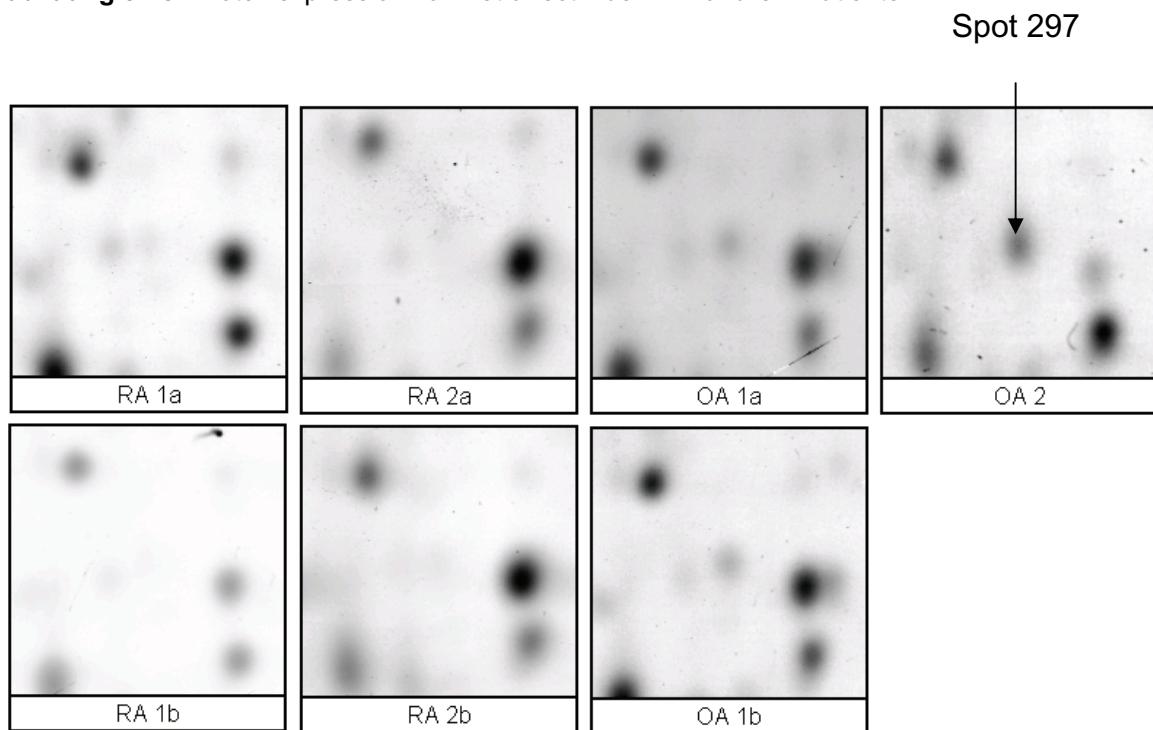
### 3.2.5 Tetranectin

Tetranectin ist ein plasminogen-bindendes Protein, welches sowohl im Plasma als auch in der extrazellulären Matrix zu finden ist [64], [65].

Es wurde ein Spot mit diesem Protein bei allen Patienten identifiziert. Das Tetranectin war bei den Osteoarthrosepatienten im Vergleich zu den Rheumapatienten um den Faktor 10 erhöht. In der Detailansicht der Region VIII ist der Unterschied in der Spotintensität gut zu erkennen.



**Abbildung 3-28:** Proteinexpression von Tetranectin der RA- und OA-Patienten.



**Abbildung 3-29:** Detailansicht der Region VIII in den verschiedenen Gelen, Spot 297 kennzeichnet Tetranectin.

### 3.3 Immunanalytik

In der vergleichenden Proteomanalyse zwischen rheumatoider Arthritis und Osteoarrose wurden 14 Proteine als unterschiedlich exprimiert erkannt.

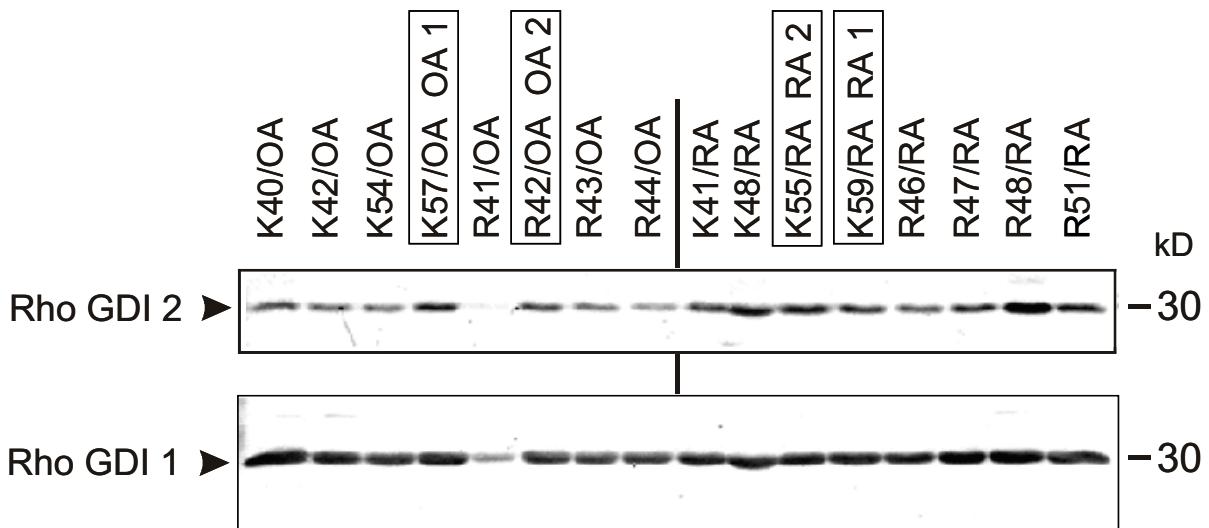
Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden zwei der 14 Proteine mit Hilfe der Immunanalytik genauer untersucht. Bei den beiden Proteinen handelte es sich um Endoplasmin und Rho GDP-dissociation Inhibitor 2. Zusammen mit dem Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 wurde außerdem noch der nicht unterschiedlich exprimierte Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 untersucht.

Für die Immunanalytik wurde Synovialgewebe von je 8 Patienten mit rheumatoider Arthritis bzw. Osteoarrose aufgearbeitet (s. Abschnitt 2.8). In diesen Patientengruppen waren auch die Patienten der Proteomanalyse vertreten. Die einzelnen Proben wurden elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit Hilfe der entsprechenden Antikörper konnten die verschiedenen Proteine sichtbar gemacht werden.

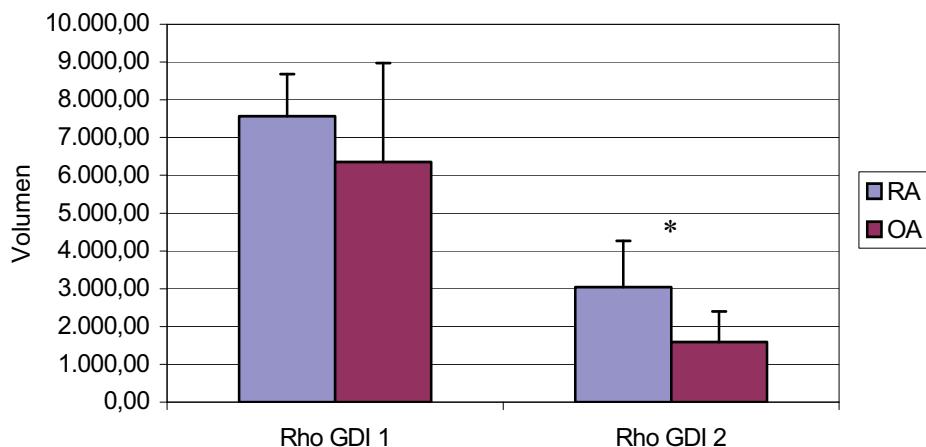
Aufgrund eines nicht weiter erkennbaren Fehlers ist die Immunanalytik für das Endoplasmin nicht gelungen. Daher werden im Weiteren nur die Ergebnisse der Rho GDP-dissociation Inhibitoren besprochen.

Die Immunanalytik der Rho GDP-dissociation Inhibitoren zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,013$ ) in der Proteinexpression von Rho GDP-dissociation Inhibitor 2. Ein Unterschied in der Expression von Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 wurde nicht gefunden.

Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage der Proteomanalyse, in der ebenfalls ein Unterschied in der Expression dieser Proteine festgestellt wurde.



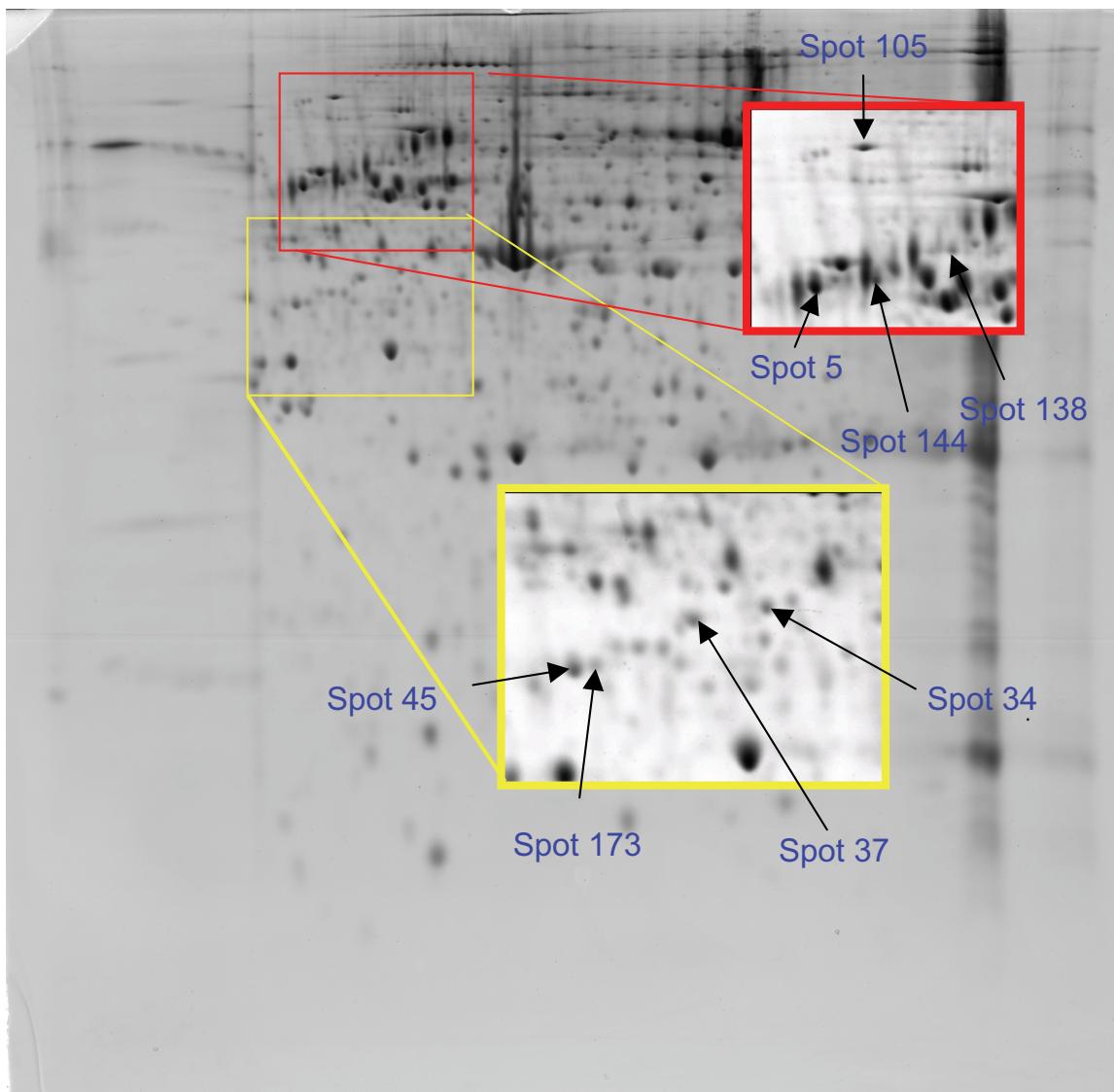
**Abbildung 3-30:** Western Blot Analyse der Proteinlevels von je 8 Patienten mit RA bzw. OA. Die ersten acht Proben stammen von Patienten mit Osteoarthrose, die zweiten acht von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Im oberen Abschnitt wurde ein Antikörper gegen Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 verwendet und im zweiten Abschnitt ein Antikörper gegen Rho GDP-dissociation Inhibitor 1. Die umrandeten Proben wurden auch für die Proteomanalyse verwendet.



**Abbildung 3-31:** Durchschnittliches densitometrisch bestimmtes Volumen + Standardabweichung der beiden Patientengruppen für Rho GDI 1 und Rho GDI 2. \* p = 0,013

### 3.4 Proteinstrukturcharakterisierung des Endoplasmins

Bei der Identifizierung der Proteine fiel auf (s. Abschnitt 3.1), dass teilweise zu einem Protein mehrere Spots in den Gelen gefunden werden konnten. Aufgrund der Lage im Gel unterschieden sich diese Spots in ihrem isoelektrischen Punkt und in ihrer Masse. Serum Albumin, beispielsweise, wurde in insgesamt 37 Spots identifiziert.



**Abbildung 3-32:** 2D-Gel eines Rheumapatienten. Die farbigen Rechtecke zeigen die Bereiche, in denen Endoplasmin gefunden wurde. Die Pfeile markieren die einzelnen Endoplasmin-enthaltenden Spots.

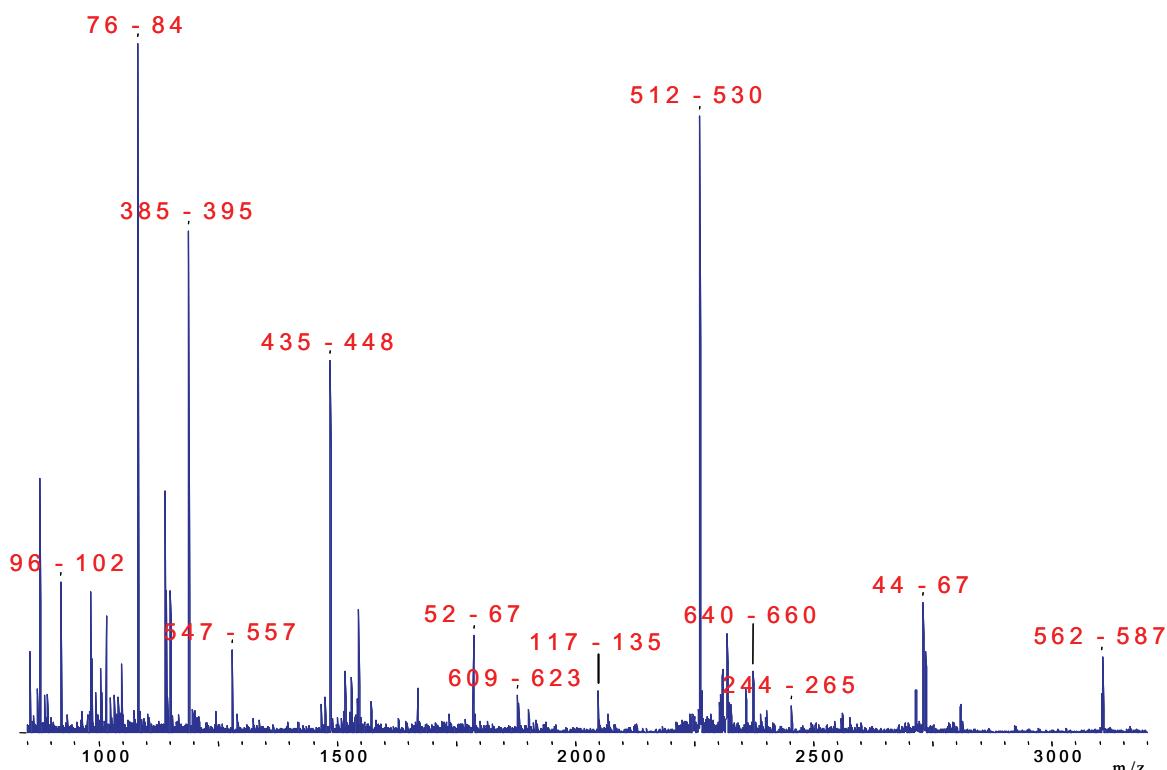
Ein weiteres Protein, Endoplasmin, wurde in 8 Spots gefunden (s. Abb. 3-32). Mittels der massenspektroskopischen Untersuchung konnten Ursachen für das unterschiedliche Migrationsverhalten der Proteinderivate gefunden werden.

Es konnte gezeigt werden, dass neben dem kompletten Protein eine Vielzahl von C- und N-terminalen Fragmenten auf den Gelen vorhanden sind. Diese Fragmente haben eine unterschiedliche Masse und einen anderen isoelektrischen Punkt als das ursprüngliche Protein. Diese Unterschiede erklären die verschiedenen Positionen der Fragmente auf den Gelen.

**Tabelle 3-4:** Endoplasminspots und deren Eigenschaften

Spotnummer	Eigenschaft
105	Komplettes Protein
5	N-terminales Fragment
138	N-terminales Fragment
144	<i>N-terminales Fragment + Vimentin</i>
34	C-terminales Fragment
37	C-terminales Fragment
45	C-terminales Fragment
173	C-terminales Fragment

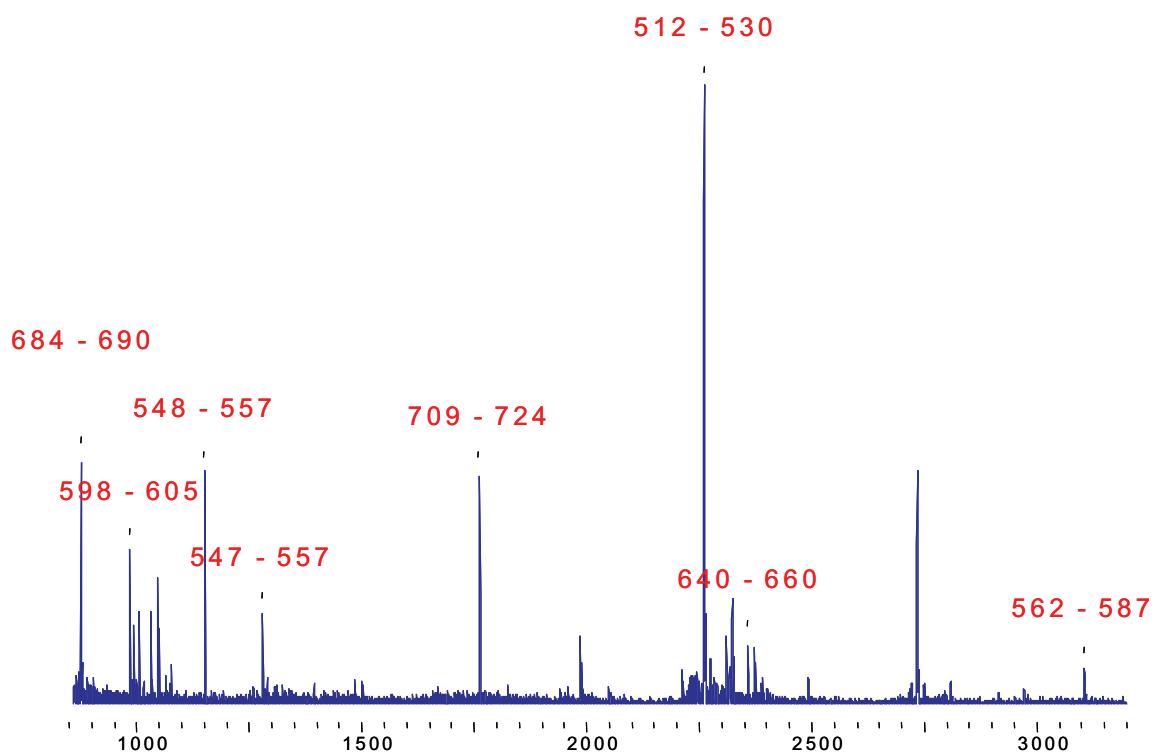
Spot 105 ist der einzige Spot, der Endoplasmin in der vollen Länge enthält. Mittels massenspektrometrischem „Peptide Mass Fingerprinting“ konnte das Protein eindeutig identifiziert werden und ein Großteil der gesamten Sequenz abgedeckt werden.

**Abbildung 3-33:** Massenspektrum von Endoplasmin, Spot 105. Die dem Protein zugeordneten Ionensignale sind mit der dazugehörigen Sequenz gekennzeichnet.

1	MRALWVLGLC	CVLLTFGSVR	ADDEVDVDTG	VEEDLGKSRE	GSR	TDDEVVQ
51	REEEAIQLDG	LNASQIRELR	EKSEK	FAFQA	EVNRM	MKLII
101	LRELISNASD	ALDKIRLISL	TDENALSGNE	ELTVK	IKCDK	EKNLLHVTDT
151	GVGMTREELV	KNLGTIAKSG	TSEFLNKMT	AQEDGQSTSE	LIGQFGVGFY	
201	SAFLVADKVI	VTSKHNNDTQ	HIWESDSNEF	SVIADPRGNT	LGR	GTTITLV
251	LKEEASDYLE	LDTIKNLVKK	YSQFINFPIY	VWSSKTETVE	EPMEEEAAK	
301	EEKEESDDEA	AVEEEEEKK	PKTKKVEKTV	WDWELMNDIK	PIWQRPSKEV	
351	EEDEYKAFYK	SFSKESDDPM	AYIHFTAEGE	VTFKSILFVP	TSAPRGLFDE	
401	YGSKKSDYIK	LYVRRVRFITD	DFHDMMPKYL	NFVKGVVDSD	DLPLNVSR	ET
451	LQQHKLLKVI	RKKLVRKTL	MIKKIADDKY	NDTWFKEFGT	NIK	LGVIEDH
501	SNRTRLAKLL	RFQSSHHTD	ITSLDQYVER	MKEKQDKIYF	MAGSSRKEAE	
551	SSPFVERLLK	KGYEVILYTE	PVDEYCIQAL	PEFDGKRFQN	VAKEGVK	FDE
601	SEKTKE	SEREA	VEKEFEPLL	WMKDALKDK	IEKAVVSQRL	TESPCALVAS
651	QYGWSGNMER	IMKAQAYQTG	KDISTNYYAS	QKKT	FEINPR	HPLIRDMLRR
701	IKEDED	DKTV	LDLAVVLFET	ATLRS	GYLLP	DTKAYGDRIE
751	PDAK	VEEEPE	EEPEETAEDT	TEDTEQDEDE	EMDVGT	DEEE
801	DEL					

**Abbildung 3-34:** Aminosäuresequenz von Endoplasmin, Spot 105. Die rot markierten Bereiche wurden durch die Massenspektrometrie identifiziert. Die Sequenzabdeckung beträgt 46%.

Bei den Spots 34, 37, 45 und 173 handelt es sich um C-terminale Fragmente. Mittels Massenspektrometrie wurden ausschließlich Ionensignale aus dem C-terminalen Bereich von Endoplasmin gefunden.



**Abbildung 3-35:** Massenspektrum von Endoplasmin, Spot 45. Die dem Protein zugeordneten Ionensignale sind mit der dazugehörigen Sequenz gekennzeichnet.

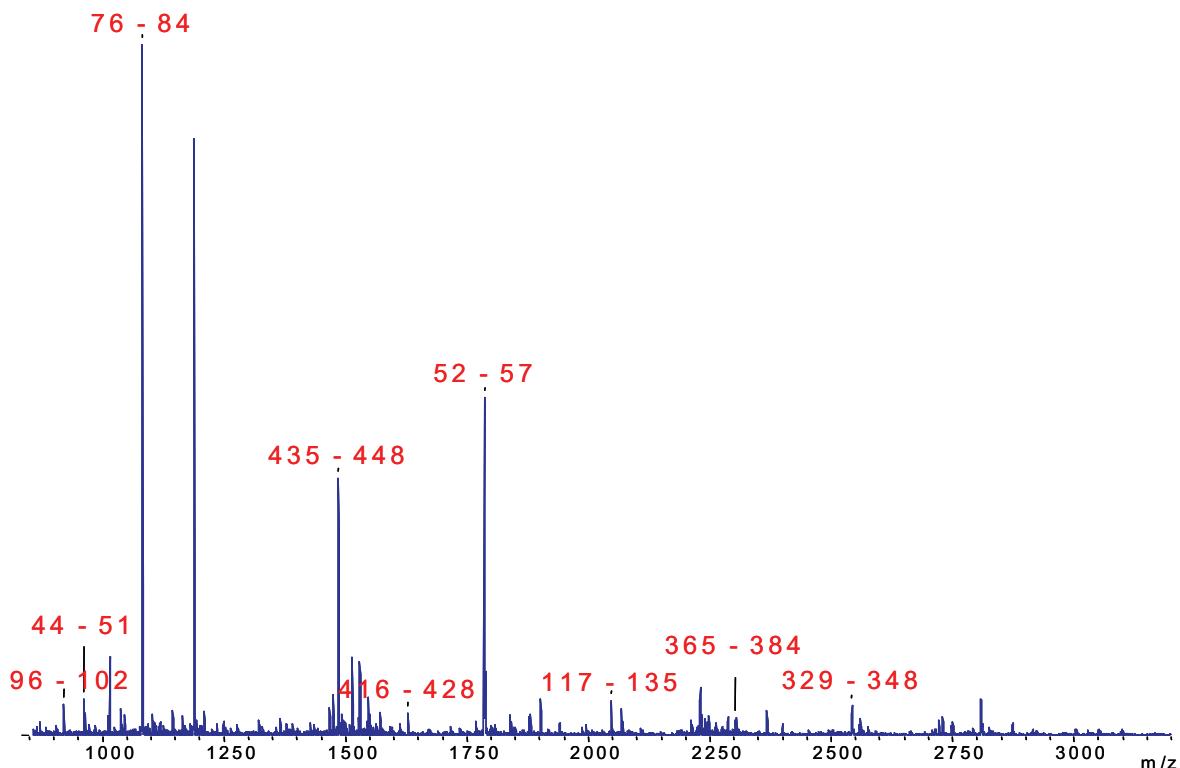
```

1 MRALWVLGLC CVLLTGFGSVR ADDEVVDVDTG VEEDLGKSRE GSRTDDEVVQ
51 REEEAIQLDG LNASQIRELR EKSEKFAFQA EVNRMMLII NSLYKNKEIF
101 LRELISNASD ALDKIRLISL TDENALSGNE ELTVKIKCDK EKNLLHVTDT
151 GVGMTREELV KNLGTIAKSG TSEFLNKMTA AQEDGQSTSE LIGQFGVGFY
201 SAFLVADKVI VTSKHNNDTQ HIWESDSNEF SVIADPRGNT LGRGTTITLV
251 LKEEASDYLE LDTIKNLVKK YSQFINFPIY VWSKTETVE EPMEEEEAK
301 EEKEESDDEA AVEEEEEKK PTKKKVEKTV WDWELMNDIK PIWQRPSKEV
351 EEDEYKAFYK SFSKESDDPM AYIHFTAEGE VTFKSILFVP TSAPRGLFDE
401 YGSKKSDYIK LYVRRVFITD DFHDMMPKYL NFVKGVVDSD DLPLNVSRET
451 LQQHKLLKVI RKKLVRKTL MIKKIADDKY NDTFWKEFGT NIKLGVIEDH
501 SNRTRLAKLL RFQSSHPTD ITSLDQYVER MKEKQDKIYF MAGSSRKEAE
551 SSPFVERLLK KGYEVIYLTE PVDEYCIQAL PEFDGKRFQN VAKEGVKFDE
601 SEKTGESREA VEKEFEPLLW WMKDKALKDK IEKAVVSQRL TESPCALVAS
651 QYGWSGNMER IMKAQAYQTG KDISTNYYAS QKKTTEINPR HPLIRDMRLR
701 IKEDEDKTV LDLAVALFET ATLRSGYLLP DTKAYGDRIE RMLRLSLNID
751 PDAKVEEEPE EEPEETAEDT TEDTEQDEDE EMDVGTDEEE ETAKESTAEK
801 DEL

```

**Abbildung 3-36:** Aminosäuresequenz von Endoplasmin, Spot 45. Die rot markierten Bereiche wurden durch die Massenspektrometrie identifiziert. Die Sequenzabdeckung beträgt 14%.

Bei den Spots 5 und 138 handelt es sich um N-terminale Fragmente von Endoplasmin. Die Auswertung der Massenspektren zeigte, dass die nachgewiesenen Ionensignale nur dem N-terminalen Teil von Endoplasmin zugeordnet werden können.



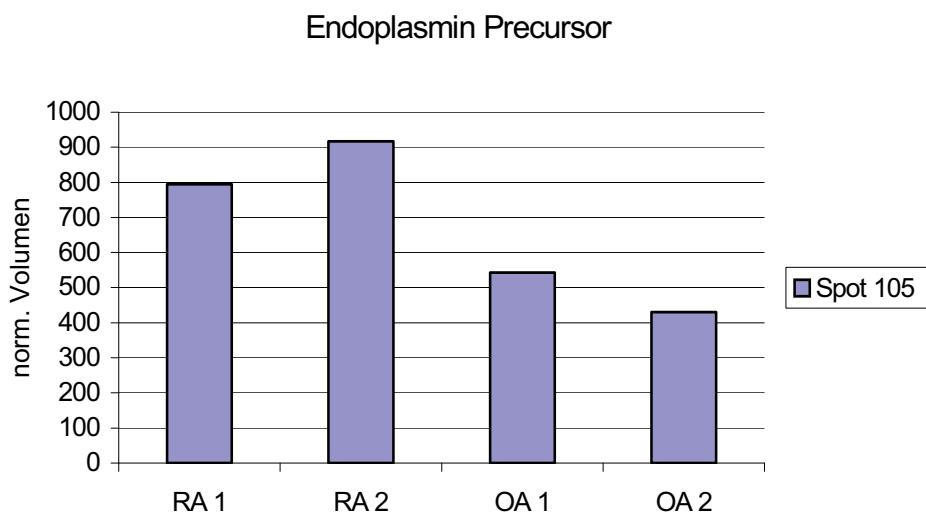
**Abbildung 3-37:** Massenspektrum von Endoplasmin, Spot 5. Die dem Protein zugeordneten Ionensignale sind mit der dazugehörigen Sequenz gekennzeichnet.

1 MRALWVLGLC CVLLT<sub>1</sub>FGS<sub>2</sub>VR ADDEV<sub>3</sub>DVG<sub>4</sub>T VEEDL<sub>5</sub>GKS<sub>6</sub>RE GSR<sub>7</sub>T<sub>8</sub>D<sub>9</sub>E<sub>10</sub>V<sub>11</sub>V<sub>12</sub>Q  
 51 REEEAIQLD<sub>1</sub>G LNASQIRELR EKSEK<sub>3</sub>FAFQA EVNRM<sub>5</sub>MKLII NSLYK<sub>7</sub>NKEIF  
 101 LRELISNASD ALDKIR<sub>3</sub>LISL TDENALSGNE ELTV<sub>5</sub>K<sub>6</sub>CDK EKN<sub>8</sub>L<sub>9</sub>HVTDT  
 151 GVGM<sub>3</sub>TREELV KNLGTIAKSG TSEFLNKMT<sub>6</sub> AQEDGQSTSE LIGQFGVG<sub>10</sub>FY  
 201 SAFLVADKVI VTSKHNNDTQ HIWESDSNEF SVIADPRGNT LGRGTTITLV  
 251 LK<sub>3</sub>EASDYLE LDTIK<sub>5</sub>NLVKK YSQFINFPIY VWS<sub>7</sub>S<sub>8</sub>K<sub>9</sub>TETVE EPMEEEEAAK  
 301 EEKEESDDEA AVEEEEEKK PTKKK<sub>4</sub>VEKTV WDWE<sub>6</sub>LMNDIK PIWQRPSKEV  
 351 E<sub>2</sub>E<sub>3</sub>EYKA<sub>5</sub>FYK SFSK<sub>7</sub>ESDDPM AYI<sub>9</sub>HFTAE<sub>11</sub>GE VTFK<sub>13</sub>SILFVP TSAPRGLFDE  
 401 YGSKKSDYIK LYVRRV<sub>4</sub>FITD DFHD<sub>6</sub>MM<sub>7</sub>PKYL NFVKGV<sub>10</sub>V<sub>11</sub>DSD DLPLNV<sub>14</sub>S<sub>15</sub>RET  
 451 LQQHK<sub>3</sub>LLKVI RKKL<sub>5</sub>VRK<sub>6</sub>TLD MIKKIADDKY NDTFW<sub>9</sub>KEFGT NIKLG<sub>12</sub>VIEDH  
 501 SNRTRLAKLL RFQSSH<sub>4</sub>HPTD ITSLDQYVER MKEKQDKIYF MAGSSRKEAE  
 551 SSPFVERLLK KG<sub>3</sub>YEVIYLTE PVDEYCIQAL PEFDGKRFQN VAKEGVKFDE  
 601 SEKT<sub>3</sub>KESREA VEKEFEPLL<sub>6</sub> WMKD<sub>8</sub>KALKDK IEKAVVSQRL TESP<sub>11</sub>CALVAS  
 651 QYGWSGNMER IMKAQAYQTG KDISTNYYAS QKKTFEINPR HPLIRDMLRR  
 701 IKEDED<sub>4</sub>DKTV LD<sub>6</sub>LAVVLFET ATLRS<sub>9</sub>GYLLP DTKAYGDRIE RMLRLSLNID  
 751 PDAK<sub>3</sub>V<sub>4</sub>EEPE E<sub>5</sub>E<sub>6</sub>P<sub>7</sub>ETAED<sub>10</sub>T TEDTEQ<sub>12</sub>DEDE EMDVGT<sub>15</sub>DEEE ETAKESTA<sub>18</sub>EK  
 801 DEL

**Abbildung 3-38:** Aminosäuresequenz von Endoplasmin, Spot 5. Die rot markierten Bereiche wurden durch die Massenspektrometrie identifiziert. Die Sequenzabdeckung beträgt 21%.

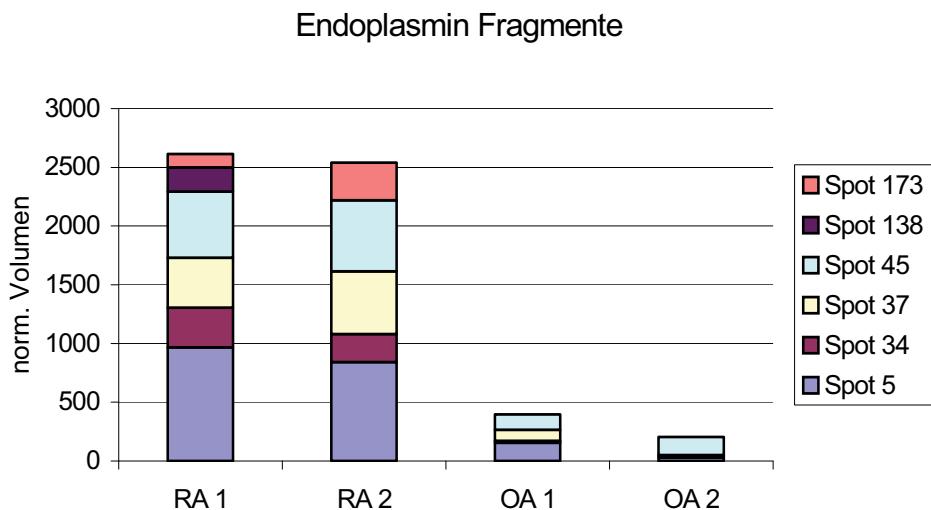
Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, ist in der vergleichenden Proteomanalyse von RA und OA Endoplasmin als unterschiedlich exprimiert erkannt worden. Im direkten Vergleich war das Endoplasmin in der RA um den Faktor 4,4 höher exprimiert als in der OA.

Mit der Erkenntnis der starken Fragmentierung des Endoplasmins war eine genauere Analyse der Expressionsunterschiede zwischen den beiden Proteomen möglich. Dabei zeigte sich, dass das Endoplasmin in der vollen Länge bei allen Patienten etwa gleich stark vorhanden war (s. Abbildung 3-39).



**Abbildung 3-39:** Proteinexpression von nativem Endoplasmin der RA- und OA-Patienten.

Bei der alleinigen Betrachtung der Endoplasminfragmente ist der Expressionsunterschied zwischen RA und OA hingegen noch deutlich stärker hervorgetreten. Wenn man allein die Fragmente des Endoplasmins betrachtet, ist das Protein bei den Rheumapatienten sogar um den Faktor 8,6 erhöht.



**Abbildung 3-40:** Proteinexpression der Endoplasmin Fragmente

Das bedeutet, dass der Unterschied in der Proteinexpression des Endoplasmins allein durch die unterschiedliche Menge an Fragmenten zustande kommt.

Man kann also abschließend postulieren, dass in den Proben der Rheumapatienten im Vergleich zu den Proben der Patienten mit Osteoarthrose proteolytische Prozesse vermehrt ablaufen. Diese Proteinabbauprozesse sind in den 2D-Gelen deutlich sichtbar. Somit erlauben die 2D-Gelanalysen nicht nur deskriptive Aussagen über die differentielle Abundanz einzelner Proteine, sondern darüberhinaus gehende Rückschlüsse über funktionelle Unterschiede zwischen den Proben. Diese werden im Anschluss im Kontext des Literaturwissens diskutiert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Limitierungen der 2D-Gel-basierten Proteomanalyse

Eine Möglichkeit zur Identifizierung molekularer Prozesse im Krankheitsgeschehen stellt die vergleichende Proteomanalyse dar. Während das Genom eine statische Größe ist, hat das Proteom eine dynamische sich ständig verändernde Gestalt. Die Proteinsynthese von Zellen und Geweben ist spezifisch und unterliegt ständig inneren und äußeren Einflüssen, die zu einer Veränderung der Proteinsynthese führen können.

Die Methode der Wahl zur Auftrennung komplexer Proteingemische stellt die 2D-Gelelektrophorese dar. Mit ihr ist es möglich, bis zu 10.000 Spots auf 46 x 30 cm<sup>2</sup> großen Gelen darzustellen [66]. Ein entscheidender Punkt für eine gelungene 2D-Elektrophorese ist, dass die Proteine des Ausgangsmaterials komplett gelöst, deaggregiert, denaturiert und reduziert vorliegen. Um die Komplexität nicht noch weiter zu erhöhen, wurde auf eine Extraktion der Membranproteine aus dem Pellet, welches nach der Zentrifugation des Pannusextraktes übrig blieb, verzichtet. Dadurch sind Vertreter dieser Gruppe schwerlöslicher Proteine in dieser Arbeit unterrepräsentiert.

In der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese folgt die Auftrennung des Proteingemisches mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (IEF). In dieser Arbeit wurde für die IEF ein pH-Bereich von 4-7 gewählt. Proteine, die einen isoelektrischen Punkt außerhalb dieser pH-Werte haben, wurden nicht dargestellt. In der zweiten Dimension werden die aufgetrennten Proteine auf ein SDS-Polyacrylamidgel übertragen und nach ihrer Größe getrennt. Dabei besteht die Gefahr, dass ein Teil der Proteine nicht übertragen wird und somit für die weitere Analyse nicht zur Verfügung steht.

Durch die anschließende Färbung werden die Proteine in den Gelen sichtbar gemacht. Als Standardmethoden gelten die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue oder die Silberfärbung. Ein Vorteil der Silberfärbung ist die größere Nachweisempfindlichkeit. So lassen sich Proteinmengen von 2–5 ng mit einer Silberfärbung visualisieren, während die Coomassie-Färbung eine Proteinmenge von etwa 100 ng benötigt. Die Vorteile der Coomassie-Färbung liegen in dem größeren linearen dynamischen Bereich, der leichteren Anwendung und besseren

Reproduzierbarkeit sowie in der guten Kompatibilität mit der Massenspektrometrie. Aufgrund dieser Vorteile ist die Färbung der 2D-Gele mit Coomasie-Brilliant .Blue durchgeführt worden [67].

## 4.2 Diskussion zu Funktion und Vorkommen der differentiell exprimierten Proteine

### 4.2.1 Heat-Shock-Proteine

Heat-Shock-Proteine (HSPs) wurden erstmals 1962 von Ritossa beschrieben. Er konnte zeigen, dass in den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen von *Drosophila hydei* bei erhöhter Temperatur bestimmte Genloki verstärkte Aktivität zeigen [68]

Heute weiß man, dass HSPs durch eine Vielzahl von Stress- bzw. Umweltstimuli neu oder vermehrt synthetisiert werden. Dazu gehören Hypoxie, zelltoxische Substanzen wie Schwermetalle oder Alkohol, oxidativer und osmotischer Stress, Chemotherapeutika, aber auch entzündliche Prozesse [69, 70] Die unterschiedlichen HSPs werden nach ihrem Molekulargewicht in die fünf Hauptfamilien HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 und sHSPs (*small heat shock proteins* ) eingeteilt [71]

Untersuchungen dieser Proteine bei anderen Organismen konnten zeigen, dass es sich bei ihnen um eine hochkonservierte Gruppe von Genprodukten handelt, die bei praktisch allen Organismen vorkommen. Sie assistieren bei der Faltung von Proteinen, beim Transport zwischen den Kompartimenten, schützen Polypeptide vor der Denaturierung, oder wirken auch beim Abbau von irreversibel geschädigten Proteinen mit [72].

Im Rahmen einer Stressantwort kommt es zu einer starken Induktion von HSPs. Diese binden an denaturierte oder beschädigte Proteine und helfen bei ihrer Neufaltung oder bei ihrem Abbau mit [73].

Neben den beschriebenen zytoprotektiven Eigenschaften der HSPs rücken die immunmodulierenden Effekte immer mehr in den Vordergrund.

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene HSPs als vermehrt exprimiert bei der RA identifiziert. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Untersuchungen zur rheumatoiden Arthritis [74, 75]. Dabei scheint die Überexpression der HSPs keine alleinige Reaktion auf die chronische Entzündung zu sein, sondern auch mit

spezifischen Eigenschaften in der Pathogenese der rheumtoiden Arthritis zusammen zu hängen.

Es konnte gezeigt werden, dass gegen HSPs, wie z.B. 78 kDa glucose-regulated Protein Antikörper nachgewiesen werden konnten [76]. Außerdem scheinen Heat-Shock-Proteine auch eine wichtige Funktion in der Prozessierung und Präsentation von Antigenen über MHC-I- und MHC-II-Rezeptoren zu haben [77, 78]. Neben den intrazellulären Funktionen konnte weiterhin gezeigt werden, dass extrazelluläre HSPs, welche im Rahmen von Zelluntergängen entstehen, durch eine rezeptorvermittelte Endozytose von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden können [79]. Die intrazellulären Peptide, die an das extrazelluläre HSP gebunden sind, werden weiter prozessiert und von MHC-I- oder MHC-II-Rezeptoren auf den antigenpräsentierenden Zellen präsentiert. Dies kann zur Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen gegen das an das HSP gebundene Peptid führen (Cross-Priming). Dieser Vorgang könnte zu einer autoimmunen Reaktion der T-Zellen führen [80, 81].

Ein besonders interessantes HSP ist das Hypoxia up-regulated Protein 1, das in dieser Arbeit als bei RA verstärkt exprimiert gefunden wurde. Im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis ist nur sehr wenig bekannt. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I konnten Antikörper gegen das Protein gefunden werden. Die Menge an Antikörpern war im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht und korrelierte auch mit deren HbA1c-Wert [82]. Das Hypoxia up-regulated Protein 1 konnte in verschiedenen Tumoren als vermehrt exprimiert identifiziert werden, z.B. in Brusttumoren, in Prostatatumoren und in Tumoren der Blase [83-85]. Durch eine Reduktion von Hypoxia up-regulated Protein 1 mit Hilfe von Antisens-cDNA konnte die Angiogenese und die Tumorgröße bei Prostatatumoren reduziert werden [86]. Möglicherweise lassen sich durch diese Erkenntnisse auch neue Strategien in der Pathogenese, Diagnostik und Behandlung der rheumatoiden Arthritis entwickeln [86, 87].

#### **4.2.2 Peptidasen**

Unter Peptidasen versteht man Enzyme, die Peptidbindungen unter Freisetzung kleinerer Peptide oder Aminosäuren hydrolytisch spalten können. Dabei werden Endopeptidasen, die eine Peptidbindung innerhalb einer Peptidkette spalten, von

Exopeptidasen, die sie endständig angreifen, unterschieden.[54]. Die proteolytische Spaltung von Proteinen ist auch für den Abbau von Fremdorganismen und die anschließende Präsentation auf der Zelle via MHC-II-Rezeptoren von entscheidender Bedeutung.

Durch die Möglichkeit der limitierten Proteolyse sind Peptidasen außerdem in der Lage, Proteine zu aktivieren und sind damit an einer Vielzahl von regulatorischen Schritten beteiligt, wie z.B. Zellzyklus, Zellproliferation, Apoptose oder Immunantwort. Neben den intrazellulären Aufgaben haben Peptidasen auch wichtige extrazelluläre Funktionen. Dazu gehören funktionelle aber auch pathologische Um- und Abbauvorgänge der extrazellulären Matrix im Rahmen des Geweberemodeling. Daneben sind Peptidasen auch in der Tumorentwicklung und der Metastasierung beteiligt [88].

Peptidasen sind hauptsächlich für die Zerstörung der Gelenke bei Patienten mit rheumatoider Arthritis verantwortlich [89]. Die Peptidasen stammen vor allem aus synovialen Fibroblasten, Granulozyten sowie Osteoklasten. [18, 90].

In dieser Arbeit sind drei Peptidasen als verstärkt exprimiert bei der RA gefunden worden. Dazu gehören die Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3) sowie Cathepsin B und Z. In einer Untersuchung von Kekow *et al.* wurde die Peptidaseaktivität in synovialem Gewebe von Rheumapatienten mit dem von Osteoarthrosepatienten verglichen (persönliche Mitteilung). Dabei zeigte sich eine stärkere Aktivität bei den rheumatoiden Geweben. Eine genauere Untersuchung der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 3 ergab ebenfalls eine deutlich erhöhte Aktivität in den Geweben der Rheumapatienten.

Abgesehen von der erhöhten Aktivität von MMP-3 haben auch andere MMPs destruktive Eigenschaften in der rheumatoiden Arthritis [91]. Bei MMPs handelt es sich um Zinkproteasen, die von Fibroblasten, Endothelzellen und anderen Zellen gebildet und als inaktive Proenzyme in den Extrazellulärraum sezerniert werden, wo sie durch limitierte Proteolyse aktiviert werden. Die Regulation der MMPs erfolgt durch TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase)[92].

Neben den MMPs haben auch die Cathepsine einen entscheidenden Anteil an der Zerstörung des Gelenkes. Cathepsine gehören zur Familie der lysosomalen Proteasen und werden in Cystein-, Aspartat- und Serin-Proteasen unterschieden.

Neben Cathepsin B werden auch weitere Cathepsine wie Cathepsin K, L und S in Verbindung mit der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis gebracht.[93, 94].

Eine Sonderstellung scheint das Cathepsin Z einzunehmen. Über die 1998 entdeckte Peptidase ist bisher wenig bekannt. Sie wurde in verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert gefunden. Eine besonders starke Expression findet sich in immunkompetenten Zellen. Aufgrund dieser Verteilung könnte man vermuten, dass Cathepsin Z nicht am allgemeinen Proteinumsatz beteiligt ist, sondern eine spezifische Funktion in diesen Zellen übernimmt [95-97].

Die Möglichkeit einer gezielten Hemmung der Proteaseaktivität und damit einer Verminderung der Gelenkdestruktion scheint ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zu sein. Die erfolgreiche Hemmung von Peptidasen für therapeutische Zwecke konnte mit den ACE-Hemmern demonstriert werden [88].

Ein weiteres neues Ergebnis dieser Arbeit war die Analyse von bestimmten Peptidfragmenten des Endoplasmmins. Hintergrund war die große Anzahl von Spots desselben Proteins an verschiedenen Stellen der 2D-Gele. Eine genauere Untersuchung der Spots des Endoplasmmins zeigte neben dem nativen Protein eine Vielzahl von C-und N-terminalen Fragmenten. Es zeigte sich, dass der Unterschied in der Proteinexpressipon von Endoplasmin durch die unterschiedliche Menge an Peptidfragmenten zustande kommt. Die Menge an nativem Protein war in beiden Patientengruppen gleich.

Eine Möglichkeit für die stärkere Fragmentierung liegt in der beschriebenen starken proteolytischen Aktivität in der rheumatoiden Arthritis. Dies kann zu einer vermehrten Spaltung des Endoplasmmins führen und die gezeigten Peptidfragmente erklären. Somit lassen sich mit der Proteomanalyse nicht nur Proteinmuster vergleichen, sondern die Spotmuster lassen auch einen Rückschluss auf funktionelle Vorgänge in den Geweben zu.

#### **4.2.3 Protein-Disulfid-Isomerasen**

Zwei Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) wurden in dieser Arbeit unterschiedlich exprimiert. Zum einen die Protein-Disulfid-Isomerase A6 und zum anderen das Thioredoxin domain-containing Protein 5. Die Protein-Disulfid-Isomerase ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das erstmals 1963 von Goldberger *et al.* beschrieben wurde [98]. Bis heute wurden 19 verschiedene Vertreter dieser im endoplasmatischen Retikulum vorkommenden Enzymfamilie identifiziert. Mit Hilfe der Thiolgruppen sind die PDIs in der Lage, Disulfidbrücken in Proteinen zu bilden und

falsch gebildete Disulfidbrücken wieder zu lösen und neu zu arrangieren. Damit sind sie wichtige Enzyme in der korrekten Biosynthese von Proteinen [99]. Neben der Redox-Isomerase-Funktion scheinen PDIs auch unabhängig ihrer eigentlichen enzymatischen Funktion an der Faltung von Proteinen mitzuwirken. Damit haben sie eine wichtige Funktion als Chaperone wie sie auch für die HSPs beschrieben wurde. In einer Arbeit von Mayer *et al.* wurde sogar die Interaktion von HSP70 und PDIs bei der Prozessierung von Immunglobulinen gezeigt [100]. Weiterhin sind die PDIs an der Antigenprozessierung beteiligt [101].

Neben den Funktionen im endoplasmatischen Retikulum haben einige PDIs auch Aufgaben außerhalb dieses Kompartiments. So konnten PDIs auch auf der Zelloberfläche, im Zytosol und im Zellkern nachgewiesen werden. Über die genauen Funktionen in diesen Kompartimenten ist wenig bekannt [102]. Auch eine Assoziation mit Tumoren konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden [103, 104].

Somit scheinen PDIs an einer Vielzahl von biologischen Funktionen beteiligt zu sein, die auch in der Pathogenese der rheumatoïden Arthritis eine wichtige Rolle spielen könnten.

#### 4.2.4 Zelluläres Immunsystem

Wie in der Einleitung beschrieben, sind die Vertreter des zellulären Immunsystems maßgeblich an der Pathogenese der RA beteiligt. In der histologischen Untersuchung der Gewebe durch Prof. Dr. med. Stiehl wurde ebenfalls in den RA-Proben ein diffuses Infiltrat von Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen beschrieben.

In der Proteomanalyse wurden 3 Proteine differentiell exprimiert, die in Beziehung zum zellulären Immunsystem stehen. Dabei handelt es sich um Rho GDP-dissociation Inhibitor 2, Calgranulin B sowie Hematopoietic lineage cell-specific Protein.

Der Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 ist ein Regulator der Rho-GTPasen. Rho-GTPasen gehören zur Gruppe GTP-bindender Proteine. Rho GTPasen sind molekulare Schalter, die eine Vielzahl wichtiger zellulärer Funktionen steuern [61]. Es sind drei Isoformen der Rho GDP-dissociation Inhibitors bekannt. Während Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 ubiquitär exprimiert wird, ist Rho GDP-dissociation

Inhibitor 2 vor allem in Lymphozyten zu finden [105]. Der Rho GDP-dissociation Inhibitor 3 wird vor allem im Gehirn und im Pankreas exprimiert [106].

Calgranulin B gehört zu den S100 calcium-binding Proteinen. Zusammen mit Calgranulin A bildet es Calprotectin. Calgranulin A und B werden primär von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten gebildet [60]. Ein Vergleich der Synovialflüssigkeit mit Hilfe der Proteomanalyse von Sinz *et al.* zeigt ebenfalls eine Überexpression von Calgranulin B im Vergleich zur Synovialflüssigkeit von Osteoarthrosepatienten [43]. In einer weiterführenden Untersuchung konnten Drynda *et al.* die Ergebnisse bestätigen. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Plasmaproteinlevel von Calprotectin gut mit dem Erfolg einer Anti-TNF $\alpha$ -Therapie korrelieren. Somit könnte Calprotectin nicht nur zur Diagnose, sondern auch zum Therapiemonitoring benutzt werden [107].

Das Hematopoietic lineage cell-specific Protein ist, wie der Name schon sagt, ein Protein, das vor allem in Zellen der Hämatopoiese gebildet wird. Aus den Stammzellen der Hämatopoiese bilden sich alle zellulären Bestandteile des Blutes, unter anderem auch die Leukozyten. Diese sind bekanntermaßen an der Pathogenese der RA beteiligt. Das Hematopoietic lineage cell-specific Protein ist ein wichtiges Substrat der Protein-Tyrosin-Kinase und damit in die intrazelluläre Signalverarbeitung nach Aktivierung von B- und T-Zellrezeptoren involviert [108].

#### 4.2.5 Tetranectin

Tetranectin ist ein plasminogen-bindendes Protein, das ursprünglich im Plasma gefunden wurde. Tetranectin dient dabei als Kofaktor in der Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch den Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) [64]. Außerdem konnte es in endokrinem Gewebe sowie epithelialen und mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden [109-111]. Neben der plasminogen-bindenden Aktivität scheint es auch eine wichtige Funktion beim Geweberemodeling zu haben [112, 113].

Eine Anhäufung von Tetranectin im Stroma von verschiedenen Tumoren ist beschrieben [114, 115]. Diskutiert wird dabei ein Zusammenhang mit der Invasion und Metastasierung. Ob das Tetranectin dabei aus dem Plasma stammt oder von den Zellen selbst gebildet wird, ist noch unklar. Interessant dazu ist, dass

Untersuchungen, eine Korrelation von niedrigen Plasmalevel von Tetranectin bei Tumoren mit einer schlechteren Prognose zeigen konnten [114, 116].

In dieser Arbeit ist die Menge an Tetranectin in der RA deutlich niedriger als in der OA. Für das invasiv wachsende Pannusgewebe hätte man aber eher höhere Tetranectinmengen erwartet, ähnlich wie bei Tumoren. Möglicherweise ist die Tetranectinmenge im Pannusgewebe insgesamt so gering, dass sie durch die Menge im Plasma überdeckt wird. Die starke Durchblutung des Pannusgewebes erklärt das Vorhandensein von Plasmaproteinen. Somit könnte es sich bei der hier gemessenen Tetranectinmenge vor allem um den Plasmawert handeln. Eine Untersuchung von Kamper *et al.* zeigt ebenfalls niedrigere Plasmalevel von Tetranectin in RA im Vergleich zu OA. Darüber hinaus zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Tetranectinlevel und Schwere der Erkrankung [117]. Damit könnte Tetranectin ein möglich Marker der Krankheitsaktivität sein und somit möglicherweise für das Therapiemonitoring genutzt werden.

#### **4.3 Validierung der Ergebnisse mit Hilfe der Immunanalytik**

Für die vergleichende Untersuchung der Proteome von Patienten mit RA bzw. Osteoarrose wurden jeweils zwei Patientenproben untersucht. Dabei konnte für insgesamt 14 Proteine ein Unterschied in der Proteinexpression gezeigt werden. Aufgrund der wenigen Patienten ist die Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu verstärken, wurde ein Teil der unterschiedlich exprimierten Proteine mit einem zweiten Verfahren validiert.

Dazu wurden zwei Proteine erneut auf ihr unterschiedliches Vorkommen mit einem zweiten Verfahren untersucht. Bei den Proteinen handelte es sich um die Rho GDP-dissociation Inhibitoren 1 und 2.

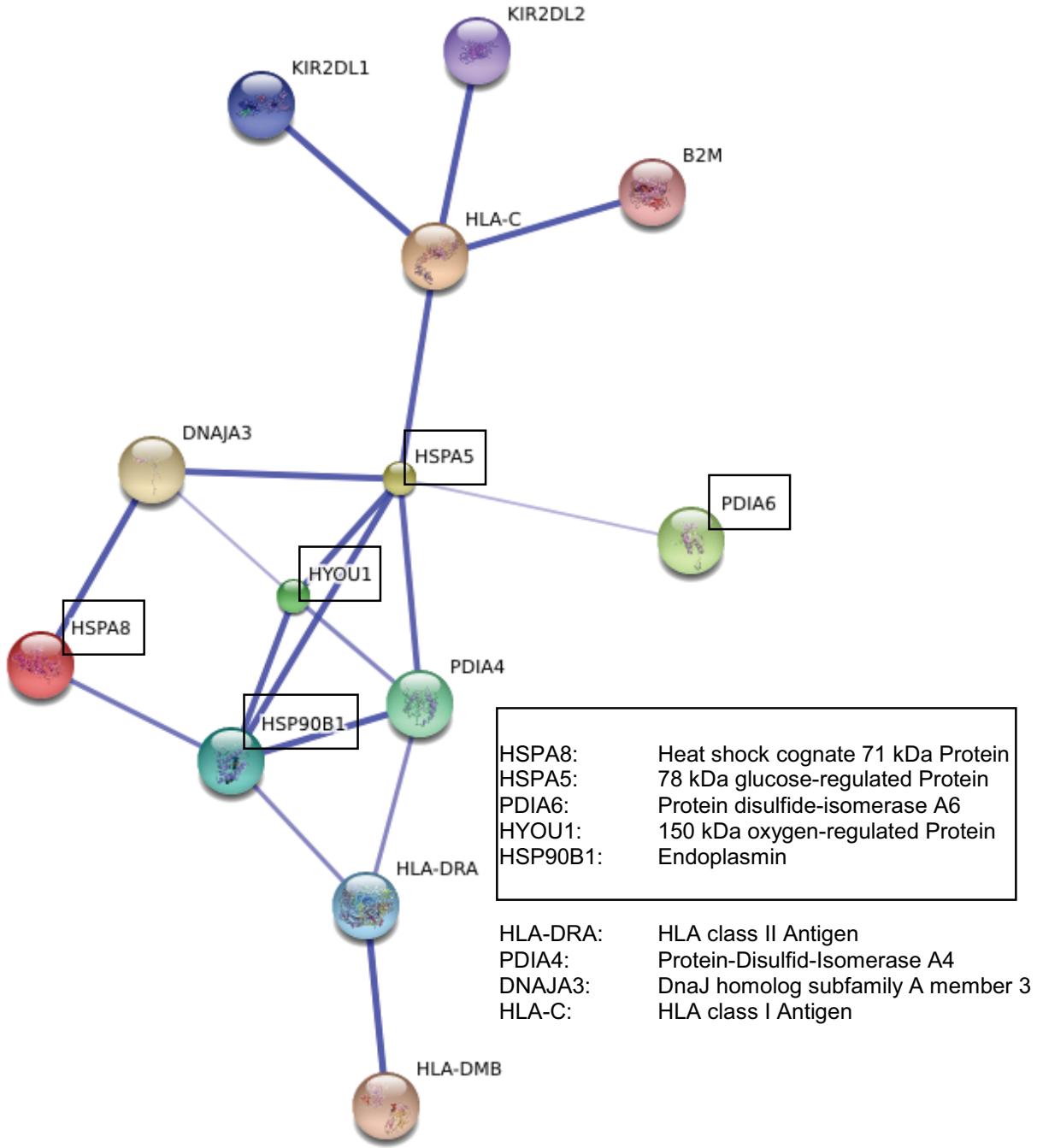
Als Analysemethode wurde der Westernblot gewählt, der ein Standardverfahren in der Proteinanalytik darstellt. Zusätzlich zu den bereits untersuchten Proben wurden noch jeweils 6 Proben von RA- und OA-Patienten für den Vergleich verwendet, so dass insgesamt 8 Proben pro Patientengruppe untersucht wurden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von Rho GDP-dissociation Inhibitor 2. Bei der Expression von Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 gab es keinen signifikanten Unterschied.

Dieses Resultat unterstreicht die Aussagen aus der differenziellen Proteomanalyse. Auch hier ist der Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 bei Patienten mit RA verstärkt exprimiert, während der Rho GDP-dissociation Inhibitor 1 in beiden Gruppen gleichstark vertreten ist.

Die anderen, mit der Immunanalytik nicht untersuchten differentiell exprimierten Proteine, zeigen zum Teil einen deutlich größeren Unterschied in der Proteomanalyse als Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 oder sind bei OA-Patienten gar nicht vorhanden.

#### **4.4 Zusammenfassung**

Die größte Gruppe der differentiell exprimierten Proteine in dieser Arbeit waren die der Heat-Shock-Proteine. Weitere Gruppen sind die Isomerasen, die Peptidasen sowie Proteine des zellulären Immunsystems. Viele bekannte Aspekte der Pathogenese der RA zeigen sich in der Proteomanalyse, wie z.B. der Einfluss des zellulären Immunsystems, hier erkennbar durch die vermehrte Expression spezifischer Proteine. Auch die Bedeutung der Peptidasen an der Zerstörung des Gelenkes ist hinreichend bekannt. Ein entsprechender Nachweis findet sich ebenfalls in dieser Arbeit. Nicht nur die vermehrte Expression von Peptidasen, sondern auch deren Aktivität, hier durch das vermehrte Auftreten von Endoplasminfragmenten gezeigt, spiegelt sich direkt im Proteinmuster wieder. Aber auch bis jetzt weniger bekannte Aspekte der RA kommen zum Vorschein. So zeigt die zunehmende Diskussion der HSPs an der Pathogenese der RA, dass es sich bei ihnen nicht nur um Chaperone handelt, sondern ihre Funktionen weit darüber hinaus gehen. Vor allem die Prozessierung von MHC-Molekülen sowie die Modulation des Immunsystems durch extrazelluläre HSPs ist dabei von besonderem Interesse. Dabei ist die Hochregulation von Chaperonen wie HSPs und PDIs nicht nur eine Reaktion auf den Stress durch die Entzündung, sondern gleichzeitig ein Zeichen der erhöhten Aktivität verschiedener Zellen und deren Proteinsynthese im Rahmen der Inflammation. Dies konnte in dieser Arbeit an der verstärkten Expression von Peptidasen und verschiedenen Proteinen des zellulären Immunsystems gezeigt werden. Besonders interessant scheint dabei das Hypoxia up-regulated Protein 1, welches bisher noch gar nicht im Zusammenhang mit der RA diskutiert wurde.



**Abbildung 4-1:** Interaktionsnetzwerk von HSPs und PDIs bei der Prozessierung von MHC-Molekülen. Das Netzwerk wurde mit Hilfe der Datenbank STRING erstellt und stellt die verschiedenen Partner der MHC-Prozessierung dar [118]. Dabei wird deutlich, dass die Synthese sowohl der MHC-I- als auch der MHC-II-Rezeptor von der Interaktion verschiedener HSPs und PDIs abhängig ist. Die eingerahmten Proteine sind in der RA verstärkt exprimiert worden. Die Dicke der blauen Linie korreliert mit dem Confidence-Level der Interaktion.

Damit konnten mit Hilfe der differentiellen Proteomanalyse in dieser Arbeit eine Vielzahl bekannter Erkenntnisse zur RA auf molekularer Ebene bestätigt und durch neue Aspekte ergänzt werden.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass es sich bei den Ergebnissen aufgrund der geringen Patientenzahl nicht um allgemeingültige Aussagen handelt, da nur für den Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 das Ergebnis der Proteomanalyse mit einem zweiten Verfahren und einer größeren Patientengruppe überprüft und bestätigt wurde. Es sollen lediglich Vorschläge für eine weitergehende Untersuchung differentiell exprimierter Proteine zur Charakterisierung der jeweiligen Patientengruppen gemacht werden.

## 5 Literatur

1. **Lawrence, R.C., et al.**, Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *J Rheumatol*, 1989. 16(4): p. 427-41.
2. **Silman, A.J.**, Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Apmis*, 1994. 102(10): p. 721-8.
3. **Lipsky, P.**, Rheumatoide Arthritis. 14 ed. *Harrisons Innere Medizin*. 1999, New York: McGraw-Hill, Inc.
4. **Wolfe F, M.D., Sibley JT et al.**, The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1994. 37: p. 481–494.
5. **Ruof, J., et al.**, Costs of rheumatoid arthritis in Germany: a micro-costing approach based on healthcare payer's data sources. *Ann Rheum Dis*, 2003. 62(6): p. 544-9.
6. **Rothschild, B.M. and R.J. Woods**, [Does rheumatoid polyarthritis come from the New World?]. *Rev Rhum Mal Osteoartic*, 1990. 57(3 ( Pt 2)): p. 271-4.
7. **Rothschild, B.M., Woods,R.J., Rothschild,C., & Sebes,J.I.**, Geographic distribution of rheumatoid arthritis in ancient North America: implications for pathogenesis. *Semin.Arthritis Rheum.*, 1992. 22: p. 181-187.
8. **Short, C.L.**, The antiquity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1974. 17(3): p. 193-205.
9. **Lantré-Beauvais , A.J.**, Doit-on admettre une nouvelle espéce de goutte sous la dénomination de goutte asthénique primitive? 1800.
10. **Glocker, M.O., et al.**, Rheumatoid arthritis, a complex multifactorial disease: on the way toward individualized medicine. *Med Res Rev*, 2006. 26(1): p. 63-87.
11. **Carty, S.M., N. Snowden, and A.J. Silman**, Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *J Rheumatol*, 2003. 30(3): p. 425-9.
12. **Keck, E.**, Rheumatologie Ein Basislehrbuch. 2002, Wiss. Verl.-Ges: Stuttgart. p. 372.
13. **Stastny, P.**, Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 1978. 298(16): p. 869-71.
14. **Gonzalez-Gay, M.A., C. Garcia-Porrua, and A.H. Hajeer**, Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 2002. 31(6): p. 355-60.

15. **Stern, L.J., et al.**, Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 1994. 368(6468): p. 215-21.
16. **Rosloniec, E.F., et al.**, Crystallographic structure of a rheumatoid arthritis MHC susceptibility allele, HLA-DR1 (DRB1\*0101), complexed with the immunodominant determinant of human type II collagen. *J Immunol*, 2006. 177(6): p. 3884-92.
17. **Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher**, Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 1996. 383(6603): p. 787-93.
18. **Muller-Ladner, U., et al.**, Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*, 1996. 149(5): p. 1607-15.
19. **Seemayer, C.A., et al.**, [Rheumatoid arthritis: new developments in the pathogenesis with special reference to synovial fibroblasts]. *Z Rheumatol*, 2001. 60(5): p. 309-18.
20. **Waaler, E.**, on the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood opuscles. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1940. 17: p. 172-188.
21. **Miehle, W.**, Rheumatoide Arthritis - Diagnose und Therapie. 2 ed. 1999, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
22. **Vallbracht, I., et al.**, Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2004. 63(9): p. 1079-84.
23. **Gromnica-Ihle, E., G.Ganser, E.Genth**, Neue Erkenntnisse zum klinischen Verlauf („outcome“) rheumatischer Erkrankungen. *Internist*, 2001. 42: p. 237-249.
24. **Arnett, F.C., et al.**, The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1988. 31(3): p. 315-24.
25. **Aringer, M., N. Leuchten, and K.P. Machold**, [Early rheumatoid arthritis - rapid help is double help.]. *Z Rheumatol*, 2007. 66(8): p. 693-702.
26. **Gromnica-Ihle, E.**, Pharmacotherapy of rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol*, 2002. 61 Suppl 2: p. II35-II38.
27. **Muller-Ladner, U.**, Are "biologics" in the treatment of rheumatoid arthritis really cost effective? *Internist (Berl)*, 2004. 45(12): p. 1402-6.
28. **Jiang, Y., et al.**, A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(5): p. 1001-9.

29. **Emery, P., et al.**, The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(5): p. 1390-400.
30. **Koller, M.D.**, Targeted therapy in rheumatoid arthritis. *Wien Med Wochenschr*, 2006. 156(1-2): p. 53-60.
31. **Felson, D.T., et al.**, The Prosorba column for treatment of refractory rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, sham-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 1999. 42(10): p. 2153-9.
32. **Fischer, M. and G. Modder**, Radionuclide therapy of inflammatory joint diseases. *Nucl Med Commun*, 2002. 23(9): p. 829-31.
33. **Nakamura, H., et al.**, The anti-rheumatic effect of multiple synovectomy in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Int Orthop*, 2000. 24(5): p. 242-5.
34. **Krasnokutsky, S., J. Samuels, and S.B. Abramson**, Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2007. 65(3): p. 222-8.
35. **Aigner, T. and L. McKenna**, Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 2002. 59(1): p. 5-18.
36. **Muller-Hilke, B.**, [Pathogenesis of osteoarthritis--a snapshot]. *Z Rheumatol*, 2007. 66(8): p. 703-5.
37. **Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D. and Hochstrasser, D.F.**, Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. 1997, Berlin: Springer.
38. **Gygi S.P., R.Y., Franzia B.R., Aebersold R.**, Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 1999(19): p. 1720-1730.
39. **Baumeister, W., et al.**, The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 1998. 92(3): p. 367-80.
40. **O 'Farrell, P.H.**, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.*, 1975. 250: p. 4007- 4021.
41. **Klose, J.**, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues.A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 1975. 26: p. 231-243.
42. **Lorenz, P., et al.**, Proteome analysis of diseased joints from mice suffering from collagen-induced arthritis. *Clin Chem Lab Med*, 2003. 41(12): p. 1622-32.
43. **Sinz, A., et al.**, Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis*, 2002. 23(19): p. 3445-56.
44. **Gey, M.H.**, Instrumentelle Bioanalytik. 1998, Braunschweig/Wiesbaden: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH.

45. **Görg A., P.W., Günther S., Weser J.**, Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis*, 1985. 6: p. 599-604.
46. **Lottspeich F. , Z.H.**, Bioanalytik. 1998, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
47. **Just, T., et al.**, Differential proteome analysis of tonsils from children with chronic tonsillitis or with hyperplasia reveals disease-associated protein expression differences. *Anal Bioanal Chem*, 2006. 384(5): p. 1134-44.
48. **Bantscheff, M., Glocker, M.**, MALDI-Massenspektrometrie in der Proteomforschung. *Biospektrum*, 2001(7): p. 250-252.
49. **Mikkat, S., et al.**, Mass spectrometric protein structure characterization reveals cause of migration differences of haptoglobin alpha chains in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 2004. 4(12): p. 3921-32.
50. **Kalbitzer, H.P., P**, Proteine, in *Biochemie und Pathobiochemie*. 2007, Springer Berlin Heidelberg.
51. **Kyhse-Andersen, J.**, Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 1984. 10(3-4): p. 203-9.
52. **Craig, E.A., B.D. Gambill, and R.J. Nelson**, Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev*, 1993. 57(2): p. 402-14.
53. **Andrej, H.**, Biosynthese, Modifikation und Abbau von Proteinen, in *Biochemie und Pathobiochemie*. 2007, Springer Berlin Heidelberg.
54. **Linnemann, M., Kühl M.**, Aminosäurestoffwechsel, in *Biochemie für Mediziner*. 2007, Springer Berlin Heidelberg.
55. **Georg, L.**, Basiswissen Biochemie. 2005: Springer Berlin Heidelberg.
56. **Hayano, T. and M. Kikuchi**, Cloning and sequencing of the cDNA encoding human P5. *Gene*, 1995. 164(2): p. 377-8.
57. **Kikuchi, M., et al.**, Functional analysis of human P5, a protein disulfide isomerase homologue. *J Biochem*, 2002. 132(3): p. 451-5.
58. **Knoblauch, B., et al.**, ERp19 and ERp46, new members of the thioredoxin family of endoplasmic reticulum proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2003. 2(10): p. 1104-19.
59. **Neumann, J.**, Das Immunsystem, in *Immunbiologie*. 2007, Springer Berlin Heidelberg.
60. **Hessian, P.A., J. Edgeworth, and N. Hogg**, MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol*, 1993. 53(2): p. 197-204.

61. **Dovas, A. and J.R. Couchman**, RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J*, 2005. 390(Pt 1): p. 1-9.
62. **Fukumoto, Y., et al.**, Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene*, 1990. 5(9): p. 1321-8.
63. **Kitamura, D., et al.**, Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucleic Acids Res*, 1989. 17(22): p. 9367-79.
64. **Clemmensen, I., L.C. Petersen, and C. Kluft**, Purification and characterization of a novel, oligomeric, plasminogen kringle 4 binding protein from human plasma: tetranectin. *Eur J Biochem*, 1986. 156(2): p. 327-33.
65. **Christensen, L.**, The distribution of fibronectin, laminin and tetranectin in human breast cancer with special attention to the extracellular matrix. *APMIS Suppl*, 1992. 26: p. 1-39.
66. **Klose, J. and U. Kobalz**, Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 1995. 16(6): p. 1034-59.
67. **Chambers, G., et al.**, Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol*, 2000. 192(3): p. 280-8.
68. **Ritossa, F.**, A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia*, 1962. 18: p. 571-573.
69. **Beckmann, R.P., M. Lovett, and W.J. Welch**, Examining the function and regulation of hsp 70 in cells subjected to metabolic stress. *J Cell Biol*, 1992. 117(6): p. 1137-50.
70. **Tiligada, E.**, Chemotherapy: induction of stress responses. *Endocr Relat Cancer*, 2006. 13 Suppl 1: p. S115-24.
71. **Craig, E.A., J.S. Weissman, and A.L. Horwich**, Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell*, 1994. 78(3): p. 365-72.
72. **Naylor, D.J. and F.U. Hartl**, Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells. *Biochem Soc Symp*, 2001(68): p. 45-68.
73. **Soti, C. and P. Csermely**, Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *J Biosci*, 2007. 32(3): p. 511-5.
74. **Blass, S., et al.**, The stress protein BiP is overexpressed and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(4): p. 761-71.
75. **Schick, C., et al.**, Continuous enhanced expression of Hsc70 but not Hsp70 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(1): p. 88-93.

76. **Corrigall, V.M., et al.**, The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis. *J Immunol*, 2001. 166(3): p. 1492-8.
77. **Schirmbeck, R., W. Bohm, and J. Reimann**, Stress protein (hsp73)-mediated, TAP-independent processing of endogenous, truncated SV40 large T antigen for Db-restricted peptide presentation. *Eur J Immunol*, 1997. 27(8): p. 2016-23.
78. **Haug, M., et al.**, 70-kDa heat shock proteins: specific interactions with HLA-DR molecules and their peptide fragments. *Eur J Immunol*, 2007. 37(4): p. 1053-63.
79. **Arnold-Schild, D., et al.**, Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol*, 1999. 162(7): p. 3757-60.
80. **Singh-Jasuja, H., et al.**, The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol Chem*, 2001. 382(4): p. 629-36.
81. **Srivastava, P.**, Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(3): p. 185-94.
82. **Nakatani, Y., et al.**, Increased stress protein ORP150 autoantibody production in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med*, 2006. 23(2): p. 216-9.
83. **Miyagi, T., et al.**, Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression in human prostate cancer cells. *Mol Urol*, 2001. 5(2): p. 79-80.
84. **Asahi, H., et al.**, Immunohistochemical detection of the 150-kDa oxygen-regulated protein in bladder cancer. *BJU Int*, 2002. 90(4): p. 462-6.
85. **Tsukamoto, Y., et al.**, Expression of the 150-kd oxygen-regulated protein in human breast cancer. *Lab Invest*, 1998. 78(6): p. 699-706.
86. **Miyagi, T., et al.**, Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression on human prostate cancer cells. *Int J Urol*, 2002. 9(10): p. 577-85.
87. **Brownlie, R.J., et al.**, Treatment of murine collagen-induced arthritis by the stress protein BiP via interleukin-4-producing regulatory T cells: a novel function for an ancient protein. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(3): p. 854-63.
88. **Turk, B.**, Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(9): p. 785-99.
89. **Bresnihan, B.**, Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1999. 26(3): p. 717-9.
90. **Danks, L., et al.**, Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61(10): p. 916-21.

91. **Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff**, Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 2006. 11: p. 529-43.
92. **Deutzmann, R., Bruckner-Tuderman, L, Bruckner, P**, Binde- und Stützgewebe, in *Biochemie und Pathobiochemie*. 2007, Springer Berlin Heidelberg.
93. **Hansen, T., et al.**, Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium. *J Rheumatol*, 2000. 27(4): p. 859-65.
94. **Yasuda, Y., J. Kaleta, and D. Bromme**, The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005. 57(7): p. 973-93.
95. **Nagler, D.K., et al.**, Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate*, 2004. 60(2): p. 109-19.
96. **Kos, J., et al.**, Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res*, 2005. 306(1): p. 103-13.
97. **Krueger, S., et al.**, Up-regulation of cathepsin X in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *J Pathol*, 2005. 207(1): p. 32-42.
98. **Goldberger, R.F., C.J. Epstein, and C.B. Anfinsen**, Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem*, 1963. 238: p. 628-35.
99. **Appenzeller-Herzog, C. and L. Ellgaard**, The human PDI family: Versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta*, 2007.
100. **Mayer, M., et al.**, BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J Biol Chem*, 2000. 275(38): p. 29421-5.
101. **Park, B., et al.**, Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell*, 2006. 127(2): p. 369-82.
102. **Turano, C., et al.**, Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol*, 2002. 193(2): p. 154-63.
103. **Goplen, D., et al.**, Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. *Cancer Res*, 2006. 66(20): p. 9895-902.
104. **Wang, Y., et al.**, Differential expression of mimecan and thioredoxin domain-containing protein 5 in colorectal adenoma and cancer: a proteomic study. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007. 232(9): p. 1152-9.
105. **Scherle, P., T. Behrens, and L.M. Staudt**, Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(16): p. 7568-72.

106. **Adra, C.N., et al.**, RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(9): p. 4279-84.
107. **Drynda, S., et al.**, Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract*, 2004. 200(2): p. 165-71.
108. **Egashira, M., et al.**, The human HCLS1 gene maps to chromosome 3q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1996. 72(2-3): p. 175-6.
109. **Christensen, L., et al.**, Immunohistochemical localization of a novel, human plasma protein, tetranectin, in human endocrine tissues. *Histochemistry*, 1987. 87(3): p. 195-9.
110. **Nielsen, H., I. Clemmensen, and A. Kharazmi**, Tetranectin: a novel secretory protein from human monocytes. *Scand J Immunol*, 1993. 37(1): p. 39-42.
111. **Clemmensen, I., et al.**, A tetranectin-related protein is produced and deposited in extracellular matrix by human embryonal fibroblasts. *Eur J Biochem*, 1991. 195(3): p. 735-41.
112. **Wewer, U.M., et al.**, A potential role for tetranectin in mineralization during osteogenesis. *J Cell Biol*, 1994. 127(6 Pt 1): p. 1767-75.
113. **Wewer, U.M., et al.**, Tetranectin is a novel marker for myogenesis during embryonic development, muscle regeneration, and muscle cell differentiation in vitro. *Dev Biol*, 1998. 200(2): p. 247-59.
114. **Hogdall, C.K., L. Christensen, and I. Clemmensen**, The prognostic value of tetranectin immunoreactivity and plasma tetranectin in patients with ovarian cancer. *Cancer*, 1993. 72(8): p. 2415-22.
115. **Christensen, L. and I. Clemmensen**, Differences in tetranectin immunoreactivity between benign and malignant breast tissue. *Histochemistry*, 1991. 95(5): p. 427-33.
116. **Hogdall, C.K., et al.**, Serum tetranectin is an independent prognostic marker in colorectal cancer and weakly correlated with plasma suPAR, plasma PAI-1 and serum CEA. *Apmis*, 2002. 110(9): p. 630-8.
117. **Kamper, E.F., et al.**, Plasma tetranectin levels and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1997. 24(2): p. 262-8.
118. **von Mering, C., et al.**, STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Database issue): p. D358-62.

## 6 Thesen

Die rheumatoide Arthritis ist eine häufige chronische Erkrankung, an der weltweit etwa 0,5 – 1% der Bevölkerung leiden. In Deutschland rechnet man mit ca. 800.000 Erkrankten, wobei Frauen ca. 3 x häufiger betroffen sind als Männer.

Trotz erheblicher Fortschritte im Verständnis der Pathogenese, ist die Ursache der rheumatoiden Arthritis bis heute unklar. Nach heutigen Vorstellungen handelt es sich bei der rheumatoiden Arthritis um eine polyätiologische Erkrankung, bei der es auf Grundlage einer genetischen Veranlagung im Zusammenhang mit exogenen oder endogenen Einflüssen zu einer dauerhaften Aktivierung des Immunsystems mit autoaggressivem Verhalten kommt.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung molekularer Prozesse von Krankheiten stellt die vergleichende Proteomanalyse dar. Während das Genom eine statische Größe ist, hat das Proteom eine dynamische, sich ständig verändernde Gestalt. Die Proteinsynthese von Zellen und Geweben ist spezifisch und unterliegt ständig inneren und äußeren Einflüssen, die zu einer Veränderung der Proteinsynthese führen können. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese, einer Schlüsseltechnologie der Proteomanalyse, lassen sich komplexe Proteingemische auftrennen. Anschließend lassen sich die Proteine durch Anfärbung sichtbar machen und mit der Massenspektrometrie identifizieren. Durch den Vergleich der Proteinmuster der verschiedenen synovialen Gewebe lassen sich Unterschiede in der Proteinexpression der Gewebe erkennen und möglicherweise Rückschlüsse auf die Pathogenese ziehen.

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich von synovialem Gewebe von 4 Patienten mit Hilfe der Proteomanalyse. Zwei der Proben stammten von Patienten mit rheumatoider Arthritis, zwei von Patienten mit Osteoarthrose. In einem weiteren Schritt wurde ein Teil der Ergebnisse mit einem immunanalytischen Verfahren (Western Blot) und einer größeren Patientenzahl validiert.

Daraus ergaben sich die zentralen Aufgaben dieser Arbeit:

1. Erstellung von 2D-Gelen der verschiedenen synovialen Gewebe.
2. Vergleich der beiden Patientengruppen und Identifizierung von differentiell exprimierten Proteinen.
3. Identifizierung der Proteinspots mit Hilfe der Massenspektrometrie.
4. Validierung eines Teils der Ergebnisse der Proteomanalyse mit Hilfe der Western Blot Analyse.

Ergebnisse:

1. In dieser Arbeit wurden pro Patient zwei 2D-Gele erstellt, auf denen je etwa 800 Proteinspots zu erkennen waren.
2. Es wurden insgesamt 659 Proteinspots von den verschiedenen 2D-Gelen mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Zusammengenommen handelte es sich um 336 unterschiedliche Spots, die in einem Referenzgel zusammengefasst wurden. Da ein und dasselbe Protein teils in mehreren Spots auftauchte, handelte es sich letztlich um 205 unterschiedliche, nicht-redundante Proteine.
3. Durch den Vergleich der verschiedenen synovialen Gewebe konnten 14 unterschiedlich exprimierte Proteine identifiziert werden. Dabei waren 13 Proteine in der rheumatoiden Arthritis stärker und eines schwächer exprimiert. Die Proteine konnten verschiedenen funktionellen Gruppen zugeordnet werden, wobei die größte Gruppe die der Heat-Shock-Proteine war. Weitere Gruppen waren Peptidasen, Isomerasen, Proteine des zellulären Immunsystems sowie Plasmaproteine.  
Viele bekannte Aspekte der Pathogenese der RA spiegeln sich in den Ergebnissen der globalen Proteomanalyse wider, wie z.B. der Einfluss des zellulären Immunsystems oder die Bedeutung der Peptidasen an der Zerstörung des Gelenkes. Besonders interessant scheint das Hypoxia up-regulated Protein 1, ein Heat-Shock-Protein welches bisher noch gar nicht im Zusammenhang mit der RA diskutiert wurde.

4. In einem zweiten Schritt wurde ein Protein, der Rho GDP-dissociation Inhibitor 2, aus der Gruppe des zellulären Immunsystems mit Hilfe der Immunanalytik auf seine Expression in den beiden Patientengruppen untersucht. Als Analysemethode wurde der „Western Blot“ gewählt, der ein Standardverfahren in der Proteinanalytik darstellt. Dabei zeigte sich eine signifikant stärkere Proteinexpression von Rho GDP-dissociation Inhibitor 2 in der Gruppe der rheumatoiden Arthritis. Dieses Resultat bestätigt das Ergebnis der Proteomanalyse

Insgesamt kann man schließen, dass die Ergebnisse der molekularen Analyse der Synovia bzw. Pannusgewebe mit Hilfe der globalen Proteomanalyse im Einklang zu bislang bekannten Krankheitsgeschehnissen stehen. In Einzelfällen können, wie hier gezeigt, mit der Proteomanalyse noch unbekannte Proteinfaktoren in den Kontext zur Erkrankung gebracht werden. Diese Kandidaten können für weitergehende Untersuchungen vorgeschlagen werden. Somit eröffnet die Proteomanalyse zusätzlich zum „Hypothesen-getriebenen“ einen „Daten-getriebenen“ Zugang zur Charakterisierung von polygenen Erkrankungen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$\lambda$	Wellenlänge
2D	zweidimensional
A	Amper
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
ACR	American College of Rheumatology
Anti-CCP	Antikörper gegen zyklisches citrulliniertes Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DMARD's	disease modifying antirheumatic drugs
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamintetraacetat
Et al.	et alteri
H <sub>2</sub> O	Wasser
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
FWHM	full width half maximum
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSPs	Heat-Shock-Proteine
HT	High TRIS
IAA	Iodacetamid
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kV	Kilovolt
LT	Low TRIS
M	Mol
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight

MHC	Major histocompatibility complex
$\mu$ l	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MS	Massenspektrometrie
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	Ammoniumhydrogencarbonat
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	Natriumorthovanadat
nm	Nanometer
OA	Osteoarthrose
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
pI	Isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TBS	TRIS buffered saline
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **8 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und ohne dabei andere als in der Arbeit angegebene Hilfsmittel verwendet zu haben.

Alle Inhalte, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Andreas Francke

## 9 Wissenschaftliche Publikationen

1. A. Francke, P. Lorenz, D. Koczan, M. Bantscheff, S. Moeller, M. O. Glocker und H.-J. Thiesen „Comparison of RNA and protein expression levels in pannus tissue from patients suffering from rheumatoid arthritis.“, Deutsches Humangenomprojekt (DHGP)–Jahrestagung 2001
2. A. Francke, P. Lorenz, M. Bantscheff, P. Ruschpler, P. Stiehl, H.-J. Thiesen und M.O. Glocker „Vergleichende massenspektrometrische Proteomanalysen zur molekularen Charakterisierung von humanen rheumatischen und osteoarthritischen Geweben.“, 34. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie 2001.
3. H.-J. Thiesen, A. Francke, P. Lorenz, D. Koczan, M. Bantscheff, S. Möller, S. Drynda, J. Kekow, P. Ruschpler, P. Stiehl und M. O. Glocker „From gene expression profiling to proteome analysis in rheumatoid arthritis“, Dechema 2002
4. P. Lorenz, A. Francke, D. Koczan, M. Bantscheff, S. Mikkat, S. Möller, P. Ruschpler, P. Stiehl, B. Scheidt, M. Glocker, H.-J. Thiesen „Combined proteome and transcriptome approaches to elucidate expression patterns of synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis versus osteoarthritis“, Deutsches Humangenomprojekt (DHGP)–Jahrestagung 2002
5. A. Francke, P. Lorenz, D. Koczan, M. Bantscheff, S. Möller, B. Scheidt, S. Drynda, J. Kekow, P. Ruschpler, P. Stiehl, M. O. Glocker, and H.-J. Thiesen „Therapy monitoring by gene expression profiling and proteome analysis in rheumatoid arthritis“, 50<sup>th</sup> Conference of the American Society for Mass Spectrometry, 2002
6. M. O. Glocker, P. Lorenz, A. Francke, D. Koczan, M. Bantscheff, S. Mikkat, S. Möller, P. Ruschpler, P. Stiehl, B. Scheidt, H.-J. Thiesen „Combined transcriptome and proteome approaches to elucidate gene expression patterns of synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis versus osteoarthritis“, HUPO 1<sup>st</sup> Annual World Congress, 2002.
7. P. Lorenz, A. Francke, D. Koczan, M. Bantscheff, S. Mikkat, S. Möller, P. Ruschpler, P. Stiehl, B. Scheidt, M. O. Glocker und H.-J. Thiesen „Combined transcriptome and proteome approaches to elucidate gene expression patterns of synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis versus

- osteoarthritis“, BioCon Valley® International Conference and Industrial Exhibition – Biosystems, Biotechnology, Bioengineering, 2002.
8. P. Lorenz, **A. Francke**, D. Koczan, M. Bantscheff, S. Mikkat, S. Möller, P. Ruschpler, P. Stiehl, B. Scheidt, M. O. Glocker, and H.-J. Thiesen „Combined transcriptome and proteome approaches to elucidate gene expression patterns of synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis versus osteoarthritis“, Joint Meeting of the German National Genome Research Network and the German Human Genome Project "The Genetic and Molecular Basis of Human Disease", 2002
  9. P. Lorenz, **A. Francke**, D. Koczan, M. Kreutzer, P. Serrano, S. Möller, S. Drynda, J. Kekow, P. Ruschpler, P. Stiehl, M. O. Glocker und H.-J. Thiesen „Expression profiling of proteases by transcriptome and proteome analysis in rheumatoid arthritis“, 1<sup>st</sup> International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics, 2004.
  10. H.-J. Thiesen, D. Koczan, P. Ruschpler, P. Stiehl, **A. Francke**, R. Guthke, M. O. Glocker, P. Lorenz „Comparative transcriptome and proteome analysis of genes in rheumatoid arthritis substantiates the Stiehl classification of synovial tissues“, HUPO 3<sup>rd</sup> Annual World Congress, 2004.
  11. **A. Francke**, P. Lorenz, D. Koczan, P. Serrano-Fernandez, S. Drynda, P. Ruschpler, P. Stiehl, J. Kekow, H.-J. Thiesen und M.O. Glocker „Mass Spectrometric Proteome Analyses of Biomaterials from Patients Suffering from Rheumatoid Arthritis, and Comparison to Osteoarthritis: An approach to Discover Biomarker Proteins in Body Fluids and Tissues“, Proceedings of the Swiss Proteomics Society, 2004.

## 10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. O. Glocker für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die hervorragende Betreuung bedanken. Trotz der Länge des Promotionszeitraum stand er mir immer mit Geduld und fachlichem Rat zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. P. Lorenz für die unermüdliche Hilfe bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie die vielen Ratschläge, Ideen und Diskussionen.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. P. Stiehl und Herrn Dr. P. Ruschpler für die Bereitstellung und Untersuchung der Patientenproben.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. M. Bantscheff und Herrn Dr. S. Mikkat für die Einführung in die Massenspektrometrie sowie Frau Dr. S. Wandschneider für die Hilfe bei der Gelelektrophorese danken.

Mein Dank gilt auch Frau M. Sieb für die freundliche Hilfe im Labor.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. C. Koy für die Korrektur meiner Arbeit sowie bei allen Mitarbeitern des Proteom-Zentrums Rostock für ihre freundliche Aufnahme und Hilfe bedanken.

Vielen Dank meinen Eltern für ihre Unterstützung und Motivation.