

Identifizierung neuer potentieller Biomarker für das Kolonkarzinom sowie dessen Vorstufen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Alexandra Wlodarski
geb. am 29.07.1981 in Mainz

Mainz, Februar 2014

Institut für Immunologie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2014

Vorbemerkungen

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit

Identifizierung neuer potentieller Biomarker für das Kolonkarzinom sowie dessen Vorstufen

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Mainz, den

Alexandra Wlodarski

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Das Kolonkarzinom	2
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Ätiologie	3
1.1.3	Pathogenese	4
1.1.4	Klassifikation	7
1.1.5	Screening/Diagnostik des KRK	9
1.1.6	Therapie	11
1.2	Biomarker	12
1.2.1	Entdeckung neuer Tumorbiomarker	13
1.3	Das Plasmaproteom	15
1.4	Detektion neuer potentieller Biomarkerkandidaten aus Serum und Plasma mittels Massenspektrometrie	18
1.5	Aufbau eines Massenspektrometers	19
1.5.1	Quantitative labelfreie LC-MS/MS	21
1.6	Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Materialien	24
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
2.3	Puffer und Lösungen	25
2.4	Antikörper	25
2.5	Kits und Fertigsysteme	27
2.6	Marker und Enzyme	28
2.7	Patienten-Blutproben	28
2.8	Gewinnung von Blutplasma	29
2.9	Plasma Depletion	30
2.9.1	Probenvorbereitung für die Plasmadepletion	32
2.9.2	Blutplasma-Fraktionierung / Depletion der hoch und moderat abundanten Proteine (Tandem-Separation)	33
2.9.3	Aufkonzentrieren des Durchflusses und der Eluate	33
2.10	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.11	Fällung der Proteine	34
2.12	In-Lösungsverdau	34
2.13	Filter-aided sample preparation (FASP) - Proteinverdau	35
2.14	Analyse durch Massenspektrometrie	36
2.14.1	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	36
2.14.2	LC-MS Analyse tryptisch verdauter Peptide und Proteinidentifizierung mittels Tandem-Massenspektrometrie	37
2.14.3	Datenbanksuche	38
2.15	SDS-PAGE	38
2.16	Kolloidale Coomassie-Färbung	39

2.17	Western Blot und Immundetektion aufgetrennter Proteine	40
2.18	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	41
2.19	Statistische Auswertung	42
2.19.1	Receiver operating characteristics (ROC).....	42
2.19.2	Biomarker-Kombinationen.....	43
2.20	Immunfluoreszenzfärbung	44
2.20.1	Entparaffinierung und Fixierung	44
2.20.2	Inkubation mit Antikörpern.....	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Identifizierung neuer potentieller Biomarkerkandidaten im Plasma mittels LC-MS/MS	46
3.2	Depletion der Plasmaproben	49
3.3	Analyse des Blutplasmas	52
3.4	Auswertung der MS-Daten und Entdeckung neuer potentieller Biomarkerkandidaten	56
3.5	Verifizierung der MS-Daten mittels Western Blot	61
3.6	Validierung der MS und WB Daten mittels ELISA	67
3.6.1	C-reaktives Protein (CRP).....	67
3.6.2	Alpha-1-microglobulin/bikunin Precursor (AMBP).....	68
3.6.3	Komplement Komponente 9.....	69
3.6.4	SerpinA3/ Alpha-1-antichymotrypsin	70
3.6.5	S100 Kalzium-bindendes Protein A9 (S100A9)	71
3.6.6	Vermindert exprimierte Proteine.....	72
3.6.7	Kombinationsmarker aus AMBP+CRP	73
3.6.8	Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Proteinkonzentrationen von AMBP und CRP	75
3.7	Statistische Analyse/ Receiver operating characteristics (ROC)	75
3.8	Untersuchung zur Spezifität der potentiellen Tumormarker CRP+AMBP	78
3.9	Lokalisation von AMBP im Gewebe	79
4	Diskussion	82
4.1	Studiendesign und Auswahl der Methoden	82
4.2	Plasmadepletion	83
4.3	Biomarkerdetektion mittels Massenspektrometrie	84
4.4	Identifizierung neuer potentieller Biomarker	85
4.5	Kombinationen von Biomarkern	87
4.6	Biologische Bedeutung der potentiellen Tumorbiomarker	88
4.6.1	Das C-reaktive Protein (CRP) und die Rolle von Akute-Phase-Proteinen während der Karzinogenese	88
4.6.2	Das Alpha-1-Mikroglobulin/Bikunin Precursor (AMBP) und seine Rolle während der Karzinogenese.....	89
4.7	Untersuchungen zur Spezifität	90
4.8	Ausblick und Anwendung des diagnostischen Testverfahrens	91
5	Zusammenfassung	93
6	Summary	94

7	Abkürzungsverzeichnis	95
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	99
9	Literaturverzeichnis	101
10	Publikationen	111
11	Danksagung	112
12	Lebenslauf.....	113

1 Einleitung

Der Begriff Tumor beschreibt die Neubildung (Neoplasie) jeglicher Art von Körpergewebe. Dies kann gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) sein. Als Krebs bezeichnet man maligne Tumoren, die die Fähigkeit besitzen unkontrolliert zu wachsen und in Nachbargewebe zu streuen bzw. Metastasen zu bilden.¹

Weltweit gab es 2008 7,6 Millionen krebsbedingte Todesfälle, was 13% aller Todesfälle entspricht.² In Europa verzeichnete man 2012 1,75 Millionen Menschen, die an Krebs starben. Die meisten Todesfälle gab es bei Lungen- (353.000), Darm- (215.000) und Brustkrebs-Patienten (131.000).³ Krebs zählt nach den Herz-Kreislaufkrankungen zu den zweit häufigsten Todesursachen in den Industrienationen.⁴ Die entscheidende Maßnahme im Kampf gegen Krebsneuerkrankungen stellt die Vorbeugung bzw. Vorsorgeuntersuchung dar, da bislang nur für die wenigsten Krebsarten Impfstoffe (z.B. für das Zervix-Karzinom) existieren. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) ließen sich bis zu einem Drittel aller Krebsneuerkrankungen durch geeignete Vorsorgemaßnahmen vermeiden, dazu zählt das häufig vorkommende Kolonkarzinom (KRK).

Die Kanzerogenese ist ein komplexer Vorgang. Die Heterogenität und Komplexität stammt vom Zusammenspiel genomischer Alterationen und immunologischen, hormonellen oder umweltbedingten Faktoren, die alleine oder in Kombination wirken. Aufgrund der veränderten Eigenschaften der Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen, ist es möglich, diese anhand ihres differentiell regulierten Proteinhaushalts zu identifizieren und sezernierte Proteine z.B. im Blut nachzuweisen. Mit Hilfe von spezifischen Proteinen, die auf eine Krebserkrankung hinweisen könnten, sog. Biomarkern, ließen sich viele Krankheitsfälle bereits in frühen Stadien aufdecken und somit die Heilungschancen enorm verbessern. Gerade im Hinblick auf das Kolonkarzinom ließe sich idealerweise im premalignen Stadium, den sog. Kolon-Adenomen, die Entstehung einer malignen Form sogar vermeiden.⁵⁻⁷ Seit der Entdeckung des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) im Jahre 1969 ist die Suche nach Biomarkern, die eine frühzeitige Diagnose des KRK ermöglichen, das Ziel bei der Entwicklung neuer diagnostischer Methoden. Ein halbes Jahrhundert später existiert jedoch immer noch kein brauchbarer und glaubwürdiger Biomarker, der in der klinischen Praxis Anwendung findet. Basierend auf dieser Tatsache und einer stetig alternden Gesellschaft ist die Mortalitätsrate des KRK immer noch sehr hoch. Neue Methoden zur Entdeckung des KRK in einem frühen und symptomlosen Stadium sind dringend erforderlich, nicht nur, um dem Patienten zu helfen, sondern auch die extrem hohen Kosten, die dem Gesundheitssystem dadurch entstehen, zu reduzieren. Aus diesem Grund werden neue Biomarker, die sowohl Adenome als auch Kolonkarzinome nachweisen können, dringend gesucht.

1.1 Das Kolonkarzinom

Als Kolonkarzinome (KRK) bezeichnet man maligne Neoplasien des Dickdarmes. Der Dickdarm unterteilt sich in den aufsteigenden Dickdarm (Colon ascendens), den querliegenden (Colon transversum) und den absteigenden Dickdarm (Colon descendens) sowie in das Sigmoid und den Enddarm (Rektum). Das Kolonkarzinom entwickelt sich überwiegend aus den Epithelzellen der Darmschleimhaut (Adenokarzinom). Abgesehen davon findet man Plattenepithelkarzinome im Analbereich und die seltenen neuroendokrinen Tumore (ca. 1%) vor.⁸ Rund 70% der Tumore sind im Bereich des Rektums und sigmoiden Kolons lokalisiert, etwa 3% betreffen den absteigenden Teil des Kolons, die übrigen verteilen sich auf den aufsteigenden und querliegenden Teil (Abbildung 1)⁹.

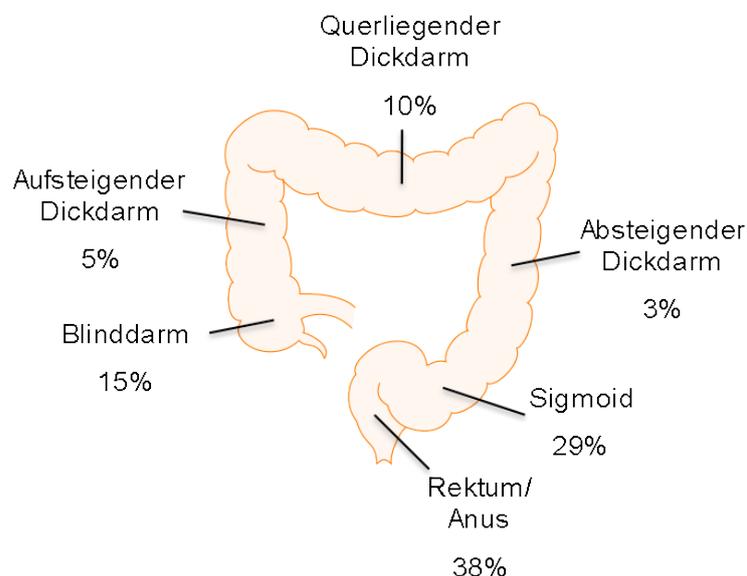


Abbildung 1: Prozentuale Verteilung der KRK-Lokalisationen in den verschiedenen Abschnitten des Dickdarms. Rund zwei Drittel der Erkrankungen treten im unteren Teil des Kolons (Sigmoid und Rektum) auf. Nur ein geringer Prozentsatz betrifft den aufsteigenden, querliegenden sowie absteigenden Dickdarm.

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit erkranken jedes Jahr über eine Millionen Menschen an einem KRK.¹⁰ Das KRK zählt zu den dritthäufigsten Krebserkrankungen weltweit mit über 600.000 Todesfällen.¹¹ Aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung und zunehmenden Lebenserwartung der Menschen werden diese Zahlen weiterhin steigen.¹² In Deutschland ist das KRK für beide Geschlechter die zweithäufigste Krebserkrankung nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen. Im Jahr 2008 erkrankten etwa 35.000 Männer und 30.000 Frauen.⁸ Insgesamt ist die Zahl der Neuerkrankungen in den letzten Jahren gestiegen. Die Zahl der Todesfälle hin-

gegen sinkt, was die Verbesserungen in der Früherkennungs-Diagnostik widerspiegelt.¹³ Das Lebenszeitrisiko wird für die bundesdeutsche Bevölkerung mit 4-6% angegeben.¹⁴

1.1.2 Ätiologie

Rund die Hälfte aller Menschen in den westlichen Nationen entwickeln im Alter von 70 Jahren Darmtumore. In einem von zehn Fällen entwickelt sich daraus Darmkrebs¹⁵. Zu den Hauptrisikofaktoren zählen Übergewicht und ein ungesunder Lebensstil, der sich durch Bewegungsmangel und eine ballaststoffarme, fettreiche Nahrung mit einem hohen Anteil an rotem Fleisch und verarbeiteten Wurstwaren sowie einem geringen Anteil an Gemüse auszeichnet. Auch regelmäßiger Alkohol- und Tabakkonsum wirken sich ungünstig aus.¹⁶ Das Risiko an Darmkrebs zu erkranken steigt mit dem Alter drastisch an. Mehr als die Hälfte der Betroffenen erkranken jenseits des 70. Lebensjahres, nur etwa 10% vor dem 55. Lebensjahr. Weitere Risikofaktoren sind Diabetes mellitus, das Vorhandensein von Polypen oder vorausgegangene Fälle von Darmkrebs. Männer haben tendenziell ein höheres Risiko an Darmkrebs zu erkranken als Frauen.¹⁷ Darmkrebs gehört zu den Krebserkrankungen mit mittlerer Prognose. Früh entdeckt, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für das Kolonkarzinom etwa 90%, im mittlerem Stadium 70%, im späten Stadium 12%.¹⁸

Ungefähr 85% der kolorektalen Karzinome treten sporadisch auf, etwa 15% der sind hereditär bedingt.¹⁹⁻²¹ Die zwei häufigsten und am besten erforschten erblich bedingten Formen sind familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC oder Lynch-Syndrom).

Das Lynch-Syndrom ist die häufigste erblich bedingte Form von Darmkrebs. Es wurde erstmals 1966 von Henry Lynch beschrieben²² und trägt zu 3-5% aller Kolontumore bei. Beim Lynch-Syndrom besteht bereits in jüngeren Jahren ein sehr hohes Risiko zu erkranken. Ursache ist eine Keimbahn-Mutation des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems. Hauptsächlich sind die MSH2 und MLH1 Gene betroffen, weniger häufig MSH6, PMS1 und PMS2.²³ Nahezu alle Kolontumore, die mit dem Lynch-Syndrom assoziiert sind, weisen eine Mikrosatelliten-Instabilität auf. Überdies besteht bei Patienten, die am Lynch-Syndrom leiden ein erhöhtes Risiko an anderen Krebsarten zu erkranken.²⁴ Bei Frauen ist dies hauptsächlich Gebärmutterhalskrebs.²⁵ Anhand der Amsterdam-Kriterien und der Bethesda-Richtlinien (verbesserte Sensitivität gegenüber den Amsterdam-Kriterien) lässt sich das Risiko, am Lynch-Syndrom zu erkranken, bestimmen.^{26,27}

Die FAP wurde erstmals Mitte des 18. Jahrhunderts entdeckt. FAP ist eine autosomal-dominant vererbte Krankheit, die etwa 1 von 7000 Menschen betrifft. Ursache der FAP ist eine Mutation des Tumorsuppressorgens Adenomatous Polyposis Coli (APC). Typischerweise entwickeln Pa-

tienten mit FAP bereits in jungen Jahren hunderte bis tausende Darmpolypen, aus denen, sofern nicht frühzeitig entfernt, mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% ein Kolonkarzinom entsteht. Daher scheint eine frühzeitige Proktokolektomie in diesem Krankheitsfall sinnvoll. Für 90% der sporadisch auftretenden Kolonkarzinome ist ebenfalls eine Mutation des FAP-Gens verantwortlich.²⁸

Weitere seltenere erblich bedingte Darmkrebsformen sind die MYH-assoziierte Polyposis (MAP), das Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS)²⁹ und die juvenile Polyposis (JPS)³⁰.

Etwa zwei Drittel der Neuerkrankungen an KRK lassen sich auf chronisch-entzündliche Darm-erkrankungen, wie der ulcerativen Colitis und Morbus Crohn zurückführen.³¹ Das Risiko steigt in diesem Fall mit der Dauer der Krankheit (2% bei 10 Jahren, 18% bei 30 Jahren Krankheitsdauer).³² Charakteristika des Colitis-assoziierten Kolonkarzinoms (CAC) sind das im Vergleich zum KRK jüngere Patientenalter bei Erstdiagnose, die Multifokalität und die unselektive Verteilung über das gesamte Kolon.

1.1.3 Pathogenese

Das KRK entwickelt sich meist über viele Jahre bis Jahrzehnte über Vorstufen, die sogenannten Darmpolypen. Darmpolypen sind gutartige, in den Dickdarm hineinragende Schleimhautwucherungen, die erstmals 1961 von Basil C. Morson beschrieben wurden.³³ Siebzig bis achtzig Prozent aller kolorektalen Polypen sind Adenome, die als Neoplasien eine maligne Potenz in sich tragen.³⁴ Sie gelten somit als die Vorstufe des malignen Adenokarzinoms. Die meisten Adenome ragen in das Darmlumen hinein und sind entweder gestielt oder ungestielt, seltener sind sie abgeflacht.⁹

Die Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein aus dem Jahre 1990 besagt, dass sich das Kolonkarzinom über viele Jahre hinweg über die benignen Vorstufen der Polypen bis hin zum bösartigen Tumor entwickelt³⁵ (Abbildung 2).

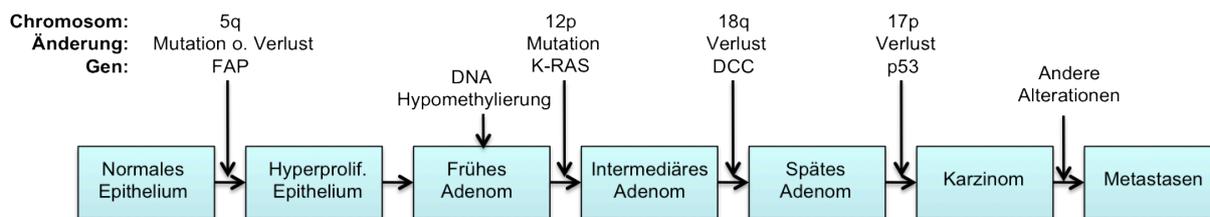


Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein.³⁵ Dargestellt sind die einzelnen molekulargenetischen Ereignisse, die zur Entstehung eines Karzinoms beitragen. Laut Fearon und Vogelstein sind mindestens fünf molekulargenetische Alterationen zur Entstehung eines Karzinoms notwendig. Ein tumorinitiierender Schritt wird durch die Mutation des APC-Gens ausgelöst. Ein weiteres frühzeitiges Ereignis stellt eine Hypomethylierung der DNA dar. Die weitere Tumorentstehung wird durch Mutationen im Onkogen KRAS, sowie durch Verlust von Tumorsuppressorgenen wie *Deleted in Colon Carcinoma* (DCC) und p53 vermittelt.

Die Progression des Adenoms zum Karzinom wird durch eine Vielzahl von genetischen Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen ausgelöst, die zu einer Disregulation von Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod in den Epithelzellen führen. Kinzler und Vogelstein teilten diese Gene, die für die Tumorentstehung verantwortlich sind in zwei Klassen, die „Gatekeeper“ und die „Caretaker“.³⁶ Die „Gatekeeper“ Gene kontrollieren die Zellproliferation. Genetische Veränderungen in Tumorsuppressor- und Onkogenen führen folglich zu einem gestörten Zellwachstum. Die „Caretaker“ Gene sind verantwortlich für die Vollständigkeit und Reparatur des Genoms durch Mismatch-repair(mmr)-Gene. Durch Mutationen der mmr-Gene können DNA-Fehler während der Replikation nicht mehr behoben werden, wodurch es zu Veränderungen in den repetitiven DNA-Sequenzen kommt (sog. Mikrosatelliteninstabilität, MSI). MSIs sind Mutationen (Insertionen oder Deletionen) der Mikrosatelliten (kurze, sich oftmals wiederholende nicht-kodierende DNA-Sequenzen), da diese für Fehler während der DNA-Replikation besonders anfällig sind.³⁷ In den meisten Fällen tritt eine MSI auf, wenn die Promotor-Region der Gene des MMRs durch Hypermethylierung der CpG-Region stillgelegt bzw. ausgeschaltet wird (sog. CpG Island Methylator Phenotyp, CIMP).

Die Suche nach MSIs ist als Screening-Methode für das Erkennen von erblich bedingten Formen des Kolonkarzinoms, wie das Lynch-Syndrom, sehr hilfreich. Um das Risiko, an einem Lynch-Syndrom zu erkranken abzuschätzen, dienen die Bethesda-Richtlinien²⁶ und die Amsterdam-Kriterien.²⁷ Seit 2004 gibt es eine dritte Klassifikation, die sogenannten „Landscape“ Gene.³⁸ Mutationen dieser Gene tragen zum Tumorwachstum bei, indem sie eine für das Tumorwachstum förderliche und ideale Umgebung schaffen.

Beim sporadisch auftretendem Kolonkarzinom sind dies vor allem die Tumorsuppressorgene APC und p53, Mutationen der Protoonkogene betreffen u.a. das KRAS-Gen. Mutationen der oben beschriebenen Gene treten hauptsächlich in drei Signalwegen auf: im Wnt-β-Catenin-, im TGFβ- und im Tyrosinkinase Rezeptor- Signalweg (EGFR-Signalaktivierung)²⁸ (Abbildung 3).

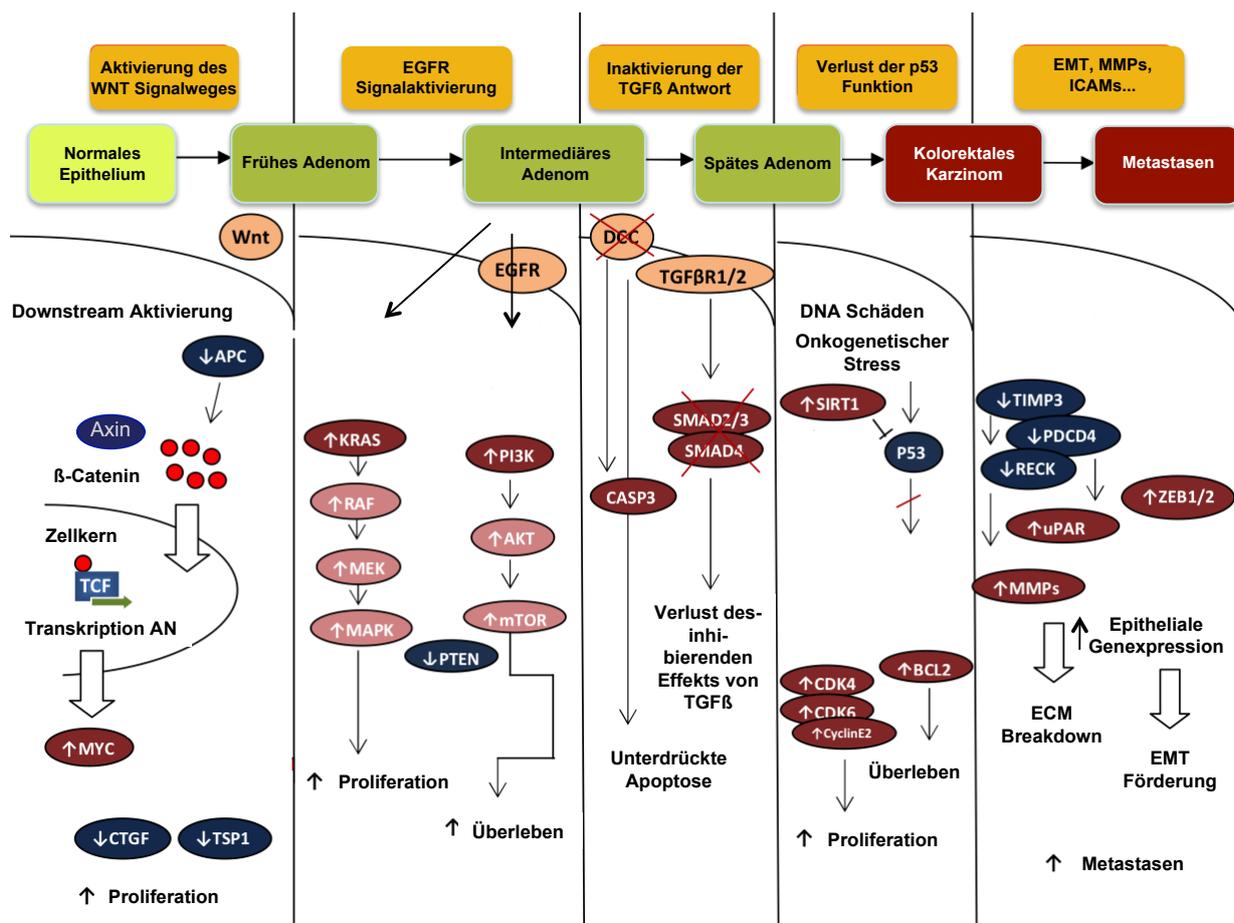


Abbildung 3: Beteiligte Signalwege in der Pathogenese des KKR nach dem Modell von Fearon und Vogelstein. Bei der Entstehung eines KKR sind hauptsächlich drei Signalwege beteiligt: der Wnt-Signalweg, die EGFR /KRAS/ PI3K- Signalkaskade und der TGFβ- Signalweg. Zu einem späteren Zeitpunkt treten außerdem ein Verlust der p53- Funktion und Funktionsverluste der Extrazellulären Matrix (ECM) sowie die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) auf. Außerdem spielen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs) eine Rolle, indem sie das Tumorstadium und die Bildung von Metastasen begünstigen. Verändert nach Slaby et al. 2009.³⁹

Die abnormale Aktivierung des Wnt-β-Catenin Signalweges ist ein entscheidender initiiender Schritt für die Entstehung von KKR. Mutationen der Komponenten *APC*, *CTNNB1* (β-Catenin kodierendes Gen) und *Axin2* tragen wesentlich zur Entstehung eines KKR bei.⁴⁰ Der TGF-β-Rezeptor ist ein Dimer aus TGFβRII und TGFβRI. Der komplette Rezeptor wird autophosphoryliert und verstärkt und phosphoryliert somit ein genregulatorisches Protein namens SMAD, welches im Zellkern die Transkription mehrerer Gene moduliert.⁴¹

Die Rezeptoren für viele Wachstumsfaktoren und Hormone sind Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (wie z.B. den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, auch HER2), den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGFR), platelet derived Wachstumsfaktor-Rezeptor (PDGFR), fibroblast Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR) und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptor (IGFR)).⁴² Die Bindung eines Wachstumsfaktors an den Rezeptor führt über die Bindung von Guanosin triphosphat (GTP) zur Aktivierung von Ras, welches eine Phosphorylierungskaskade initiiert, die mit der Aktivierung von Transkriptions-Genen endet.⁴³

Die PI3K-AKT-mTOR Signalkaskade ist ein weiterer Angriffspunkt von EGFR, die in der Kanzerogenese aktiviert wird. Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) phosphoryliert PIP2 zu PIP3. Das Tumorsuppressorgen PTEN (Phosphat- und Tensin-Homolog) hemmt den Signalweg, indem PI3 phosphoryliert wird und somit AKT inhibiert, was zu einer Hyperaktivierung der PI3-Signale führt. Das Endprodukt mTOR (*mammalian target of rapamycin*) bewirkt DNA-Schäden.⁴⁴ Die weitere Tumorprogression wird u.a. durch Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 sowie Funktionsverluste von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) vermittelt (Abbildung 3).

1.1.4 Klassifikation

Die Klassifikation der Tumorstadien erfolgt nach dem TNM-System der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*, Internationale Vereinigung gegen Krebs). Andere veraltete Einteilungssysteme wie das Dukes⁴⁵ und Astler-Coller-System⁴⁶ sind nicht so präzise wie das TNM-System, aber dennoch in Gebrauch (Tabelle 1).^{47,48}

Dabei beschreibt der Buchstabe „T“ die Ausdehnung des Primärtumors, „N“ das Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) oder „M“ das Vorhandensein von Fernmetastasen.

Tabelle 1: Erläuterung der Abkürzungen des TNM-Systems.

Primärtumor (T)	T0	Kein Anhalt für Primärtumor
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor infiltriert Submukosa
	T2	Tumor infiltriert Muskularis propria
	T3	Tumor infiltriert Subserosa oder nichtperitonealisiertes Gewebe
	T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum oder infiltriert anliegende Organe oder Strukturen
Regionäre Lymphknoten (N)	N0	Kein Anhalt für Befall regionärer Lymphknoten
	N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
	N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
Fernmetastasen (M)	M0	Kein Anhalt für Vorliegen von Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2: Übersicht der UICC-Stadien, sowie der entsprechenden Dukes und Astler-Coller-Einteilungssysteme.

	TNM	Dukes	Astler-Coller
Stadium 0	Tis, N0, M0	-	-
Stadium I	T1-T2, N0, M0	A	A, B1
Stadium IIA	T3, N0, M0	B	B2
Stadium IIB	T4a, N0, M0	B	B2
Stadium IIC	T4b, N0, M0	B	B3
Stadium IIIA	T1-T2, N1, M0 T1, N2a, M0	C	C1
Stadium IIIB	T3-T4a, N1, M0 T2-T3, N2a, M0 T1-T2, N2b, M0	C	C1, C2
Stadium IIIC	T4a, N2a, M0 T3-T4, N2b, M0 T4b, N1-N2, M0	C	C2, C3
Stadium IV	Jedes T, jedes N, M1a Jedes T, jedes N, M1b	-	D

Aufgrund mikroskopischer Beurteilung der Tumorzellen lässt sich eine Einteilung in Malignitätsgrade (Grading) vornehmen. Nach der WHO werden vier Malignitätsgrade unterschieden (G1-G4). Die Stufe G1 beschreibt einen niedrigen Malignitätsgrad, d.h. die Tumorzellen sind gut differenziert, G2 und G3 mäßig differenzierte Tumorzellen und G4 beschreibt einen hohen Malignitätsgrad mit völlig undifferenzierten Tumorzellen.⁴⁹ Abbildung 4 zeigt die zeitliche Entwicklung des KRK und die Einteilung in die Stadien I-IV.

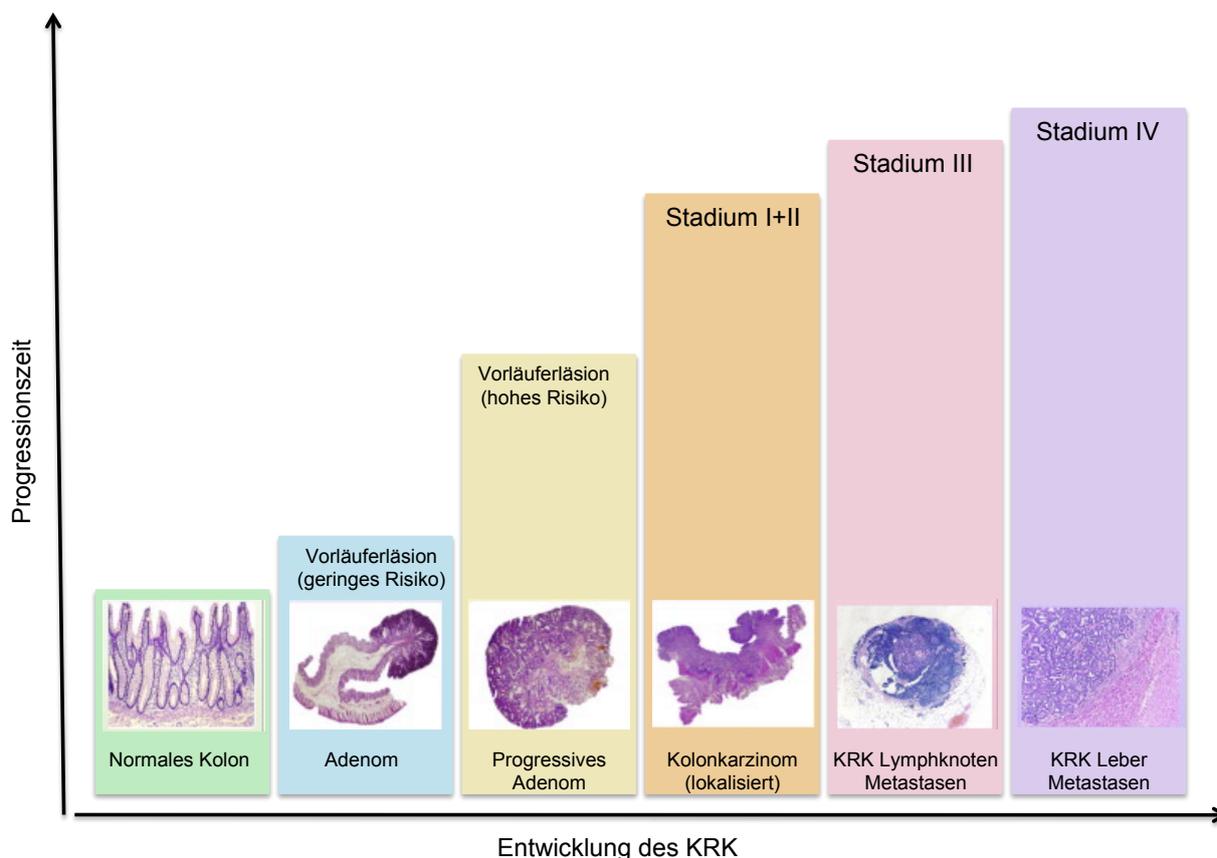


Abbildung 4: Darstellung der verschiedenen Stadien des KRKs als Balken. Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte zeigen gesundes Gewebe, sowie Adenom- und Karzinomgewebe der jeweiligen Stadien. Die Progressionszeit wird mit der Höhe der Balken indiziert. Über eine lange Progressionszeit entsteht über die Vorläuferläsionen (Adenome) ein lokales Karzinom vom Stadium I+II. In Stadium III liegen bereits Metastasen in den Lymphknoten vor, im Stadium IV sind Fernmetastasen ausgebildet (erstellt nach de Wit 2012⁵⁰).

1.1.5 Screening/Diagnostik des KRK

Das Kolonkarzinom entwickelt sich in den meisten Fällen über einen Zeitraum von 10-15 Jahren aus gutartigen Vorstufen, den Adenomen (Adenom-Karzinom-Sequenz, siehe Abbildung 2, Kapitel 1.1.3). Aus diesem Grund besteht bei diesem Karzinom eine einzigartige Gelegenheit, den Krebs durch geeignete Vorsorgemaßnahmen wie z.B. Screening zu erkennen oder gar zu vermeiden.

Im Rahmen der Krebsfrüherkennung können gesetzlich krankenversicherte Personen im Alter von 50 bis 54 Jahren jährlich einen Test auf Blut im Stuhl (*Fecal Occult Blood Test*, FOBT) durchführen lassen. Ab dem Alter von 55 Jahren besteht Anspruch auf eine Darmspiegelung (Koloskopie). Die Koloskopie gilt derzeit als Goldstandard der Screening-Methoden. Bis zu zwei Drittel aller kolorektalen Karzinome lassen sich durch eine Vorsorge-Koloskopie verhindern⁵¹, indem vorhandene Polypen oder Karzinome in einem frühen Stadium erkannt und rechtzeitig entfernt werden. Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, lässt sich die Überlebenszeit deutlich ver-

längern, je früher das KRK erkannt wird. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei über 90%, wenn das KRK in einem frühen Stadium (G1) erkannt wird.⁵² Dennoch ist die Zahl der Patienten, die sich für eine Vorsorge-Koloskopie entscheiden, sehr gering. Der hohe zeitliche Aufwand, die Unannehmlichkeiten und eventuellen Risiken verringern die Akzeptanz der Koloskopie bei der Risikobevölkerung.

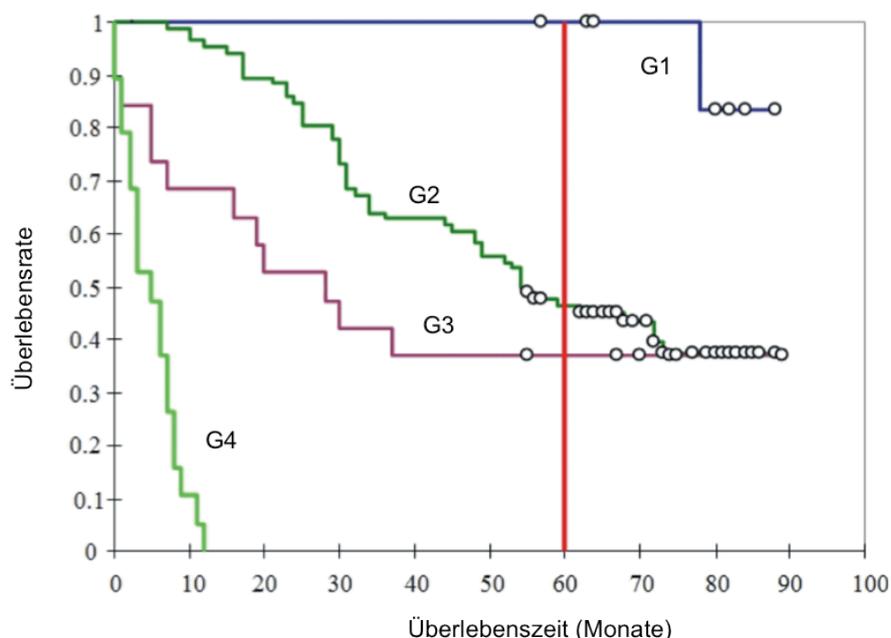


Abbildung 5: Die Kaplan-Meier-Survival-Kurve zeigt die Überlebensraten nach Malignitätsgraden (Grading). Bei einem Kolonkarzinom der Stufe G1 (blau) besteht eine 100%ige Überlebenschance innerhalb der nächsten fünf Jahre (rote senkrechte Linie). Bei Patienten mit Kolontumoren der Stufe G2 und G3 sinkt die 5-Jahres Überlebensrate drastisch ab auf knapp 50% bzw. 40% (grüne bzw. violette Kurve). Bei Patienten mit G4 Diagnose besteht in 5 Jahren keine Überlebenschance (hellgrün). Verändert nach Asile et al.⁵³

Im Gegensatz zur Koloskopie ist der FOBT (auch gFOBT, *guaiac-based fecal occult blood test*, guajakbasierter Stuhlbluttest) eine nicht-invasive einfach durchzuführende Methode zur Erkennung von Kolontumoren. Mit Hilfe des FOBT lässt sich die Peroxidase-Aktivität des Häm im Stuhl nachweisen. Bei einer regelmäßigen Anwendung lässt sich die Mortalität des KRK um rund 30% senken.^{54,55}

Die Sensitivität des Tests, d.h ein richtig positives Testergebnis, ist allerdings sehr gering und beträgt nur etwa 20-40%, da auch Peroxidasen aus tierischen und pflanzlichen Nahrungsmitteln reagieren.⁵⁶ Hinzu kommt, dass einige Tumore nicht oder erst in einem späten Stadium bluten, sodass der FOBT als Früherkennungsmethode nicht nutzbar ist. Bei einem positiven Hämoculttest sollte eine Koloskopie erfolgen. Der neuere immunologische FOBT (iFOBT, *immunological fecal occult blood test*) reagiert sensitiver auf verstecktes Blut im Stuhl durch die spezifische Bestimmung des humanen Hämoglobins mittels monoklonaler Antikörper. Bei diesem Test beträgt die Sensitivität für KRK 66-95%.⁵⁷⁻⁵⁹

Die Sigmoidoskopie erlaubt eine Untersuchung des sigmoiden Kolons und des Rektums, wo sich 70% der Kolonkarzinome und Adenome befinden. Die Sigmoidoskopie wird in Deutschland nicht zur Routine-Früherkennung angeboten. Studien in Italien, England und den USA zeigen jedoch, dass diese Methode hilft, den Nutzen der angebotenen Koloskopie abzuschätzen. Ergebnisse dieser Studien zeigen außerdem, dass das Screening mittels Sigmoidoskopie die Inzidenz und die Mortalitätsrate des distalen Kolonkarzinoms um ungefähr 60-80% senken kann.^{60,61}

Seit 2008 wurden Stuhl-DNA Tests in die Empfehlungen der US-Fachschaften zur Früherkennung kolorektaler Karzinome aufgenommen.⁶² Diese Tests untersuchen Zellen, die sich von der Darmwand ablösen, auf genetische Veränderungen. Auf diese Weise sollen Krebszellen identifiziert werden.

Zu weiteren Früherkennungsverfahren über Stuhluntersuchungen zählt der Nachweis der Aktivität des Tumor-M2-Pyruvatkinase-Isoenzym. Seit 2010 findet dieser M2-PK-Test zunehmend Anwendung. Allerdings führen praktische Aspekte nach wie vor zu entscheidenden Limitierungen. Eine Untersuchung von Hang *et al* zeigte, dass die Lagerung der Stuhlproben einen starken Einfluss auf die Degradation des Enzyms hat, sodass die Sensitivität des Tests kontinuierlich von dem ohnehin mäßigen Wert von 68% am Tag 0 auf 37% am Tag 5 nach der Probenahme sinkt.⁶³ Neuere Studien an großen Patientenkollektiven zeigen, dass dieser Test mit einer Spezifität von 85% auch Polypen detektieren kann, allerdings bei einer Sensitivität von nur 23%.⁶⁴

Trotz der genannten Tests erfolgt eine erste Diagnose oft erst in späteren Stadien, da Kolonkarzinome lange ohne Symptome bleiben können. Symptome wie Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Wechsel von Obstipation und Diarrhö, Blutbeimengungen, Schmerzen im Bauchbereich und Gewichtsverlust treten meist erst dann auf, wenn der Tumor schon fortgeschritten ist.

1.1.6 Therapie

Beim diagnostizierten KRK wird initial der tumortragende Darmabschnitt mitsamt des Lymphabflussgebiets (Lymphadenektomie) operativ entfernt. Im Stadium I-III ist die chirurgische Entfernung des Tumors mit kurativem Ziel das Mittel erster Wahl. Je nach Stadium und Ausbreitung erfolgt postoperativ zusätzlich eine strahlentherapeutische oder chemotherapeutische Behandlung. Die adjuvante Chemotherapie besteht aus 5-Fluorouracil (5FU) oder 5FU in Kombination mit Levamisol oder Leucovorin und wird intravenös verabreicht.⁶⁵ Ebenso erfolgreich wirkt eine

Monotherapie mit Capecitabine.⁶⁶ Eine Kombination von 5FU plus Oxaliplatin, ein Platin-Derivat, steigert die 3-Jahres-Überlebensrate um etwa 6%. Eine Chemotherapie mit Oxaliplatin und Irinotecan ist ebenso verbreitet.⁶⁷ Bei Befall der Lymphknoten im Stadium 3 senkt die Gabe von 5FU für 6 Monate das Sterberisiko um 30%.¹⁶ Allgemein liegt der Erfolg einer Therapie im fortgeschrittenen Stadium III bei 33-71%, je nachdem welches Unterstadium vorliegt^{68,69} Die Überlebensrate 5 Jahre nach Ausbruch der Erkrankung beträgt bei Stadium IV lediglich 5%. Auch das Alter und der körperliche Zustand bei einer fortgeschrittenen Krebserkrankung können eine belastende Strahlen- oder Chemotherapie erschweren. Viele Patienten haben mit Nebenwirkungen wie z.B. Übelkeit zu kämpfen, einige müssen mit Spätschäden der Therapie rechnen.⁷⁰ Beim metastasierenden Kolonkarzinom können monoklonale Antikörper, die sich gegen die Wachstumsfaktoren VEGF (Bevacizumab) oder EGFR (Cetuximab und Panitumumab) richten, zum Einsatz kommen. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Angiogenesehemmer und wirkt der Neubildung von Gefäßen im wachsenden Tumor entgegen. Cetuximab bindet an den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), ein epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, der bei Kolonkarzinom-Zellen überexprimiert ist. Ist eine Heilung aufgrund der Tumorgroße oder einer ausgedehnten Metastasierung nicht mehr möglich, kann auf palliative Therapiemaßnahmen zurückgegriffen werden. Diese haben vor allem das Ziel, die Überlebenszeit des Patienten zu verlängern und die verbleibende Zeit so angenehm wie möglich zu machen.

1.2 Biomarker

Biomarker sind messbare biochemische oder molekulare Größen, die einen normalen oder pathologischen Prozess oder die Antwort auf eine therapeutische Intervention beschreiben.⁷¹

Über Biomarker lassen sich gesunde und erkrankte Personen differenzieren. Biomarker können außerdem dazu dienen, das individuelle Risiko einer Erkrankung abzuschätzen, eine bestehende Erkrankung zu diagnostizieren, den Schweregrad einer Erkrankung zu charakterisieren, einen Therapieeffekt im Organismus zu beschreiben, die Sicherheit einer Therapie zu beurteilen und Patientengruppen zu identifizieren, die nicht von einer Therapie profitieren.⁷²

Die Sensitivität und Spezifität sind ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung von Biomarkern. Hierbei beschreibt die Sensitivität den Anteil der richtig positiv erkannten Patienten an allen Kranken (Richtig-Positiv-Rate) und die Spezifität die richtig negativ erkannten Patienten an den Nicht-Kranken (Richtig-Negativ-Rate). Die Vorhersagequalität eines diagnostischen Tests lässt sich mit dem AUC-Wert (*Area under the curve*) bestimmen, der die Fläche unter einer ROC (*receiver operating characteristics*)-Kurve beschreibt. Liegt dieser Wert zwischen 0,9 und 1,0 kann man mit einer recht sicheren Vorhersage rechnen. Die in der Literatur beschriebenen Serum- und Plasma-Biomarker erreichen einen AUC-Wert von 0,70 bis zu 0,98 für akute Phase-Proteine was die Vorhersage eines KRK betrifft.^{73,74} Hauptsächlich werden Biomarker für das

KRK beschrieben, kolorektale Adenome als Vorstufen sind meist nicht mit eingeschlossen. Der bekannteste Tumormarker ist das Prostata-spezifische Antigen (PSA). Der PSA-Wert im Blut ist ein Marker für den Krankheitsverlauf bei einem diagnostizierten Prostatakarzinom. Allerdings sind die Sensitivität und die Spezifität dieses Markers derart begrenzt, dass sein Einsatz für ein Screening nach wie vor umstritten ist.⁷⁵ Da das PSA altersbedingt ansteigt, existiert kein bestimmter Grenzwert. Erhöhte Werte kommen u.a. auch bei einer Vergrößerung oder Entzündung der Prostata vor.^{70,75}

Um ein Ansprechen auf eine Therapie zu untersuchen sind z.B. Mutationen des KRAS beim Kolonkarzinom, die mit einem geringen Ansprechen auf eine EGFR-Therapie in Zusammenhang gebracht werden, geeignete Biomarker. Auch die Überexpression des HER2- Gens in Mamma- und Magenkarzinomen gibt Hinweis auf ein Ansprechen auf eine Anti-HER2 Therapie (Trastuzumab).^{76,77}

Das Alpha-Feto-Protein (AFP), das CEA und das humane β -Choriongonadotropin (β -HCG) sind Biomarker für Leberzell-, Kolon- und Ovarialkarzinome, die helfen, ein frühzeitiges Wiederauftreten der Krankheit zu erkennen⁷⁸

Das CEA dient daher weniger dem Screening, als zur posttherapeutischen Verlaufskontrolle des metastasierenden Kolonkarzinoms. Hierfür eignen sich ebenso das PSA, CA-125, CA15-3 und CA27.29 und das CA19-9 beim Prostata-, Ovarial-, Mamma- und Pankreaskarzinom.^{79,80}

1.2.1 Entdeckung neuer Tumorbiomarker

Der erste Tumorbiomarker wurden von Henry Bence-Jones im Jahre 1847 im Urin eines Patienten mit multiplen Myelom entdeckt und ist seitdem als Bence-Jones Protein bekannt.⁸¹

In den 165 Jahren nach der Entdeckung des Bence-Jones Proteins, wurden weniger als zehn Protein-Biomarker von der FDA (*US Food and Drug Administration*) für diagnostische Tests zugelassen.⁸² Den meisten Biomarkern fehlt es an ausreichender Sensitivität und Spezifität. Es erweist sich als sehr schwierig, einen einzelnen Marker zu finden, der beide Kriterien erfüllt, ausreichend sensitiv und spezifisch gegenüber einer bestimmten Krebsart zu sein. Zusätzlich sollte er beständig sein; ein labiler Marker würde eine Detektion erschweren oder gar verhindern. Ein Beispiel eines solchen Biomarkers ist das BCR-ABL Fusionsprotein, ein Protein, das in Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) und einigen akuten Leukämien vorkommt.⁸³

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an potentiellen Biomarker-Kandidaten publiziert.⁸⁴ Die wenigsten eigneten sich von Anfang an als prognostische und diagnostische Marker und noch weniger konnten validiert werden⁸⁵ (Abbildung 6). Dieser langsame Fortschritt lässt sich auf mehrere Faktoren zurückführen: Einerseits sind die Möglichkeiten im Bereich der Analytik be-

grenzt, besonders für die Detektion niedrig abundanter Proteine stellt der extrem hohe dynamische Bereich der Proteine, vor allem im Plasma oder Serum eine große Herausforderung dar. Insbesondere die Detektion der niedrig abundanten Proteine ist von großer Bedeutung, da sich unter ihnen potentielle Biomarker befinden könnten. Andererseits sind die Kapazitäten zur Verifizierung und Validierung von Biomarkerkandidaten limitiert und teuer. Somit ist es möglich, dass geeignete Biomarker zwar schon entdeckt, aber noch nicht validiert werden konnten. Die Etablierung von verlässlichen diagnostischen und prognostischen Markern steht bei vielen Krankheiten somit erst am Anfang.

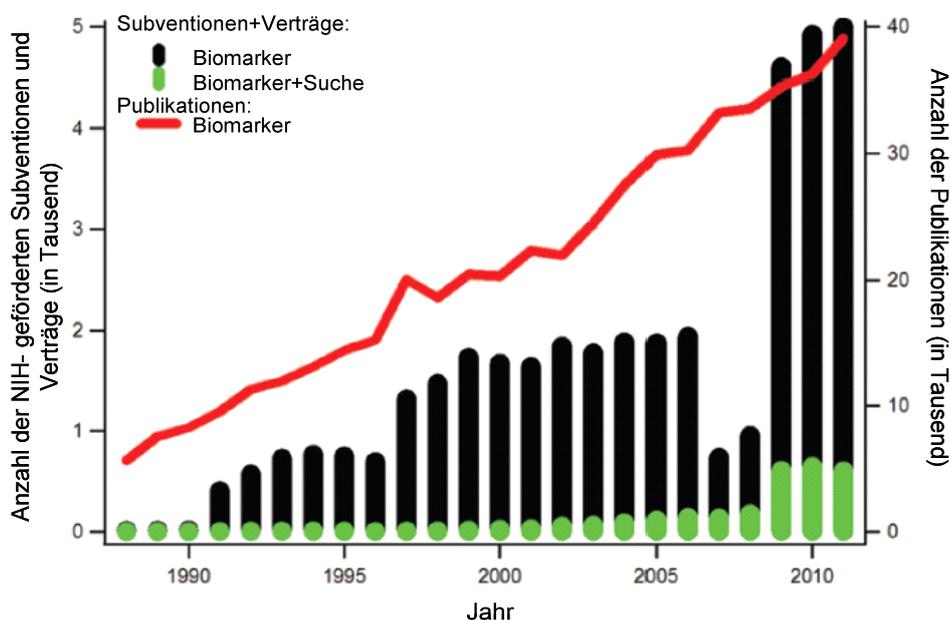


Abbildung 6: Die Anzahl der von der NIH (National Institute of Health, nationales US-Gesundheitsinstitut) geförderten Biomarker-Projekte und zugehöriger Publikationen. Es ließ sich eine Verdreifachung gegenüber dem Jahr 2000 erkennen. Verändert nach Anderson et al.⁸⁵

Die drei größten Herausforderungen bei der Entdeckung neuer Biomarker sind erstens die Komplexität und der hohe dynamische Bereich des Proteoms von Körperflüssigkeiten (z.B. Plasma), zweitens die erwartungsgemäß sehr niedrige Konzentration vieler krankheitsspezifischer Biomarker im Blutplasma und drittens das Ausmaß an personen- und krankheitsbezogener Variabilitäten.⁸⁶ Idealerweise dürften sich Kontrolle und Probe exklusiv nur in der zu untersuchenden Bedingung differenzieren.

Die erforderlichen Schritte für die Etablierung neuer Biomarker sind die analytische Validierung, die klinische Validierung sowie der klinische Nutzen.^{87,88} Die analytische Validierung beschreibt die Beurteilung technischer Aspekte des Assays, der gewisse Kriterien erfüllen muss. Es ist hierfür wichtig die Sensitivität, Spezifität und Robustheit des neuen Tests zu bestimmen. Zusätzlich sollte er möglichst präzise und reproduzierbar sein. Die klinische Validierung bezieht sich auf die Beobachtung, wie zuverlässig ein Biomarker die erkrankten Patienten von den ge-

sunden unterscheiden kann. Die Bewertung des klinischen Nutzens beinhaltet die Prüfung der Effektivität eines Biomarkers als auch die Abwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses.⁸⁷ Bei klinischen Studien spielen mitunter die Patientenauswahl, Probenqualität und Reproduzierbarkeit eine wichtige Rolle, um brauchbare, qualitative Ergebnisse zu erzielen.

Der ideale Biomarker sollte demnach hochspezifisch, robust und möglichst wenig komplex sein.⁸⁹ Es hat sich allerdings gezeigt, dass bei Tumorerkrankungen individuelle Marker oft nur in geringem Umfang gefunden werden können. Die Möglichkeit, eine Vielzahl molekularer Veränderungen in Tumorzellen zu testen, gibt dazu Anlass, dass die Kombination von mehreren Markern die Früherkennung von Tumorerkrankungen verbessern könnte.

1.3 Das Plasmaproteom

Das menschliche Plasmaproteom erwies sich als Goldstandard für die Entdeckung neuer Biomarker.^{90,91} Die Verwendung des Plasmaproteoms zur Detektion neuer Biomarker bietet viele Vorteile. Die Blutgewinnung ist minimal invasiv und kann praktisch an jedem Ort ausgeführt werden. Blutuntersuchungen sind Routine und relativ kostengünstig. Ferner existieren große Archive von Blutproben zur initialen Biomarkersuche. Inwieweit diese aber für spezielle Studien verwendbar sind hängt u.a. von der Probenqualität und Verarbeitung und auch von der individuellen Variabilität ab. Da die meisten Körperzellen Proteine ins Blut sezernieren, bietet Plasma eine gute Repräsentation aller physiologischen und pathophysiologischen Prozesse und stellt somit eine ideale Quelle für diagnostische Marker dar.⁹²

Die Proteinkonzentration im Plasma liegt im Bereich von 60-80 mg/mL. Im Gegensatz zur Anzahl an Genen, die auf mindestens 10.000 geschätzt wird, ist die Anzahl an Proteinen jedoch um mehrere Größenordnungen höher aufgrund von post-translationalen und metabolischen Modifikationen der einzelnen Proteine sowohl in gesunden als auch in erkrankten Zellen.^{93,94}

Aufgrund der permanenten Freisetzung von Proteinen und Proteinfragmenten aus dem Gewebe, ist das Plasmaproteom sehr komplex. Sechsendneunzig Prozent der Gesamtproteine im humanen Plasma werden allerdings nur durch 12 Proteine abgedeckt, sodass interessante, potentielle Biomarkerkandidaten höchstwahrscheinlich verdeckt werden, da sie sehr niedrig konzentriert vorliegen. In den restlichen 4% befinden sich dagegen Tausende von Proteinen mit einem dynamischen Konzentrationsbereich von über 10^7 (Abbildung 7). Vermutlich finden sich alle spezifischen Krebs-Biomarker in diesem Sub-Proteom.^{95,96}

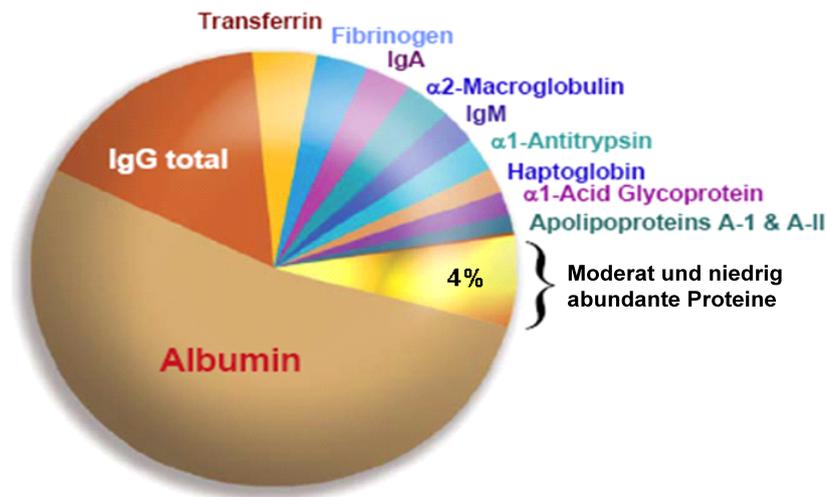


Abbildung 7: Einteilung des Plasmaproteoms. Die 12 hoch abundantesten Proteine nehmen 96% der Proteinmasse ein, in nur 4% der Gesamtproteinmasse befinden sich die moderat und niedrig abundanten Proteine (verändert nach www.genway.com, Stand 2008).

Der extrem hohe dynamische Bereich stellt eine große Herausforderung dar, neue potentielle Biomarker, die in einer Konzentration von wenigen ng/mL im Plasma vorkommen zu detektieren.

Im Jahre 2002 zeigten Anderson und Anderson, dass der dynamische Bereich des Plasmaproteoms einen Konzentrationsbereich von bis zu zwölf Größenordnungen aufweist⁹² (Abbildung 8). Vergleicht man das hoch abundante Albumin, welches in Konzentrationen von 35-50 mg/mL im Plasma bzw. Serum enthalten ist mit dem gering abundanten Interleukin-6 von 0-5 pg/mL, erhält man einen Faktor von 10^{10} .⁹² Bekannte Protein-Biomarker wie das AFP, CEA oder PSA differieren vom Albumin um den Faktor 10^6 - 10^7 .⁹⁷

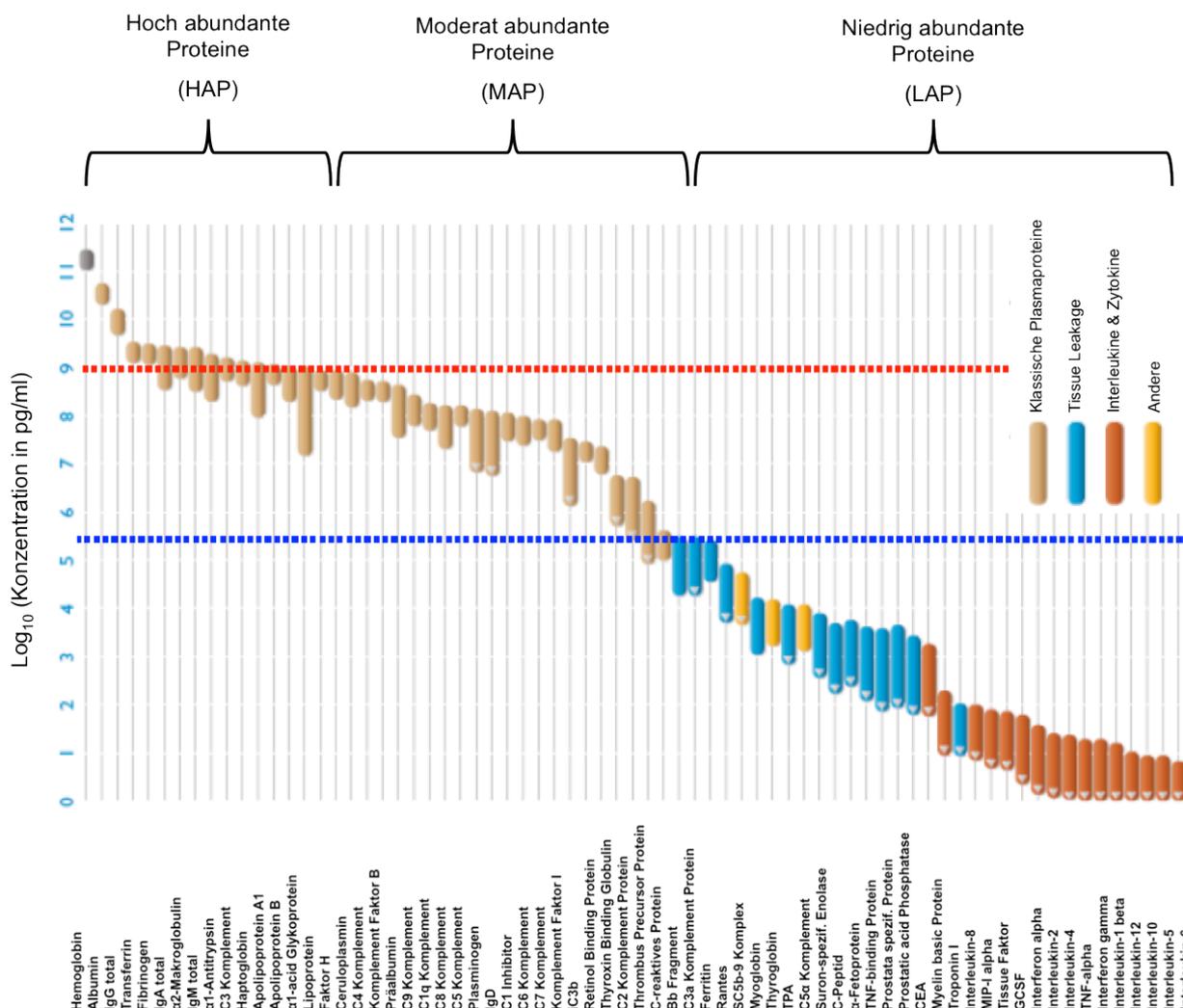


Abbildung 8: Der dynamische Bereich des Plasmaproteoms. Er umfasst einen logarithmischen Bereich von bis zu zwölf Größenordnungen. Die klassischen Plasmaproteine wie Albumin und IgGs stehen am oberen Ende der hoch abundanten Proteine, Zytokine und Interleukine wie das Interleukin-6 repräsentieren die niedrig abundanten Proteine (verändert nach www.genway.com, Stand 2008).

Da Plasma eine ideale Quelle an potentiellen Biomarkern darstellt, rückte die Analyse des Plasmaproteoms in den letzten Jahren immer mehr in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Die Proteomik als ein neues Informationsarchiv bietet den Vorteil, dass posttranslationale Modifikationen, Spaltprodukte, niedermolekulare Proteine (LMWs, *low molecular weight proteins*) und Fragmente, die auf Genebene nicht zu erkennen sind, detektiert werden können.^{98,99}

Immer neuere Innovationen im Bereich der Proteinanalytik führten zu einer Erhöhung der Auflösung sowie des dynamischen Bereichs. Mit den heutzutage erhältlichen MS-Geräten können bis zu 2000 Proteine in einer einzigen Plasma Probe identifiziert werden.¹⁰⁰ Dennoch nimmt man trotz laufend verbesserter Technologien an, dass bislang nur ein moderater Anteil an Plasma-proteinen identifiziert werden konnte.⁹⁷

1.4 Detektion neuer potentieller Biomarkerkandidaten aus Serum und Plasma mittels Massenspektrometrie

Eine sensitive Methode zur Detektion von Proteinen in Serum und Plasma ist die Massenspektrometrie. Die klassischen Methoden zur Detektion neuer Biomarker sind die 2D- Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der ausgewählten Spots, die MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight*), MS in Kombination mit Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS), sowie Microarray-basierte Strategien und Proteinchips. In den letzten Jahren konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie eine Vielzahl neuer Biomarkerkandidaten und Kombinationen daraus gefunden werden.^{101,102}

Der Fortschritt hängt in diesem Bereich primär von der Entwicklung neuer Geräte ab. Wie bereits in Abschnitt 1.7 (Biomarker) beschrieben ist trotz signifikanter Fortschritte in der Instrumentenentwicklung die verlässliche Detektion von Proteinen im Bereich von wenigen ng/mL und darunter noch nicht mit Standardmethoden der Proteomanalytik realisierbar.

Hoch abundante Proteine sind nach wie vor der limitierende Faktor bei der Identifizierung neuer Biomarkerkandidaten im Serum und Plasma. Die Depletion der hoch abundanten Proteine, vor allem Albumin, ist eine häufig angewendete Strategie zur massenspektrometrischen Detektion von niedrig abundanten Proteinen im Plasma-Proteom.¹⁰³

Die Depletion kann mittels antikörperbasierter Chromatographiesäulen oder Microbeads erfolgen. Neue mehrdimensionale Trennungssysteme entfernen im ersten Schritt die 12-14 hoch abundantesten Proteine, in einem zweiten Schritt werden weitere 60-80 moderat abundanten Proteine entfernt.^{104,105} In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Säulen IgY-12 LC10 und IgY SuperMix LC2 von Seppro[®] (Sigma-Aldrich[®]) verwendet. Sie können bis zu 100 µl Plasma in einem Lauf von hoch und moderat abundanten Proteinen befreien, um die Analyse der niedrig abundanten Proteine zu erleichtern.

Ein mögliches Problem stellt hierbei unspezifisches Binden von Proteinen während der Depletion und der sogenannte „Sponge“ Effekt (*engl.* Schwamm) des Albumins dar, das niedermolekulare Proteine (LMWs, *low molecular weight proteins*), Peptide und Proteinfragmente an sich binden kann.¹⁰⁶ Außerdem sollte bei der Depletion eine hohe Reproduzierbarkeit erzielt werden, um einen Vergleich zwischen Proben von gesunden und erkrankten Personen zu ermöglichen.¹⁰⁷ Idealerweise verwendet man automatisierte Methoden, um Biomarker zu detektieren, die den Zustand einer Krankheit beschreiben und nicht auf eine unsachgemäße Probenvorbereitung zurückzuführen sind.

Weitere Methode zur Plasmadepletion sind der Einsatz von Nanopartikeln oder Zentrifugal- Ultrafiltration. Eine Plasmadepletion mit Nanopartikeln basiert auf der Bindung der Proteine gemäß ihrer Größe und Affinität, mit Ultrafiltration werden Proteine der Größe nach selektiert. Eine Angleichung der Proteinkonzentration der hoch abundanten Proteine an die LMWs lässt sich durch Beads mit Hilfe des Proteominer[®]-Kits von Biorad erzielen.^{108,109} Neueste Studien zeigen,

dass beim Vergleich dreier Depletionsstrategien der Einsatz von Hydrogel-Nanopartikeln im Gegensatz zur Anwendung mit den Vivaspin[®] Filtermembranen und der Proteominer[®] Strategie die besten Ergebnisse hervorbrachte.¹¹⁰ Der Einsatz von Chromatographiesäulen erlaubt zwar eine Depletion der hoch und moderat abundanten Proteine, dafür ist diese Methode sehr kostspielig und zeitintensiv. Im Vergleich dazu lässt sich mit neuen günstigeren Methoden eine Depletion der Top 12 abundanten Proteine in nur 1 h durchführen.

Mit Hilfe der genannten Methoden kann man Plasma- und Serumproben für nachfolgende Proteinanalysen aufbereiten. Dies erlaubt tiefere Einblicke ins Plasmaproteom.¹¹¹ Die MS, speziell die Tandem-MS (MS/MS) bildet die Grundlage moderner Proteomik. Innovationen im Bereich der Massenspektrometrie führten zu höherer Auflösung und höherem dynamischen Bereich.¹¹² Mit den neuesten massenspektrometrischen Verfahren können sogar dynamische Bereiche von etwa 7 Größenordnungen abgedeckt werden, was die Detektion von Konzentrationen im Bereich von weniger als 1 ng/mL ermöglicht.¹¹³

1.5 Aufbau eines Massenspektrometers

Die Massenspektrometrie basiert auf der Messung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht prinzipiell aus drei Teilen, der Ionenquelle, dem Massenanalysator und dem Detektor. Je nach Analysator unterscheidet man zwischen Sektorfeld-, Ionenfallen- (z.B. Orbitrap)¹¹⁴, Flugzeit (*time of flight*, TOF)- und Quadrupol-MS. Bei einem Tandem-MS sind zwei oder mehrere Analysatoren in Serie geschaltet. Die MS/MS basiert auf mehreren Schritten in welchen die Peptide in einer Kollisionszelle fragmentiert werden. Die Fragmentationen geben Aufschluss über die Aminosäuresequenz der Peptide. Zusammen mit den Informationen der selektierten Vorläufer-Peptide können sie zur Datenbanksuche genutzt werden, um schließlich die Peptide und Proteine zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Q-TOF MS verwendet. Der schematische Aufbau eines Tandem-MS am Beispiel eines Q-TOF wird in Abbildung 9 gezeigt. In dieser Arbeit wurde mit dem Q-TOF Premier Massenspektrometer von Waters[®] gearbeitet. Eine gängige Methode zur Ionenerzeugung ist die Elektrospray-Ionisierung (ESI). Im Gegensatz zur MALDI kann die ESI an ein LC-System gekoppelt werden. Komplexe Proben können somit zuerst chromatographisch aufgetrennt werden bevor sie in das Massenspektrometer gelangen. Die Kombination eines UPLC- Gerätes (*ultra performance liquid chromatography*) mit einem ESI Q-TOF MS erlaubt die simultane Separation von Peptiden vor der MS-Analyse und reduziert somit eine Suppression der Ionen durch Salze und anderer Elutions-Moleküle.

Die Analyse der Daten in einem klassischen MS/MS-Experiment erfolgt normalerweise über eine Vorselektion des Analyten (Abbildung 9). Bei dieser datenabhängigen Analyse (*data de-*

pendent *acquisition*, DDA) werden die Vorläuferionen seriell fragmentiert: Im MS1 werden die Vorläuferionen detektiert („survey mode“), im MS2 die Fragmentationen („collision mode“).

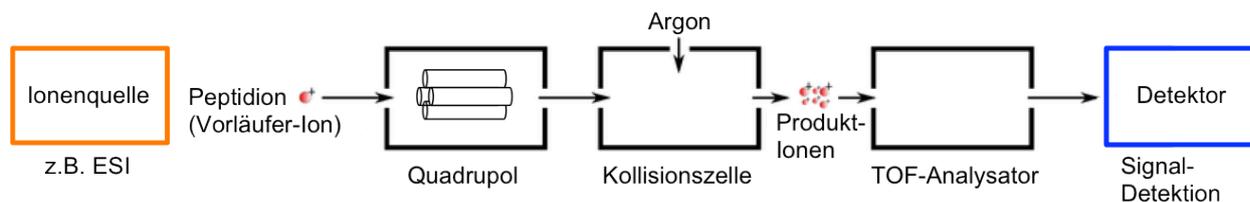


Abbildung 9: Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers am Beispiel eines Q-TOF MS. Bei der DDA selektiert der erste Massenanalysator, ein Quadrupol, Vorläuferionen bezüglich ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z). Dies erlaubt, dass nur ein einziges Peptidion mit einem bestimmten m/z die Kollisionszelle betritt. Diese ist mit einem inerten Gas (z.B. Argon) befüllt, das die Fragmentierung der Peptidionen bewirkt (*collision induced dissociation*, CID). Die Fragmentationen gelangen anschließend in das Flugrohr des zweiten Massenanalysators (TOF-Analysator), der die Masse dieser Produktionen bezüglich ihrer Flugzeit bestimmt. Diese Signale werden letztlich vom Computer in das Massenspektrum (Intensitäts- m/z -Diagramm) übersetzt. Mittels Datenbanksuche wird dem Spektrum schließlich ein Peptid zugeordnet.

Obwohl diese Methode sehr verbreitet ist, weist die DDA jedoch Limitierungen auf wie z.B. zufällige und nicht reproduzierbare Selektion der Vorläuferionen, „Under-sampling“ und lange Messzeiten. Im Gegensatz zur seriellen Fragmentierung der Peptide bei der DDA, erfolgt diese bei der datenunabhängigen Analyse (DIA, *data-independent acquisition*) parallel. Diese Methode der Daten-Acquisition erlaubt einen schnellen und kontinuierlichen Prozess mit einer hohen Reproduzierbarkeit.^{115,116}

MS^E ist eine patentierte Methode der Daten-Aquisition, die die exakte Vorläufermassen- und Fragmentation-Information jeder detektierbaren Komponente in einer Probe erfasst. MS^E ist eine parallele Datenerfassungsmethode, die charakterisiert ist durch einen schnellen Wechsel zwischen niedrigem Energie- und erhöhtem Energie- Modus (Kollisionsenergie)(Abbildung 10).

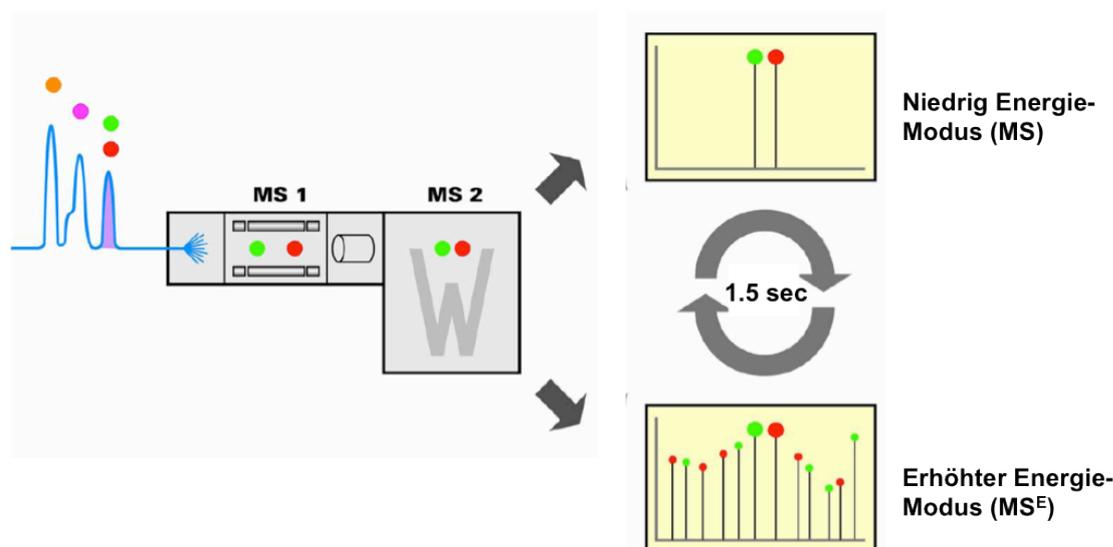


Abbildung 10: MS^E-Analyse beim Q-TOF Premier Tandem-MS von Waters®. Entgegengesetzt zur traditionellen DDA wird bei MS^E zwischen niedrig Energie-Modus (MS) und erhöhtem Energie-Modus (MS^E) gewechselt werden, was eine simultane Erfassung von Vorläufer- und Fragmentationen ermöglicht. Abgeändert nach Waters®.

Im niedrig Energie-Modus erhält man Vorläuferionenspektren, im erhöhten Energie-Modus Fragmentionenspektren (Abbildung 10). Jede Masse wird gemessen und das Spektrum jeder Komponente mit der Retentionszeit verglichen. Über Abgleich der Chromatographie-Profile bzw. Retentionszeit können den Vorläuferionen zugehörige Fragmentionen zugeordnet werden. Nach Dekonvolution der Fragmentionen-Spektren werden die Proteine aufgrund ihrer exakten Masse und Sequenzinformation mittels Datenbanken identifiziert (Abbildung 11).

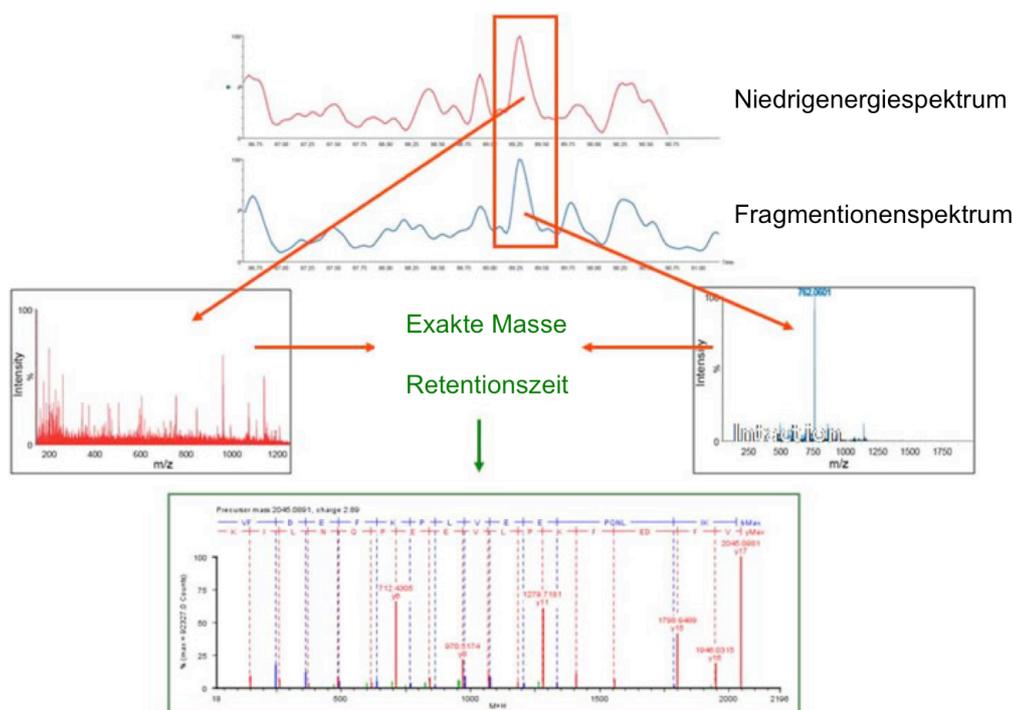


Abbildung 11: MS^E Technologie. Bei MS^E werden zwei Massenspektren erzeugt: Niedrigenergiespektren der Vorläuferionen und Fragmentionenspektren mit höheren Kollisionsenergien. Hierdurch wird jede Masse gemessen und die Spektren aller Komponenten werden der Retentionszeit zugeordnet. Nach Dekonvolution der Fragmentionenspektren erfolgt die Identifizierung der Proteine mittels Datenbanksuche.

1.5.1 Quantitative labelfreie LC-MS/MS

Proteomanalysen, die auf quantitativer labelfreier LC-MS/MS basieren, konnten für etliche Studien in der Tumorforschung Verwendung finden.¹¹⁷ Bei der quantitativen LC-MS/MS unterscheidet man zwischen Verfahren, bei denen Proteine oder Peptide mit verschiedenen Isotopen markiert werden (z.B. SILAC (*s*table *i*sotope *l*abeling with *a*mino acids in *c*ell culture), ICAT (*i*sotope-coded *a*ffinity *t*ags), iTRAQ (*i*sobaric *t*ags for *r*elative and *a*bsolute *q*uantification)) oder labelfreie Analysen.¹¹⁸ Die labelfreien LC-MS Methoden gewinnen zunehmend an Interesse.¹¹⁹ Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die labelfreie Quantifizierung angewendet. Hierbei werden hauptsächlich zwei Strategien unterschieden: (1) Messung und Vergleich der Signalintensitäten der Vorläuferionen eines bestimmten Proteins oder (2) Vergleich der Anzahl an Frag-

mentspektren je Peptid („spectral counting“).¹²⁰⁻¹²² Grundlage bildet bei der erstgenannten Methode die Tatsache, dass Peptide zwar unterschiedlich gut ionisierbar sind, die Signalintensität eines Peptids im Massenspektrometer aber dennoch mit seiner Konzentration in der Probe korreliert. „Spectral counting“ basiert auf der Beobachtung, dass je mehr eines bestimmten Proteins in einer Probe vorliegt, desto mehr MS/MS-Spektren werden für Peptide dieses Proteins gesammelt. Ein Vorteil ist, dass im Prinzip relative Mengen verschiedener Proteine gemessen werden können.¹²³ Diese Methode ist allerdings nicht für komplexe Proben geeignet.¹²⁴ In dieser Arbeit wurden die Peptide daher anhand ihrer Signalintensität (TOP3 Intensität) quantifiziert. Um kleine Veränderungen in der Proteinmenge lebender Zellen zu detektieren, ist die sehr akkurate und präzise Methode SILAC vorzuziehen.^{125,126} Mittels SILAC können bis zu drei Bedingungen in einem Experiment untersucht werden. SILAC hat sich vor allem zur Untersuchung des Sekretoms bewährt.¹²⁷ Im Gegensatz dazu ist die labelfreie Probenvorbereitung gerade bei hoher Probenanzahl schneller und günstiger, da keine Labelreagenzien benötigt werden.¹²⁸ Es kommt zu keiner Beeinflussung durch Labelartefakte. Des Weiteren ist die labelfreie LC-MS sensitiver und bietet einen größeren dynamischen Bereich in der Quantifizierung.^{129,130} Dies ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung komplexer Proben oder eines gesamten Proteoms. Dennoch ist die labelfreie Methode die am wenigsten genaueste unter den Quantifizierungstechniken.¹³⁰

1.6 Zielsetzung

Das Kolonkarzinom entsteht meist durch graduelle Progression von gutartigen Polypen der Darmwand über frühe Krebsstadien bis hin zu späten, metastasierenden Formen. Symptome treten meist erst in späteren Stadien auf, sodass ein Kolonkarzinom oft erst im späten Krankheitsstadium diagnostiziert wird. Dies bedingt eine schlechte Prognose für den weitergehenden Krankheitsverlauf. Die Anwendung von Screening-Programmen zur frühzeitigen Diagnose führte zu einer deutlichen Verminderung der Patientensterblichkeit. Jedoch sind die heutigen diagnostischen Verfahren aufgrund ihrer hohen Invasivität in ihrer Anwendbarkeit limitiert. Endoskopische Untersuchungen des Kolons (Koloskopie/Darmspiegelung) sind zur Zeit als Standard für die Diagnose eines KRK zu betrachten.

Bislang ist kein Blut-basierter Test für diese Krebsart bekannt, der über eine ausreichende Sensitivität und Spezifität verfügt. Die Identifizierung von Hochrisikopatienten mittels eines weniger invasiven, beispielsweise Blutplasma-basierten Tests würde die Anzahl an endoskopischen Untersuchungen deutlich verringern. Aus diesem Grund werden dringend neuartige Tests für die Diagnose des Kolonkarzinoms im Frühstadium, in dem noch keine für den Patienten bemerkbare Symptome auftreten, benötigt.

In dieser Arbeit sollte das Blutplasma-Proteom als potentielle Quelle für Kolonkarzinom-spezifische Biomarker untersucht werden. Plasma bietet eine gute Repräsentation aller physiologischen und pathophysiologischen Prozesse und stellt somit eine ideale Quelle für diagnostische Marker dar. Für Proteomanalysen stellt jedoch der extrem hohe dynamische Bereich der Plasmaproteine eine große Herausforderung dar, besonders für die Detektion niedrig abundanter Proteine, die für die erfolgreiche Identifikation potentieller Biomarker essentiell ist. Aus diesem Grund sollte ein immunoaffinitäts-basierter Ansatz mit Hilfe von kommerziell erhältlichen IgY12 und IgY-Supermix Chromatographie-Säulen zur Depletion von Plasma von Karzinom-, Adenom- und Kontrollgruppen herangezogen werden. Im Durchfluss, der weniger als 0,5% des applizierten Gesamtproteins enthält, sind niedrig abundante Proteine, also potentielle Biomarker-Kandidaten, signifikant angereichert und sollten somit massenspektrometrisch untersucht werden. Anschließend sollen die ausgewählten Biomarker-Kandidaten in einer prospektiven Studie mittels eines ELISA Tests validiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Geräte:

ELISA Reader	SPECTRAFluor plus Reader oder GENios (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
Feinwaage	CP 64 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Heizblock	RotiLabo Block Heater H250 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
HPLC	Äkta FPLC System (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)
Kippschüttler	Shaker DRS-12 (Neolab, Heidelberg, Deutschland)
Massenspektrometer	Q TOF Premier (Waters, Eschborn, Deutschland)
pH-Meter	CG 840 (SCHOTT, Mainz, Deutschland)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu (IBS Integra Biosciences)
Power-Supply	Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland)
SDS-PAGE Laufkammer	Mini Protean System (BioRad, München, Deutschland)
SpeedVac	SVC100 (Savant, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)
Vortex- Mixer	(Neolab, Heidelberg, Deutschland)
Western Blot Dokumentation	GelDoc System (BioRad, München, Deutschland)
Western Blot Transferapparatur	XCell SureLock System (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
Waage	Typ 1202 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge groß, kühlbar	Multifuge 3L-R (Thermo Scientific, Rockford, USA)
Zentrifuge klein, kühlbar	Biofuge fresco (Heraeus, Hanau, Deutschland)

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Verbrauchsmaterialien von Greiner bio-one (Frickhausen) bezogen.

Weitere Verbrauchsmaterialien:

Zentrifugalkonzentratoren	Vivaspin 20/500 (Sartorius AG, Göttingen)
Transfermembran	PVDF-Membran 0,45µm (Millipore)

2.3 Puffer und Lösungen

1M Neutralisations- Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl
10x Dilutions- Puffer	1 M Glycin-HCl, pH 2,5
1M Stripping- Puffer	1 M Tris-HCl, pH 8,0
Blocking-Lösung	5% Milchpulver in TBST
Blotpuffer	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% Methanol, 0,02% SDS Super Block T20 (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific)
Harnstoffpuffer	8 M Urea, 0,1 M TRIS, pH 8,5
FASP-Lysepuffer	7 M Urea, 2 M Thiourea, 10 mM DTT
Fixierlösung	50% Methanol in Aqua dest., 10% Essigsäure
Kolloidales Coomassie	0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/v), 10% Ammoniumsulfat (w/v), 10% Phosphorsäure (v/v), 20% Methanol (v/v)
Lysepuffer	7 M Urea, 2 M Thiourea, 5mM DTT, 2% CHAPS
NH ₄ HCO ₃ -Puffer	0,05g NH ₄ HCO ₃ in 10ml H ₂ O (MS grade)
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NH ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
SDS-Ladepuffer (4x)	8% TBS pH 8,8, 100 mM DTT, 20% SDS, 0,7% EDTA, 0,2% Bromphenolblau in Glycerin
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 1% SDS
TBS/Tween	150 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, pH 8,0
Tris-Puffer	1,5 M Tris (pH 8,8), 1 M Tris (pH 6,8)

2.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbung verwendet:

Primärantikörper für Western Blot:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
AMBP monoclonal antibody (M01), clone 3F1 (Best.-Nr.: H00000259-M01)	Abnova, Taiwan	1:10.000
CRP monoclonal antibody, clone C1 (Best.-Nr.: MAB0415)	Abnova, Taiwan	1:10.000
S100A9 monoclonal antibody (M01), clone 1C10 (Best.-Nr.: H00006280-M01)	Abnova, Taiwan	1:10.000
SERPINA3 monoclonal antibody, clone 71A1 (Best.-Nr.: MAB0779)	Abnova, Taiwan	1:10.000
C9 Mouse anti-Human Antibody (Best.-Nr.:LS-C62022/24286)	LifeSpan BioSciences, Seattle, USA	1:10.000
LRG1 polyclonal antibody (A01) (Best.-Nr.: H00116844-A01)	Abnova, Taiwan	1:10.000
VCAM1 MaxPab mouse polyclonal antibody (B01) (Best.-Nr.: H00007412-B01)	Abnova, Taiwan	1:10.000
Clusterin monoclonal antibody (clone 1A11) (Best.-Nr.:ACL0751)	ATGen, Süd-Korea	1:10.000
Plastin 1 (PLS1) antibody (Best.-Nr.:ARP56400_P050)	Aviva System Biology, San Diego, USA	1:10.000
LCAT polyclonal antibody (A01) (Best.-Nr.: H00003931-A01)	Abnova, Taiwan	1:10.000

Sekundärantikörper für Western Blot:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat anti-mouse-HRP (Best.-Nr.:32430)	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA	1:2000

Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
AMBP monoclonal antibody (M01), clone 3F1 (Best.-Nr.: H00000259-M01)	Abnova, Taiwan	1:250

EpCAM (CD326), clone UZ4 (Best.-Nr.: NBP1-97813)	Novus Biologicals, Little- ton, USA	1:200
Goat-anti-rabbit IgG-Cy3-konjugierter Sekundärantikörper (Best.-Nr.:111-65-008)	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:300
Streptavidin –Dylight ⁶⁴⁸	Invitrogen (jetzt Life Technologies)	1:200
Streptavidin-Alexa ⁴⁸⁸	Invitrogen (jetzt Life Technologies)	1:200
Kernfarbstoff Hoechst 33342	Life Technologies, Cali- fornia, USA	1:2000
Goat-anti-mouse Sekundärantikörper, biotinyliert (Best.-Nr.:405303)	BioLegend, San Diego, USA	1:400

2.5 Kits und Fertigsysteme

Plasma Depletion:

IgY-12 High Capacity LC10 Proteome Partitioning Kit	(Beckman Coulter; jetzt über Sigma Aldrich, St.Louis, MO)
Supermix LC2 Column Kit	(GenWay Biotech, San Diego, CA; jetzt über Sigma Aldrich, St.Louis, MO)

ELISA Kits:

Human C-reactive protein (CRP) ELISA Kit (Best.-Nr.: E90821Hu)	USCN Life Sciences
Human AMBP ELISA Kit (Best.-Nr.: CSB-E11316h)	Cusabio Biotech
Human C9 ELISA Kit (Best.-Nr.: E91823Hu)	USCN Life Sciences
Human SERPINA3/ Alpha-1-antichymotrypsin (Best.-Nr.: E91015Hu)	USCN Life Sciences
Human S100A9 ELISA Kit (Best.-Nr.: E91793Hu)	USCN Life Sciences
Human Transthyretin (TTR) ELISA Kit (Best.-Nr.: CSB-E11169h)	Cusabio Biotech

Human IGFALS ELISA Kit (Best.-Nr.: E93892Hu)	USCN Life Sciences
Human a1M ELISA Kit (Best.-Nr.: E90217Hu)	USCN Life Sciences

Sonstige Fertigsysteme:

Protein Precipitation Kit	ProteoExtract Calbiochem
Western Blot Detection Reagents	SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA)

2.6 Marker und Enzyme

Molekulargewichtsmarker	Prestained Protein Ladder Plus (#SM 1811) Fermentas
Trypsin	Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega GmbH Mannheim, Deutschland
Proteaseinhibitor	Complete Mini, Proteaseinhibitor Cocktail Tabletten, Roche, Mannheim, Deutschland

2.7 Patienten-Blutproben

Die Patienten-Blutproben wurden von Oktober 2008 bis Oktober 2009 in der Endoskopie der 1. Medizinischen Klinik Mainz und ab Dezember 2009 in der Endoskopie des Universitätsklinikums Erlangen bezogen. Die Gewinnung der Proben erfolgte nach den Richtlinien der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz.

In die Studie wurden Patienten mit Adenomen und Kolonkarzinomen aller Stadien und Lokalisation, die deswegen noch nicht therapiert wurden, eingeschlossen (Erstdiagnose). Patienten hingegen mit anderen Tumorerkrankungen neben dem Kolonkarzinom, Patienten mit Diabetes, chronischen Erkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) sowie Raucher wurden ausgeschlossen.

Plasmaproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wurden ausschließlich im Universitätsklinikum Erlangen gesammelt. Die Proben wurden von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gewonnen.

Kontrollpatienten waren Patienten, die sich einer Vorsorge unterzogen haben (Normalbefund). Zusätzlich wurden Labormitglieder in die Kontrollgruppe eingeschlossen.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Studienpopulation mit Angaben über das Geschlecht, mittleres Alter und Tumorgrad. Insgesamt wurden 20 Adenome, 20 Karzinome und 20 Kontrollen verwendet. Für die CED-Studie wurden jeweils 6 CED-Proben für die ELISA-Versuche eingesetzt.

Tabelle 3: Patienten-Charakteristik. Die Tabelle zeigt einen Überblick über das Alter und Geschlecht der verwendeten Patientenproben für die Identifizierungs-Studie, die Validierungs-Studie und die CED Patienten. (Lokalisation der KRK der Identifizierungs-Studie: Rektum n=4 Dist.Sigma n=2 Prox.Kolon n=1 Unbekannt n=3).

Identifizierungs-Studie		N	Mittleres Alter (Bereich)	Weiblich	Gewebe	Grad
	Gesamt	30				
	Kontrollen	10	46 (24-84)	3/10 (30%)	Kolon	
	Adenome	10	66 (58-82)	6/10 (60%)	Kolon	
	KRK	10	76 (44-89)	4/10 (40%)	Kolon	G2-G3
Validierungs-Studie						
Neoplasie-Studie	Gesamt	60				
	Kontrollen	20	33 (28-87)	13/20 (67%)	Kolon	
	Adenome	20	65 (48-80)	11/20 (55%)	Kolon	
	KRK	20	62 (27-88)	2/20 (10%)	Kolon	G2-G3
CED-Studie	Gesamt	18				
	Kontrollen	6	30 (24-38)	3/6 (50%)	Kolon	
	Colitis ulcerosa	6	43 (24-76)	2/6 (33%)	Kolon	
	Morbus Crohn	6	36 (21-46)	4/6 (66%)	Kolon	

2.8 Gewinnung von Blutplasma

Etwa 3-8 ml Vollblut wurde den Patienten mit einem Lithium-Heparin-Röhrchen vor einer endoskopischen Untersuchung abgenommen und direkt mit einem Proteaseinhibitor versehen (Roche complete Mini tablets: 1 Tablette in 1 ml Aqua dest. lösen; 1/10 zu der Blutprobe gegeben). Die Blutprobe wurde im Labor unmittelbar in ein 15 ml Falcon überführt und bei 1700 x g für 10 min zentrifugiert. Das hierdurch gewonnene Plasma wurde abgenommen und aliquotiert. Die 500 µl Aliquots wurden anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Es wur-

de darauf geachtet, dass die Probenabnahme und Plasmagewinnung möglichst zügig erfolgte und von Blutgewinnung bis zum Einfrieren des Plasmas nicht mehr als 60 min vergingen.

2.9 Plasma Depletion

Um möglichst viele potentielle Biomarker-Kandidaten zu identifizieren, die man in der niedrig abundanten Fraktion erwartet, wurden zunächst die hoch abundanten und moderat abundanten Proteine aus dem Blutplasma entfernt. Dies erfolgte mit Hilfe spezieller Chromatographie-Säulen, die Antikörper gegen die 12 hoch abundanten Proteine und 77 moderat abundanten Proteine enthielten. Hierfür wurden die ProteomeLab IgY12 LC10 (ehemals Beckman Coulter, jetzt über Sigma-Aldrich) und die Seppro[®] SuperMix LC2 (ehemals Genway, jetzt über Sigma-Aldrich) verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Depletionssäulen.

Depletions-Säule	IgY12 LC10	SuperMix LC2
Antikörper gegen	Serum Albumin, IgG, Fibrinogen, Transferrin, IgA, IgM, HDL (Apo-A1, Apo-A2), Haptoglobin, alpha-1-Antitrypsin, alpha-1-acid Glykoprotein, alpha-2-Makroglobulin	Mind. 77 moderat abundante Proteine

Um die Säulen zu generieren wurden von den Firmen Antikörper aus zuvor mit menschlichem Plasma immunisierten Hühnern isoliert. Für die SuperMix LC2 wurden Antikörper aus Hühnern isoliert, die mit der IgY12-depletierten Fraktion immunisiert wurden. Abbildung 12 gibt einen Überblick über die beiden verwendeten Säulen und die Versuchsdurchführung.

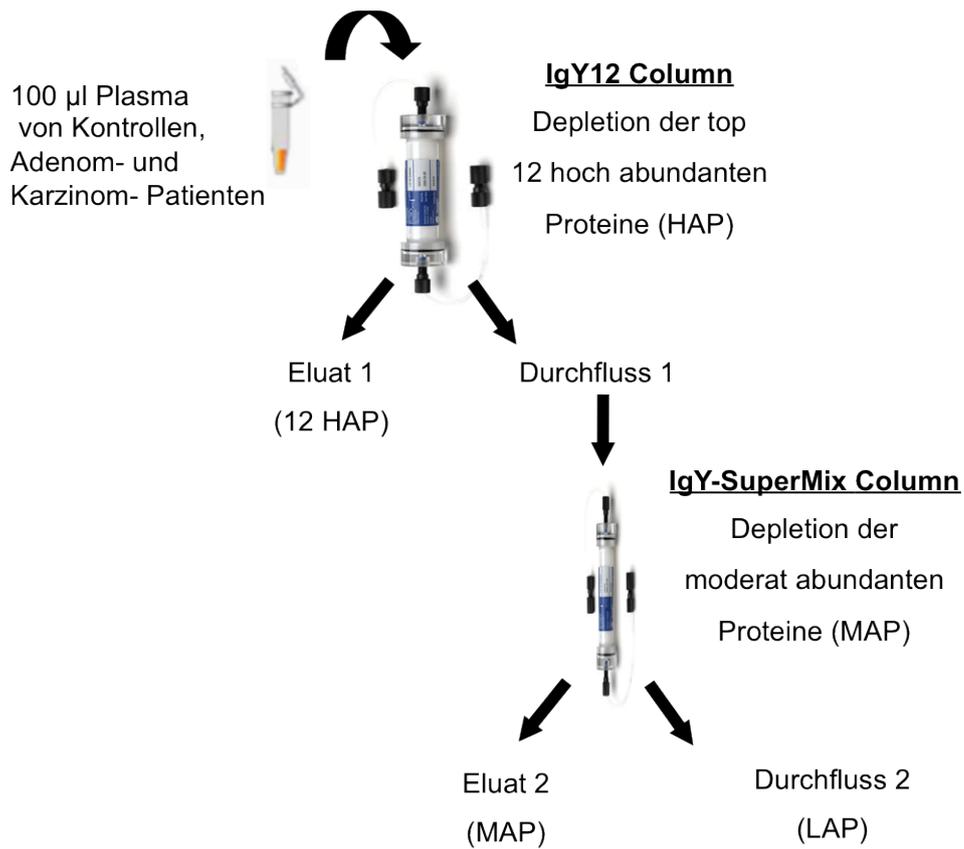


Abbildung 12: Prinzip der Plasma-Depletion mit Hilfe der beiden Depletionssäulen IgY12 LC10 und SuperMix LC2. 100 µl Plasma von Kontrollen, Adenom- oder Karzinom-Patienten wurde nach Verdünnung in einem ersten Schritt von den 12 hoch abundanten, im zweiten Schritt mit Hilfe der SuperMix LC2 von den moderat abundanten Proteinen bereinigt. Der Durchfluss beider Säulen wurde für weitere Analysen verwendet.

Abbildung 13 zeigt den Aufbau und die Lokalisation für die Plasma-Separation als Schema am Äkta FPLC System. Benötigt wurden ein Äkta FPLC Gerät, 3 Puffer, ein UV-Detektor, ein Fraktionssammler, 3 Behälter zum Auffangen der Probe sowie die Depletionssäulen.

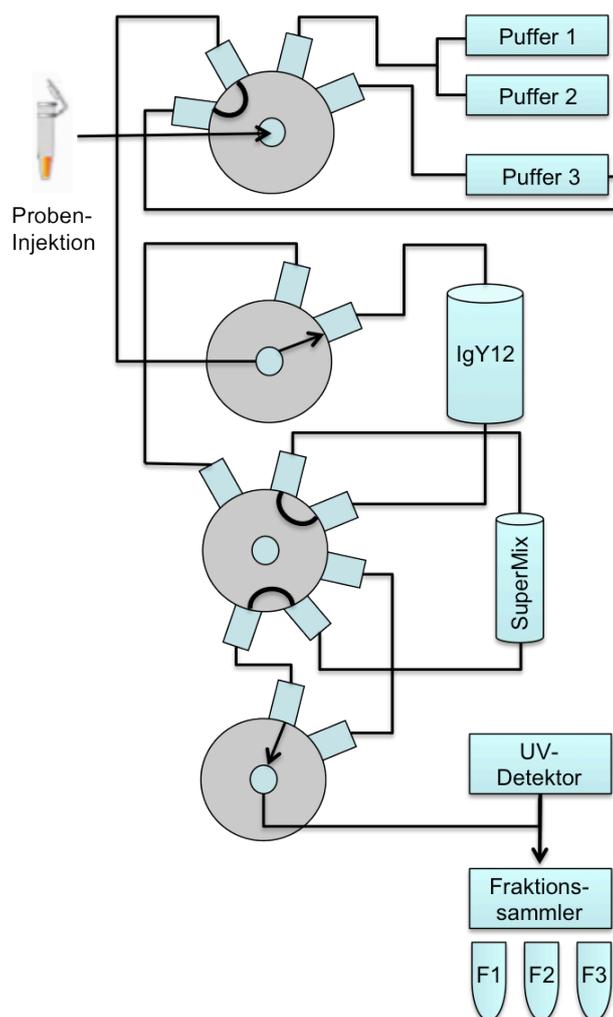


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Plasma-Separationsmethode. Dargestellt sind der Aufbau und die Lokalisation der Depletions-Säulen am Äkta FPLC System.

Die mit der Unicorn Software speziell programmierte Methode garantiert die Reproduzierbarkeit und Gleichbehandlung der Proben. Die Separations-Methode beinhaltet die Equilibrierung der Säulen, Proben-Injektion, Elution, Neutralisation und Re-equilibrierung der IgY12 LC10 und SuperMix LC2 (s. Tabelle 5) sowie automatisches Auffangen des Durchflusses (Fraktion F1) und der Eluate (Fraktionen F2+F3).

2.9.1 Probenvorbereitung für die Plasmadepletion

Jeweils ein Aliquot Blutplasma wurde auf Eis aufgetaut und 100 µl Plasma wurde 1:5 mit Dilutions-Puffer verdünnt (insgesamt 500 µl). Die Probe wurde anschließend mittels Filterzentrifugation bei 9200 x g für 1 min von eventuellen Partikeln bereinigt und auf eine 1 ml Braun-Kanüle gezogen. Die Puffer wurden als 10-fach Stock-Lösungen angesetzt und vor Gebrauch sterilfiltriert.

2.9.2 Blutplasma-Fraktionierung / Depletion der hoch und moderat abundanten Proteine (Tandem-Separation)

Zur Depletion der hoch und moderat abundanten Proteine wurden die beiden Säulen in Serie/hintereinander geschaltet/angebracht. Nach Equilibrierung der Säulen erfolgte die Injektion der Plasma-Probe. Eine Plasma-Separation dauerte 150 min und erfolgte bei Raumtemperatur (18-25°C). Eine detaillierte Übersicht über die Depletionsmethode gibt Tabelle 5. Die Säulen wurden über Nacht bei einer konstanten Flussrate von 0,05 ml/min mit Dilutions-Puffer gespült (Über-Nacht-Methode).

Tabelle 5: Methode zur Plasmadepletion mit der IgY12 LC10 und SuperMix LC2.

Cycle	Zeit (min)	Dilutions- Puffer (%)	Elutions-Puffer (%)	Neutralisations-puffer (%)	Flussrate (ml/min)
Spülen der Pumpe	0	100			2
Equilibrierung LC10+LC2	2,5	100			1
Probeninjektion und Beladen der LC10+LC2	17,5	100			0.5
Waschen LC10	52,5	100			2
Elution LC10	57,5		100		2
Neutralisation LC10	78,5			100	2
Re-Equilibrierung LC10	90,5				2
Waschen LC2	100,5	100			1
Elution LC2	95,5		100		1
Neutralisation LC2	120,5			100	1
Re-Equilibrierung LC2	126,5	100			1
Stop	150				

2.9.3 Aufkonzentrieren des Durchflusses und der Eluate

Die gesammelten Fraktionen wurden auf Eis gestellt und gekühlt weiterverarbeitet. Beide Eluate wurden mit 10 x Neutralisationspuffer neutralisiert. Die Fraktionen umfassten ein Volumen von 10-25 ml und wurden zur weiteren Verwendung mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Hierfür wurden die Vivaspin 20 und Vivaspin 500 (5000 MW) zur Erhöhung der Proteinausbeute

zuvor mit 0,1% (w/v) n-Octylglucosid kurz durchgespült. Die Filterzentrifugation erfolgte bei 4°C für etwa 1 h bei 3000 x g. Anschließend wurde die Durchfluss-Fraktion nochmals auf ein Volumen von 100-500 µl mit Vivaspin 500 Filterzentrifugatoren aufkonzentriert.

2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der 660 nm Protein Assay (Pierce, Rockford) nach Angabe des Herstellers verwendet. Auf jeder 96-Well-Platte wurde eine BSA Eichgerade (von 0-2 mg/ml BSA) in Duplikaten mitgeführt. Die Absorption wurde am SPECTRAFluor Plus Reader (TECAN) gemessen und die Konzentration der Proben anschließend anhand der Steigung der Eichgeraden ermittelt.

2.11 Fällung der Proteine

Die Fällung der Proteine erfolgte mit dem Protein Precipitation Kit von Calbiochem. Hierfür wurden 20 µg der depletierten Blutplasma-Probe mit 4-fachem Volumen von -20°C kaltem Präzipitations-Reagenz vermischt und für 60 min bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min bei RT. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 0,5 ml -20°C kalter Waschlösung gewaschen und erneut für 2 min bei RT und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Pellet etwa 1 h bei geöffnetem Deckel getrocknet, bevor es in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat mit 0,1% RapiGest aufgenommen wurde.

2.12 In-Lösungsverdau

Es werden hauptsächlich zwei Methoden angewandt, um Proteine zu Peptiden zu verarbeiten, um sie für massenspektrometrische Analysen vorzubereiten. Einerseits der In-Gel Verdau, bei dem zuerst die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und anschließend der Verdau der im Gel befindlichen Proteine erfolgt und zweitens der In-Lösungs-Verdau. Beim In-Lösungsverdau werden Proteine in vier Schritten (Solubilisierung, Reduzierung, Alkylierung und proteolytischer Verdau) für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Nach Fällung der Proteine wurde das Pellet in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat mit 0,1% RapiGest für 15 min bei 80°C gelöst. Danach erfolgte die Reduktion der Cysteine mittels DTT (1/40 Vol., Endkonzentration = 8 mM) bei 56°C für 15 min. Schließlich wurden die Cysteine mit IAA (1/40 Vol., Endkonzentration = 15 mM) alkyliert. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei RT in Dunkelheit wurde erneut DTT (8 mM) zugegeben um die Reaktion von IAA abzustoppen. Danach

erfolgte die Zugabe des proteolytischen Enzyms Trypsin in einem Enzym-Substratverhältnis von 1:100. Verdaut wurde über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurde zur Probe 100 mM HCl zugegeben und 5-10 min bei RT oder 37°C inkubiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C konnte der Überstand abgenommen und direkt mittels Massenspektrometrie analysiert oder bei -20°C gelagert werden.

2.13 Filter-aided sample preparation (FASP) - Proteinverdau

Besonders für niedrig konzentrierte und kleine Probenmengen eignet sich dieser mit Hilfe einer Filterzentrifugationseinheit durchgeführte Proteinverdau nach Wiśniewski.¹³¹ Diese Methode der Proteinaufbereitung bietet außerdem eine hohe Ausbeute und einen hohen Reinheitsgrad.

In vier Schritten lassen sich Proben für eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse vorbereiten: (1) Entfernen schädlicher niedrigmolekularer Komponenten durch harnstoffhaltigen Puffer, (2) Carbamidomethylierung von Thiolen, (3) Verdau der Proteine und (4) Elution der Peptide.

Auf eine mit 1% Ameisensäure gespülte Filtereinheit (10 kDa Filter) wurden 10 bis 20 µg Protein in einem Volumen von 200 µl (FASP-Lysepuffer) gegeben. Nach Zentrifugation [15 min, 12.500 rpm] wurde mit 200 µl Harnstoffpuffer gewaschen [15 min, 12.500 rpm]. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 100 µl 8 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) in Harnstoffpuffer auf den Filter gegeben und 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Nach Zentrifugation [10 min, 12.500 rpm] wurde der Filter zwei Mal mit 100 µl Harnstoffpuffer gewaschen [15 min, 12.500 rpm] und anschließend mit 100 µl 50 mM Iodoacetamid (IAA) in Harnstoffpuffer 20 min bei RT dunkel inkubiert. Danach wurde der Filter erneut zwei Mal mit je 100 µl Harnstoffpuffer gewaschen [15 min, 12.500 rpm] und mit 100 µl 8 mM DTT in Harnstoffpuffer inkubiert [15 min, 56°C]. Nach zwei Waschstritten mit 100 µl Harnstoffpuffer [15 min, 12.500 rpm] folgte dreimaliges Waschen [10 min, 12.500 rpm] mit je 100 µl 65 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH₄HCO₃) – Lösung. Hiernach wurde die Probe über Nacht mit Trypsin bei 37°C in einem LowBind Eppendorfgefäß inkubiert [Trypsin 1:100 in 65 mM NH₄HCO₃ – Lösung]. Am nächsten Tag wurde die Probe zentrifugiert [10 min, 12.500 rpm] und anschließend mit 40 µl 65 mM NH₄HCO₃ – Lösung eluiert [10 min, 12.500 rpm]. Das Eluat wurde zu einer Endkonzentration von 0,2% Trifluoressigsäure angesäuert und bei -80°C eingefroren, bevor es über einen SpeedVac auf ein Volumen von 20 µl reduziert wurde.

2.14 Analyse durch Massenspektrometrie

Die depletierte und trypsinierte Plasma-Probe (FT, Durchfluss) wurde anschließend mit dem Q-TOF Premier MS von Waters[®] gemessen (Abbildung 14). Das MS ist mit einer patentierten Methode zur Datenerfassung ausgestattet, MS^F genannt. Diese hat den Vorteil, dass, im Vergleich zur traditionellen Datenerfassung, die Datenerfassung parallel und nicht seriell erfolgt. Dies wird durch den schnellen Wechsel zwischen Hochenergie- (high energy) und Niedrigenergie- (low energy) Modus ermöglicht. Es wurde eine labelfreie Quantifizierung durchgeführt (Kapitel 1.5.1).

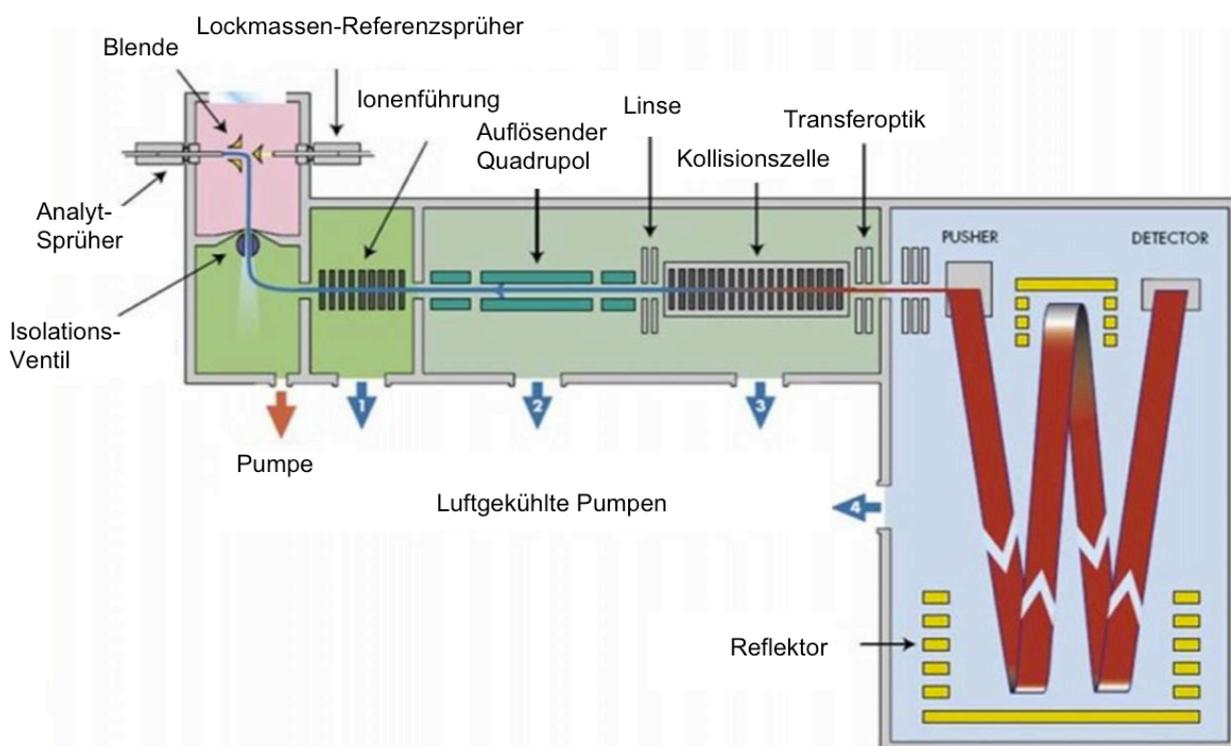


Abbildung 14: Aufbau des Q-TOF Premier MS von Waters[®]. Das verwendete MS ist ein Quadrupol Time-of-flight MS. Nach der Ionisierung der Peptide werden die geladenen Moleküle durch einen Quadrupol-Massenfilter geleitet. Durch Anlegen einer Wechselspannung werden die Molekülonen in komplexer Weise mit Hilfe elektrischer Felder getrennt. In der Kollisionszelle werden den Ionen durch Kollision mit einem Stoßgas Energie zugeführt, worauf sie in kleinere Fragmente zerfallen. Anschließend wird im Flugrohr die Flugzeit (TOF) bestimmt und daraus kann auf die Masse des Fragmentations rückgeschlossen werden.

2.14.1 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Die zuvor mit Trypsin verdauten Proben (20 µg) wurden mit wässriger 0,1% (v/v) Ameisensäure auf die Konzentration von 200 ng/µl verdünnt und 25 fmol/µl Enolase zur Quantifizierung zugefügt. Die fertige Probe wurde in ein Glasvial (Waters, Eschborn, Deutschland) pipettiert und entweder direkt in den Probenhalter des Massenspektrometers gestellt, oder bei -20°C gelagert.

2.14.2 LC-MS Analyse tryptisch verdauter Peptide und Proteinidentifizierung mittels Tandem-Massenspektrometrie

Die Flüssigkeitschromatographie (LC) der tryptisch verdauten Peptide wurde mit einem *Waters NanoAcquity UPLC* System (Waters, Eschborn, Deutschland) durchgeführt, das mit einer 75 µm x 150 mm BEH-C18 Umkehrphasen- Säule ausgestattet war. Als wässrige mobile Phase (Puffer A) wurde H₂O (LC-MS grade, Roth, Freiburg, Germany) mit 0,1% Ameisensäure, als organische mobile Phase (Puffer B) 0,1% Ameisensäure in Acetonitril (LC-MS grade, Roth) eingesetzt. Die Proben (2,6 µl) wurden im direkten Injektionsmodus mit 3% Puffer B auf die Säule geladen. Die Peptide wurden mit einem Gradienten von 5%-35% Puffer B über 90 min bei einer Flussrate von 300 nl/min von der Säule eluiert. Nach dem Spülen mit 90% Puffer B wurde die Säule auf Anfangsbedingungen (1% Puffer B) für 20 min re-equilibriert (Tabelle 6). 500 fmol/µl [Glu1]-fibrinopeptide diente zum Kalibrieren. Die Proben wurden in Triplikaten gemessen.

Tabelle 6: UPLC Methode.

	Zeit (min)	Flussrate (µl/min)	% Puffer A	% Puffer B
1	Initial	0,3	99	1
2	10	0,3	99	1
3	11	0,3	99	1
4	13	0,3	95	5
5	90	0,3	75	25
6	120	0,3	65	35
7	125	0,4	10	90
8	135	0,4	10	90
9	136	0,4	99	1

Die massenspektrometrische Analyse der Peptide wurde mit dem Waters Q-TOF Premier API System (Abbildung 14) im positiven V-Modus mit einer Auflösung von 10000 FWHM (*full width half maximum*, Halbwertsbreite) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten im positiven ESI-Modus mit einer NanoLockSpray Quelle. Der Referenzkanal wurde alle 30 s gemessen. Die LC-MS Daten wurden im Wechsel zwischen Niedrigenergie- (MS) und dem hochenergetischen Erfassungsmodus (MS^E) aufgenommen. Die Scanzeit in jedem Modus lag zwischen 0,7 s mit einem Inter-scan-Delay von 0,05 s. Im Niedrigenergie- Modus (MS) wurden die Daten bei einer konstanten Kollisionsenergie von 3 eV gemessen, im MS^E zwischen 16 eV und 36 eV variiert.

Ein Zyklus von MS und MS^E Daten wurde alle 1,5 s erfasst. Die Chromatogramme und Spektren wurden mit Hilfe des Programmes MassLynx 4.1 erstellt.

2.14.3 Datenbanksuche

Die LC-MS^E Daten wurden durch den iDENTITY^E-Algorithmus des ProteinLynx Global Server (PLGS) 2.5 prozessiert und ausgewertet. Die identifizierten Proteine und Peptide wurden von dem Programm nach statistischen Methoden berechnet. Proteinidentifikation wurde durch die Suche in der UniProtKB/SwissProt Datenbank mit der Taxonomie homo sapiens durchgeführt, wobei mögliche Kontaminationen und Standardproteine (Trypsin, Enolase) mit einbezogen wurden. Des Weiteren wurden nur Peptidfragmente akzeptiert die maximal eine fehlende tryptische Spaltung aufwiesen. Carbamidomethyl Cystein wurde als Modifikation angegeben. Oxidiertes Methionin, N-Acetylierung und Deamidierung von Asparagin und Glutamin wurden als variable Modifikationen angegeben. Als maximale Massenabweichung für Vorläufer wurden 15 ppm und für dessen Fragmentationen 30 ppm toleriert. Für die Zuordnung von Peptiden zu ihrem entsprechenden Protein mussten folgende Kriterien erfüllt werden: mindestens zwei Peptide mit wenigstens sieben Fragmentationen mussten detektiert werden. Alle gemessenen Peptididentifikationen durch den IDENTITYE Algorithmus bereitgestellt waren mit >95% Wahrscheinlichkeit korrekt. Die Falschpositiv-Rate der Proteinidentifikation wurde auf 3% gesetzt, basierend auf einer 5-fach randomisierten Decoy-Datenbank, die automatisch von PLGS 2.5 erstellt wurden. Durch weiteres Filtern verringerte sich die Falschpositiv-Rate auf <0,2%, da nur identifizierte Peptide, die in mindestens zwei technischen Replikaten vorkamen, in die Auswertung einbezogen wurden. Alignment, Normalisierung und labelfreie Quantifizierung sowie Isoform/Homolog-Filterung und Replikat-Filterung wurden mit der im Institut für Immunologie/ AG Tenzer entwickelten Software ISOQuant 1.5 durchgeführt.¹³²

2.15 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-PAGE (Sodium- Dodecyl- Sulfat- Polyacrylamid- Geleelektrophorese) lassen sich Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts auftrennen. Je nach Konzentration des Acrylamids erhält man unterschiedliche Porengrößen im Gel und kann somit unterschiedlich große Proteine auftrennen. Es wurden hier entweder 10%ige oder 12%ige Trenngelle hergestellt (Tabelle 7). Das Trenngel wurde zuerst zwischen zwei Glasplatten gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol luftdicht abgeschlossen. Im Anschluss erfolgte nach Entfernung des Isopropanols die Übersichtung mit dem Sammelgel, in welches mit einem Probekamm Aussparungen eingebracht wurden. Nach kompletter Polymerisation wurde das Gel

in die Gelelektrophorese- Apparatur eingespannt (BioRad Mini Protean System), die Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt und der Probenkamm entfernt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Gele.

Chemikalie	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O	4,8 ml	4,31 ml	3,2 ml
1,5 M Tris pH 8,6	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	-	1,2 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	50 µl
Acrylamid	2,5 ml	3 ml	0,5 ml
10 % APS	50 µl	70 µl	25 µl
TEMED	10 µl	20 µl	5 µl

Für die SDS-PAGE wurden 20 µg undepletiertes Blutplasma in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die hohe Temperatur bewirkt, dass Sekundär-, Tertiär, und Quartärstruktur der Proteine zerstört werden. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Acrylamidgels, das sich im SDS-Laufpuffer befand, pipettiert. Zur Größenbestimmung wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Durch das anionische Detergenz SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Aus diesem Grund wandern die Proteine in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Dabei migrieren kleine Proteine schneller als Große. Die SDS-PAGE erfolgte für 2-3 h bei ca. 100 V-120 V.

2.16 Kolloidale Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurde das Gel in eine Färbeschale überführt und 15 min in Fixierlösung geschwenkt. Danach wurde das Gel mit kolloidaler Coomassie-Lösung bedeckt und ÜN bei RT gefärbt. Das Gel wurde am nächsten Tag solange mit dH₂O gespült bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden und der Hintergrund genügend entfärbt war. Coomassie Gele wurden auf weißem Hintergrund mit dem GelDoc System (BioRad) dokumentiert.

2.17 Western Blot und Immundetektion aufgetrennter Proteine

Mit Hilfe der Western Blot Technik können elektrophoretisch getrennte Proteine auf einer Membran immobilisiert und mit Antikörpern spezifisch detektiert werden. Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Die zugeschnittene PVDF-Membran (0,45 μm , Millipore) wurde für ca. 30 s mit Methanol aktiviert und für 15 min in Blotpuffer äquilibriert. Gel und Membran wurden luftblasenfrei zwischen zwei angefeuchteten Whatman-Papieren und jeweils drei Schwämmchen gelegt. Anschließend wurden die Schichten („Sandwich“) entsprechend der Polung der Apparatur (Membran zur Anode, Gel zur Kathode weisend) in die Transferkammer (XCell SureLock System von Invitrogen) eingespannt (Abbildung 15). Der Transfer erfolgte über 1,5 h bei einer Stromstärke von 24 mA.

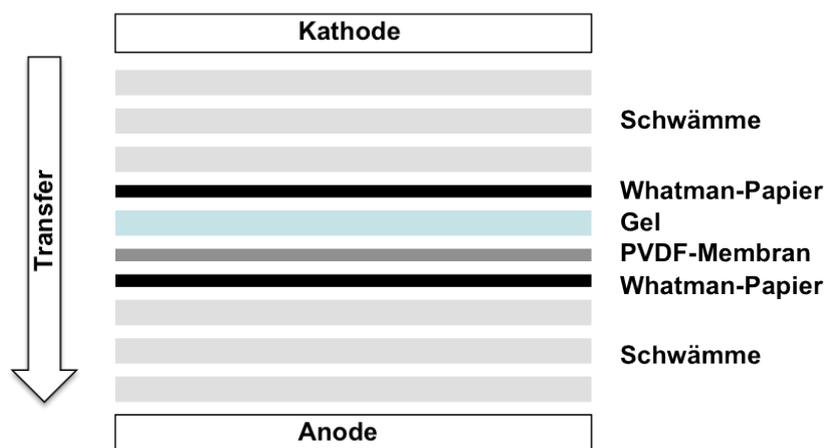


Abbildung 15: Aufbau eines Western Blots.

Bei der Immunfärbung werden Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert und mittels eines Chemilumineszenz-Systems nachgewiesen. Dazu wurde die Membran unmittelbar nach dem Transfer für 1 h mit 5% Milchpulver in TBST geblockt, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird entsprechend der Angaben des Herstellers in 5% Milchpulver in TBST verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Kippschüttler. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran dreimal für 5 min in TBST gewaschen und mit HRP gekoppeltem Sekundärantikörper in TBST + 5% Milchpulver für 1 h bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Fc-Teil des Primärantikörpers (Abbildung 16). Abschließend wurde wieder 3x5 min mit TBST und 1x5 min in TBS gewaschen.

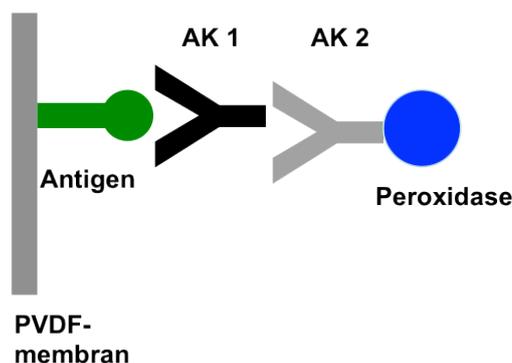


Abbildung 16: Schematische Darstellung über die Funktionsweise eines Western Blots. Beim Western Blot wurden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt. Der zweite Antikörper bindet spezifisch an den Fc-Teil des Primärantikörpers. An ihn ist ein Enzym, die Peroxidase gekoppelt, die nach Zugabe des entsprechenden Substrates zu einer chemilumineszierenden Substanz umgesetzt wird, die für die Sichtbarmachung des Antigens sorgt.

Die Detektion erfolgte aufgrund der Messung der Chemilumineszenz. Hierfür wurde das Super-Signal West Dura Extended Duration Kit (Pierce, Rockford, USA) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Das zugegebene Substrat wird durch die Meerrettich-Peroxidase am Sekundärantikörper zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt, die mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (BioRad GelDoc System) dokumentiert werden konnte.

Die Quantifizierung der Western Blot-Daten erfolgte mit dem Programm Image Lab von BioRad. Die schwächste, aber gerade noch detektierbare Bande, diente als Referenz und wurde auf 1 gesetzt. Nicht detektierbare Banden ergaben den Wert 0.

2.18 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die ELISA-Experimente wurden mit kommerziell erhältlichen ELISA-Kits durchgeführt. Nach Empfehlung der Hersteller wurden alle Plasmaproben 1:10 für den AMBP-ELISA und 1:1000 für den CRP-ELISA verdünnt, um ein Signal innerhalb der Referenzkurve zu erhalten.

Prinzipiell handelt es sich beim CRP-ELISA um einen „Sandwich“-Immunoassay. Die Mikrotiter-Platte ist mit einem Biotin-konjugierten CRP-spezifischen Antikörper versehen. Nachdem die Proben und der Standard pipettiert wurden, wurde eine Avidin-konjugierte „Horseradish-Peroxidase“ (HRP) zugefügt und inkubiert. Nach Zugabe des TMB-Substrates erscheint nur in den Wells, die CRP, Biotin-konjugierten Antikörper und Enzym-konjugiertes Avidin enthalten, ein Farbumschlag. Die Enzym-Substrat-Reaktion wird durch die Zugabe von schwefelsäurehaltiger Lösung abgestoppt und die Farbänderung spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Der AMBP-ELISA der Firma Cusabio ist ein kompetitiver Assay, d.h. es wurde eine kompetitive Inhibitions-Reaktion zwischen dem AMBP in den Proben und Standards und dem HRP-konjugierten AMBP mit dem AMBP-Antikörper auf der Mikrotiter-Platte ausgelöst. Je größer die Menge an AMBP in den Proben, desto weniger Antikörper wird vom HRP-konjugierten AMBP gebunden. Nach Zugabe der Substrat-Lösung entwickelt sich demnach in den Wells mit wenig AMBP ein stärkerer Farbumschlag.

2.19 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte teilweise mit Microsoft Office Excel 2003 und Graphpad Prism Version 5.0. Letzteres beinhaltet alle statistischen Methoden (t-Test, ROC), die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

Alle Grafiken wurden ebenso mit Graphpad Prism Version 5.0 erstellt. Die Unterschiede zwischen den mittels Massenspektrometrie erhaltenen Proteinmengen [ppm] zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem zweiseitigen t-Test bestimmt. Für die statistischen Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von $<0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

2.19.1 Receiver operating characteristics (ROC)

Die Sensitivität und Spezifität eines Labortests bei verschiedenen Entscheidungsgrenzen lässt sich anhand einer ROC-Kurve bestimmen. Die Fläche unter der Kurve ist das Maß für die Leistung bzw. die Vorhersagequalität des Labortests.¹³³ In ROC-Kurven werden die Wertepaare von Spezifität und Sensitivität eines diagnostischen Tests für alle möglichen Cut-off-Punkte innerhalb des Messbereichs aufgetragen. Üblicherweise verwendet man einfach jeden Messpunkt als Cut-off-Wert und erhält so die Sensitivität und Spezifität und diese ergeben die Punkte der ROC-Kurve. Hierbei werden die Spezifität entlang der Abszisse, die Sensitivität entlang der Ordinate aufgetragen. Die Abszisse repräsentiert die Werte $1 - \text{Spezifität}$.

Die **Sensitivität** beschreibt den Anteil der richtig positiv erkannten Patienten an allen Kranken (Richtigpositiv-Rate, rp):

$$rp/(rp+fn)$$

Die **Spezifität** beschreibt den Anteil der richtig erkannten Patienten an den Nicht-Kranken (Richtignegativ-Rate, rn):

$$rn/(rn+fp)$$

Die Fläche unter der Kurve (AUC, *Area under the curve*) bewegt sich zwischen 0,5 für eine rein zufallsbedingte Vorhersage bis zu 1,0 für eine perfekte Vorhersage (Abbildung 17).

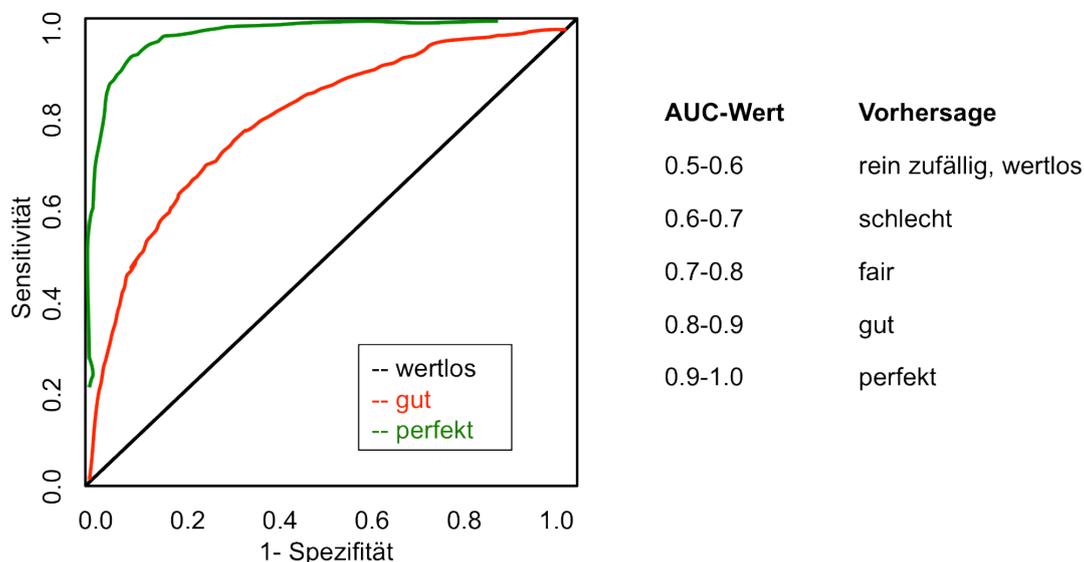


Abbildung 17: Vergleich von ROC-Kurven. Eine perfekte Kurve (grün) liefert einen AUC-Wert von annähernd 1,0. Wertlos dagegen ist ein Wert von 0,5 zu bezeichnen (schwarze Kurve).

2.19.2 Biomarker-Kombinationen

Um zu überprüfen, ob sich der Vorhersagewert bei der Kombination von zwei Biomarkern verbessert, wurden AUC-Werte und Sensitivitäten und Spezifitäten für die Kombination von AMBP mit CRP berechnet. Für beide Biomarker zusammen wurde eine gemeinsame Einheit "Marker Units" (MU) gewählt.

MU wurden definiert als eine lineare Kombination verschiedener Abtrennungsverhältnisse („weighting ratios“) der ermittelten AMBP- und CRP- Konzentration im Plasma. Die Abtrennungs-Koeffizienten K_{CRP} and K_{AMBP} wurden basierend auf dem initialen ELISA-Datenset (Abbildung 18) wie folgt definiert:

$$K_{\text{CRP}} = 12 \mu\text{g}/\text{ml}$$

$$K_{\text{AMBP}} = 3,5 \mu\text{g}/\text{ml}$$

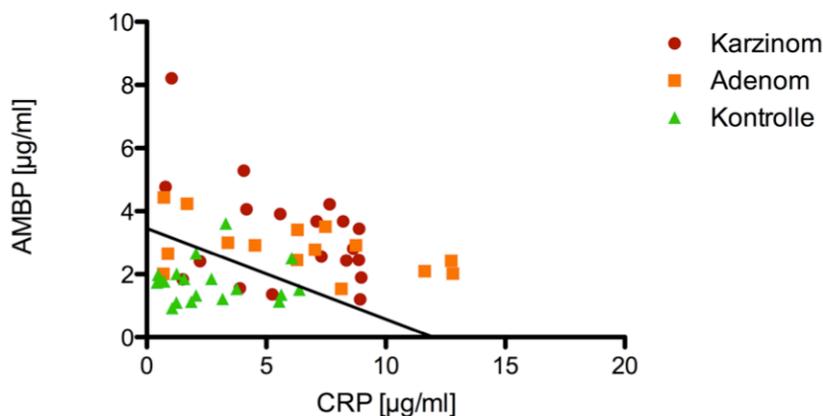


Abbildung 18: Bestimmung eines gemeinsamen Kombinationswertes aus AMBP- und CRP-Konzentrationen anhand verschiedener „weighting ratios“. Durch Anlegen einer Geraden bei $x=3,5$ und $y=12$, die für eine optimale Trennung der Kontroll- und Neoplasie-Gruppen sorgte, konnten die Marker Units bestimmt werden.

Mit Hilfe der oben bestimmten Koeffizienten, wurden die MU wie folgt berechnet:

$$MU = [c(\text{CRP}) / K_{\text{CRP}}] + [c(\text{AMBP}) / K_{\text{AMBP}}]$$

Für weitere ELISA Daten wurde jeweils diese Strategie angewendet und verschiedene „weighting ratios“ ausprobiert. Die hierdurch neu ermittelten MUs wurden bezüglich ihres AUC-Wertes geprüft.

2.20 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde paraffiniertes Kolongewebe von gesundem Kontroll-, Adenom- und Karzinomgewebe von Prof. Michael Vieth (Pathologie, Klinik Bayreuth) und von Dr. Nathalie Britzen-Laurent (Molekulare und Experimentelle Chirurgie, Uniklinik, Erlangen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle Färbungen wurden im Labor von Dr. Benno Weigmann durchgeführt.

2.20.1 Entparaffinierung und Fixierung

Zunächst wurden die Kryostatschnitte über eine absteigende Ethanolreihe entparaffiniert. Hierfür wurden sie zunächst für 10 min in Roti[®]-Histol-Lösung (Roth) inkubiert und anschließend für 20 min in kaltem Methanol + 3% H₂O₂ fixiert. Darauf folgte eine 5-minütige Inkubation in 80% Ethanol-Lösung, anschließend wurden die Schnitte in 70% Ethanol gelegt. Die Schnitte wurden danach mit Aqua dest. und dann mit 1 x PBS gespült. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch die anschließende Inkubation in Protein- und Peroxidase-Blockierungsreagenz

(Roth; Vector labs) für 30 min blockiert und erneut mit 1 x PBS gespült. Danach folgte die fluoreszenzimmunhistologische Färbung.

2.20.2 Inkubation mit Antikörpern

Für die Einzelfärbung von AMBP wurden die Paraffinschnitte zunächst mit dem monoklonalen Antikörper aus der Maus spezifisch für AMBP (Abnova, clone 3F1) in einer Konzentration von 1:250 inkubiert und ÜN bei 4°C in einer feuchten Kammer gelassen. Nach dem Waschen mit 1 x PBS wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Goat-anti-mouse (Biolegend, 1:400 verdünnt) inkubiert und abschließend mit Streptavidin-Dylight⁶⁴⁸ (Invitrogen, 1:200) gefärbt. Für die Doppelfärbung von intestinalen Epithelzellen und AMBP wurde derselbe Antikörper für AMBP wie vorher (1:200 verdünnt) verwendet, aber diesmal wurde mit einem 1:400 verdünnten biotinylierten Horse-anti-mouse Sekundärantikörper (Invitrogen) und anschließend mit Streptavidin-Alexa⁴⁸⁸ (Invitrogen, 1:200) inkubiert. Für die Färbung der intestinalen Epithelzellen wurde ein Antikörper gegen den epithelialen Oberflächenmarker EpCAM (CD326) (Novus Biologicals) in einer Konzentration von 1:200 verwendet. Im Anschluss wurden die Schnitte mit einem Goat-anti-rabbit Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (1:300 verdünnt, Dianova) behandelt. Als Negativkontrolle dienten Gewebeschnitte, die mit den entsprechenden Isotypantikörpern (mouse IgG und rabbit IgG) inkubiert wurden. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Kernfarbstoff *Hoechst 33342* (Life Technologies, 1:2000 verdünnt) gegengefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem Olympus Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70).

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer potentieller Biomarkerkandidaten im Plasma mittels LC-MS/MS

Durch regelmäßige und geeignete Vorsorgeuntersuchungen lässt sich die Inzidenz und Mortalität des Kolonkarzinoms drastisch senken. Bislang existiert kein blutbasierter Screeningtest, der über eine ausreichende Sensitivität und Spezifität verfügt. Idealerweise sollte ein solcher Test sowohl vorhandene Kolonkarzinome als auch deren Vorstufen detektieren können. Adenom- und Karzinom-spezifische Biomarker werden also dringend benötigt.

Studiendesign:

Die Phasen der Biomarker-Entwicklung umfassen die Identifizierung neuer Biomarkerkandidaten (Identifizierungs-Studie), die Qualifizierung, Verifizierung und Validierung der Biomarker (Validierungs-Studie), sowie letztendlich die Kommerzialisierung.⁸⁶ In dieser Arbeit wurde ein Set aus n=30 Plasmaproben zur Identifizierung neuer Biomarkerkandidaten erstellt. In der Validierungs-Studie (n=60) wurde eine größere Patientenanzahl auf die aus der Identifizierungs-Studie hervorgegangenen möglichen Biomarkerkandidaten untersucht. Abbildung 19 zeigt den Studienablauf als Flussdiagramm.

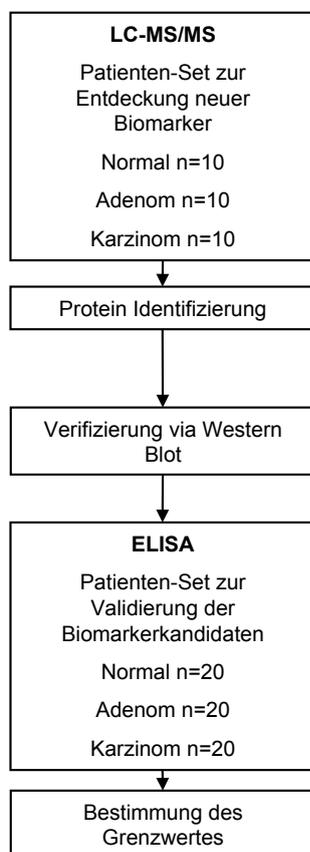


Abbildung 19: Flussdiagramm über den Ablauf der Biomarker-Studie. Ein Patienten-Set mit insgesamt 30 Plasmaproben diente zur Entdeckung neuer potentieller Biomarker. Nach Verifizierung mittels Western Blot und ELISA, wurden im Validierungs-Set weitere Kontrollen (n=20) und Patienten (n=40) untersucht und ein optimaler Grenzwert bestimmt.

Experimenteller Ablauf der Biomarker-Studie:

Zur Identifizierung neuer potentieller Biomarkerkandidaten wurden in einer initialen Studie (Identifizierungs-Studie) jeweils 10 Plasmaproben von gesunden Kontrollen, 10 Patienten mit Adenom und 10 Kolonkarzinom-Patienten massenspektrometrisch untersucht. Jeweils 100 µl Plasma mit einer Gesamt-Proteinmenge von etwa 5 mg wurde für die Depletion mittels spezieller antikörperbasierter Chromatographie-Säulen eingesetzt. In einem ersten Schritt erfolgte die Depletion der 12 hoch abundanten Proteine durch die IgY12 LC10 Säule. Der Durchfluss (Durchfluss 1) gelangte sofort auf eine zweite Säule, die SuperMix LC2. Diese entfernte die etwa 70-80 moderat abundanten Proteine (MAP). Der resultierende Durchfluss (Durchfluss 2) enthält nun die niedrig abundanten Proteine (LAP), wo sich meisten der potentiellen Biomarker befinden. Um die Reproduzierbarkeit der Probenaufbereitung zu gewährleisten, erfolgte die Depletion über die Säulen mit einer automatisierten Methode. Dies ermöglichte einen besseren Vergleich zwischen den Patientengruppen mit den Kontrollen. Die depletierte Proteinfraction (Durchfluss 2) wurde anschließend massenspektrometrisch untersucht. Mittels quantitativer labelfreier LC-MS/MS konnten durchschnittlich 158 Proteine identifiziert werden. Die identifizierten Proteine in den Kontroll- und Patientenproben wurden anschließend verglichen und auf Unterschiede in der Proteinexpression hin untersucht. Hauptsächlich Proteine, die in den Patientenproben eine Hochregulation gegenüber den Kontrollen zeigten, wurden für Western Blot und ELISA Experimente ausgewählt (Validierungs-Studie). Konnte die differentielle Expression der Protein-Biomarkerkandidaten bestätigt werden, wurde in einer letzten statistischen Untersuchung das Potenzial dieser Biomarker für den diagnostischen Einsatz überprüft. Abbildung 20 gibt einen Überblick über den experimentellen Ablauf der Biomarker-Studie.

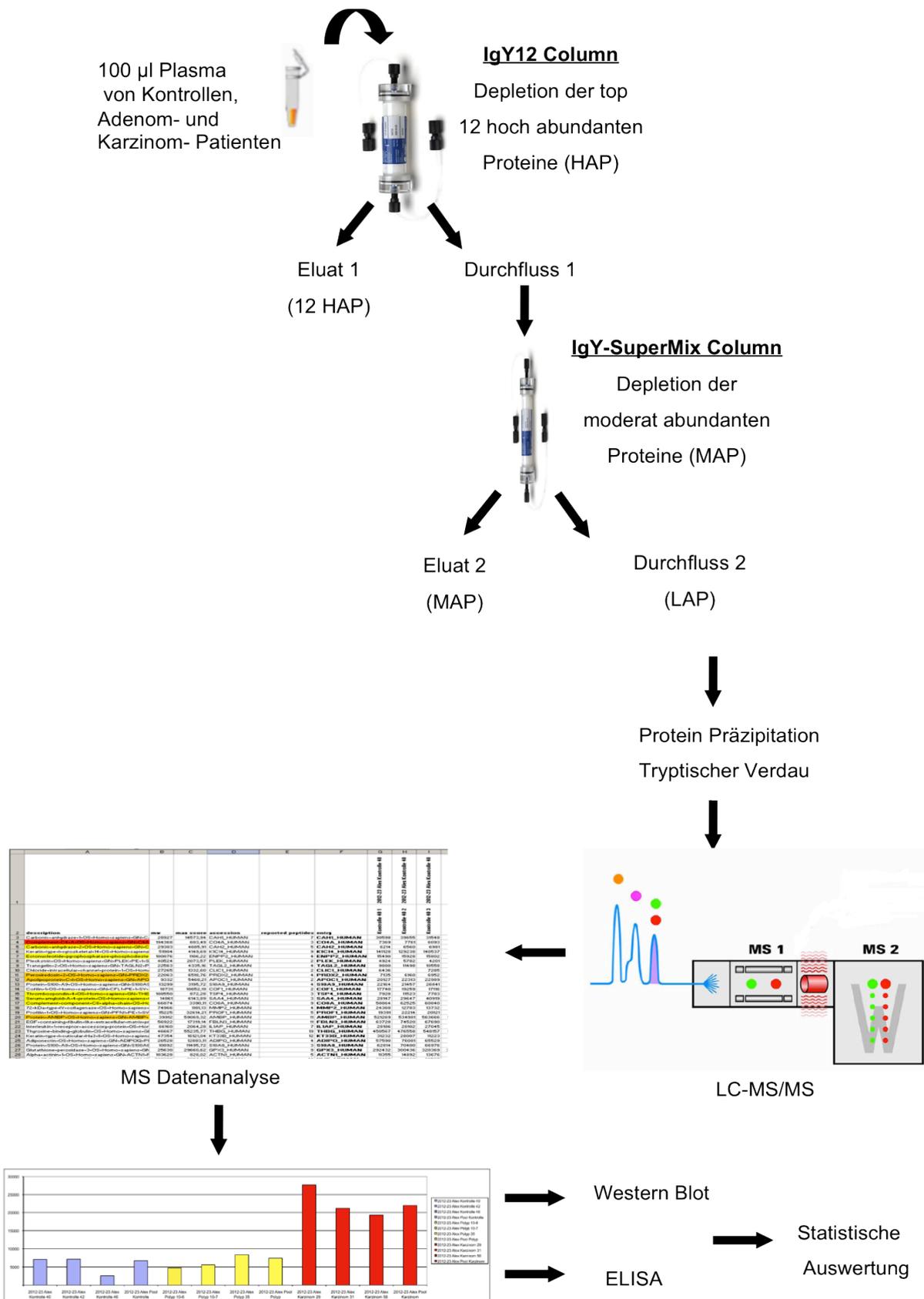


Abbildung 20: Schematischer Aufbau der durchgeführten Experimente zur Detektion neuer Biomarker im Blutplasma.

3.2 Depletion der Plasmaproben

Aufgrund der Komplexität des Plasmaproteoms und der Tatsache, dass lediglich 12 Plasmaproteine etwa 96% der Gesamt-Proteinkonzentration einnehmen, werden niedrig abundante Proteine und somit potentielle Biomarker möglicherweise durch die hoch abundanten Proteine verdeckt. Zur besseren Detektion von potentiellen Biomarkern im Blutplasma wurden in einem ersten Schritt die HAP und MAP mit Hilfe spezieller Depletions-Säulen entfernt. Hierzu wurden die IgY12 LC10 und die IgY SuperMix LC2 von Seppro[®] (damals Beckman Coulter und Genway) verwendet. Sie enthalten Antikörper aus zuvor mit menschlichem Plasma immunisierten Hühnern. Die IgY12 LC10 Chromatographie-Säule entfernt die 12 HAPs, die SuperMix LC2 die etwa 70-80 MAPs. Hierfür wurde eine speziell angepasste automatisierte Separationsmethode angewendet. Nur so lässt sich eine Gleichbehandlung der Proben sicherstellen, was für darauffolgende quantitative Analysen entscheidend ist.

Vor der Injektion der Plasmaprobe wurde diese 1:5 mit Dilutions-Puffer verdünnt und durch eine Filterzentrifugation von etwaigen Partikeln gereinigt. Die 150-minütige Separationsmethode umfasst die Equilibrierung, Elution und Neutralisation der beiden Depletionsäulen. Hierfür wurden entsprechend drei Puffer benötigt. Die drei Fraktionen wurden automatisch aufgefangen und bis zum Aufkonzentrieren bei 4°C oder auf Eis gelagert. Man erhielt ein Chromatogramm wie es in Abbildung 21 dargestellt ist.

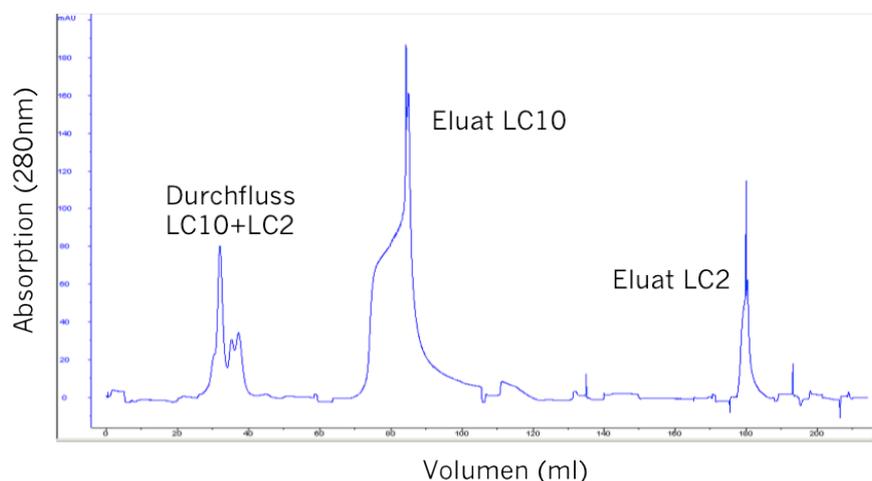


Abbildung 21: Chromatogramm der Plasma-Separationsmethode repräsentativ für eine Plasmaprobe. Die drei Fraktionen Durchfluss LC10+LC2, Eluat LC10 und Eluat LC2 wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Der Durchfluss der beiden Depletions-Säulen wurde für die massenspektrometrische Analyse verwendet.

Das obige Chromatogramm zeigt drei Fraktionen. Anhand der Peak-Höhe und -Breite ließ sich auf die Proteinmenge schließen. Die erste Fraktion repräsentiert den Durchfluss der IgY12 LC10 und SuperMix LC2 Säule. Sie enthält die niedrig abundanten Proteine, die für die weiteren Experimente verwendet wurden. Die hoch abundanten Proteine und somit der Großteil der

Proteinmasse stellt die zweite Fraktion dar. Diese Proteine wurden an die IgY12 LC10 gebunden und mit einem sauren Glycin-Puffer von der Säule eluiert (Eluat LC10). Die eluierten Proteine der SuperMix LC2 Säule stellt die dritte Fraktion dar (Eluat LC2). Die sauren Eluate wurden zuerst mit Neutralisationspuffer (pH 8) neutralisiert. Zusätzlich musste das Volumen der aufgefangenen Fraktionen vor der Weiterverwendung reduziert werden. Hierfür wurden die drei Fraktionen mit Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren erst auf etwa 1-2 ml aufkonzentriert, anschließend mit Vivaspin 500 auf ein Volumen von 100-500 µl eingengt. Die Konzentrationen der Fraktionen sind in der Tabelle der Abbildung 22 eingetragen.

Fraktion	Proteinmenge
Plasma	5 mg
Eluat LC10	4,2 mg
Eluat LC2	0,7 mg
Durchfluss	0,05-0,1 mg

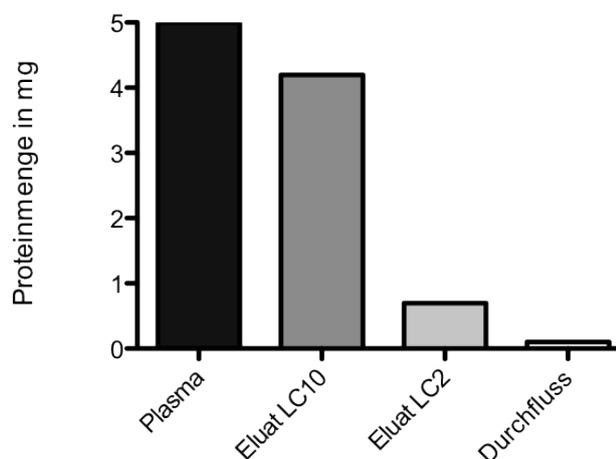


Abbildung 22: Konzentrationen des Plasmas vor und nach der Depletion und der Eluate. Die in der Tabelle aufgeführten Konzentrationen sind rechts als Balkendiagramm dargestellt.

Von etwa 5 mg eingesetzten Gesamtplasma konnten im ersten Depletionsschritt 4,2 mg entfernt werden. Der Durchfluss wies eine Proteinkonzentration von etwa 0,05-0,1 mg auf. Die Tabelle und das zugehörige Balkendiagramm zeigen, dass trotz der geringen Proteinmenge im Durchfluss die meisten Proteine detektiert werden konnten (Abbildung 26, Venn-Diagramm).

Besonderes Interesse wurde auf die Reproduzierbarkeit der Separations-Methode gelegt. Eine automatisierte Methode stellt die Gleichbehandlung für jede einzelne Probe sicher. Dies lässt sich beim Übereinanderlegen der Chromatogramme erkennen (Abbildung 23). Etwaige Peak-Differenzen der Durchfluss-Fraktion beruhen auf der Variabilität der Patientenproben.

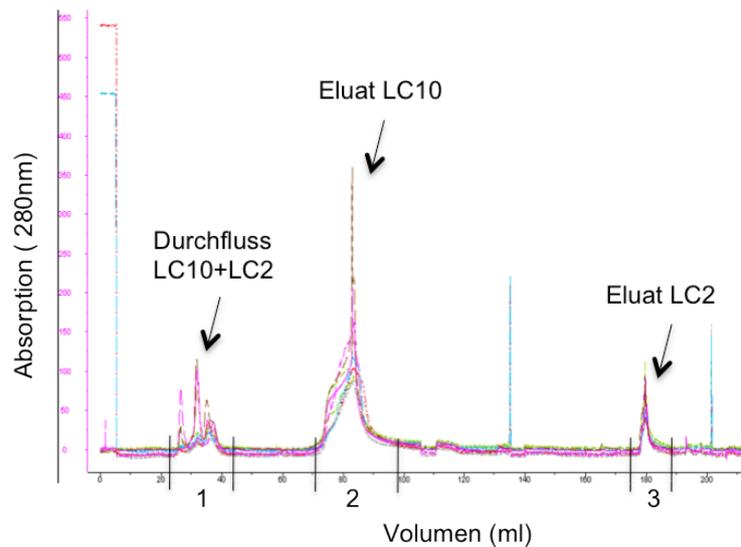


Abbildung 23: Reproduzierbarkeit der Depletionsmethode. Zur Darstellung der Reproduzierbarkeit wurden jeweils die Chromatogramme von 3 Kontrollproben, 3 Adenom- und 3 Karzinomproben übereinandergelegt.

Die Effektivität der Depletion wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 24). Das Bandenmuster der an die IgY12 LC10-Säule gebundenen Proteine (Eluat LC10) gleicht dem des Gesamtplasmas. Die IgY12 LC10 Chromatographie-Säule entfernt nahezu vollständig die hoch abundanten Proteine im Plasma wie Albumin (70 kDa), Transferrin (80 kDa), Apolipoprotein (28 kDa), IgG (50 kDa und 25 kDa) oder Alpha 2-Makroglobulin (180 kDa).

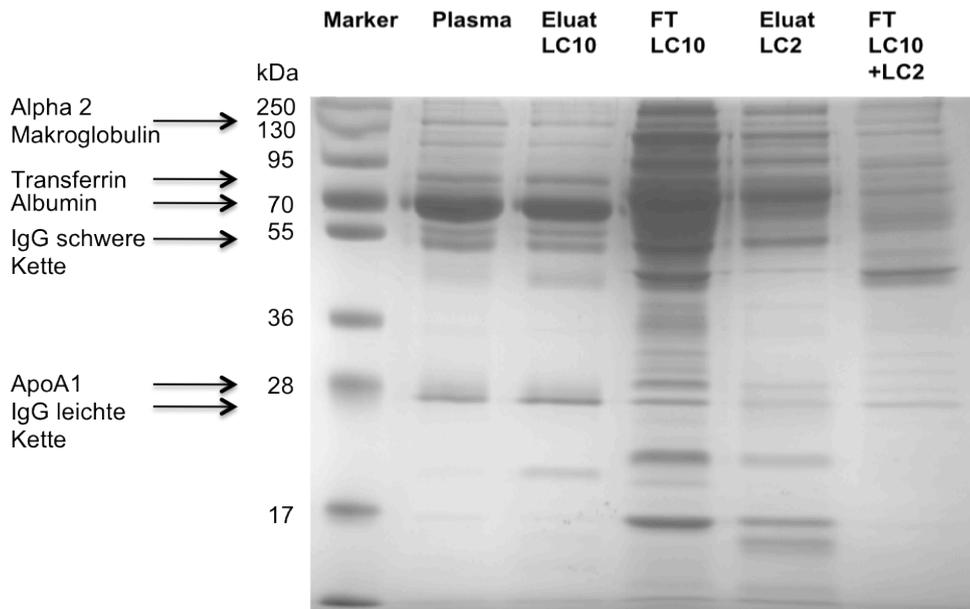


Abbildung 24: SDS-PAGE des Gesamtplasmas sowie der depletierten Fraktionen. Jeweils 5 µg Probe wurde auf ein 14%iges SDS-Gel aufgetragen, welches nach der Auftrennung in kolloidalem Coomassie gefärbt wurde.

Von 5 mg an eingesetzten Plasmaprotein konnten in diesem ersten Schritt alle hoch abundanten Proteine entfernt werden. Ebenso entfernt die SuperMix LC2 Säule (Eluat LC2) einen Großteil der im ersten Durchfluss (FT LC10) enthaltenen moderat abundanten Proteine. Die letzte Gelbande zeigt den Durchfluss beider Säulen (FT LC10+LC2). Dieser enthält die niedrig abundanten Proteine, die mittels Massenspektrometrie weiter analysiert wurden.

3.3 Analyse des Blutplasmas

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit dem Q-TOF Premier Massenspektrometer von Waters mit vorgeschalteter NanoAcquity UPLC. Die mit Trypsin verdauten depletierten Plasmaproben wurden mit zwei Puffern (Puffer A: H₂O mit 0,1% Ameisensäure; Puffer B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril) mit einem Gradienten von 3-35% Puffer B über 90 min aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Bei der anschließenden Datenbanksuche wurde einem Spektrum das zugehörige Peptid zugeordnet.

In der Identifizierungs-Studie wurden in drei unabhängigen Experimenten (n= 3,3,4 Proben pro Gruppe) Plasmaproben von Adenom- und Karzinom-Patienten, sowie von gesunden Kontrollen analysiert. Nach der Depletion der hoch und moderat abundanten Proteine, wurden die Proben aufkonzentriert, gefällt und tryptisch verdaut. Jeweils 20 µg Probe wurde für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt. In jede Probe wurde zusätzlich 25 fmol/µl Enolase gespiked.

Neben dem depletierten Durchfluss wurden auch die beiden Eluate untersucht. Es wurde nach folgenden Kriterien vorgegangen: jede Probe wurde jeweils dreimal gemessen, es wurden für die Auswertung nur Proteine, die in mindestens zwei Messungen detektiert werden konnten, herangezogen. Abbildung 25 zeigt die technische Reproduzierbarkeit der Massenspektrometrie-Messung repräsentativ für 1 Kontrollprobe. Die Replikate weisen untereinander eine hohe Übereinstimmung auf (Korrelationskoeffizient $R^2 > 0.99$).

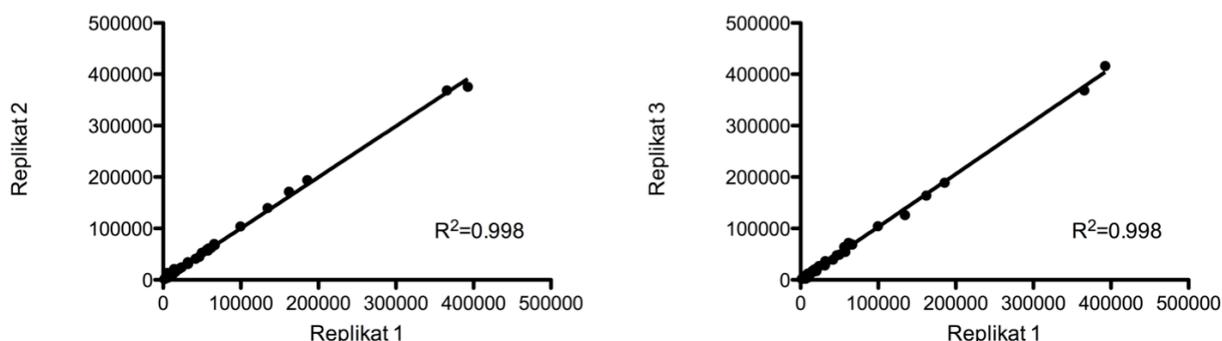


Abbildung 25: Technische Reproduzierbarkeit. Dargestellt ist die TOP3 Intensität dreier Replikate einer ausgewählten Kontrollprobe.

In einem initialen Experiment wurde jeweils der Durchfluss, die eluierte Fraktion der IgY LC10- und das Eluat der SuperMix LC2-Säule einer Plasmaprobe mit der Massenspektrometrie untersucht. Zusammengerechnet konnten über 180 Proteine identifiziert werden (Abbildung 26). Im undepletierten Plasma hingegen konnten nur etwa 130 Proteine identifiziert werden.

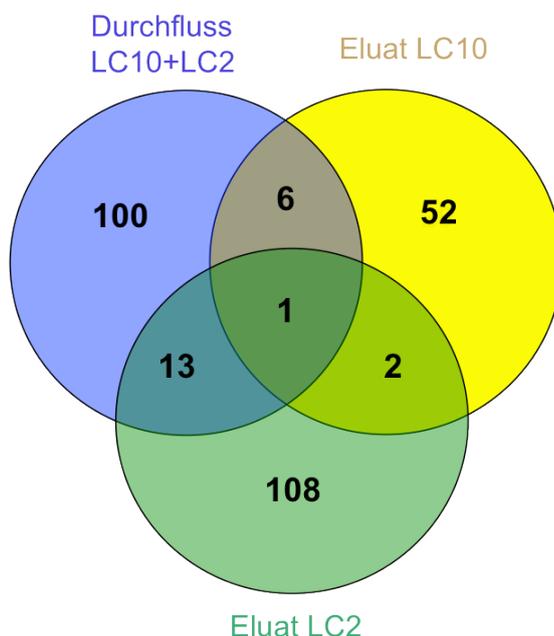


Abbildung 26: Venn-Diagramm identifizierter Proteine der einzelnen Fraktionen mittels LC-MS/MS. Das Venn-Diagramm präsentiert die Anzahl der identifizierten Proteine des Durchflusses und der Eluate. Nur Proteine, die in mindestens zwei der drei Messungen vorkamen, wurden in die Auswertung einbezogen.

Das Venn-Diagramm (Abbildung 26) zeigt, dass wesentlich mehr Proteine an die Säulen gebunden wurden als erwartet, obwohl die IgY12 LC10 Säule nur Antikörper gegen die 12 hoch abundanten Proteine besitzt, die SuperMix Chromatographie-Säule etwa 70-80. Das Ergebnis zeigt, dass zusätzlich Proteine, die wahrscheinlich an hoch abundante Proteinen wie z. B. dem Albumin binden, aus dem Plasma entfernt wurden. Außerdem konnten in der niedrig abundanten Proteinfraction (Durchfluss LC10+LC2) nahezu gleich viele Proteine identifiziert werden wie im Eluat der SuperMix LC2 Säule.

Für die Identifizierungs-Studie wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 3, 3 und 4 Kontroll-, Adenom- und Karzinomproben untersucht. Abbildung 27 zeigt die Anzahl identifizierter Proteine der einzelnen Experimente in der IgY12 LC10 + SuperMix LC2-Durchfluss-Fraktion. Nur Proteine, die in mindestens zwei der drei Messungen vorkamen, wurden für die Auswertung berücksichtigt.

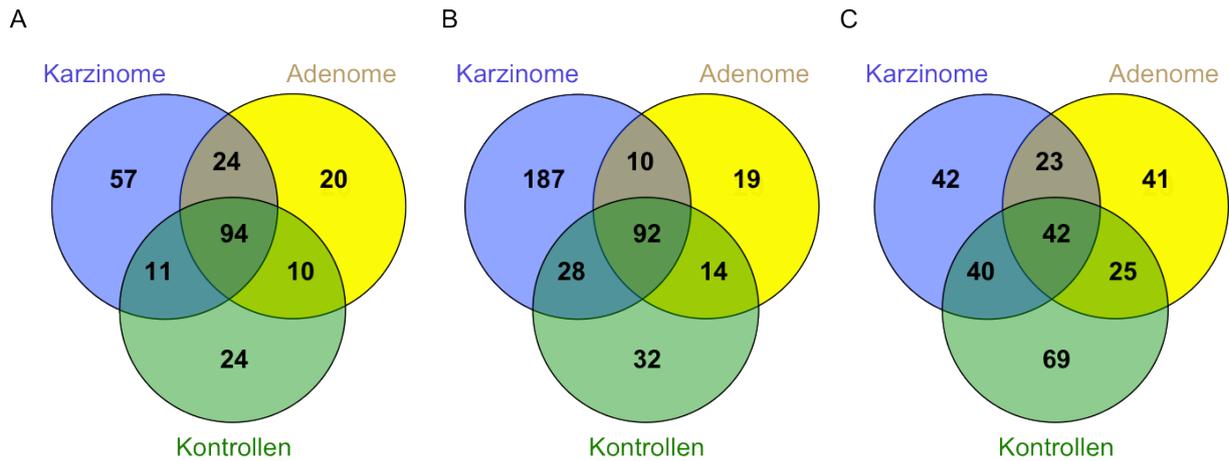


Abbildung 27: Venn-Diagramme aller identifizierter Proteine, die in mindestens zwei der drei Messungen vorkamen. Insgesamt konnten 240 unterschiedliche Proteine in Experiment 1 (A), 382 Proteine in Experiment 2 (B) und 282 Proteine in Experiment 3 (C) identifiziert werden.

In Experiment 1 konnten 240 Proteine in den depletierten Plasmaproben identifiziert werden (Abbildung 27 A). Im zweiten Experiment konnte die größte Anzahl an Proteinen gefunden werden (n= 382) aufgrund einer sehr hohen Anzahl identifizierter Proteine in den Karzinomproben (n= 317). In Experiment 1 und 2 konnten in allen drei Gruppen mehr als 90 identische Proteine identifiziert werden, in Experiment 2 wurden nur 42 gemeinsame Proteine detektiert (Abbildung 27 B). In Experiment 3 konnten nur 282 verschiedene Proteine identifiziert werden, obwohl hierfür jeweils 4 Proben pro Gruppe untersucht wurden (Abbildung 27 C).

Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Anzahl der identifizierten Proteine der depletierten Plasmaproben. Bis zu 295 Proteine konnten in einer Probe mit einer einzigen Messung identifiziert werden. Die Tabelle gibt die durchschnittliche Anzahl der Proteine an, die in den drei durchgeführten Experimenten gefunden werden konnten.

Tabelle 8: Durchschnittliche Anzahl identifizierter Proteine in der Durchfluss-Fraktion. Jede Probe wurde im Triplikат gemessen. Durchschnittlich 158 Proteine konnten pro Messung und Probe in den drei Experimenten identifiziert werden. Bis zu 295 Proteine konnten in einer einzigen Messung gefunden werden (Falschpositiv-Rate=3%).

Mittelwerte Anzahl identifizierter Proteine				
Proben-Gruppe	Experiment 1 n = 3	Experiment 2 n = 3	Experiment 3 n = 4	Mittelwert
Kontrollen	147	193	133	157
Adenome	154	146	172	157
Karzinome	172	167	139	159

Um den dynamischen Bereich der identifizierten Proteine zu ermitteln, wurden die Proteinkonzentrationen in einem Diagramm dargestellt. Die Ordinate gibt den 10er Logarithmus der Proteinkonzentrationen in pg/μl an, die Abszisse gibt die Anzahl identifizierter Proteine wieder (Abbildung 28).

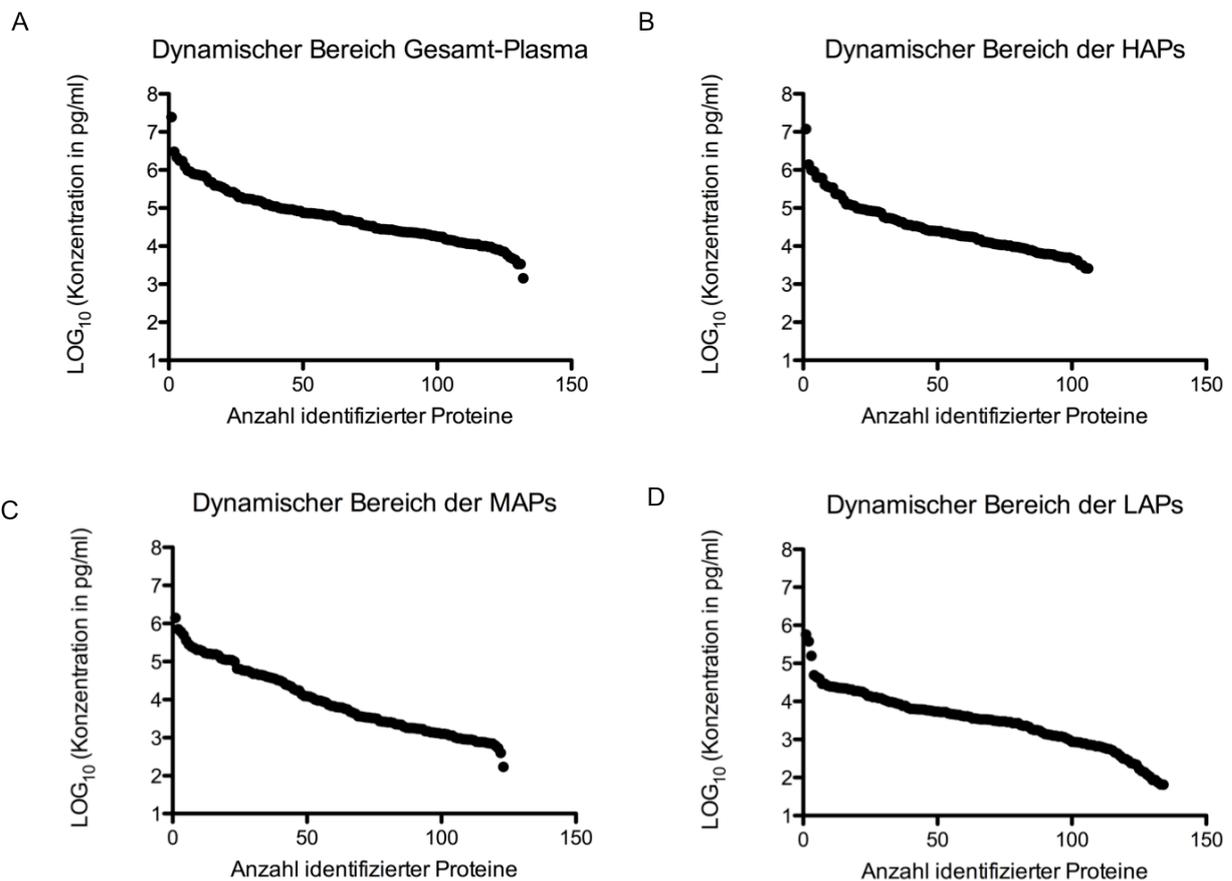


Abbildung 28: Dynamischer Bereich des undepletierten Gesamtplasmas (A), der HAPs (B), MAPs (C) sowie der LAPs (C).

Die hoch abundanten Proteine (HAP) umfassen einen logarithmischen Bereich von etwa 10^3 bis 10^7 (Abbildung 28 B), die niedrig abundanten Proteine von 10^2 bis 10^6 (Abbildung 28 D). Dies entspricht einem dynamischen Bereich von 4 Größenordnungen. Der dynamische Bereich der MAP liegt zwischen dem der HAPs und LAPs (Abbildung 28 C). In der LAP-Fraktion konnten zudem die meisten Proteine identifiziert werden. Zusammengenommen konnte ein dynamischer Bereich von etwa 10^2 - 10^8 , also 6 Größenordnungen für die HAPs, MAPs und LAPs abgedeckt werden. Bei Betrachtung des Komplet-Plasmas konnten nur 4-5 Größenordnungen abgedeckt werden (Abbildung 28 A).

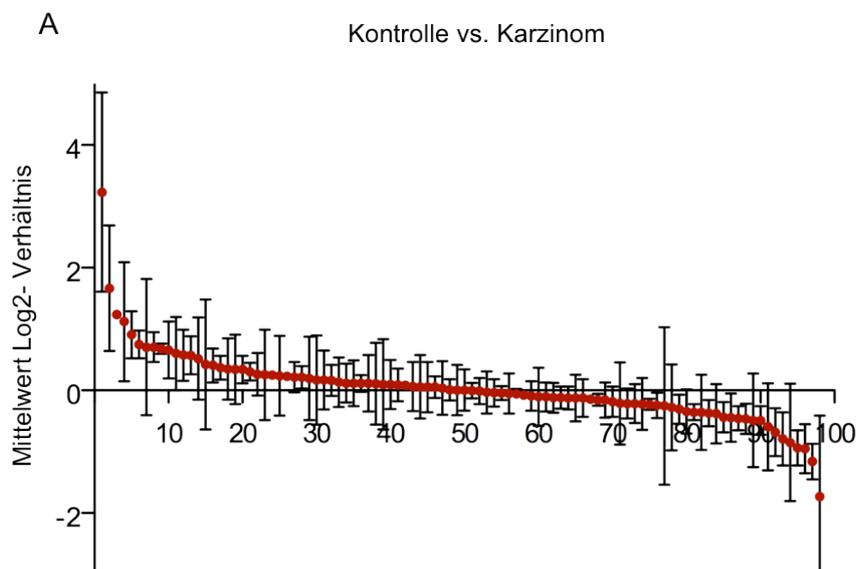
3.4 Auswertung der MS-Daten und Entdeckung neuer potentieller Biomarkerkandidaten

Die mit dem Q-TOF Premier Massenspektrometer gewonnenen Daten wurden per Hand mit Microsoft Excel und Access ausgewertet. Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit wurden die Daten mit einer im Institut für Immunologie/AG Dr. Tenzer entwickelten Software (ISOQuant) erneut analysiert und verifiziert. Beim Vergleich der Proteinkonzentrationen ließen sich Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Neoplasie-Gruppen erkennen. Eine große Anzahl an Proteinen, die sowohl in allen drei als auch in den einzelnen Experimenten im Gegensatz zu den Kontrollen hochreguliert bzw. runterreguliert waren, konnten ermittelt werden.

Auswahlkriterien:

Potentielle Biomarkerkandidaten waren Proteine, die gegenüber den Kontrollen in den Adenom- und Karzinom-Proben erhöht waren. Bedeutsam waren Proteine, die eine Hochregulation zwischen Kontrollen und Adenomen aufwiesen, da diese für die Erkennung von Vorstufen des Kolonkarzinoms dringend benötigt werden. Die Proteine mit der stärksten Hochregulation in allen drei Experimenten sowie in einzelnen Messungen wurden ausgewählt, sowie Proteine, die laut Literatur eine Verbindung zur Pathogenese des Kolonkarzinoms aufwiesen, wurden in Betracht gezogen. Proteine, die zu große Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten zeigten, wurden nicht in die Auswahl einbezogen.

Die differentielle Regulierung der Proteine wurde über das Log2 Verhältnis von Kontrollen gegenüber Adenomen und Karzinomen für jedes der drei Experimente berechnet. Der Mittelwert aus den drei Log2-Verhältnissen zeigt Abbildung 29 A für die Karzinome gegenüber den Kontrollen und Abbildung 29 B für Adenome gegenüber den Kontrollen.



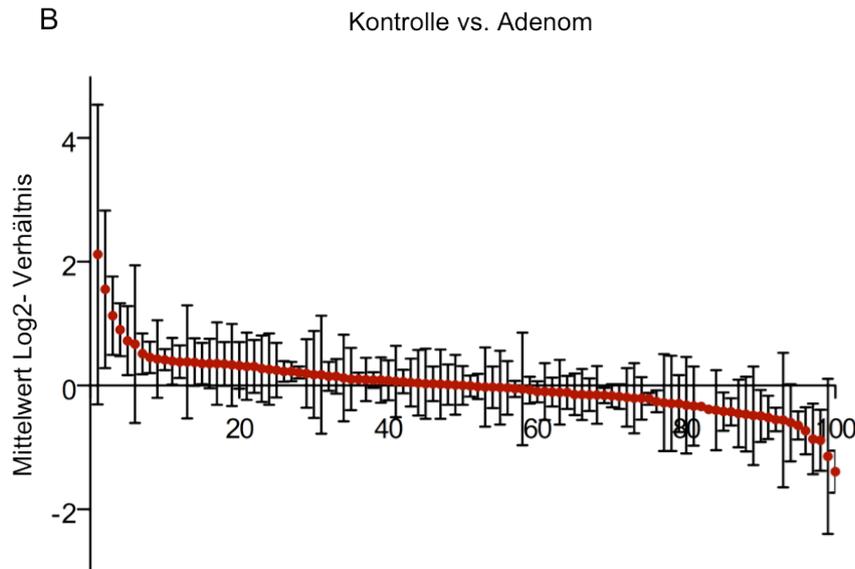


Abbildung 29: Differenziell regulierte Proteine in den Karzinom- und Adenom-Proben. Die Grafik zeigt die logarithmische Auftragung der Änderung der identifizierten Proteine in der Karzinom- (A) und Adenomgruppe (B) gegenüber den Kontrollen inklusive ihrer Standardabweichungen (n=3 Experimente).

Etwa 30-35 Proteine konnten in den Karzinom- und Adenom-Proben erhöht detektiert werden, ebenso viele zeigten eine geringere Expression im Gegensatz zu den Kontrollen. Proteine, die in mindestens zwei Experimenten die größte Differenz zu den Kontrollen zeigten sowie weitere, zum Teil in der Literatur in Verbindung mit malignen Tumoren erwähnte potentielle Kandidaten wurden ausgewählt und in Abbildung 30 in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Diese ausgewählten Proteine sind in Tabelle 9 entsprechend ihres Log2-Verhältnisses Karzinom zur Kontrolle aufgelistet.

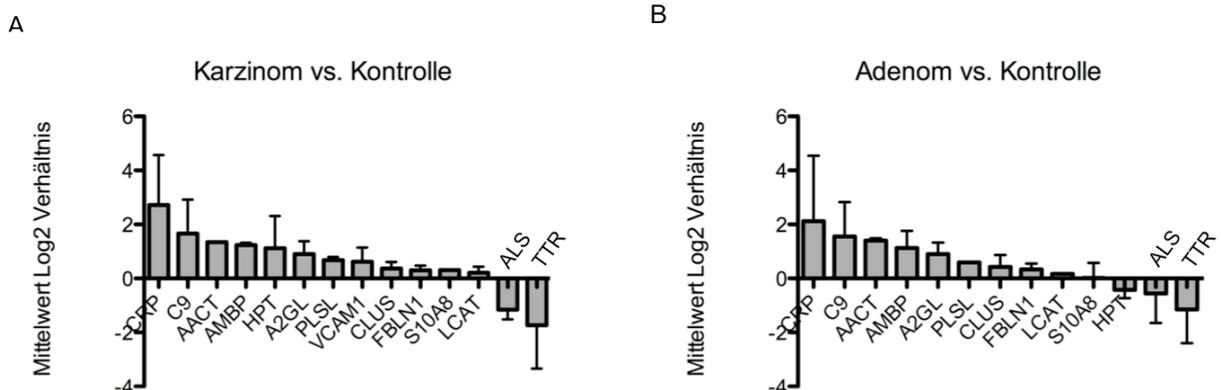


Abbildung 30: Balkendiagramm möglicher Biomarkerkandidaten für das Kolonkarzinom sowie dessen Vorstufen. (A) Ausgewählte Proteine, die in mindestens zwei Experimenten eine starke Hoch- bzw. Runterregulation in den Karzinom-Proben gegenüber den Kontrollen aufwiesen. (B) Ausgewählte Proteine, die in mindestens zwei Experimenten eine starke Hoch- bzw. Runterregulation in den Adenom-Proben gegenüber den Kontrollen aufwiesen.

Ein vielversprechendes Protein war das C-reaktive Protein (CRP). Dieses akute Phase Protein zeigte die stärkste Hochregulation der gefundenen Proteine, gefolgt von der Komplement Komponente 9 (C9), Alpha-1-antichymotrypsin (AACT), Alpha-1-Mikroglobulin/Bikunin Precursor (AMBp) und Leucine-rich alpha-2 Glykoprotein 1 (A2GL), die außer AACT in allen drei Experimenten erhöht detektiert werden konnten (siehe Tabelle 9, fett hervorgehoben). Ebenso konnte man Proteine mit einer deutlich niedrigeren Regulation gegenüber den Kontrollen finden. Hierzu zählten Transthyretin (TTHY oder TTR) und das Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-bindende Protein ALS oder IGFALS (*insulin like growth factor binding protein, acid labile subunit*) mit dem größten Unterschied zu den Kontrollen. Die genannten Proteine sind ebenso bei den Adenom-Patienten hochreguliert und somit als Biomarkerkandidaten zur Erkennung von Vorstufen des Kolonkarzinoms von besonderem Interesse.

Tabelle 9: Differenziell regulierte Proteine in der Durchfluss-Fraktion von Adenom- und Karzinom-Patienten. Die Tabelle gibt einen Überblick über die ausgewählten Proteine, ihre Accession-Nummer, Molekulargewicht und in welchem Experiment sie erhöht bzw. erniedrigt vorgefunden werden konnten. Unterschiede in der Proteinexpression zwischen Karzinom- bzw. Adenomproben und Kontrolle und zwischen Karzinom- und Adenom-Proben sind als Mittelwert ihres Log2-Verhältnisses angegeben. Die Reihenfolge der Auflistung erfolgte nach dem Log2-Verhältnis Karzinom vs. Kontrolle. Die fett hervorgehobenen Proteine könnten sich besonders als Biomarkerkandidaten eignen. (* dieses Protein wurde im genannten Experiment stark erhöht vorgefunden, in einem zweiten allerdings erniedrigt).

Accession Nummer	Gen-symbol	Beschreibung	Molekulare Masse (kDa)	Experiment	Mittelwert Log2 Verhältnis		
					Karzinom/ Kontrolle	Adenom/ Kontrolle	Karzinom/ Adenom
P02741	CRP	C-reaktives Protein	25,0	alle	3,23	2,12	2,61
P02748	CO9	Komplement Komponente 9	63,2	alle	1,67	1,56	0,78
P01011	AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	47,7	1*	1,34	0,67	1,62
P02649	AMBP	Alpha-1-Mikroglobulin Bikunin Preprotein	39,0	alle	1,24	1,13	0,62
P02750	A2GL	Leucine rich alpha 2 Glykoprotein 1	38,2	alle	0,91	0,41	1,05
P13796	PLSL	L Plastin	70,3	1+2	0,68	0,59	0,28
P19320	VCAM1	Vasculäres Zell-adhäsions-molekül 1	81,3	1+2	0,58	-	-0,09
P10909	CLUS	Clusterin	52,5	alle	0,37	0,43	0,02
P05109	S10A8	S100A8 Kalzium-bindendes Protein	10,8	2*	0,31	0,42	0,56
P23142	FBLN1	Fibulin 1	77,2	alle	0,31	0,34	-0,25
P04180	LCAT	Lecithin-cholesterol Acyltransferase	49,6	alle	0,21	0,17	0,03
P35858	ALS	Insulin like growth factor binding protein complex acid labile subunit	66,0	alle	-1,16	-0,56	-0,55
P02766	TTHY	Transthyretin	15,9	alle	-1,70	-1,14	-0,62

Da ein 2er Logarithmus von 1 eine zweifache Änderung bedeutet, heißt das für das CRP, dass dieses im Vergleich zur Kontrolle mehr als 9-fach stärker exprimiert wird (Log2-Verhältnis von

3,23). Für C9 wurde ein mittleres Log₂-Verhältnis von 1,67, für das AMBP wurde 1,24 berechnet und für A2GL 0,91 beim Vergleich der Karzinome mit den Kontrollen. Die genannten Proteine weisen zugleich eine Hochregulation im Plasma der Adenom-Proben auf. Das CRP zeigt ebenfalls die stärkste Hochregulation bei den Adenomen im Gegensatz zur Kontrolle (Log₂-Verhältnis von 2,12). Bei der Komplement Komponente 9 ergab sich ein Log₂-Verhältnis von 1,56, für das AMBP wurde 1,13 und für A2GL 0,41 berechnet. Diese vier Proteine könnten als potentielle Biomarker für das Erkennen von Vorstufen des Kolonkarzinoms, den sog. Adenomen fungieren. Aus diesem Grund sollten diese Proteine in weiteren Experimenten auf ihre Eignung als Plasma-Biomarker überprüft werden. Unter den genannten Proteinen wies AMBP die geringste Standardabweichung (Stabw=0,6) zwischen den einzelnen Experimenten auf. Es war das einzige Protein, das bei allen drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten beim Vergleich der Karzinome mit den Kontrollen die ähnlichsten Werte aufwies. Die AMBP-Konzentration in den Adenom-Proben war durchschnittlich mehr als zweifach erhöht gegenüber den Kontrollen (Log₂-Verhältnis von 1,13).

Die beiden Proteine, die gegenüber den Kontrollen die geringsten Konzentrationen im Plasma aufwiesen, waren TTR (auch TTHY) und ALS. TTR zeigte ein Log₂-Verhältnis von -1,77 und -1,14 was einer mehr als dreifachen bzw. doppelten Verminderung im Plasma von Karzinom- und Adenom-Patienten entsprach.

Weitere interessante Proteine waren Fibulin, Clusterin, Platin 1, VCAM, die in mindestens zwei Experimenten erhöht vorgefunden werden konnten. Weiterhin konnten Alpha-1-antichymotrypsin (AACT oder auch SerpinA3) und S100A8/S100A9 in einzelnen Experimenten erhöht vorgefunden werden und sollten mittels Western Blot bestätigt werden. Letztere Proteine wurden ausgewählt, da sie bereits in vorausgegangenen Studien eine differentielle Expression in Patienten mit KRK aufwiesen und evtl. eine Rolle in der Karzinogenese spielen^{134–136}.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass an erster Stelle der hochregulierten und an erster Stelle der am stärksten runterregulierten Proteine jeweils ein Akute-Phase (CRP) und Anti-akute-Phase Protein (TTR) steht. Es ist bereits mehrfach publiziert worden, dass Entzündungsfaktoren eine Rolle in der Pathogenese des Kolonkarzinoms spielen.^{1,137,138}

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach massenspektrometrischer Analyse sich vier Proteine heraussonderten, die als potentielle Biomarker sowohl für Kolonkarzinome als auch für Adenome in Betracht kamen und in allen drei Experimenten detektiert werden konnten: (1) das CRP aufgrund seiner stärksten Hochregulation in den Karzinom-, und Adenom-Proben, (2) das AMBP, da es in allen Experimenten eine gleichermaßen starke Hochregulation in den Neopla-

sie-Patienten aufwies (geringste Standardabweichung zwischen den einzelnen Experimenten), (3) die Komplement Komponente 9, die zwar in der Literatur bereits als Biomarkerkandidat für das Kolonkarzinom^{102,139,140}, aber noch nicht für Adenome beschreiben ist und (4) das A2GL oder auch LRG1, da es ebenfalls in allen Experimenten in den Neoplasie-Proben verstärkt exprimiert wurde.

3.5 Verifizierung der MS-Daten mittels Western Blot

In Western Blot Experimenten sollten die potentiellen Biomarkerkandidaten verifiziert werden. Für die Western Blot Experimente wurden nur Antikörper gegen die hochregulierten Proteinkandidaten ausgewählt. Die identifizierten Proteine, die eine niedrigere Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen in den mittels LC-MS-generierten Daten (TTR und ALS) aufwiesen, wurden daraufhin im ELISA nachgewiesen. Für die nachfolgenden Versuche wurde das komplette, undepletierte Blutplasma verwendet.

Die Kontrollen und Adenom- bzw. Karzinom-Proben wurden auf ein 10%- oder 12%iges SDS Gel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern, die gegen die ausgewählten Biomarker-Kandidaten gerichtet sind, über Nacht bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurde die Intensität der Banden bestimmt. Die Werte der Ordinate (y-Achse) geben die Erhöhung der Bandenintensität in Relation zur niedrigsten Intensität an. Die niedrigste, noch messbare Intensität wurde auf 1 gesetzt.

Wie mit Hilfe der Massenspektrometrie ermittelt, konnten für das C-reaktive Protein sehr hohe Konzentrationen in den Karzinom-Proben relativ zu den Kontrollen gemessen werden. CRP mit einer molekularen Masse von 25 kDa zeigte auch im Western Blot sehr starke Banden bei den Karzinom-Patienten (Abbildung 31). In den Kontrollen ließ sich das CRP nicht nachweisen bzw. war aufgrund der sehr starken Expression in den Karzinom-Proben kaum detektierbar. Auch bei den Adenom-Proben konnte man einen eindeutigen Unterschied zu den Kontrollproben erkennen.

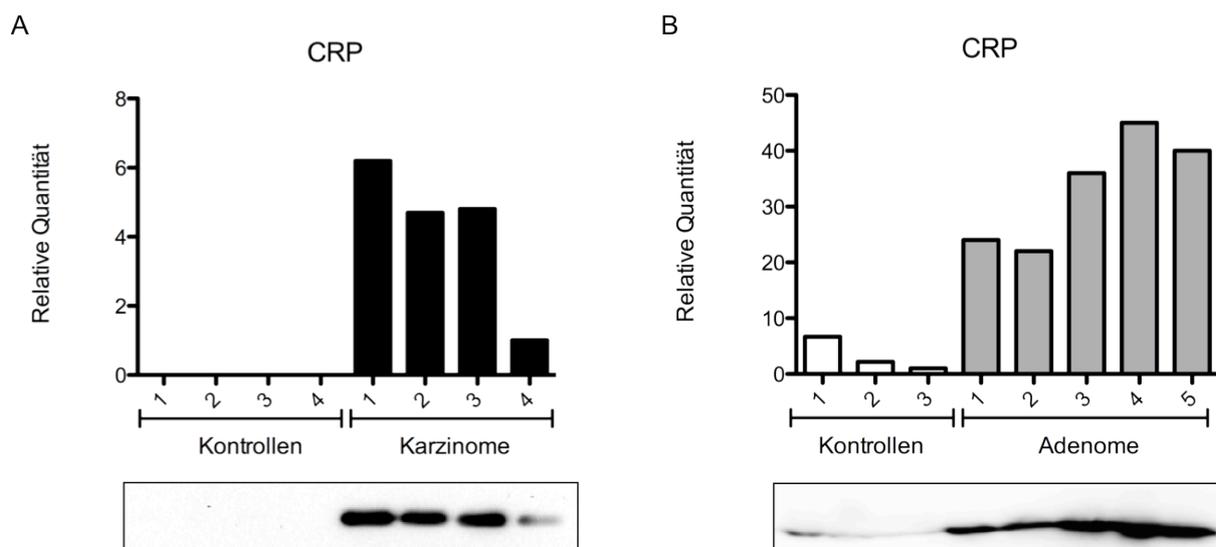


Abbildung 31: Western Blot Analyse für das C-reaktive Protein (CRP). Es wurde Gesamtplasma von 4 Kontrollen und 4 Karzinom-Patienten (A) und 3 Kontrollen und 5 Adenom-Patienten (B) untersucht. Die Balkendiagramme zeigen die relative Quantität der Banden. Die schwächste, gerade noch detektierbare Bande diente als Referenz und wurde auf 1 gesetzt.

Ein weiteres interessantes Protein, das sich bei der massenspektrometrischen Analyse als potentieller Kandidat zur Unterscheidung zwischen Kontrollen und Adenom und/oder Karzinom-Proben erwies, war das Protein Alpha-1-Mikroglobulin/Bikunin Precursor (AMBP). Dieses Protein lag im Vergleich zur Kontrolle sowohl in den Adenom- als auch in den Karzinom-Proben vermehrt vor. Abbildung 33 A lässt erkennen, dass bei etwa 3 von 4 Patienten-Proben eine erhöhte Proteinkonzentration nachgewiesen werden konnte. Das AMBP-Precursor Protein besitzt eine molekulare Masse von 39 kDa. Die detektierten Banden liegen jedoch bei etwa 36 kDa, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um das Spaltprodukt Alpha-1-Mikroglobulin (A1M) des AMBP Proteins handeln könnte (33 kDa).

Das Balkendiagramm zeigt die relative Quantität der Banden. Bei den Karzinomen konnte eine 4-20-fach höhere Bandenstärke im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Abbildung 32 A). Bei den Adenomen ließ sich eine 2-3-fach höhere Intensität der Banden berechnen (Abbildung 32 B).

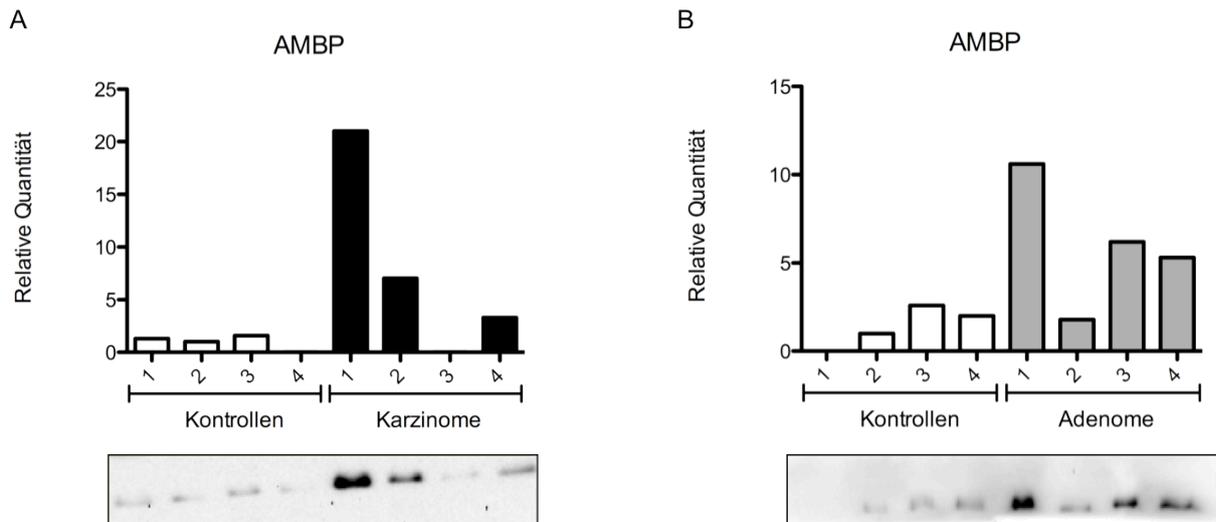


Abbildung 32: Western Blot mit einem Antikörper gegen AMBP gerichtet. Es wurden jeweils 4 Kontrollen mit 4 Karzinomproben (A) und 4 Adenomproben (B) untersucht und die Banden-Intensität in einem Balkendiagramm dargestellt.

Ebenso zeigte die Komplement Komponente C9 mittels Massenspektrometrie eine Hochregulation in den Adenom- und Karzinomproben im Vergleich zur Kontrolle. Wie in der Abbildung 34 zu erkennen ist, konnte dies im Western Blot bestätigt werden. Nach Inkubation mit einem Antikörper gegen C9 erhält man eine spezifische Bande bei 70 kDa. Es ist eine eindeutige Trennung der Karzinom-Patienten von den Kontroll-Patienten zu erkennen (Abbildung 33 A). In jeder Karzinom-Probe konnte eine höhere Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Allerdings ist hier kein signifikanter Unterschied bei den Adenomen festzustellen (Abbildung 33 B).

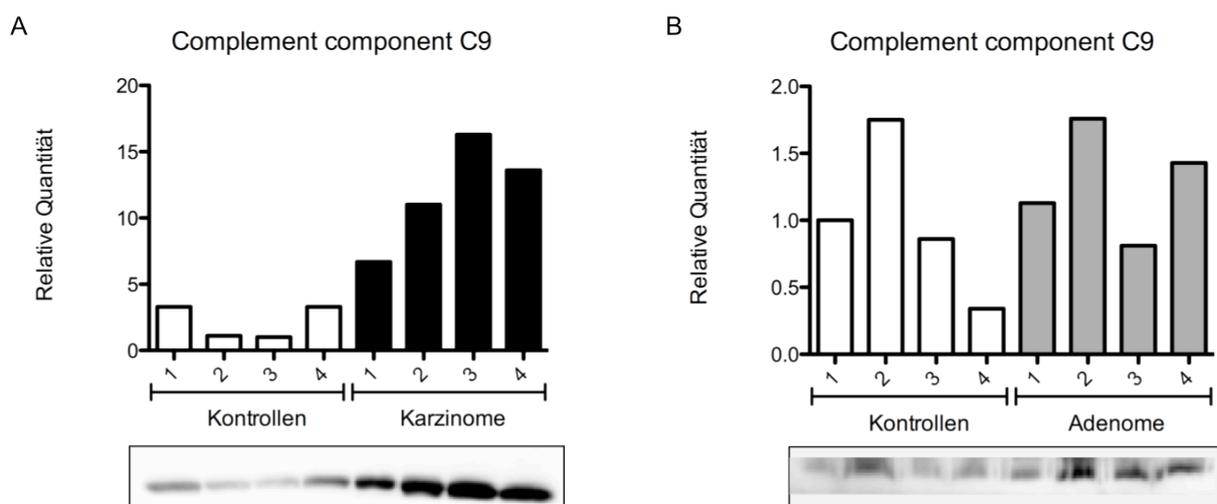


Abbildung 33: Western Blot mit Antikörper gegen Complement component 9 gerichtet. Es wurden jeweils 4 Kontrollen mit 4 Karzinomproben (A) und 4 Adenomproben (B) untersucht und die Banden-Intensität in einem Balkendiagramm dargestellt.

Das Glykoprotein A2GL (LRG1) konnte bereits bei verschiedenen Karzinomarten¹⁴¹⁻¹⁴³ sowie bei Patientinnen mit Kolonkarzinom vermehrt vorgefunden werden¹⁴⁴. Das ca. 50 kDa große LRG1 konnte in dieser Arbeit sowohl in den Adenom- und Karzinom-Proben mit Hilfe der Massenspektrometrie vermehrt detektiert werden. Im Western Blot ließ sich jedoch kein Unterschied in der Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollen erkennen (Abbildung 34).

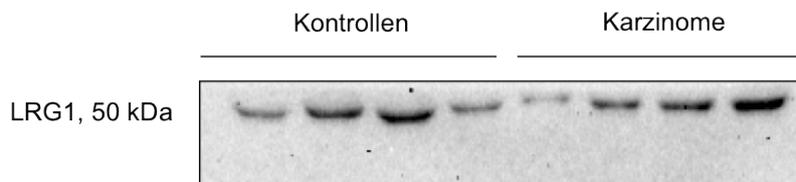


Abbildung 34: Western Blot mit Antikörper gegen LRG1 gerichtet.

Es fiel jedoch auf, dass die Banden der Karzinom-Proben etwas höher liefen im Gegensatz zu den Kontrollen. Das bedeutet, dass das LRG1 in den Karzinom-Proben ein höheres Molekulargewicht aufweist. Laut Literatur liegt dieses Protein vielfach glykosyliert vor, was einen Größenunterschied von bis zu 11 kDa (44-55 kDa) ausmachen kann^{141,145}. Ebenso verhielt sich das weiter unten beschriebene LCAT (Abbildung 38).

Unter den gelisteten Proteinen in Tabelle 9, die nur in einzelnen Experimenten eine Hochregulation zeigten, konnten folgende im Western Blot nachgewiesen werden: Alpha-1-antichymotrypsin (auch SerpinA3) und S100A9. Das kalzium-bindende Protein S100A9, das zusammen mit S100A8 auch Calprotectin genannt wird, ist bereits als Serummarker für das KKR bekannt.¹³⁵ Abbildung 35 zeigt auf, dass S100A9 sowohl in den Adenom- als auch in den Karzinom-Proben exprimiert wird. In den Kontrollen ließ sich S100A9 nicht nachweisen.

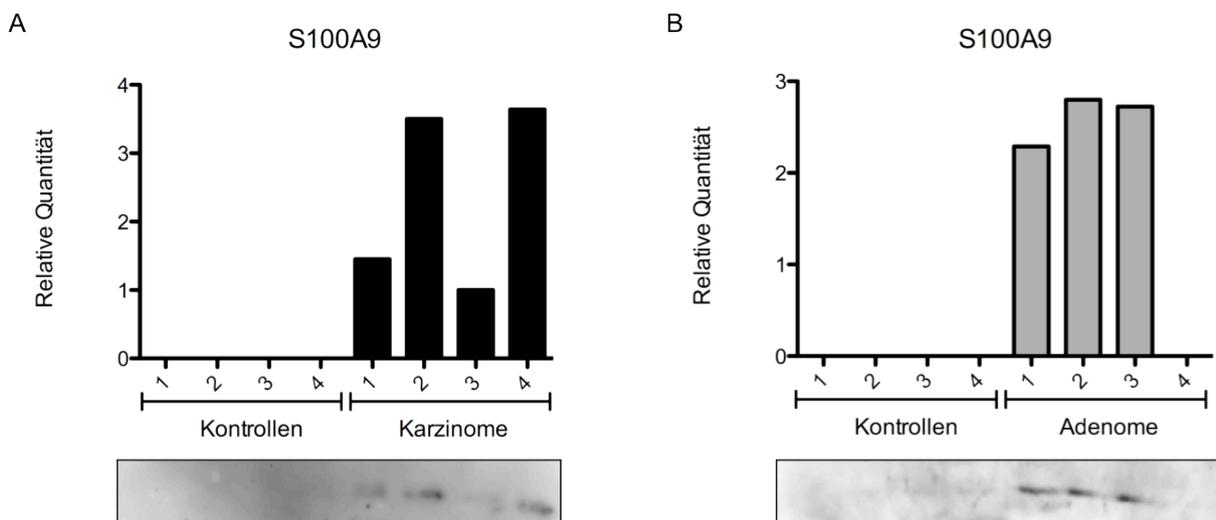


Abbildung 35: Western Blot mit einem Antikörper, der gegen S100A9 gerichtet ist. Es wurden jeweils 4 Kontrollen mit 4 Karzinomproben (A) und 4 Adenomproben (B) untersucht und die Banden-Intensität in einem Balkendiagramm dargestellt.

Eine deutliche Hochregulation des SerpinA3 Proteins konnte ebenfalls mit Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 36). Das Glykoprotein SerpinA3 besitzt ein Molekulargewicht von 47,7 kDa und ist wie das CRP ein Akute-Phase-Protein, das bei Entzündungen im Körper freigesetzt wird.^{146,147} Die Quantitätsbestimmung zeigt eine 3- bis 5-fach verstärkte Expression in den Karzinom-Proben.

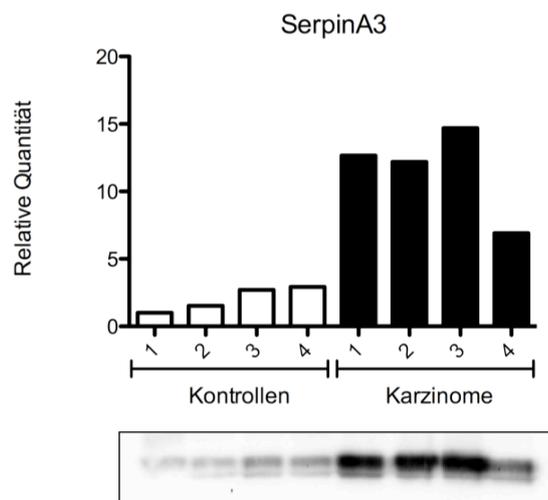


Abbildung 36: Western Blot mit einem Antikörper gegen SerpinA3. Es wurden jeweils 4 Kontrollen und 4 Karzinomproben untersucht und die Banden-Intensität in einem Balkendiagramm dargestellt.

Nach Bestätigung der Daten aus der Massenspektrometrie für die Karzinomproben wurde entsprechend ein Western Blot mit Adenomproben durchgeführt. Dieser zeigte jedoch keine erhöhte Expression von SerpinA3 gegenüber den Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurden die nur in einzelnen Experimenten erhöht detektierten Proteine aus Tabelle 9 mittels Western Blot nachgewiesen. Es konnten die mit Hilfe der Massenspektrometrie erhaltenen Daten für die Proteine Clusterin, L Platin und VCAM 1 im Western Blot nicht bestätigt werden (Abbildung 37).

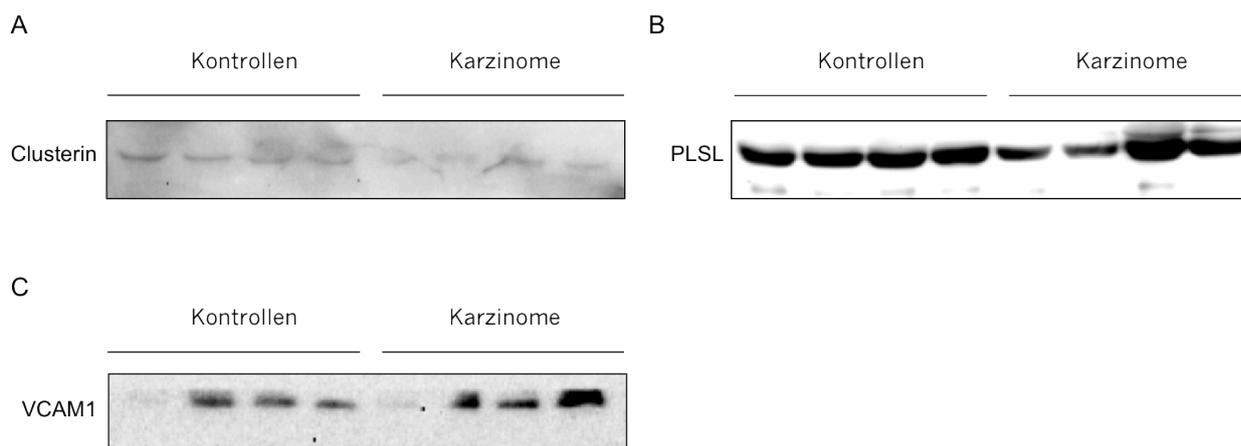


Abbildung 37: Western Blot der Proteine Clusterin (A), L Plastin (B) und VCAM 1 (C). Es wurden jeweils 4 Kontrollen und 4 Karzinome untersucht.

Wie bereits für LRG1 beschrieben, konnte auch für das Protein LCAT eine vermutliche differentielle Expression in den Karzinom-Proben beobachtet werden. Abwechselnd Kontrollen und Karzinome aufgetragen, brachte den Unterschied in der Bandenhöhe noch deutlicher hervor (Abbildung 38).

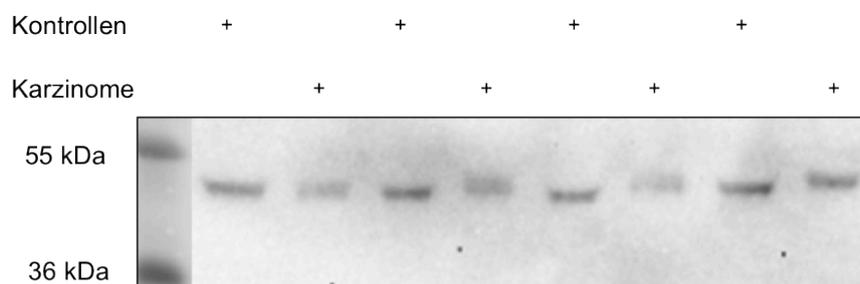


Abbildung 38: Nachweis des LCAT-Proteins in den Karzinom- und Kontrollproben mittels Western Blot. Es wurden abwechselnd Kontrollen und Karzinomproben aufgetragen, um den Unterschied in der Bandenhöhe zu bestätigen.

Der Western Blot in der obigen Abbildung verdeutlicht die unterschiedliche Bandenhöhe der Kontrollen gegenüber den Karzinom-Proben. Die detektierten Banden befanden sich in einem Größenbereich von etwa 50-54 kDa, das LCAT-Protein in den Karzinom-Proben lief geringfügig höher als in den Kontrollproben. Vermutlich handelt es sich bei den Karzinom-Proben um eine differentiell glykosylierte Form des Proteins. Die Unterschiede konnten jedoch in darauffolgenden Experimenten nicht aufgedeckt werden.

Nach Massenspektrometrie und Western Blot Analyse lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die drei Proteine CRP, AMBP und S100A9 als potentielle Biomarkerkandidaten für das KRK sowie für dessen Vorstufen in Betracht kommen könnten. Sie ermöglichten eine gute Einteilung in Adenom- und Tumor-Patienten. Besonderes Augenmerk lag auf dem AMBP, da dies

noch nicht in der Literatur in Verbindung mit der Entstehung und Progression eines KRK in Verbindung gebracht wurde.

3.6 Validierung der MS und WB Daten mittels ELISA

Die mit LC-MS/MS und Western Blot-Methoden erhaltenen Daten sollten nun mit größeren Patientenzahlen validiert werden (Abbildung 39). Hierfür wurden 13 Kontrollen, 13 Adenom-Proben und 13 Kolonkarzinom-Proben verwendet. In einer zweiten Studie wurden für das CRP und AMBP weitere Proben untersucht (insgesamt 20 Kontrollen, 20 Adenom- und 20 Kolonkarzinom-Proben), da diese beiden Proteine die Daten der MS und WB Analysen bestätigten. Die Konzentration der jeweiligen Proteine wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits bestimmt.

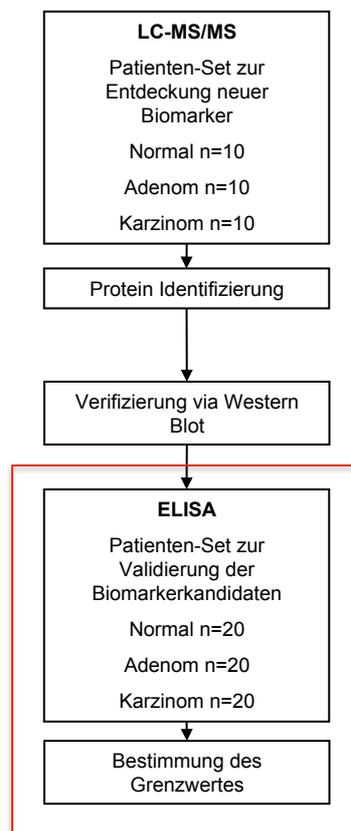


Abbildung 39: Fluss-Diagramm der Biomarker-Studie. Nach Identifizierung neuer potentieller Biomarkerkandidaten und Verifizierung mittels Western Blot, erfolgte die Validierung mit einem größeren Patienten-Set mittels eines ELISA (rot hervorgehoben).

3.6.1 C-reaktives Protein (CRP)

Das CRP konnte bereits mit Massenspektrometrie- und Western Blot-Analysen in Adenom- und Karzinom-Proben in deutlich größeren Mengen detektiert werden. Auch im ELISA nahm das

Plasmalevel von den Kontrollen (1,98 µg/ml) zu den Adenomen (4,36 µg/ml) und zu den Karzinomen (8,05 µg/ml) signifikant zu. Abbildung 40 zeigt die Konzentrationsverteilung der Kontrollen und der Neoplasie-Gruppen.

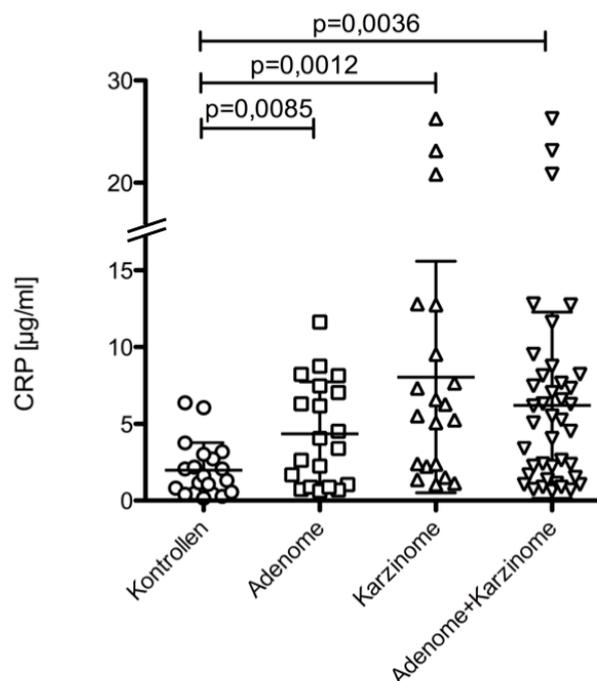


Abbildung 40: CRP Plasma-Konzentrationen in jeweils 20 Adenom-, Karzinom-, und Kontroll-Patienten. Die Konzentrationen von CRP im Plasma von Adenom-, und Karzinom-Patienten wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt.

Die CRP-Konzentrationen der gesunden Kontrollen lagen im Bereich von 0,16 bis 3,76 µg/ml. Nur zwei Werte von Kontrollen lagen über der 5 mg/l Grenze, aber auch durchaus einige Karzinom-Patienten wiesen sehr geringe Werten auf. Karzinom- und Adenom-Patienten zusammen wiesen im eine durchschnittliche CRP-Konzentration von 6,20 µg/ml auf, die Kontrollen dagegen nur 1,98 µg/ml. Bei einem Cut-off von 3,09 µg/ml wurde die höchste Sensitivität erreicht, sie lag bei 60% bei einer Spezifität von 80% für die Detektion von Adenomen plus Karzinomen.

3.6.2 Alpha-1-microglobulin/bikunin Precursor (AMBP)

AMBP konnte sowohl mittels Massenspektrometrie als auch im Western Blot in den Adenom- und Karzinom-Proben verstärkt detektiert werden. Weitere Patientenproben wurden daraufhin in einem ELISA untersucht. Hierfür wurden die Plasmaproben wurden 1:10 verdünnt, um einen Wert im Standardbereich von 0,05 bis 20 µg/ml zu erhalten und auf eine ELISA Platte aufgetragen, die mit einem spezifischen Antikörper gegen AMBP ausgestattet war. Es handelte sich hierbei um einen kompetitiven ELISA, d.h. je intensiver der Farbumschlag nach Zugabe des Substrates und je höher die gemessene OD war, desto weniger an AMBP war in dieser Probe enthalten.

Die Mittelwerte der Plasma-Konzentrationen waren bei den Kontrollen 1,80 µg/ml, bei den Adenom-Patienten 2,60 µg/ml und bei den Karzinom-Patienten 2,75 µg/ml. Bei den Adenom-Patienten zeigte sich eine stärkere Verteilung der Konzentrationen, sodass der Mittelwert hier über dem der Karzinome liegt (Abbildung 41). Bei den Kontrollen weist eine Patientenprobe eine erhöhte AMBP-Konzentration auf (3,61 µg/ml), was den Durchschnitt und die Standardabweichung anhebt. Dennoch ist der Unterschied zu den Kontrollen zu jeder Patientengruppe sehr signifikant ($p=0,0056$ bzw. $p<0,0003$).

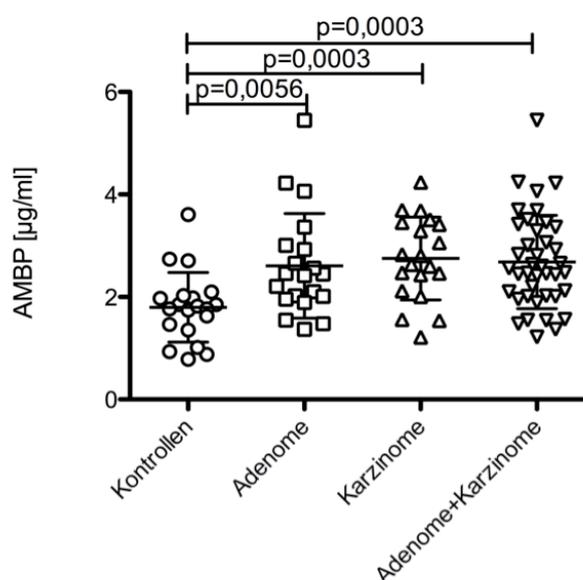


Abbildung 41: Ermittlung der AMBP-Konzentrationen in 20 Kontrollen, 20 Adenom- und 20 Karzinom-Proben mit Hilfe eines ELISA Assays. Die Konzentrationen von AMBP im Plasma von Adenom- und Karzinom-Patienten wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt.

Da das AMBP ein gemeinsamer Präkursor von A1M und Bikunin ist und diese getrennt ins Blut abgegeben werden¹⁴⁸, sollte in einem weiteren ELISA-Experiment untersucht werden, welches Spaltprodukt für die erhöhten Plasma-Konzentrationen verantwortlich sein könnte. Mit einem ELISA, der sich spezifisch gegen A1M richtete, konnte ebenfalls eine Erhöhung des A1M-Proteins in den Adenom- und Karzinom-Patienten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.3 Komplement Komponente 9

Die Komplement Komponente 9 gehört zum Komplementsystem und ist Bestandteil des Membranangriffskomplexes MAC (*Membran attack complex*), der sich an der Zellmembran der Zielzelle anlagert und durch Perforation deren Tod bewirkt.¹⁴⁹ C9 wies sowohl in den Massenspektrometrie-Daten als auch im Western Blot erhöhte Konzentrationen in den Karzinom-Patienten

auf. Diese Ergebnisse sollten nun mit Hilfe eines ELISA-Tests verifiziert werden. Abbildung 42 zeigt die Daten des C9-ELISAS.

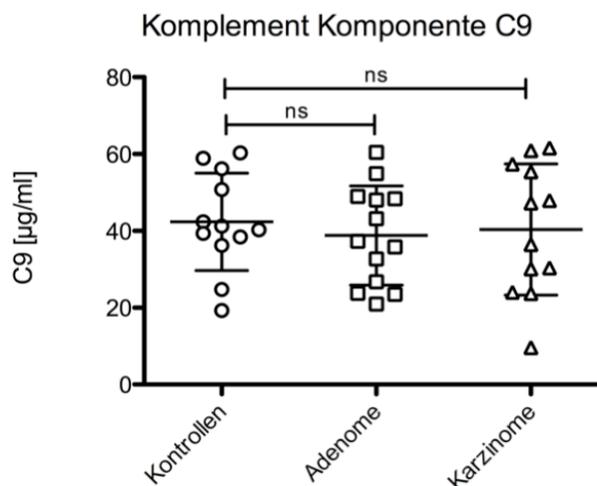


Abbildung 42: Analyse von Patienten- und Kontroll-Plasma mit Hilfe eines ELISAs spezifisch gegen C9. ns=nicht signifikant.

Die in den vorherigen Experimenten erhaltenen Daten zum Protein C9 konnten im ELISA Test leider nicht bestätigt werden. Die Werte der Patienten lagen im gleichen Konzentrations-Bereich wie die der Kontrollen (0-60 µg/ml), der Mittelwert der Karzinom-Gruppe liegt sogar minimal unter dem der Kontrollen (37,3 vs. 39,2 µg/ml).

3.6.4 SerpinA3/ Alpha-1-antichymotrypsin

Das SerpinA3 oder Alpha-1-antichymotrypsin zeigte im Western Blot eine deutlich stärkere Bande bei den Karzinomproben als bei den Kontrollen. Mit Hilfe eines ELISAs wurden die Konzentrationen in jeweils 13 Kontrollen, Adenom- und Karzinom-Proben bestimmt.

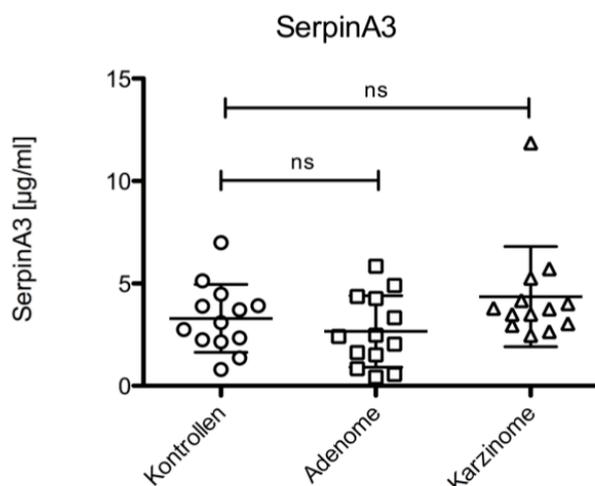


Abbildung 43: Analyse von Patienten- und Kontroll-Plasma mit Hilfe eines ELISAs spezifisch gegen SerpinA3. ns=nicht signifikant.

Aufgrund eines stark erhöhten Wertes in einer Karzinom-Probe, liegt der Mittelwert der Karzinom-Plasmakonzentration über dem der Kontrollen, sie unterschieden sich aber nicht signifikant (Abbildung 43). Im Gegensatz zu den Western Blot Daten konnte keine signifikant verstärkte Expression des SerpinA3 Proteins detektiert werden. Allerdings ist zu erkennen, dass bei den Karzinomen keine sehr niedrigen Werte vorkamen wie bei den Kontrollen. Die berechneten Konzentrationen lagen hier alle über 2,4 µg/ml.

3.6.5 S100 Kalzium-bindendes Protein A9 (S100A9)

Die Western Blot Analyse ergab, dass das S100A9 Protein hauptsächlich in den Adenom- und Karzinom-Proben detektiert werden konnte (s. Abbildung 35, Western Blot). Die S100-Proteine zählen zur Familie der Kalzium-bindenden Proteine. Sie spielen eine Rolle bei Entzündungsprozessen und der Immunantwort.¹⁵⁰⁻¹⁵² Nun sollten die Ergebnisse mit weiteren Patientenproben validiert werden.

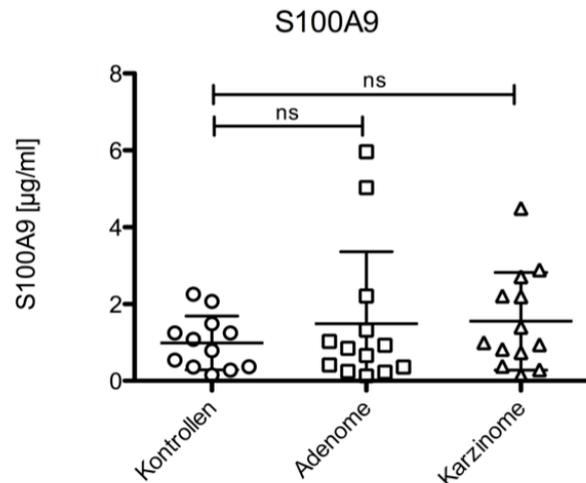


Abbildung 44: Analyse von Patienten- und Kontroll-Plasma mit Hilfe eines ELISAs spezifisch gegen S100A9. ns=nicht signifikant.

Die Daten in Abbildung 44 zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und den Adenom- bzw. Karzinom-Proben gemessen werden konnte. Zwar liegen mehrere Werte der Karzinom-Gruppe in einem höheren Konzentrationsbereich als bei den Kontrollen (Mittelwerte stiegen von den Kontrollen über die Adenome bis zu den Karzinomen leicht an: 0,99 µg/ml; 1,49 µg/ml; 1,55 µg/ml), jedoch ist dies nicht ausreichend. Es wäre zu untersuchen, ob bei einer größeren Anzahl an Proben in diesem Fall eventuell ein deutlicherer Unterschied erreicht werden könnte. Der leichte Anstieg des Mittelwertes der Adenomgruppe wird, wie in obiger Abbildung ersichtlich, durch 2 Ausreißer verursacht, die bei 5,03 µg/ml und 5,96 µg/ml liegen.

3.6.6 Vermindert exprimierte Proteine

Nachdem die am stärksten hochregulierten Proteine mittels antikörperbasierter Methoden untersucht wurden, sollten nun die zwei am stärksten supprimierten Proteine TTR und ALS in einem ELISA überprüft werden.

Da TTR zur Gruppe der Anti-Akute-Phase-Proteine gehört, wurde vermutet, dass dieses bei Patienten mit einer Krebserkrankung erniedrigt ist. Die Erhöhung von CRP verdeutlichte bereits, dass Akute-Phase-Proteine eine Rolle bei der Progression des Kolonkarzinoms spielen. Anti-Akute-Phase-Proteine dagegen zeigen sinkende Serum-Konzentrationen bei akuten Entzündungen an. TTR ist in der Literatur bereits als Biomarker für das KKR sowie dessen Vorstufen bekannt.^{153,154}

Eine tumorsupprimierende Eigenschaft bei Tumorpatienten wurde bereits für das ALS beschrieben.¹⁵⁵ Die Massenspektrometrie-Daten weisen daraufhin, dass dieses auch bei Kolonkarzinom-Patienten erniedrigt ist. Für die ELISA Studie wurden jeweils 12 Kontrollen, 12 Adenom- und 12 Karzinom-Proben einbezogen. Leider konnten sowohl die Massenspektrometrie-

Daten für ALS und TTR im ELISA nicht bestätigt werden. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

3.6.7 Kombinationsmarker aus AMBP+CRP

Die Daten aus der Massenspektrometrie, Western Blot- und ELISA - Analysen zeigten eindeutig, dass AMBP und CRP konstant eine signifikante Erhöhung sowohl bei den Adenom- als auch bei den Karzinom-Patienten aufwiesen. Die ELISA Daten zeigten sehr deutlich, dass AMBP und CRP eine Klassifizierung der Patienten ermöglichten. Um eine Einteilung der Patienten noch zu verbessern, wurden AMBP und CRP als kombinierter Marker eingesetzt. Die mittels ELISA erhaltenen Konzentrationen der beiden Proteine wurden in einem Streudiagramm dargestellt (Abbildung 45).

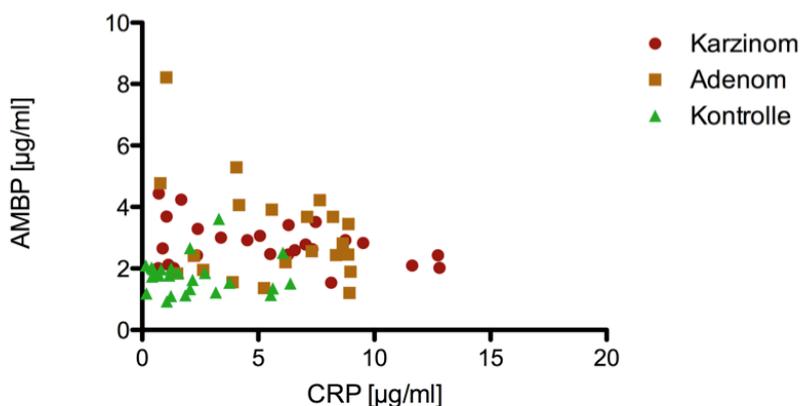


Abbildung 45: Verteilung der AMBP+CRP Konzentrationen. Die Plasma-Konzentrationen von AMBP und CRP wurden mittels ELISA bestimmt. Die Abszisse zeigt den gemessenen Konzentrationsbereich von AMBP, die Ordinate gibt die CRP-Konzentrationen wieder.

Abbildung 45 präsentiert die Verteilung der Plasma-Konzentrationen von AMBP und CRP. Optisch lässt sich eine gute Trennung der Kontrollen (grün) gegenüber den Datenpunkten der Adenom- und Karzinom-Gruppe (orange und rot) erkennen. Anhand verschiedener Abtrennungsverhältnisse („weighting ratios“) wurden die Kombinationswerte ermittelt, die den größten AUC-Wert bzw. die jeweils höchste Sensitivität und Spezifität (s. Kapitel 2.19.2 Biomarker-Kombinationen) ergaben. Abbildung 46 zeigt die Kombinationswerte für die verschiedenen Gruppen in der als „Marker Units“ (MU) gewählten Einheit.

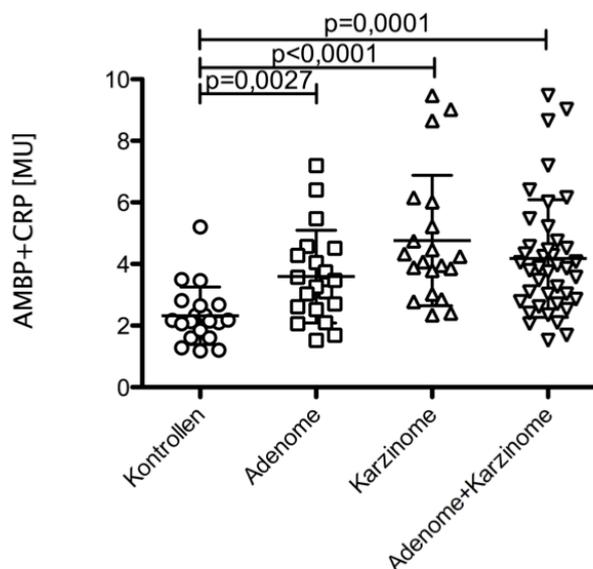


Abbildung 46: Kombinationswerte der aus den mittels ELISA ermittelten Konzentrationen von AMBP und CRP. Für jeweils 20 Kontrollen, Adenom- und Karzinom-Proben wurden Kombinationswerte bestimmt und in der Einheit MU angegeben.

Es zeigte sich, dass AMBP mit CRP zusammen als ein Kombinationsmarker sehr signifikant ($p=0,0001$) in den Neoplasie-Gruppen erhöht war. Anhand der gewonnenen Daten lässt sich ein optimaler Grenzwert (cut-off) von 2,69 MU bestimmen, bei dem die höchste Sensitivität von 80% und ebensolcher Spezifität erreicht wird. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Testergebnisse der gemessenen Patientenproben im ELISA. Wurde der Grenzwert auf 2,69 MU gesetzt, erhielten 4 Kontrollen („Normal“) ein Falsch-positives Ergebnis, nur 2 Karzinom-Patienten, aber 6 Adenom-Patienten wurden falsch klassifiziert. Alle Messwerte lagen im Referenz-Bereich.

Tabelle 10: Testergebnisse der Validierungs-Studie mit dem Kombinationsmarker. Ausgehend von einem Grenzwert von 2,69 MU ergaben sich die unten gezeigten Ergebnisse.

Grenzwert Cut-off > 2,69 units	Karzinome n = 20	Adenome n = 20	Normal n = 20
Testergebnis „normal“	2	6	16
Testergebnis „Adenom/Karzinom“	18	14	4

3.6.8 Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Proteinkonzentrationen von AMBP und CRP

Da die Kontrollen einen niedrigeren Altersdurchschnitt haben als die Adenom- und Kolonkarzinom-Patienten (siehe Tabelle 3), wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen den gemessenen AMBP- und CRP- Konzentrationen und dem Alter der Patienten besteht. Hierfür wurde die Konzentration gegenüber dem Alter aufgetragen und in einem Streudiagramm dargestellt (Abbildung 48). Der Korrelationskoeffizient gibt an, wie stark zwei Gruppen miteinander korrelieren, d.h. ob ein linearer Zusammenhang besteht. Ein Wert von 1 signalisiert einen vollständigen linearen Zusammenhang, ein Wert von 0 zeigt an, dass die beiden Merkmale überhaupt nicht linear voneinander abhängen.

Da CRP ein Entzündungsmarker ist und dieser oftmals im hohen Alter ansteigt¹⁵⁶, wurde ein Streudiagramm erstellt und der Korrelationskoeffizient (R^2) ermittelt (Abbildung 47 B).

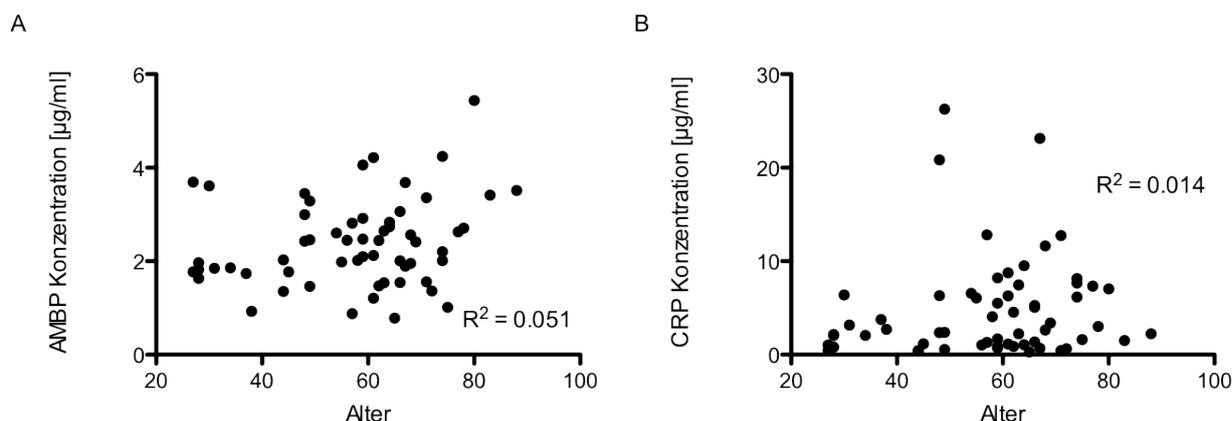


Abbildung 47: Streudiagramm der mittels ELISA bestimmten AMBP- und CRP-Konzentrationen und dem Alter der Kontrollproben sowie Karzinom- und Adenom-Patienten. Ein Korrelationskoeffizient von $R^2=0.051$ zeigt keine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der AMBP-Konzentration (A). Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen dem Patientenalter und der CRP-Konzentration gefunden werden, $R^2=0.014$ (B).

Die Abbildung 47 verdeutlicht, dass es keinen linearen Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und den mittels ELISA bestimmten Konzentrationen von AMBP und CRP besteht. Der Korrelationskoeffizient beträgt für AMBP $R^2=0.051$ und für CRP $R^2=0.014$. Dies bedeutet, dass die Erhöhung der Konzentrationen beider potentieller Biomarkerkandidaten nicht altersbedingt ist.

3.7 Statistische Analyse/ Receiver operating characteristics (ROC)

Die mittels ELISA gewonnenen Daten zeigten für AMBP und CRP erhöhte Proteinkonzentrationen in den Adenom- und Karzinom-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Um die Effizienz dieser beiden Proteine und deren Kombination für diagnostische Zwecke zu prüfen wurden

ROC Kurven erstellt und daraus die Sensitivität und Spezifität bestimmt. Die Fläche unter der ROC-Kurve (*Area under the curve*, AUC) gibt an, wie genau ein klinischer Test zwischen gesunden und erkrankten Personenproben unterscheiden kann. Ein Wert von 1 repräsentiert eine vollständige Trennung von zwei Patienten-Gruppen. Ein Wert von 0,5 kann als wertlos betrachtet werden. In Abbildung 48 sind die ROC-Kurven für AMBP und CRP dargestellt. Es wurden die ROC-Kurven für die jeweiligen Proben-Gruppen für AMBP und CRP zum besseren Vergleich übereinandergelegt.

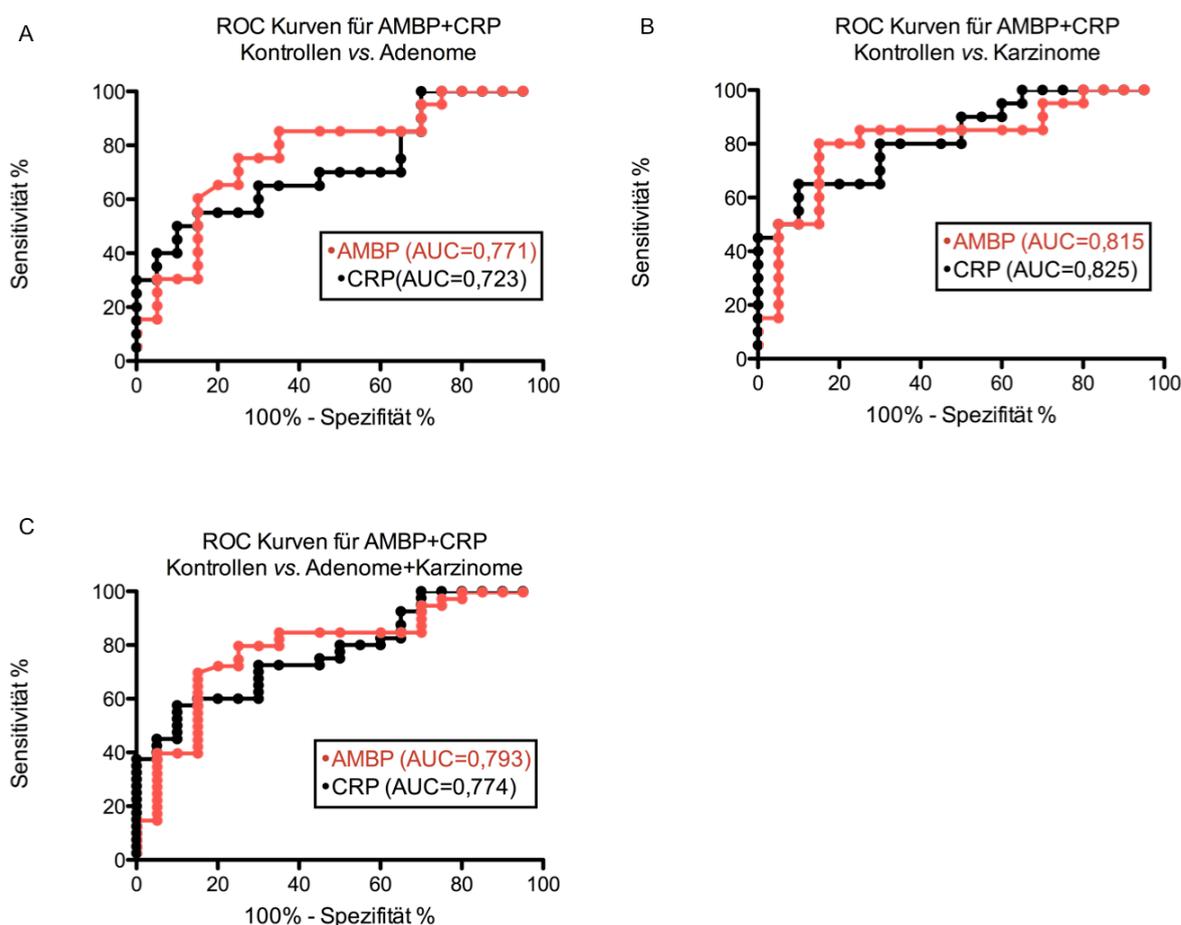


Abbildung 48: Vergleich der ROC-Kurven für AMBP (rot) und CRP (schwarz). Dargestellt sind die ROC-Kurven und AUC-Werte für AMBP und CRP für die Adenom-Gruppe (A), die Karzinom-Gruppe (B) als auch für die vereinte Neoplasie-Gruppe (C) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe eines ELISA-Tests bestimmt.

AMBP (rote ROC-Kurven) ermöglicht eine bessere Einteilung in Adenom-, Karzinom- und Adenom+Karzinom- Gruppe als CRP. Bei CRP (schwarze ROC-Kurven) liegt der AUC-Wert bei der Einteilung in Kontrollen und Adenome unter dem des AMBPs (0,723 vs. 0,771; Abbildung 48 A). Die Klassifizierung in Kontrollen und Karzinome ist ähnlich gut (0,825 für CRP und 0,815 für AMBP; Abbildung 48 B). Bei Abgrenzung der Adenome und Karzinome liegt AMBP mit einem AUC-Wert von 0,793 wieder etwas höher als CRP, das einen AUC-Wert von 0,774 erreicht (Ab-

bildung 48 C). Mit den in Abbildung 46 (ELISA Kombination) gezeigten Daten für die Kombination beider Biomarker wurden ebenfalls ROC-Kurven für die drei Patientengruppen erstellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 dargestellt.

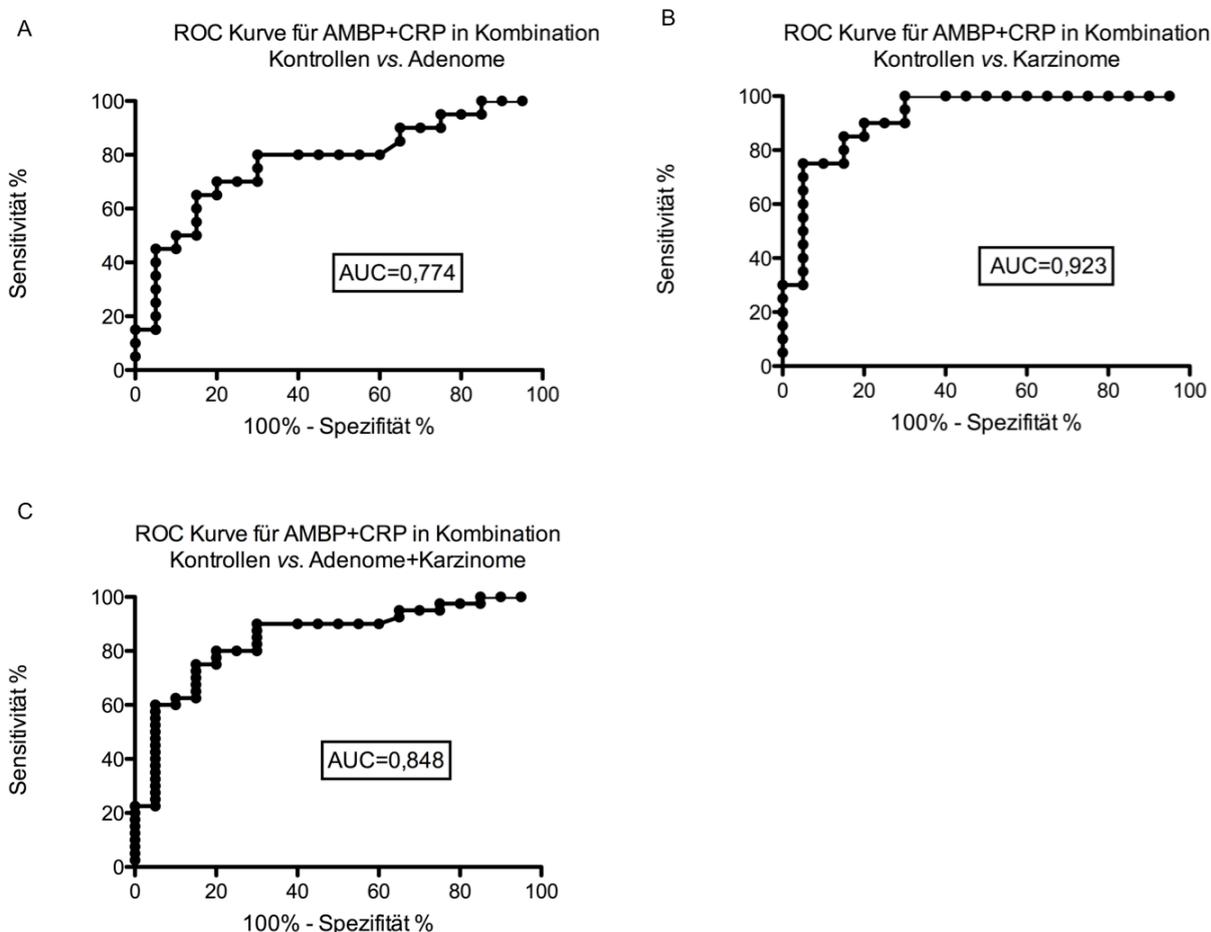


Abbildung 49: ROC-Kurven, die aus der Kombination beider Marker hervorgehen. Dargestellt sind die ROC-Kurven und AUC-Werte für AMBP und CRP in Kombination für die Adenom-Gruppe (A), die Karzinom-Gruppe (B) als auch für die vereinte Neoplasie-Gruppe (C) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

Die aus der Kombination beider Markerproteine hervorgehenden ROC-Kurven ermöglichen eine noch bessere Klassifizierung der Patientenproben als beide Proteine alleine, was anhand der Fläche unter der Kurve (AUC-Werte) ermittelt werden konnte. In Tabelle 11 sind die AUC-Werte von AMBP und CRP sowie die Kombination zusammengefasst.

Tabelle 11: AUC-Werte für AMBP, CRP sowie deren Kombination.

Biomarker	AUC Kontrollen vs. Adenome	AUC Kontrollen vs. Karzinome	AUC Kontrollen vs. Adenome+Karzinome
AMBP	0,771	0,815	0,793
CRP	0,723	0,825	0,774
AMBP+CRP	0,774	0,923	0,848

Durch die Kombination der beiden Proteine konnte ein AUC-Wert von 0,923 für die Detektion von Karzinomen erzielt werden. AMBP zusammen mit CRP weist einen AUC-Wert von 0,848 bei Betrachtung der Kontrollen gegenüber der Adenom+Karzinom-Gruppe auf. Die zugehörigen Sensitivitäten und Spezifitäten sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Sensitivitäten und Spezifitäten der Proteine AMBP und CRP sowie deren Kombination. Die Spezifität wurde auf 80% gesetzt und die zugehörigen Sensitivitäten abgelesen.

	AMBP		CRP		AMBP+CRP	
	Sensitivität%	Spezifität%	Sensitivität%	Spezifität%	Sensitivität%	Spezifität%
Kontrollen vs. Adenome	65,0	80,0	55,0	80,0	70,0	80,0
Kontrollen vs. Karzinome	80,0	80,0	65,0	80,0	90,0	80,0
Kontrollen vs. Adenome +Karzinome	72,5	80,0	60,0	80,0	80,0	80,0

Für die in Tabelle 11 genannten AUC-Werte ergaben sich die obigen Sensitivitäten und Spezifitäten. Jedem möglichen Cut-off Wert konnte eine zugehörige Sensitivität und Spezifität zugeordnet werden. Gezeigt sind die Sensitivitäten bei einer Spezifität von 80%.

3.8 Untersuchung zur Spezifität der potentiellen Tumormarker CRP+AMBP

Die Spezifität der beiden potentiellen Tumorbiomarker wurde mit Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) untersucht. Für diese Studie wurden 6 Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und 6 Patienten mit Morbus Crohn (MC) sowie 6 Kontrollen eingeschlossen.

Da CRP ein unspezifischer Entzündungsparameter ist, wurden hohe Werte bei den CED-Patienten erwartet. Diese Untersuchungen sollten vor allem für das AMBP zeigen, dass dieses nicht entzündungsabhängig reagiert.

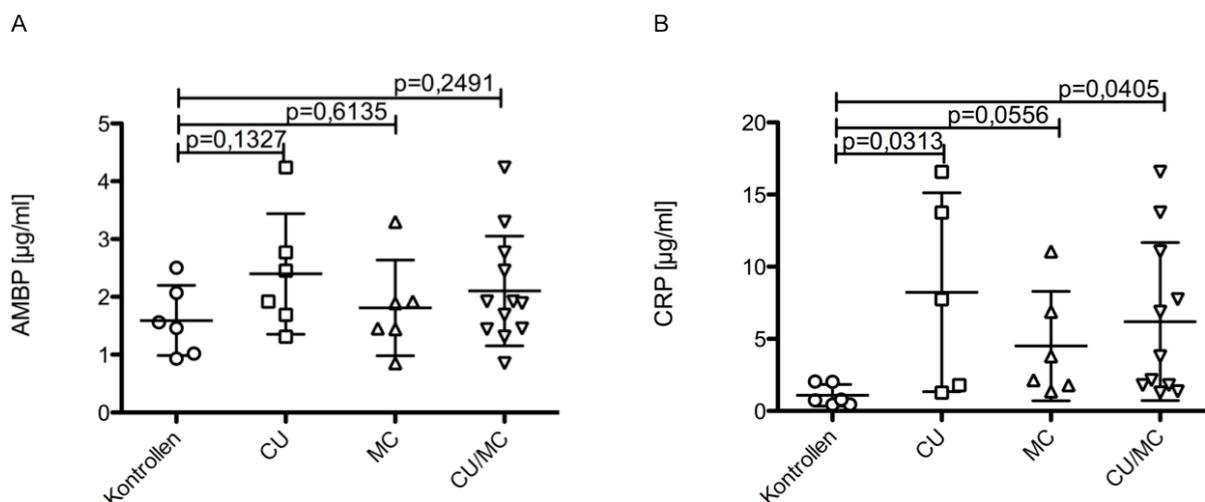


Abbildung 50: Blutplasma-Konzentrationen von CRP (A) und AMBP (B) von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Jeweils 6 Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) wurden auf die Anwesenheit von CRP und AMBP untersucht und mit Plasmaproben von 6 Kontrollen verglichen.

Die CRP-Konzentration bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind erhöht gegenüber den Kontrollen (1,09 µg/ml). Die CRP-Konzentrationen bei Colitis ulcerosa sind signifikant höher (8,23 µg/ml), die Plasma-Konzentration bei Morbus Crohn Patienten (4,5 µg/ml) liegt knapp unter dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (Abbildung 50 A). Beim AMBP ließ sich keine signifikante Konzentrationszunahme beobachten (Abbildung 50 B). Diese Daten weisen darauf hin, dass AMBP kein entzündungsabhängiger Marker ist und spezifisch für Tumorerkrankungen des Kolons sein könnte.

3.9 Lokalisation von AMBP im Gewebe

Die erhöhten AMBP-Level im Blutplasma von Adenom- und Karzinom-Patienten deuten auf eine gesteigerte zelluläre Produktion von AMBP während der Karzinogenese hin. Obwohl bisherige Studien gezeigt haben, dass AMBP in der Leber produziert werden kann^{148,157}, ist es trotzdem bislang unklar, ob AMBP auch direkt von neoplastischen Zellen des Kolons exprimiert wird.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich eine vermehrte Anreicherung von AMBP im Gewebe von Adenom- und Karzinom-Patienten vorliegt, wurde sowohl Adenom- und Karzinomgewebe als auch gesundes Kontrollgewebe mit einem Antikörper spezifisch für AMBP angefärbt. Die Kryostatschnitte wurden anschließend mit einem Antikörper gegen AMBP für 10 h bei 4°C inkubiert,

mit einem biotinylierten Sekundärantikörper behandelt und mit Streptavidin Dylight 648 (Invitrogen) detektiert.

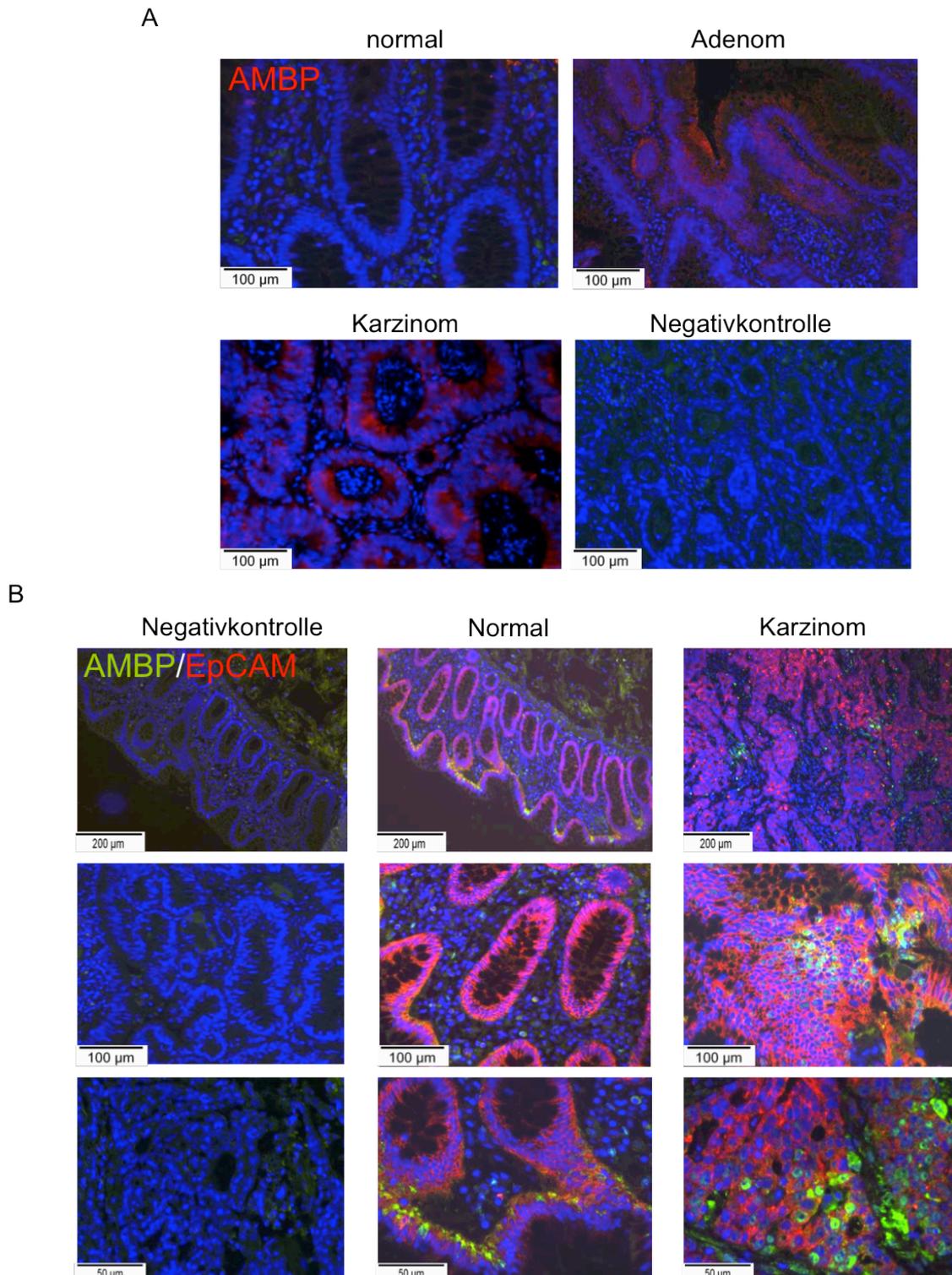


Abbildung 51: Immunofluoreszenzfärbung von AMBP im Gewebe von Patienten mit Neoplasien des Kolons sowie normalem Kolongewebe. Die entsprechenden Paraffinschnitte wurden mit einem Antikörper spezifisch gegen AMBP und einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert und mit Streptavidin-Dylight 648 behandelt. Eine erhöhte Anzahl an positiven Zellen konnte im Kolonkarzinom- und Adenomgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe beobachtet werden (A). Doppelfärbungen mit AMBP und EpCAM ließen viele doppelpositive Zellen im Tumorgewebe erkennen (B).

Die gezeigten Färbungen wurden im Labor von Dr. Benno Weigmann durchgeführt. Die Negativkontrolle zeigt Gewebeschnitte, die mit einem entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert wurden. Eine erhöhte Anzahl an positiven Zellen konnte im Kolonkarzinom- und Adenomgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe beobachtet werden (Abbildung 51 A).

Weiterhin wurden Doppelfärbungen gegen AMBP und einem Oberflächenmarker für Epithelzellen (EpCAM) durchgeführt (Abbildung 51 B). Diese Experimente zeigten eine geringe basolaterale AMBP-Expression in intestinalen Epithelzellen. Außerdem konnte man einige wenige AMBP-positive Stromazellen erkennen. Im Gegensatz dazu ließ sich eine deutliche AMBP-Expression in den Epithel- und Stromazellen von KRK- und Adenom-Patienten nachweisen (Abbildung 51 B). Des Weiteren ließ sich eine Clusterbildung der AMBP-positiven Zellen beobachten. Dies verdeutlicht, dass intestinale Epithelzellen sowie Stromazellen eine direkte Quelle für erhöhte AMBP-Level im Plasma von KRK-Patienten sind.

4 Diskussion

Komplexe chronische Krankheiten wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs oder Diabetes sind in den westlichen Industrienationen die häufigsten Todesursachen und stehen daher im Blickpunkt der Forschung. Die großen Fortschritte in der biomedizinischen Grundlagenforschung oder die Weiterentwicklung von Technologien wie der Proteomik geben Anlass zur Hoffnung auf eine neue Ära in der Prävention und Behandlung dieser Krankheiten.

In dieser Arbeit konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie im Blutplasma-Proteom potentielle Biomarker zur Früherkennung des KRK identifiziert werden. Neue Screeningmethoden könnten die Heilungschancen enorm verbessern und zu einer Senkung der Sterbensrate des KRK führen, die nach wie vor sehr hoch ist.¹⁵⁸ Dies ist hauptsächlich bedingt durch eine späte Diagnose, da Symptome beim KRK erst in einem späten Stadium auftreten. Durch regelmäßige und geeignete Vorsorgeuntersuchungen lässt sich jedoch die Inzidenz und Mortalität des Kolonkarzinoms drastisch senken. Der Spalt zwischen der möglichen frühzeitigen Diagnose und der bestehenden hohen Mortalitätsrate wird durch unzureichende Sensitivitäten und Spezifitäten existierender Screeningtests oder durch Unannehmlichkeiten und fehlende Anerkennung anderer Vorsorgemethoden wie der Koloskopie verursacht. Aus diesem Grund werden dringend zusätzliche Methoden benötigt, um eine frühe Diagnose des KRK zu erleichtern. Ein einfach durchzuführender Bluttest hätte eine höhere Akzeptanz als die Koloskopie, die bei der Risikobevölkerung nur bei 60% liegt.¹³ Ein positives Testergebnis müsste zusätzlich durch eine Koloskopie abgesichert werden.

4.1 Studiendesign und Auswahl der Methoden

Ein minimal invasiver und kostengünstiger Screeningtest für das KRK wäre eine Untersuchung des Blutes auf spezifische Proteinbiomarker. Im Gegensatz zur DNA und mRNA Analyse, repräsentiert die Analyse auf Proteinebene den dynamischen Zustand einer Zelle. Im Falle einer Krankheit findet man neben den normalen Blutkomponenten, zirkulierende Tumorzellen, Nucleinsäuren, Proteine, Peptide und Metaboliten, die von verschiedenen Geweben als Ergebnis der Sekretion, Nekrose und Apoptose abgegeben werden.^{159,160} Blutplasma eignet sich besonders, da dies in der Routinediagnostik bereits Anwendung findet, leicht zu gewinnen ist und eine gute Repräsentation physiologischer und pathologischer Zustände bietet.⁹² Die Entdeckung spezifischer diagnostischer Biomarker erfordert eine sorgfältige Auswahl, hohe Qualität der Proben, reproduzierbare Methoden sowie eine Validierung der entdeckten Biomarker mit einem großen und unabhängigen Patienten-Set.¹⁶¹

Die Komplexität des Proteoms sowie die individuelle Variabilität sind allerdings sehr groß und stellen bei der Suche nach neuen Biomarkern eine große Herausforderung dar.¹⁶² Aus diesem Grund wurde das Blutplasma vor der massenspektrometrischen Analyse mittels Immundepletion von den hoch und moderat abundanten Proteinen befreit, um potentielle Biomarker besser detektieren zu können. Ferner sollten Schwankungen zwischen Patienten so klein wie möglich gehalten werden. Einschränkungen wie Ausschluss von Rauchern, Patienten mit Diabetes, chronischen Erkrankungen sowie das Vorliegen von anderen Karzinomen jeglicher Art erschwerten das Probensammeln zusätzlich.

Um den raschen Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern, wurde dem Blut direkt nach der Entnahme ein Proteaseinhibitor zugegeben. Zusätzlich wurde darauf geachtet, die Zeitspanne zwischen Blutabnahme und Lagerung so gering wie möglich zu halten und 60 min nicht zu überschreiten.

Die Identifizierungs- oder Proteomstudie umfasste 30 Proben (n=10 pro Gruppe). Idealerweise sollte das Alter der Kontrollen und Patienten möglichst im selben Bereich liegen sowie eine gleichmäßige Verteilung der Geschlechter vorliegen. Der Altersdurchschnitt hingegen konnte bei den Patienten-Sets in der Identifizierungs- und Validierungs-Studie allerdings nicht angeglichen werden. Er liegt bei der Kontroll-Gruppe niedriger als bei der Neoplasie-Gruppe. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass alte gesunde Personen über 70 Jahre die Prozedur der Koloskopie aus rein vorsorgetechnischen Gründen nicht mehr auf sich nehmen. Gerade aus diesem Grund ist die Suche nach geeigneten, für den Patienten angenehmeren, risikoarmen und nicht zeitinvasiven Screening-Methoden dringend erforderlich.

Bei der Untersuchung, ob es einen altersbedingten Anstieg der AMBP- und CRP-Konzentrationen im Blut gibt, zeigte sich im Streudiagramm (Abbildung 47), dass keine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Konzentration von CRP und AMBP besteht ($R^2=0.014$ und $R^2=0.051$).

Eine momentane Limitierung der Anwendbarkeit und Aussagekraft des beschriebenen Diagnostiktests ist die Anzahl der analysierten Proben. Während dieser Arbeit wurden lediglich 30 Proben in der Identifizierungs-Studie und 60 Proben in der Validierungs-Studie untersucht. Daher soll zukünftig die Aussagekraft des auf der Messung von CRP und AMBP basierenden Diagnostiktests in einer größeren Patienten-Studie prospektiv getestet werden.

4.2 Plasmadepletion

Die Detektion von neuen Biomarkern aus Serum und Plasma stellt aufgrund des hohen dynamischen Bereiches der Plasmaproteine, der 12 Größenordnungen umfasst, eine große Herausforderung dar.^{163–165} Zur Identifizierung potentieller Biomarker werden verschiedene Strategien

wie die 2D-DIGE und SELDI-TOF Technologie mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung der ausgewählten Spots, angewendet.^{73,135,154} Da die Depletion von hoch abundanten Plasmaproteinen eine signifikante Verbesserung in der Erfassung des Plasmaproteoms zeigte¹⁶⁶, wurden in dieser Arbeit mit Hilfe einer zweistufigen Immundepletionsstrategie die niedrig abundanten Plasmaproteine angereichert.¹⁰⁴

Qian et al. konnten 2008 mit dieser Methode 232 niedrig abundante Proteine im Durchfluss identifizieren, darunter Zytokine und Metalloproteinasen im pg/ml Konzentrationsbereich.¹⁰⁵ Durch den Einsatz antikörperbasierter Chromatographiesäulen konnten die hoch abundanten und moderat abundanten Proteine durch Kopplung der beiden Säulen an einem Äkta FPLC System in einem Schritt entfernt werden (Abbildung 24, SDS-PAGE). Diese Methode konnte zudem automatisiert erfolgen und stellte somit die Reproduzierbarkeit und Gleichbehandlung der Proben sicher.

In dieser Arbeit wurde das Augenmerk nur auf die depletierte Proteinfraction (Durchfluss) gelegt und diese nach potentiellen Biomarkern untersucht, da der Großteil der Proteine, die auf eine Krankheit hindeuten könnten, im niedermolekularen Bereich (LMW) zu erwarten ist.⁹⁵ Kleine Proteine können jedoch auch an Albumin geheftet sein (sog. „Sponge-Effekt“) und somit aus dem Plasma entfernt werden.¹⁰⁶ Diesen Effekt zeigt das Venn-Diagramm (Abbildung 26), da mehr Proteine in den Eluaten gefunden werden konnten als erwartet bzw. als Antikörper in den Säulen vorhanden sind. Ferner gibt es zahlreiche Publikationen, die hoch abundante Proteine als Biomarker beschreiben.^{154,167,168}

Da die Suche nach neuen Biomarkern nach wie vor von großem Interesse ist, kam in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Methodiken und Strategien auf den Markt. Andere Depletionsmethoden wie z.B. die Protein Depletion Spin Columns von Pierce™, das ProteoMiner® Kit von Biorad oder ProteoPrep20® von Sigma erfolgen nach unterschiedlichen Prinzipien und erlauben z.T. mit geringen Probenmengen und Durchführungszeiten eine schnelle Depletion von Plasmaproben.^{110,169} Auch Nanopartikel geraten zunehmend in den Fokus. Hier erfolgt die Bindung der Proteine aufgrund ihrer Affinität und Größe.^{110,170}

4.3 Biomarkerdetektion mittels Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie als Methode zur Detektion neuer Biomarker wird bereits seit vielen Jahren erfolgreich angewandt und verbesserte Technologien führten dazu, dass die Serumdiagnostik in der Klinik Einzug fand. Die Serumproteomik zeigte bereits großes Potential bei der Suche nach neuen Biomarkern für zahlreiche Krankheiten.^{162,171}

Bei der Suche nach neuen Biomarkern erwies sich die quantitative, labelfreie massenspektrometrische Analyse als geeignete Methode. Viele komplexe Proben können mit minimaler Probenvorbereitung untersucht werden,¹²⁹ um Unterschiede in den Expressionslevel zu detektie-

ren. Der Vorteil gegenüber SELDI oder 2D- Gelelektrophorese besteht in der direkten Messung der Peptide und nicht über den zusätzlichen Schritt der Peak- oder Spot-Identifizierung.

Zur Identifizierung von potentiellen Biomarkerkandidaten kam eine datenunabhängige, labelfreie quantitative Proteomik-Anwendung zum Einsatz.¹⁷⁰ Die labelfreie Quantifizierung ist zugleich zeit- und kostenarm und Variabilitäten, die durch komplexe Probenvorbereitung diverser Labeling-Methoden entstehen, werden ausgeschlossen. Zusätzlich erlaubt die datenunabhängige Datenerfassung (DIA) eine simultane Identifizierung und Quantifizierung von Peptiden ohne Vorselektion.¹²⁹ Die hohe technische Reproduzierbarkeit des Workflows erleichterte die reproduzierbare Identifizierung von mehr als 100 niedrig abundanten Proteinen und erlaubte eine klare Abgrenzung der drei Patientengruppen. Mit Hilfe der labelfreien Quantifizierung konnten somit AMBP als bislang unbeschriebener Proteinbiomarker für kolorektale Adenome sowie ein signifikanter Anstieg der CRP-Level in Adenom- und Karzinom-Patienten detektiert werden.

4.4 Identifizierung neuer potentieller Biomarker

Es gibt bereits zahlreiche Publikationen, die Biomarker für das Kolonkarzinom beschreiben, jedoch nur wenige schließen die Vorstufen, die Kolonpolypen mit ein. Da eine frühzeitige Erkennung des Kolonkarzinoms die Heilungschancen enorm steigert, sollten auch die Vorstufen eines KRK in diese Studie mit eingeschlossen werden. In der Literatur sind bereits einige Biomarker beschrieben, die Adenome erkennen. Dies sind neben DNA-Markern, die Plasmaproteine CEA, S100A8/A9/A12, HNP1-3, Transthyretin, CCSA2, MMP9 und C3a-desArg. Trotz vielversprechender initialer Ergebnisse werden jedoch Tests zur Detektion von Proteinbiomarkern im Blutplasma derzeit nicht als Standard-Screeningmethode betrachtet, da ihre Durchführung unterschiedliche Ergebnisse hervorbrachten.^{153,154,172-175} Die Validierung im großen Maßstab forderte Einbußen bei der Sensitivität. So zeigte beispielsweise C3desArg in einer 2012 veröffentlichten Studie von neun Biomarkern nur noch einen AUC-Wert von 0.591 für die Detektion eines KRK.¹⁷⁶ Auch methylierte *SEPT9*-DNA (mSEPT9) im Plasma zeigte in einer prospektiven Studie eine Sensitivität von nur noch 48%, statt vorher 70% bei einer Spezifität von 90%.¹⁷⁷ Die Koloskopie ist mit einer Sensitivität von über 90% zwar die sensitivste Methode, jedoch weist sie einige Limitierungen auf. Nur gut geschultes Personal und neueste Geräte gewährleisten einen sicheren Befund.¹⁷⁸ Dennoch bleiben bei der Koloskopie 4-5% der Kolonkarzinome und Adenome von 10 mm Durchmesser unentdeckt.^{179,180}

Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden drei Probengruppen untersucht und auf eine differentielle Expression der Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen hin analysiert. Die Proteine, die die größte Hochregulation bei den Adenomen und Karzinomen aufzeigten, wurden

für nachfolgende Western Blot und ELISA- Experimente ausgewählt. Dies waren CRP, AMBP und C9 mit der größten Hochregulation zwischen Kontrollen und Adenomen bzw. Karzinomen. CRP als Akute-Phase-Protein und AMBP als Vorläuferprotein von A1M und Bikunin zeigten ein log₂-Verhältnis von 3,23 bzw. 1,24 von Karzinomen zu Kontrollen und ein log₂-Verhältnis von 2,12 bzw. 1,13 bei Adenom-Patienten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Tabelle 9).

C9 gehört zum Komplementsystem und ist eine von fünf Proteinkomponenten, die den Membranangriffskomplex (*membran attack complex*, MAC) formen. Er kann Poren in der Membran induzieren und somit die Zielzelle lysieren.¹⁸¹ Auch hier zeigte sich sowohl bei den Karzinomen als auch bei den Adenom-Patienten ein signifikanter Anstieg im Blut. Es konnte bereits in der Literatur gezeigt werden, dass C9 im Plasma von Kolonkarzinom-Patienten vermehrt vorkommt.^{102,139,140}

Unter den anderen hochregulierten Proteinen konnte man etliche bereits in der Literatur beschriebene Biomarker finden, was die hier angewandte Methode bestätigt. Erhöhte Konzentrationen von Clusterin, L Plastin, VCAM1, Fibulin 1 und LRG1 konnten im Western Blot nicht bestätigt werden, obwohl sie bereits in der Literatur mit dem Vorhandensein eines KRK in Verbindung gebracht wurden.¹⁸²⁻¹⁸⁸

Im Gegensatz dazu konnte eine Hochregulation des Proteins S100A9, in Verbindung mit S100A8 auch Calprotectin genannt, festgestellt werden. Auch hier konnten die mittels MS erworbenen Daten im Western Blot bestätigt werden. Das S100A9 wurde mehrfach als Biomarker für das Kolonkarzinom beschrieben. S100A9 liegt jedoch auch bei vielen anderen Krebsarten wie dem Magen-,¹⁸⁹ Prostata-,¹⁹⁰ Mamma-,¹⁹¹ Leberkarzinom¹⁹² und Lungenadenokarzinom¹⁹³ vermehrt vor.

Die Serinproteinaseinhibitoren (Serpine) sind eine Superfamilie von Proteinen mit diversen Funktionen wie Kontrolle der Blutgerinnung, Komplementaktivierung, programmierter Zelltod und Entwicklung. Zu den hoch abundanten Serpinen im Plasma zählen Alpha-1-antichymotrypsin (ACT) und das Alpha-1-antitrypsin (AAT). Während einer Entzündung können die Level bis zu 3-fach für AAT und 4-5-fach für ACT ansteigen.¹⁴⁶ Alpha-1-antichymotrypsin (ACT) oder SerpinA3 konnte in der Identifizierungs-Studie in der Karzinom-Gruppe sowohl vermindert als auch erhöht vorgefunden werden. SerpinA3 ist als Tumormarker bekannt und wurde oftmals bei Patienten mit KRK vermehrt detektiert.¹⁹⁴ Alpha-1-antichymotrypsin wurde vor kurzem in der Literatur aber auch erniedrigt im Plasma von KRK-Patienten vorgefunden.^{134,140}

Die Hochregulation der genannten Proteine konnte für die Karzinom-Proben im Western Blot sichtbar gemacht werden. SerpinA3, S100A9 und C9 konnten im Gegensatz zum AMBP und CRP im ELISA jedoch nicht bestätigt werden.

Nach Identifizierung der potentiellen Biomarker AMBP und CRP mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden diese mittels ELISA in einem unabhängigen Patienten-Set validiert. Dies zeigte eine signifikante Abgrenzung der Kontrollen von den Adenom- und Karzinomproben ($p=0,0003$ für AMBP, $p=0,0036$ für CRP). Auch weitere Untersuchungen mittels Receiver operating characteristics (ROC) ergaben gute AUC-Werte für AMBP und CRP sowohl für Kontrollen gegenüber Adenomen (AUC=0,771 bzw. AUC=0,773) als auch für Kontrollen gegenüber Karzinomen (AUC=0,815 bzw. AUC=0,825) und Adenomen+Karzinomen (AUC=0,793 bzw. AUC=0,774) (Tabelle 11). Diese Werte ergaben für AMBP und CRP Sensitivitäten von 65% und 55% zur Detektion von Adenomen und 80% und 65% für die Detektion von Karzinomen bei einer Spezifität von 80%. Für die Detektion von Neoplasien allgemein ergab sich eine Sensitivität von 72,5% für AMBP und 60% für CRP bei einer Spezifität von 80% (Tabelle 12).

Weitere Studien mit mehr Patientenproben könnten die Werte noch erhöhen. Schließt man die Patienten aus der Identifizierungsstudie mit ein, erreicht man einen AUC Wert für CRP von 0,78 und AMBP von 0,89 für die Identifizierung eines KRK und AUC von 0,82 und 0,79 für Adenome.

4.5 Kombinationen von Biomarkern

Die Karzinogenese ist sehr komplex, sodass ein einziges Molekül bzw. ein einziger Biomarker unzureichend und eine Kombination von mehreren Markern deshalb vorteilhaft wäre. Biomarker-Panels, die aus mehreren Proteinen bestehen, würden höhere Sensitivitäten und Spezifitäten bieten.¹⁹⁵

In dieser Arbeit wurden das AMBP und das CRP als geeigneteste Biomarker zur Erkennung eines kolorektalen Adenoms und Karzinoms identifiziert. Als einzelner Marker erzielt man mit AMBP eine Sensitivität von 72,5% und mit CRP eine Sensitivität von 60% bei einer Spezifität von 80% für das Erkennen von Neoplasien. Unter Berücksichtigung beider Marker lässt sich die Detektionsrate noch erhöhen. Nach Berechnung eines Grenzwertes von 2,69 units, erhält man eine Sensitivität von 80% (Spezifität 80%) wobei 32 von 40 Adenomen und Karzinomen (2 Karzinome und 6 Adenome wurden nicht richtig klassifiziert) richtig klassifiziert werden (Tabelle 10). Schließt man die Proben aus der Identifizierungs-Studie ein ($n=75$ Proben), wird für AMBP ein AUC-Wert von 0,84 erreicht bei einer Sensitivität von 75% bei einer Spezifität von 80% für die Detektion kolorektaler Neoplasien. Mit CRP in Kombination eine Sensitivität von 80% für Adenome und Karzinome und 90% für die Detektion eines KRK (Daten nicht gezeigt). Mit der Kombination erreicht man ähnlich hohe Sensitivität wie mit der Koloskopie $>90\%$.¹⁹⁶ Diese Werte könnten durch weitere vielversprechende Biomarker noch verbessert werden.

Sicherlich sind noch viele neue Biomarker mit Hilfe der Proteomik aufzudecken, und aufgrund der Heterogenität dieser Krankheit ist es sicherlich förderlich ein Panel aus mehreren Biomarkern zu haben, um eine präzise Charakterisierung der KRK Subtypen zu gewährleisten.¹⁹⁷

4.6 Biologische Bedeutung der potentiellen Tumorbiomarker

4.6.1 Das C-reaktive Protein (CRP) und die Rolle von Akute-Phase-Proteinen während der Karzinogenese

Das C-reaktive Protein ist ein von der Leber gebildetes Akute-Phase-Protein (APP), das bei einer Immunantwort des Körpers gegen Infektionen, Verletzungen oder Operationen, Gewebeschädigungen, Neoplasien und Immunkrankheiten freigesetzt wird.¹⁴⁷ Es gilt als das erste beschriebene APP und besteht aus einem Ring aus fünf 23 kDa großen Untereinheiten.¹⁹⁸ Seinen Namen bekam es daher, weil es an C-Polysaccharid der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* binden kann. Es heftet sich aber auch an weitere Bakterien, Pilze und Parasiten und kennzeichnet diese für die Phagozytose. Der Komplex aus Antigen und CRP wird von Makrophagen beseitigt. Auf diese Weise lässt sich auch Zellmüll, der etwa bei Nekrosen auftritt, entfernen. Dies trägt zur Wiederherstellung der normalen Struktur und Funktion des beschädigten Gewebes bei.¹⁹⁹ Zudem stimuliert der Antigen-CRP-Komplex das Komplementsystem. Wie viele andere Komponenten des Immunsystems hat CRP aber nicht nur protektive, sondern auch schädigende Eigenschaften. Es ist bereits bekannt, dass ein erhöhter CRP-Spiegel im Blut das Risiko an einem KHK zu erkranken steigert.²⁰⁰⁻²⁰² Ebenso ist es erwiesen, dass Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein erhöhtes Risiko haben, an einem KHK zu erkranken.³¹ Entzündungen fördern demnach eine Krebserkrankung bzw. ein vorhandenes Karzinom löst eine Immunantwort im Körper aus.^{203,204} Im Jahre 2011 nahmen Hanahan und Weinberg Entzündungen in die Liste der sieben Kennzeichen von Krebs („*hallmarks of cancer*“) auf.¹

CRP ist ein unspezifischer proinflammatorischer Entzündungsmarker und der klinisch wichtigste Vertreter der APPs. Andere positive APPs sind hauptsächlich das Serum Amyloid A (SAA) und das Haptoglobin (Hp), die von den Leberzellen nach Stimulation von bestimmten Zytokinen freigesetzt werden.^{205,206}

Negative oder anti Akute-Phase-Proteine sind u.a. das Albumin und Transthyretin (TTR), die bei akuten Entzündungen sinkende Serumkonzentrationen zeigen und auch bei Vorhandensein eines Karzinoms erniedrigt vorliegen. Sowohl erhöhte CRP-Level, als auch verminderte TTR-Konzentrationen im Blut, sind bei KHK-Patienten beschrieben worden.^{154,207,208} Sie üben einen negativen Einfluss auf die Kanzerogenese aus, da Entzündung die Progression von Adenomen zu Karzinomen fördert.²⁰⁹

4.6.2 Das Alpha-1-Mikroglobulin/Bikunin Precursor (AMBP) und seine Rolle während der Karzinogenese

Das humane AMBP-Gen ist auf dem Chromosom 9 lokalisiert und kodiert für ein komplexes Glykoprotein, das ins Plasma sezerniert wird.²¹⁰ AMBP ist ein Vorläuferprotein (Präkursor), das von einer Furin-ähnlichen Protease in die zwei Proteine Alpha-1-mikroglobulin (A1M) und Bikunin proteolytisch prozessiert wird. Studien in verschiedenen Expressionssystemen haben gezeigt, dass A1M und Bikunin aber auch separat exprimiert werden können.^{211,212}

A1M und Bikunin haben jeweils verschiedene Funktionen: A1M gehört zur Superfamilie der Lipocalin-Transportproteine, Bikunin ein urinärer Trypsininhibitor aus der Superfamilie der Kunitz-Proteaseinhibitoren.^{148,213}

A1M wird in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie im Urin oder Plasma vorgefunden und hat immunregulierende, hauptsächlich immunsuppressive Eigenschaften.^{213,214} Im Gegensatz zum CRP gehört es aber nicht zu den Akute-Phase-Proteinen.

Bikunin inhibiert eine große Anzahl an Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin oder Plasmin²¹⁵⁻²¹⁷ und inhibiert eine Proteinase, die bei der Metastasenbildung von Tumoren involviert ist und Bikunin somit metastaseninhibierende Eigenschaften zugeschrieben werden.²¹⁸ Ebenso spielt es eine Rolle bei Entzündungen. Es ist bekannt, dass die Konzentration von freiem Bikunin im Plasma während einer Entzündung ansteigt.²¹⁹

In situ Hybridisierungsstudien zeigten, dass AMBP-mRNA im Leberparenchym, Pankreas und intestinalen Epithelium transkribiert wird. Eine etwas schwächere Expression konnte in der Nabelschnur, in Vertebraten während der Entwicklung und den Nieren beobachtet werden.¹⁵⁷

Übereinstimmend konnte eine schwache AMBP-Proteinexpression in intestinalen Epithelzellen von Kontrollpatienten detektiert werden. Weiterhin ließ sich eine vermehrte AMBP-Expression von Epithelzellen des Kolons und Tumor-Stromazellen in Adenom- und KRK- Gewebe erkennen, was auf eine lokale Produktion von AMBP während der Karzinogenese hindeutet.

Zusätzlich konnte eine Hochregulation von AMBP mittels MS, Western Blot und ELISA im Plasma von Adenom- und KRK-Patienten festgestellt werden, die möglicherweise eine erhöhte lokale Sekretion von AMBP in den Darm reflektiert. Da A1M und Bikunin nach der Spaltung im trans-Golgi-Apparat als separate Proteine ins Blutplasma gelangen,²¹³ wurde zusätzlich die A1M-Konzentration im Plasma von Adenom- und Karzinom-Patienten untersucht. Hier konnten ebenfalls mit einem spezifisch gegen A1M gerichteten ELISA im Gegensatz zur Kontrolle erhöhte A1M-Plasmalevel vorgefunden werden (Daten nicht gezeigt). Dies ergibt die Möglichkeit, dass A1M eine funktionelle Rolle bei der kolorektalen Kanzerogenese spielt, da dem Protein bereits eine Rolle bei der Kontrolle von Entzündungsprozessen, Metastasenbildung und Immunsuppression zugeschrieben wird.^{220,221}

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AMBP direkt in den neoplastischen Zellen des Kolons exprimiert wird (Abbildung 51), d.h. dass intestinale Epithelzellen und Stromazellen eine direkte Quelle für erhöhte AMBP-Level in KRK-Patienten sind. Darüber hinaus war eine Clusterbildung von AMBP-positiven Zellen im Tumorgewebe zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass die vermehrte AMBP-Produktion von Tumor-Stammzellen ausgeht.

Eine Hypothese für die vermehrte Anreicherung wäre, dass AMBP von neoplastischen intestinalen Epithelzellen und Tumorstromazellen mit einer beeinträchtigten Furin-Proteaseaktivität übermäßig produziert wird, was zu erhöhten AMBP-Konzentrationen im Plasma führt. Eine Mutation der Furin-Protease wurde bereits in einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie beschrieben, die die Präkursor-Prozessierung supprimiert und somit zu einer defekten AMBP-Prozessierung führt.²²² Ebenso möglich wäre es, dass A1M aufgrund seiner immunregulatorischen bzw. immunsuppressiven Funktion als separates Protein vermehrt produziert wird. Eine abgeschwächte bzw. unterdrückte Immunantwort würde ein Ausbreiten der KRK-Zellen fördern.

4.7 Untersuchungen zur Spezifität

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, wie spezifisch AMBP als Biomarker für die Detektion eines KRK ist. Um auszuschließen, ob AMBP nur bei einer Entzündung des Kolons erhöht vorliegt, wurden AMBP-Serumlevel von Patienten mit einer akuten CED bestimmt. Bei CRP konnte man wie erwartet eine Erhöhung im Blutplasma feststellen.²²³ Wohingegen gezeigt werden konnte, dass AMBP bei Patienten mit CED nicht erhöht detektiert werden konnte und es somit als Tumormarker für das KRK dient (Abbildung 50) und nicht entzündungsabhängig ansteigt.

Laut Literatur findet man eine differentielle Expression von AMBP auch bei einigen anderen Erkrankungen. Kürzlich wurde beschrieben, dass erniedrigte AMBP-Level im Urin auf ein Blasenkarzinom hindeuten können.^{224,225} Bei Patienten mit Magenkarzinom dagegen liegt es in erhöhten Serumkonzentrationen vor.²²⁶ Auch bei Patientinnen mit Mammakarzinom wurde es vermehrt vorgefunden.²²⁷ Erhöhte AMBP-Plasmalevel für das KRK wurden dagegen bislang noch nicht beschrieben.

In der Literatur wird die A1M-Konzentration im Urin als ein sensitiver Indikator für eine verminderte Nierenfunktion beschrieben.²²⁸ Ebenso gibt es Hinweise dafür, dass A1M bei oxidativem Stress und Verletzungen der Haut vermehrt exprimiert wird, um die Haut vor freien Radikale und Häm zu schützen.²²⁹ Auf diesem Hintergrund basierend soll die Rolle des AMBPs im Plasma von Melanom-Patienten in einer weiteren Studie untersucht werden.

Inwieweit der vorgeschlagene Test auch bei der Normalbevölkerung anspricht, muss überprüft werden, d.h. er sollte ein Ansprechen auch unter nicht-standardisierten Bedingungen garantieren.

4.8 Ausblick und Anwendung des diagnostischen Testverfahrens

Es wird vermutet, dass viele potentielle Biomarker für das KRK bislang unentdeckt sind, speziell aufgrund der hohen Heterogenität dieser Krankheit wären mehrere Biomarker vorteilhaft. Nach wie vor stellt die Validierung neuer Biomarker eine Herausforderung dar⁸⁶, wird aber durch multiplexe MS-basierte Methoden immer mehr erleichtert.²³⁰

Wie bereits beschrieben, sind etliche Biomarker für das Erkennen eines KRK bekannt. Bei der Suche nach neuen Biomarkern sollten zusätzlich Adenome als separate Gruppe in klinische Studien eingeschlossen werden, da sie für die Tumorentstehung relevante Informationen liefern. Viele Studien beschreiben neue KRK-assoziierte Proteine, jedoch wurden die Interaktionen und Netzwerke dieser Proteine wenig berücksichtigt.¹⁹⁷ Neue Biomarker würden das Auffinden von Neoplasien im Kolon wesentlich erleichtern und neue Screeningmethoden könnten entwickelt werden. Ein Bluttest beispielsweise, der auf bestimmte Proteine reagiert könnte die Standardscreeningmethode, die Koloskopie, ablösen bzw. ergänzen. Da eine Koloskopie zeitintensiv, schmerzhaft und risikobehaftet ist, würde die Mehrzahl der Patienten alternative Vorsorgemethoden bevorzugen. 88,8% der Patienten würden auf Empfehlung des Arztes einen FOBT durchführen lassen.²³¹ Bei einem positiven FOBT, würden 84,9% der Anwender eine angebotene Koloskopie befürworten.²³¹ Aus diesem Hintergrund ist es ersichtlich, dass ein Bluttest eine vergleichbare, wenn nicht sogar höhere Akzeptanz in der Bevölkerung erreichen würde als der FOBT.

Das hier in der Arbeit identifizierte AMBP-Protein erlaubt sowohl eine Detektion von Patienten mit kolorektalen Adenomen als auch mit Karzinomen und besitzt somit ein großes Potential zur Diagnostik kolorektaler Neoplasien. Aus diesem Grund haben wir für die korrespondierenden Biomarker ein internationales Patent für ein diagnostisches Testverfahren zur nicht-invasiven Detektion kolorektaler Adenome basierend auf der Kombination der zwei Biomarker AMBP und CRP am 13. Mai 2013 durch unseren Projektpartner BioNTech AG angemeldet. Die zugehörige Nummer dieses weltweiten Patents ist die PCT/EP2013/059845. Das diagnostische Testverfahren kann sowohl zur Prävention als auch zur Beurteilung von Therapieerfolgen herangezogen werden.

Es sind allerdings weitere Schritte notwendig, um einen glaubwürdigen Diagnostiktest zu entwickeln. Dies beinhaltet die Methodenoptimierung, Validierung mit einer sehr großen Anzahl an Patientenproben (Tausende), ggf. Validierung auch auf zellulärer Ebene, sowie die Kreuzvalidierung, d.h. Test auf eine Reaktion von Patienten mit anderen Krebserkrankungen.

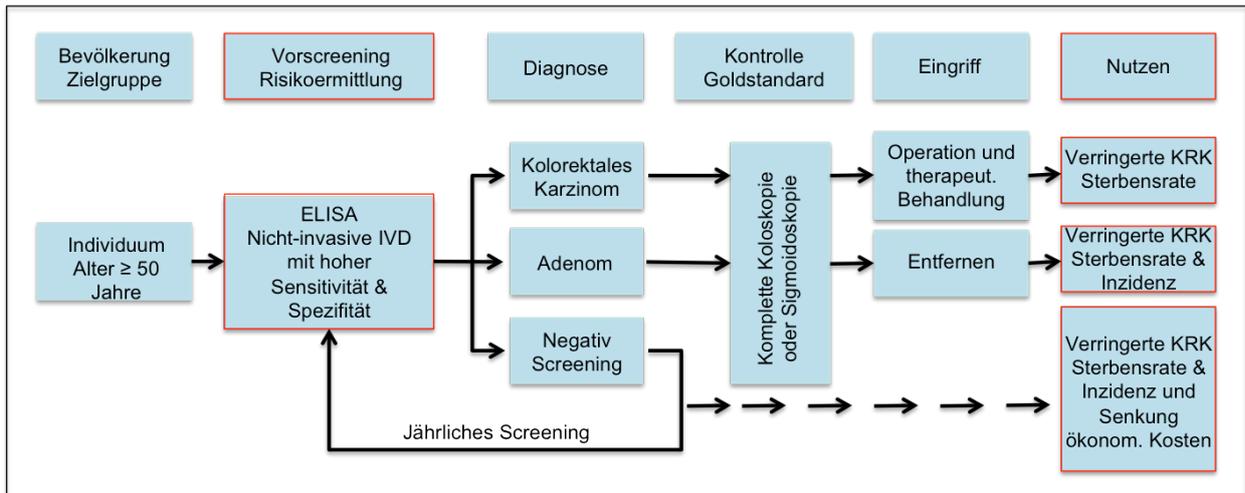


Abbildung 52: Übersicht über die Anwendung des neuen diagnostischen Testverfahrens. Das Flussdiagramm zeigt den Einsatz eines ELISAS zur Detektion von Vorstufen sowie fortgeschrittenen Stadien des KRKs und den daraus resultierenden Nutzen (rot markiert). (Erstellt nach BioNTech).

Die Validierung beider Biomarker würde zu einem Diagnostiktest führen, der als ein Vorscreening angewendet werden kann und somit betreffende Personen selektiert, um sich einer Koloskopie zu unterziehen. Dies würde die Inzidenz und Mortalitätsrate verringern und Kosten des Gesundheitssystems sowie ökonomische Kosten senken (Abbildung 52).

5 Zusammenfassung

Zur Detektion von neuen potentiellen Biomarkerkandidaten für das KRK sowie dessen Vorstufen wurde Blutplasma von gesunden Kontrollen und von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen untersucht. Mit Hilfe immunoaffinitäts-basierter Chromatographiesäulen wurde das Blutplasma mit einer automatisierten Methode von hoch- und moderat abundanten Proteinen entfernt und daraufhin massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurde eine labelfreie quantitative und datenunabhängige Methode angewendet. Beides trug zu einer hohen experimentellen bzw. technischen Reproduzierbarkeit bei und erlaubte somit einen besseren Vergleich der drei Patientengruppen. Nach Auswertung der Daten mit der am Institut für Immunologie entwickelten Software (ISOQuant), kristallisierten sich mehrere potentielle Biomarkerkandidaten heraus, wobei das Augenmerk auf solchen Proteinen lag, die sowohl bei Adenom-Patienten als auch bei Karzinom-Patienten vermehrt im Plasma vorlagen. Nach Western Blot Experimenten und einer weiteren Validierung mittels eines ELISAs an einem größeren Patienten-Set, zeigte sich, dass die beiden Proteine AMBP und CRP als potentielle Biomarker zur Detektion von Adenomen und Karzinomen herangezogen werden konnten. Receiver Operating Charakteristik (ROC)-Analysen ergaben einen AUC-Wert von 0,79 für AMBP und 0,77 für CRP für das Erkennen von Adenomen und Karzinomen. Dies resultierte in einer Sensitivität von 72,5% für AMBP bzw. 60% für CRP bei einer Spezifität von 80%. Durch die Kombination beider Markerproteine erhielt man sogar eine noch höhere Sensitivität von 80% bei 80% Spezifität für das Aufdecken kolorektaler Neoplasien. Ebenso zeigte sich in der histochemischen Analyse, dass AMBP direkt von intestinalen Epithelzellen exprimiert wird. Auch hier konnte im Vergleich zu gesundem Gewebe ein vermehrtes Auftreten in neoplastischen Zellen beobachtet werden, die somit als direkte Quelle für vermehrtes AMBP in KRK-Patienten dienen.

Beide Biomarker können mittels eines ELISAs als ein neues Screeningverfahren eingesetzt werden, da gezeigt wurde, dass AMBP und CRP sowohl bei Tumor-Vorläuferstufen als auch bei bereits etablierten ausgeprägten Karzinomen spezifisch hoch exprimiert ist. In der Abwesenheit von Tumor-Vorstufen oder Tumoren wird bei gesunden Patienten AMBP und CRP nur marginal im Serum exprimiert. Zur weiteren Unterstützung und Bestätigung der Diagnose wird empfohlen, dass sich der Patient bei positiv erhöhter AMBP-Expression im Serum zudem einer makroskopischen Kontrolle im Rahmen einer Endoskopie unterzieht. Die Spezifität des Untersuchungssystems ermöglicht somit sowohl den Einsatz im Rahmen eines präventiven Screenings vor einer Endoskopie als auch im Rahmen von Therapiestrategien oder in der post-operativen Rezidivphase. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Biomarker die Entwicklung eines innovativen Tests ermöglichen, der die Inzidenz und Mortalitätsrate des KRK verringert, die Überlebensrate erhöht und wirtschaftliche Kosten senkt, sowie die Lebensqualität im Alter verbessern könnte.

6 Summary

Currently available biomarkers for the detection of advanced colorectal cancer (CRC) are of limited value for the detection of premalignant lesions in the colon prior to screening endoscopy. Therefore, the aim of this project was the identification of novel plasma markers for colorectal adenomas.

Towards this purpose, we purified low-abundance proteins from 30 plasma samples of healthy controls and patients with colonic adenomas/CRC by using a fully automated tandem IgY12-SuperMix immunoaffinity depletion system for enhanced detection of low abundance proteins. Proteins were then subjected to tryptic digestion. For the unbiased identification of potential biomarker candidates, we then applied a data-independent-acquisition based label-free quantitative proteomic approach, requiring only minimal sample preparation. The high technical reproducibility of our workflow facilitated the reproducible identification of > 100 low-abundance plasma proteins and allowed a clear discrimination of the three patient groups. We could identify several upregulated proteins in fractionated plasma samples of adenoma and cancer patients. After verifying specific marker protein expression levels by Western blotting, immunohistochemistry and ELISA, we used receiver operating characteristics (ROC) to calculate the diagnostic accuracy of the identified biomarkers in a subsequent prospective ELISA study in 60 additional patients. Western blot and ELISA analysis confirmed that the proteins AMBP and CRP were significantly increased in the plasma of adenoma and cancer patients compared to healthy controls. The area under a receiver operating characteristic curve (AUC) was 0.79 for AMBP and 0.77 for CRP alone when colonic neoplasias were compared to controls. This resulted in a sensitivity of 72.5% for AMBP and 60% for CRP at a specificity of 80%. For both proteins together an AUC value of 0.85 could be achieved, which lead to a sensitivity of 80% and specificity of 80% for detection of colorectal neoplasias. Immunohistochemistry showed that AMBP is expressed by EpCAM+ intestinal epithelial cells in colorectal neoplasias. AMBP produced by intestinal epithelial cells emerges as plasma marker protein with high sensitivity for detection of colorectal adenomas. Plasma testing of AMBP in combination with other biomarkers might allow the stratification of patients for surveillance colonoscopy.

In conclusion, our validated biomarkers will enable the development of an innovative test that decreases incidence and mortality, increases survival and improves quality of life in old age. It also reduces costs due to loss of productivity and minimizes costs for health care by reducing treatment efforts.

7 Abkürzungsverzeichnis

5FU	5-Fluorouracil
A1M	alpha-1-Mikroglobulin
A2GL/LRG1	Leucine-rich alpha-2 Glykoprotein 1
AACT/SerpinA3	Alpha-1-antichymotrypsin
AAT	Alpha-1-antitrypsin
AFP	Alpha-Feto-Protein
AKT	alias Proteinkinase B (PKB)
ALS/IGFALS	insulin like growth factor binding protein, acid labile subunit
AMBP	Alpha-1-Mikroglobulin/Bikunin Precursor
APC	adenomatous polyposis coli
AUC	area under the curve
	Philadelphiachromosom, "breakpoint cluster region"Abelson
BCR-ABL	Murine Leukemia Viral Oncogene
Beta-HCG	Beta-Choriongonadotropin
BSA	bovine serum albumin
C9	Komplement Komponente 9
CAC	Colitis-assoziertes Kolonkarzinom
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CID	collision induced dissociation
CIMP	CpG Island Methylator Phenotyp
CLUS	Clusterin
CML	chronische myeloische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
CTNNB1	β-Catenin kodierendes Gen
CU	Colitis ulcerosa
DCC	deleted in colon carcinoma
DDA	data dependent acquisition
DIA	data independent acquisition
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECM	Extrazellulären Matrix
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition

ESI	Elektrospray-Ionisierung
et al.	et alia (und andere)
eV	Elektronenvolt
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FASP	filter aided sample preparation
FBLN1	Fibulin 1
FDA	US Food and Drug Administration
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FOBT/gFOBT	guaiac fecal occult blood test (Hämocculttest)
FPLC	fast performance liquid chromatographie
FT	Flowthrough (Durchfluss)
FWHM	full width half maximum (Halbwertsbreite)
GTP	Guanosintriphosphat
HAP	hoch abundante Proteine
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HNPCC	hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochdurchsatz-Flüssigkeitschromatographie)
HPTN	Haptoglobin
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IAA	Iodacetamid
ICAMs	intrazelluläre Adhäsionsmoleküle
ICAT	isotope-coded affinity tags
iFOBT	immunological fecal occult blood test (immunologischer Hämocculttest)
IGFR	insulin-like growth factor receptor
iTRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantification
JPS	juvenile Polyposis
KRAS	kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	kolorektales Karzinom
l	Liter
LAP	niedrig abundante Proteine
LC	liquid chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LCAT	Lecithin-cholesterin-Acyltransferase
LMWs	niedermolekulare Proteine
MAC	membran attack complex (Membranangriffskomplex)
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight

MAP	MYH-assoziierte Polyposis
MAP	moderat abundante Proteine
MC	Morbus Crohn
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLH1	MutL Homolog 1
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mmr	Mismatch-repair(mmr)-Gene
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	mammalian target of rapamycin
MU	Marker Units
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health, nationales US-Gesundheitsinstitut
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
pg	Picogramm
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PJS	Peutz-Jeghers-Syndrom
PLGS	ProteinLynx Global Server
PLS1	Plastin 1
PMS1	postmeiotic segregation increased 1
PMS2	postmeiotic segregation increased 2
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphat- und Tensin-Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	receiver operating characteristics
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SELDI-TOF	Surface-enhanced laser desorption/ionization Time-of-flight

SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture
sog.	sogenannt
TBST	Tris buffered saline mit Tween 20
TGF β	transforming growth factor beta
TOF	time of flight
TTR/TTHY	Transthyretin
u.a.	unter anderem
	union international contre le cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
UICC	
ÜN	über Nacht
UPLC	ultra performance liquid chromatography
VCAM1	vascular cellular adhesion molecule 1
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vs.	versus (gegen)
WHO	world health organization (Weltgesundheitsorganisation)
μ g	Mikrogramm

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Prozentuale Verteilung der KRK-Lokalisationen in den verschiedenen Abschnitten des Dickdarms.....	2
Abbildung 2:	Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein.....	5
Abbildung 3:	Beteiligte Signalwege in der Pathogenese des KRK nach dem Modell von Fearon und Vogelstein.....	6
Abbildung 4:	Darstellung der verschiedenen Stadien des KRKs als Balken.....	9
Abbildung 5:	Die Kaplan-Meier-Survival-Kurve zeigt die Überlebensraten nach Malignitätsgraden (Grading).....	10
Abbildung 6:	Die Anzahl der von der NIH geförderten Biomarker-Projekte und zugehöriger Publikationen.....	14
Abbildung 7:	Einteilung des Plasmaproteoms.....	16
Abbildung 8:	Der dynamische Bereich des Plasmaproteoms.....	17
Abbildung 9:	Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers am Beispiel eines Q-TOF MS...20	
Abbildung 10:	MSE-Analyse beim Q-TOF Premier Tandem-MS von Waters®.....	20
Abbildung 11:	MSE Technologie.....	21
Abbildung 12:	Prinzip der Plasma-Depletion mit Hilfe der beiden Depletionssäulen IgY12 LC10 und SuperMix LC2.....	31
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der Plasma-Separations-Methode.....	32
Abbildung 14:	Aufbau des Q-TOF Premier MS von Waters®.....	36
Abbildung 15:	Aufbau eines Western Blots.....	40
Abbildung 16:	Schematische Darstellung über die Funktionsweise eines Western Blots.....	41
Abbildung 17:	Vergleich von ROC-Kurven.....	43
Abbildung 18:	Bestimmung eines gemeinsamen Kombinationswertes aus AMBP- und CRP-Konzentrationen anhand verschiedener „weighting ratios“.....	44
Abbildung 19:	Flussdiagramm über den Ablauf der Biomarker-Studie.....	46
Abbildung 20:	Schematischer Aufbau der durchgeführten Experimente zur Detektion neuer Biomarker im Blutplasma.....	48
Abbildung 21:	Chromatogramm der Plasma Separationsmethode repräsentativ für eine Plasma-Probe.....	49
Abbildung 22:	Konzentrationen des Plasmas vor und nach der Depletion und der Eluate...50	
Abbildung 23:	Reproduzierbarkeit der Depletionsmethode.....	51
Abbildung 24:	SDS-PAGE des Gesamtplasmas sowie der depletierten Fraktionen.....	51
Abbildung 25:	Technische Reproduzierbarkeit.....	52
Abbildung 26:	Venn-Diagramm identifizierter Proteine der einzelnen Fraktionen mittels LC-MS/MS.....	53
Abbildung 27:	Venn-Diagramme aller identifizierter Proteine, die in mindestens zwei der drei Messungen vorkamen.....	54
Abbildung 28:	Dynamischer Bereich des undepletierten Gesamtplasmas (A), der HAPs (B), MAPs (C) sowie der LAPs (C).....	55
Abbildung 29:	Differentiell regulierte Proteine in den Karzinom- und Adenomproben.....	57
Abbildung 30:	Balkendiagramm möglicher Biomarkerkandidaten für das Kolonkarzinom sowie dessen Vorstufen.....	57
Abbildung 31:	Western Blot Analyse für das C-reaktive Protein (CRP).....	62
Abbildung 32:	Western Blot mit einem Antikörper gegen AMBP gerichtet.....	63
Abbildung 33:	Western Blot mit Antikörper gegen Complement component 9 gerichtet.....	63
Abbildung 34:	Western Blot mit Antikörper gegen LRG1 gerichtet.....	64
Abbildung 35:	Western Blot mit einem Antikörper, der gegen S100A9 gerichtet ist.....	65
Abbildung 36:	Western Blot mit einem Antikörper gegen SerpinA3.....	65
Abbildung 37:	Western Blot der Proteine Clusterin (A), L Plastin (B) und VCAM 1 (C).....	66
Abbildung 38:	Nachweis des LCAT-Proteins in den Karzinom- und Kontrollproben mittels Western Blot.....	66
Abbildung 39:	Fluss-Diagramm der Biomarker-Studie.....	67

Abbildung 40:	CRP Plasma-Konzentrationen in jeweils 20 Adenom-, Karzinom-, und Kontroll-Patienten.....	68
Abbildung 41:	Ermittlung der AMBP-Konzentrationen in 20 Kontrollen, 20 Adenom- und 20 Karzinomproben mit Hilfe eines ELISA Assays.	69
Abbildung 42:	Analyse von Patienten- und Kontroll-Plasma mit Hilfe eines ELISAs spezifisch gegen C9.....	70
Abbildung 43:	Analyse von Patienten- und Kontroll-Plasma mit Hilfe eines ELISAs spezifisch gegen SerpinA3.....	71
Abbildung 44:	Analyse von Patienten- und Kontroll-Plasma mit Hilfe eines ELISAs spezifisch gegen S100A9.....	72
Abbildung 45:	Verteilung der AMBP+CRP Konzentrationen.....	73
Abbildung 46:	Kombinationswerte der aus den mittels ELISA ermittelten Konzentrationen von AMBP und CRP.....	74
Abbildung 47:	Streudiagramm der mittels ELISA bestimmten AMBP- und CRP-Konzentrationen und dem Alter der Kontrollproben sowie Karzinom- und Adenom-Patienten.	75
Abbildung 48:	Vergleich der ROC-Kurven für AMBP (rot) und CRP (schwarz).	76
Abbildung 49:	ROC-Kurven, die aus der Kombination beider Marker hervorgehen.	77
Abbildung 50:	Blutplasma-Konzentrationen von CRP (A) und AMBP (B) von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	79
Abbildung 51:	Immunofluoreszenzfärbung von AMBP im Gewebe von Patienten mit Neoplasien des Kolons sowie normalem Kolongewebe.	80
Abbildung 52:	Übersicht über die Anwendung des neuen diagnostischen Testverfahrens. ...	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Erläuterung der Abkürzungen des TNM-Systems.....	7
Tabelle 2:	Übersicht der UICC-Stadien, sowie der entsprechenden Dukes und Astler-Coller-Einteilungssysteme.	8
Tabelle 3:	Patienten-Charakteristik.....	29
Tabelle 4:	Verwendete Depletionssäulen.....	30
Tabelle 5:	Methode zur Plasmadepletion mit der IgY12 LC10 und SuperMix LC2.	33
Tabelle 6:	UPLC Methode.....	37
Tabelle 7:	Zusammensetzung der SDS-Gele.	39
Tabelle 8:	Durchschnittliche Anzahl identifizierter Proteine in der Durchfluss-Fraktion.....	54
Tabelle 9:	Differentiell regulierte Proteine in der Durchfluss-Fraktion von Adenom- und Karzinom-Patienten.....	59
Tabelle 10:	Testergebnisse der Validierungs-Studie mit dem Kombinationsmarker.....	74
Tabelle 11:	AUC-Werte für AMBP, CRP sowie deren Kombination.....	78
Tabelle 12:	Sensitivitäten und Spezifitäten der Proteine AMBP und CRP sowie deren Kombination.	78

9 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
2. Ferlay, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. cancer.* **127**, 2893–917 (2010).
3. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* **49**, 1374–403 (2013).
4. *Health at a Glance 2011: OECD Indicators.* (2011).
5. Pawa, N., Arulampalam, T. & Norton, J. D. Screening for colorectal cancer: established and emerging modalities. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 711–22 (2011).
6. Gupta, A. K., Brenner, D. E. & Turgeon, D. K. Early detection of colon cancer: new tests on the horizon. *Mol. Diagn. Ther.* **12**, 77–85 (2008).
7. Burt, R. W. Colorectal cancer screening. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **26**, 466–70 (2010).
8. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Institutes und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. *Krebs in Deutschland 2007/2008.* (2012).
9. Davies, R. J., Miller, R. & Coleman, N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 199–209 (2005).
10. Parkin, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* **2**, 533–543 (2001).
11. Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J. & Forman, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* **13**, 790–801 (2012).
12. Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics. **61**, 69–90 (2011).
13. Edwards, B. K. *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* **116**, 544–73 (2010).
14. Südwestdeutsches Tumorzentrum Tübingen. Kolonkarzinom Rektumkarzinom Analkarzinom. (2009).
15. Parker, S. L., Tong, T., Bolden, S. & Wingo, P. A. Cancer statistics, 1996. *CA. Cancer J. Clin.* **46**, 5–27
16. Cunningham, D. *et al.* Colorectal cancer. *Lancet* **375**, 1030–47 (2010).
17. Facts, C. C. Colorectal Cancer. 2006–2008 (2013).
18. Siegel, R. *et al.* Cancer Treatment and Survivorship Statistics , 2012. (2013). doi:10.3322/caac.21149.
19. Cannon-Albright, L. A., Skolnick, M. H., Bishop, D. T., Lee, R. G. & Burt, R. W. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N. Engl. J. Med.* **319**, 533–537 (1988).
20. Houlston, R. S., Collins, A., Slack, J. & Morton, N. E. Dominant genes for colorectal cancer are not rare. *Ann. Hum. Genet.* **56**, 99–103 (1992).
21. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159–70 (1996).
22. Houlston, R. S., Collins, A., Slack, J. & Morton, N. E. Dominant genes for colorectal cancer are not rare. *Ann. Hum. Genet.* **56**, 99–103 (1992).
23. Lynch, H. T. & de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 919–32 (2003).
24. Aarnio, M., Mecklin, J.-P., Aaltonen, L. A., Nyström-Lahti, M. & Järvinen, H. J. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (hnpcc) syndrome. *Int. J. Cancer* **64**, 430–433 (1995).
25. Stoffel, E. *et al.* Calculation of Risk of Colorectal and Endometrial Cancer Among Patients With Lynch Syndrome. *Gastroenterology* **137**, 1621–1627 (2009).
26. Umar, A. *et al.* Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 261–268 (2010).

27. Vasen, H. F. A., Watson, P., Mecklin, J. & Lynch, H. T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* **116**, 1453–1456 (1999).
28. Centelles, J. J. General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncol.* **2012**, 139268 (2012).
29. Jeghers, H., McKusick, V. & Katz, K. H. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. *N. Engl. J. Med.* **241**, 1031–6 (1949).
30. Veale, a M., McColl, I., Bussey, H. J. & Morson, B. C. Juvenile polyposis coli. *J. Med. Genet.* **3**, 5–16 (1966).
31. Eaden, J. A., Abrams, K. R. & Mayberry, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **48**, 526–35 (2001).
32. Itzkowitz, S. H. & Harpaz, N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **126**, 1634–1648 (2004).
33. Morson, B. C. Some Peculiarities in the Histolog-y of Intestinal Polyps *. (1961).
34. Winawer, S. J. *et al.* The National Polyp Study: overview of program and preliminary report of patient and polyp characteristics. *Prog. Clin. Biol. Res.* **279**, 35–49 (1988).
35. Fearon, E. F. & Vogelstein, B. A genetic model for Colorectal Tumorigenesis. **61**, 759–767 (1990).
36. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**, 761, 763 (1997).
37. De la Chapelle, A. & Hampel, H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3380–7 (2010).
38. Michor, F., Iwasa, Y. & Nowak, M. A. Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer* **4**, 197–205 (2004).
39. Slaby, O., Svoboda, M., Michalek, J. & Vyzula, R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol. Cancer* **8**, 102 (2009).
40. King, T. D., Zhang, W., Suto, M. J. & Li, Y. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell. Signal.* **24**, 846–51 (2012).
41. Caraci, F. *et al.* TGF- β 1 Pathway as a New Target for Neuroprotection in Alzheimer's Disease. *CNS Neurosci. Ther.* **17**, 237–249 (2011).
42. Croce, C. M. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 502–11 (2008).
43. Asghar, U. & Meyer, T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? *J. Hepatol.* **56**, 686–695 (2012).
44. Zhang, Y.-J., Duan, Y. & Zheng, X. F. S. Targeting the mTOR kinase domain: the second generation of mTOR inhibitors. *Drug Discov. Today* **16**, 325–31 (2011).
45. Bomme, L. *et al.* Allelic imbalance and cytogenetic deletion of 1p in colorectal adenomas: A target region identified between DIS199 and DIS234. *Genes, Chromosom. Cancer* **21**, 185–194 (1998).
46. Bomme, L. *et al.* Assessments of clonal composition of colorectal adenomas by FISH analysis of chromosomes 1, 7, 13 and 20. *Int. J. Cancer* **92**, 816–823 (2001).
47. Thorsteinsson, M. *et al.* Gene expression profiles in stages II and III colon cancers: application of a 128-gene signature. *Int. J. Colorectal Dis.* **27**, 1579–1586 (2012).
48. Weiser, M. R., Gönen, M., Chou, J. F., Kattan, M. W. & Schrag, D. Predicting survival after curative colectomy for cancer: individualizing colon cancer staging. *J. Clin. Oncol.* **29**, 4796–802 (2011).
49. www.who.int.
50. De Wit, M., Fijneman, R. J. a, Verheul, H. M. W., Meijer, G. a & Jimenez, C. R. Proteomics in colorectal cancer translational research: Biomarker discovery for clinical applications. *Clin. Biochem.* (2012). doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.10.039
51. Kahi, C. J., Imperiale, T. F., Juliar, B. E. & Rex, D. K. Effect of Screening Colonoscopy on Colorectal Cancer Incidence and Mortality. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 770–775 (2009).
52. McFarland, E. G. *et al.* Revised colorectal screening guidelines: joint effort of the American Cancer Society, U.S. Multisociety Task Force on Colorectal Cancer, and American College of Radiology. *Radiology* **248**, 717–20 (2008).

53. Asile, L. V, Laru, A. O., Unteanu, M. M. & Leșea, I. E. P. Prognosis of colorectal cancer: clinical ., **53**, 383–391 (2012).
54. Kronborg, O., Fenger, C., Olsen, J., Jørgensen, O. D. & Søndergaard, O. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* **348**, 1467–71 (1996).
55. Hardcastle, J. D. *et al.* Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* **348**, 1472–7 (1996).
56. Lieberman, D. Progress and challenges in colorectal cancer screening and surveillance. *Gastroenterology* **138**, 2115–26 (2010).
57. Morikawa, T. *et al.* A Comparison of the Immunochemical Fecal Occult Blood Test and Total Colonoscopy in the Asymptomatic Population. *Gastroenterology* **129**, 422–428 (2005).
58. Allison, J. E. *et al.* Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1462–70 (2007).
59. Sieg, A. *et al.* Validity of new immunological human fecal hemoglobin and albumin tests in detecting colorectal neoplasms--an endoscopy-controlled study. *Z. Gastroenterol.* **36**, 485–90 (1998).
60. Atkin, W. S. *et al.* Design of a multicentre randomised trial to evaluate flexible sigmoidoscopy in colorectal cancer screening. *J. Med. Screen.* **8**, 137–44 (2001).
61. Weissfeld, J. L. *et al.* Flexible sigmoidoscopy in the PLCO cancer screening trial: results from the baseline screening examination of a randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 989–97 (2005).
62. Levin, B. *et al.* Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline From the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* **134**, 1570–1595 (2008).
63. Haug, U. *et al.* Tumor M2 pyruvate kinase as a stool marker for colorectal cancer: stability at room temperature and implications for application in the screening setting. *Clin. Chem.* **52**, 782–4 (2006).
64. Haug, U., Hundt, S. & Brenner, H. Sensitivity and specificity of faecal tumour M2 pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study. *Br. J. Cancer* **99**, 133–5 (2008).
65. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer: International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* **345**, 939–944 (1995).
66. Twelves, C. *et al.* Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2696–704 (2005).
67. Lee, W.-S., Baek, J.-H., Kang, J. M., Choi, S. & Kwon, K. A. The outcome after stent placement or surgery as the initial treatment for obstructive primary tumor in patients with stage IV colon cancer. *Am. J. Surg.* **203**, 715–719 (2012).
68. www.darmkrebs.de
69. Lombardi, L. *et al.* Adjuvant therapy in colon cancer. *Oncology* **77 Suppl 1**, 50–6 (2009).
70. www.krebsinformationsdienst.de
71. Strimbu, K. & Tavel, J. A. What are biomarkers? *Curr. Opin. HIV AIDS* **5**, 463–6 (2010).
72. Etzioni, R. *et al.* The case for early detection. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 243–52 (2003).
73. Hamelin, C. *et al.* Identification and verification of heat shock protein 60 as a potential serum marker for colorectal cancer. *FEBS J.* **278**, 4845–59 (2011).
74. Dowling, P. *et al.* Analysis of acute-phase proteins, AHSG, C3, CLI, HP and SAA, reveals distinctive expression patterns associated with breast, colorectal and lung cancer. *Int. J. Cancer* **131**, 911–23 (2012).
75. Schmid, H.-P., Riesen, W. & Prikler, L. Update on screening for prostate cancer with prostate-specific antigen. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **50**, 71–78 (2004).
76. Allegra, C. J. *et al.* American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to pre-

- dict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2091–6 (2009).
77. Untch, M. *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. 1659–1672 (2005).
 78. Gilligan, T. D., Hayes, D. F., Seidenfeld, J. & Temin, S. Guideline Summary ASCO Clinical Practice Guideline on Uses of Serum Tumor Markers in Adult Males With Germ Cell Tumors Part I: NSGCT. (2010).
 79. Harris, L. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5287–312 (2007).
 80. Locker, G. Y. *et al.* ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5313–27 (2006).
 81. Jones, H. B. On a New Substance Occurring in the Urine of a Patient with Mollities Ossium. *Philos. Trans. R. Soc. London* **138**, 55–62 (1848).
 82. Polanski, M. & Anderson, N. L. A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomark. Insights* **1**, 1–48 (2007).
 83. Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Druker, B. J. & Talpaz, M. Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Ann. Intern. Med.* **138**, 819–830 (2003).
 84. Ptolemy, A. S. & Rifai, N. What is a biomarker? Research investments and lack of clinical integration necessitate a review of biomarker terminology and validation schema. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **242**, 6–14 (2010).
 85. Anderson, N. L., Ptolemy, A. S. & Rifai, N. The Riddle of Protein Diagnostics: Future Bleak or Bright? *Clin. Chem.* **197**, (2012).
 86. Rifai, N., Gillette, M. A. & Carr, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotech* **24**, 971–983 (2006).
 87. Henry, N. L. & Hayes, D. F. Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.* **6**, 140–146 (2012).
 88. Teutsch, S. M. *et al.* The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet. Med.* **11**, 3–14 (2009).
 89. Rifai, N. & Gerszten, R. E. Biomarker discovery and validation. *Clin. Chem.* **52**, 1635–7 (2006).
 90. Lathrop, J. T., Anderson, N. L., Anderson, N. G. & Hammond, D. J. Therapeutic potential of the plasma proteome. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **5**, 250–7 (2003).
 91. Liotta, L. A., Ferrari, M. & Petricoin, E. Written in blood. **425**, 2003 (2003).
 92. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 845–67 (2002).
 93. Huber, L. A. Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 74–80 (2003).
 94. Mann, M. & Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotech* **21**, 255–261 (2003).
 95. Liu, T. *et al.* Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 2167–74 (2006).
 96. Tirumalai, R. S. *et al.* Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 1096–103 (2003).
 97. Hoffman, S. A., Joo, W.-A., Echan, L. A. & Speicher, D. W. Higher dimensional (Hi-D) separation strategies dramatically improve the potential for cancer biomarker detection in serum and plasma. *J. Chromatogr. B* **849**, 43–52 (2007).
 98. Petricoin, E. F., Belluco, C., Araujo, R. P. & Liotta, L. a. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 961–7 (2006).
 99. Cox, J. & Mann, M. Is proteomics the new genomics? *Cell* **130**, 395–8 (2007).
 100. Michalski, A. *et al.* Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, O111.013698 (2012).
-

101. Lee, B. T. K. *et al.* Candidate List of yoUr Biomarker (CLUB): A Web-based Platform to Aid Cancer Biomarker Research. *Biomark. Insights* **3**, 65–71 (2008).
102. Murakoshi, Y. *et al.* Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Sci.* **102**, 630–8 (2011).
103. Kingsmore, S. F. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 310–321 (2006).
104. Shi, T. *et al.* IgY14 and SuperMix immunoaffinity separations coupled with liquid chromatography–mass spectrometry for human plasma proteomics biomarker discovery. *Methods* **56**, 246–253 (2012).
105. Qian, W.-J. *et al.* Enhanced detection of low abundance human plasma proteins using a tandem IgY12-SuperMix immunoaffinity separation strategy. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1963–73 (2008).
106. Petricoin, E. F. & Liotta, L. A. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 24–30 (2004).
107. Faca, V. *et al.* Contribution of Protein Fractionation to Depth of Analysis of the Serum and Plasma Proteomes. *J. Proteome Res.* **6**, 3558–3565 (2007).
108. Righetti, P. G., Boschetti, E., Lomas, L. & Citterio, A. Protein Equalizer Technology: the quest for a “democratic proteome”. *Proteomics* **6**, 3980–92 (2006).
109. Boschetti, E. & Righetti, P. G. The art of observing rare protein species in proteomes with peptide ligand libraries. *Proteomics* **9**, 1492–510 (2009).
110. Capriotti, A. L. *et al.* Comparison of three different enrichment strategies for serum low molecular weight protein identification using shotgun proteomics approach. *Anal. Chim. Acta* **740**, 58–65 (2012).
111. Fang, X. & Zhang, W.-W. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *J. Proteomics* **71**, 284–303 (2008).
112. Taguchi, A. & Hanash, S. M. Unleashing the Power of Proteomics to Develop Blood-Based Cancer Markers. *Clin. Chem.* **126**, (2012).
113. Zhang, Q., Faca, V. & Hanash, S. Mining the plasma proteome for disease applications across seven logs of protein abundance. *J. Proteome Res.* **10**, 46–50 (2011).
114. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156–62 (2000).
115. Geromanos, S. J. *et al.* The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* **9**, 1683–95 (2009).
116. Silva, J. C. *et al.* Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal. Chem.* **77**, 2187–200 (2005).
117. Hu, X. *et al.* Comparative serum proteome analysis of human lymph node negative/positive invasive ductal carcinoma of the breast and benign breast disease controls via label-free semiquantitative shotgun technology. *OMICS* **13**, 291–300 (2009).
118. Gant-Branum, R. L., Kerr, T. J. & McLean, J. A. Labeling strategies in mass spectrometry-based protein quantitation. *Analyst* **134**, 1525–1530 (2009).
119. Bantscheff, M. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 937–8 (2012).
120. Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242–7 (2001).
121. Liu, H., Sadygov, R. G. & Yates, J. R. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics proteolytic digestion and liquid chromatography in com-. **76**, 4193–4201 (2004).
122. Gilchrist, A. *et al.* Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* **127**, 1265–81 (2006).
123. Old, W. M. *et al.* Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1487–502 (2005).
124. Nakamura, T. & Oda, Y. Mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **24**, 147–164 (2007).

125. Ong, S.-E. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376–386 (2002).
126. Ong, S.-E. The expanding field of SILAC. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 967–76 (2012).
127. Hathout, Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev. Proteomics* **4**, 239–48 (2007).
128. Gong, Y. *et al.* Different immunoaffinity fractionation strategies to characterize the human plasma proteome. *J. Proteome Res.* **5**, 1379–87 (2006).
129. Patel, V. J. *et al.* A Comparison of Labeling and Label-Free Mass Spectrometry-Based Proteomics Approaches. *J. Proteome Res.* **8**, 3752–3759 (2009).
130. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1017–31 (2007).
131. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **6**, 359–62 (2009).
132. Distler, U. *et al.* Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat. Methods* (2013).
133. Bradley, A. P. The use of the area under the ROC curve in the evaluation of machine learning algorithms. *Pattern Recognit.* **30**, 1145–1159 (1997).
134. Dimberg, J. *et al.* Expression of the serine protease inhibitor serpinA3 in human colorectal adenocarcinomas. *Oncol. Lett.* **2**, 413–418 (2011).
135. Kim, H.-J. *et al.* Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *J. Proteome Res.* **8**, 1368–79 (2009).
136. Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T. & Srikrishna, G. S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol. Cancer Res.* **9**, 133–48 (2011).
137. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–99 (2010).
138. Higaki, S. *et al.* Metaplastic polyp of the colon develops in response to inflammation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 709–14 (1999).
139. Brock, R., Xiong, B., Li, L., Vanbogelen, R. A. & Christman, L. Original Article A multiplex serum protein assay for determining the probability of colorectal cancer. **2**, 598–605 (2012).
140. Choi, J.-W. *et al.* Proteomic and cytokine plasma biomarkers for predicting progression from colorectal adenoma to carcinoma in human patients. *Proteomics* 1–14 (2013). doi:10.1002/pmic.201200550
141. Andersen, J. D. *et al.* Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 is upregulated in sera and tumors of ovarian cancer patients. *J. Ovarian Res.* **3**, 21 (2010).
142. Lindén, M. *et al.* Proteomic analysis of urinary biomarker candidates for nonmuscle invasive bladder cancer. *Proteomics* **12**, 135–44 (2012).
143. Sandanayake, N. S. *et al.* A combination of serum leucine-rich α -2-glycoprotein 1, CA19-9 and interleukin-6 differentiate biliary tract cancer from benign biliary strictures. *Br. J. Cancer* **105**, 1370–8 (2011).
144. Ladd, J. *et al.* Increased plasma levels of the APC-interacting protein MAPRE1, LRG1 and IGFBP2 preceding a diagnosis of colorectal cancer in women. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. (2012). doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0412
145. Hoogland, C., Mostaguir, K., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D. F. & Appel, R. D. SWISS-2DPAGE, ten years later. *Proteomics* **4**, 2352–6 (2004).
146. Kalsheker, N., Morley, S. & Morgan, K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 93–8 (2002).
147. Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. a & Koopmans, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **6**, 1045–56 (2005).
148. Tyagi, S., Salier, J.-P. & Lal, S. K. The liver-specific human alpha(1)-microglobulin/bikunin precursor (AMBP) is capable of self-association. *Arch. Biochem. Biophys.* **399**, 66–72 (2002).
149. Mayilyan, K. R. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein Cell* **3**, 487–96 (2012).

-
150. Nacken, W., Roth, J., Sorg, C. & Kerkhoff, C. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc. Res. Tech.* **60**, 569–80 (2003).
 151. Striz, I. & Trebichavský, I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol. Res.* **53**, 245–53 (2004).
 152. Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. & Tessier, P. a. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* **170**, 3233–42 (2003).
 153. Habermann, J. K. *et al.* Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors. *Gastroenterology* **131**, 1020–9; quiz 1284 (2006).
 154. Fentz, A.-K. *et al.* Detection of colorectal adenoma and cancer based on transthyretin and C3a-desArg serum levels. *Proteomics. Clin. Appl.* **1**, 536–44 (2007).
 155. Neumann, O. *et al.* Methylome analysis and integrative profiling of human HCCs identify novel protumorigenic factors. *Hepatology* **56**, 1817–27 (2012).
 156. Hutchinson, W. L. *et al.* Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin. Chem.* **46**, 934–8 (2000).
 157. Sánchez, D., Martínez, S., Lindqvist, A., Akerström, B. & Falkenberg, C. Expression of the AMBP gene transcript and its two protein products, alpha(1)-microglobulin and bikunin, in mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* **117**, 293–8 (2002).
 158. O'Connell, J. B., Maggard, M. a & Ko, C. Y. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1420–5 (2004).
 159. Srivastava, S. & Srivastava, R.-G. Proteomics in the forefront of cancer biomarker discovery. *J. Proteome Res.* **4**, 1098–103 (2005).
 160. Ray, S., Reddy, P. J., Choudhary, S., Raghu, D. & Srivastava, S. Emerging nanoproteomics approaches for disease biomarker detection: a current perspective. *J. Proteomics* **74**, 2660–81 (2011).
 161. Ransohoff, D. F. Rules of evidence for cancer molecular-marker discovery and validation. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 309–14 (2004).
 162. Zhang, A.-H., Sun, H., Yan, G.-L., Han, Y. & Wang, X.-J. Serum proteomics in biomedical research: a systematic review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170**, 774–86 (2013).
 163. Anderson, N. L. The Clinical Plasma Proteome: A Survey of Clinical Assays for Proteins in Plasma and Serum Mini-Reviews. *Clin. Chem.* **185**, 177–185 (2010).
 164. Hortin, G. L., Sviridov, D. & Anderson, N. L. High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin. Chem.* **54**, 1608–16 (2008).
 165. Hood, B. L., Malehorn, D. E., Conrads, T. P. & Bigbee, W. L. in *Tumor Biomark. Discov. SE - 8* (Tainsky, M. A.) **520**, 107–128 (Humana Press, 2009).
 166. Tu, C. *et al.* Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J. Proteome Res.* **9**, 4982–91 (2010).
 167. Kozak, K. R. *et al.* Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* **5**, 4589–4596 (2005).
 168. Orckowski, R. *et al.* Antibody microarray profiling reveals individual and combined serum proteins associated with pancreatic cancer. *Cancer Res.* **65**, 11193–202 (2005).
 169. Hakimi, A., Auluck, J., Jones, G. D. D., Ng, L. L. & Jones, D. J. L. Assessment of reproducibility in depletion and enrichment workflows for plasma proteomics using label-free quantitative data-independent LC-MS. *Proteomics* 1–31 (2013). doi:10.1002/pmic.201200563
 170. Tenzer, S. *et al.* Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano* **5**, 7155–67 (2011).
 171. Wasinger, V. C., Zeng, M. & Yau, Y. Current status and advances in quantitative proteomic mass spectrometry. *Int. J. Proteomics* **2013**, 180605 (2013).
 172. Ahlquist, D. A. Molecular detection of colorectal neoplasia. *Gastroenterology* **138**, 2127–39 (2010).
-

-
173. Liu, X.-P., Shen, J., Li, Z.-F., Yan, L. & Gu, J. A serum proteomic pattern for the detection of colorectal adenocarcinoma using surface enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Cancer Invest.* **24**, 747–53 (2006).
 174. Hurst, N. G. *et al.* Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal neoplasia in symptomatic patients. *Br. J. Cancer* **97**, 971–7 (2007).
 175. Walgenbach-Brunagel, G. *et al.* The use of a colon cancer associated nuclear antigen CCSA-2 for the blood based detection of colon cancer. *J. Cell. Biochem.* **104**, 286–94 (2008).
 176. Büniger, S. *et al.* A novel multiplex-protein array for serum diagnostics of colon cancer: a case-control study. *BMC Cancer* **12**, 393 (2012).
 177. Church, T. R. *et al.* Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* (2013). doi:10.1136/gutjnl-2012-304149
 178. Lasisi, F. & Rex, D. K. Improving protection against proximal colon cancer by colonoscopy. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 745–54 (2011).
 179. Pasha, S. F. *et al.* Comparison of the yield and miss rate of narrow band imaging and white light endoscopy in patients undergoing screening or surveillance colonoscopy: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **107**, 363–70; quiz 371 (2012).
 180. Faiss, S. The missed colorectal cancer problem. *Dig. Dis.* **29 Suppl 1**, 60–3 (2011).
 181. Tschopp, J., Podack, E. R. & Müller-Eberhard, H. J. Ultrastructure of the membrane attack complex of complement: detection of the tetramolecular C9-polymerizing complex C5b-8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7474–8 (1982).
 182. Pucci, S. *et al.* Clusterin in stool: a new biomarker for colon cancer screening? *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 2807–15 (2009).
 183. Andersen, C. L. *et al.* Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1039–48 (2007).
 184. Rodríguez-Piñeiro, A. M., de la Cadena, M. P., López-Saco, A. & Rodríguez-Berrocal, F. J. Differential expression of serum clusterin isoforms in colorectal cancer. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1647–57 (2006).
 185. Foran, E., McWilliam, P., Kelleher, D., Croke, D. T. & Long, A. The leukocyte protein L-plastin induces proliferation, invasion and loss of E-cadherin expression in colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **118**, 2098–104 (2006).
 186. Okugawa, Y. *et al.* Serum level of soluble vascular cell adhesion molecule 1 is a valuable prognostic marker in colorectal carcinoma. *Dis. Colon Rectum* **52**, 1330–6 (2009).
 187. Gallagher, W. M., Currid, C. a & Whelan, L. C. Fibulins and cancer: friend or foe? *Trends Mol. Med.* **11**, 336–40 (2005).
 188. Ladd, J. J. *et al.* Increased plasma levels of the APC-interacting protein MAPRE1, LRG1, and IGFBP2 preceding a diagnosis of colorectal cancer in women. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **5**, 655–64 (2012).
 189. El-Rifai, W. *et al.* Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins. *Cancer Res.* **62**, 6823–6 (2002).
 190. Hermani, A. *et al.* Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5146–52 (2005).
 191. Cross, S. S., Hamdy, F. C., Deloulme, J. C. & Rehman, I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* **46**, 256–69 (2005).
 192. Arai, K., Yamada, T. & Nozawa, R. Immunohistochemical investigation of migration inhibitory factor-related protein (MRP)-14 expression in hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* **17**, 183–8 (2000).
 193. Arai, K., Teratani, T., Nozawa, R. & Yamada, T. Immunohistochemical investigation of S100A9 expression in pulmonary adenocarcinoma: S100A9 expression is associated with tumor differentiation. *Oncol. Rep.* **8**, 591–6
-

-
194. Bernacka, K., Kuryliszyn-Moskal, A. & Sierakowski, S. The levels of alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin in the sera of patients with gastrointestinal cancers during diagnosis. *Cancer* **62**, 1188–93 (1988).
 195. Tan, H. T., Lee, Y. H. & Chung, M. C. M. CANCER PROTEOMICS. 583–605 (2012). doi:10.1002/mas
 196. Schapira, M. & Adler, M. Colonoscopy as a screening test for colorectal cancer. *Acta Gastroenterol. Belg.* **68**, 251–6
 197. Jimenez, C. R., Knol, J. C., Meijer, G. a & Fijneman, R. J. a. Proteomics of colorectal cancer: overview of discovery studies and identification of commonly identified cancer-associated proteins and candidate CRC serum markers. *J. Proteomics* **73**, 1873–95 (2010).
 198. Tillett, W. S. & Francis, T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.* **52**, 561–71 (1930).
 199. Volanakis, J. E. Human C-reactive protein: expression , structure , and function. **38**, 189–197 (2001).
 200. Mazhar, D. & Ngan, S. C-reactive protein and colorectal cancer. *QJM* **99**, 555–9 (2006).
 201. Gunter, M. J. *et al.* A Prospective Evaluation of C-reactive Protein Levels and Colorectal Adenoma Development. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1–15 (2012). doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1099.A
 202. Toriola, A. T. *et al.* Biomarkers of inflammation are associated with colorectal cancer risk in women but are not suitable as early detection markers. *Int. J. Cancer* **000**, (2012).
 203. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–44 (2008).
 204. Trinchieri, G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 677–706 (2012).
 205. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* **334** (Pt 2, 297–314 (1998).
 206. Heinrich, P. C., Castell, J. V & Andus, T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **265**, 621–36 (1990).
 207. Chiu, H.-M. *et al.* Elevation of C-reactive protein level is associated with synchronous and advanced colorectal neoplasm in men. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2317–25 (2008).
 208. Nozoe, T., Mori, E., Takahashi, I. & Ezaki, T. Preoperative elevation of serum C-reactive protein as an independent prognostic indicator of colorectal carcinoma. *Surg. Today* **38**, 597–602 (2008).
 209. Tsilidis, K. K. *et al.* C-reactive protein and colorectal adenoma in the CLUE II cohort. *Cancer Causes Control* **19**, 559–67 (2008).
 210. Pilz, A., Fountain, J., Peters, J. & Abbott, C. Linkage mapping of the Aldo-2, Pax-5, Ambp, and D4h9S3E loci on mouse chromosome 4 in the region of homology with human chromosome 9. *Genomics* **18**, 705–8 (1993).
 211. Bratt, T., Olsson, H., Sjöberg, E. M., Jergil, B. & Akerström, B. Cleavage of the alpha 1-microglobulin-bikunin precursor is localized to the Golgi apparatus of rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1157**, 147–54 (1993).
 212. Lindqvist, a & Akerström, B. Isolation of plaice (*Pleuronectes platessa*) alpha1-microglobulin: conservation of structure and chromophore. *Biochim. Biophys. Acta* **1430**, 222–33 (1999).
 213. Akerström, B., Lögdberg, L., Berggård, T., Osmark, P. & Lindqvist, a. alpha(1)-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 172–84 (2000).
 214. Penders, J. & Delanghe, J. R. Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications. *Clin. Chim. Acta.* **346**, 107–18 (2004).
 215. Balduyck, M. *et al.* Human urinary proteinase inhibitor: inhibitory properties and interaction with bovine trypsin. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **366**, 9–14 (1985).
 216. Bromke, B. J. & Kueppers, F. The major urinary protease inhibitor: simplified purification and characterization. *Biochem. Med.* **27**, 56–67 (1982).
-

-
217. Hochstrasser, K., Albrecht, G., Schönberger, O. L. & Wachter, E. Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter-alpha-trypsin inhibitor, VII. Characterization of the bovine inhibitor as double-headed trypsin-elastase inhibitor. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **364**, 1689–96 (1983).
 218. Kobayashi, H. *et al.* Inhibition of the soluble and the tumor cell receptor-bound plasmin by urinary trypsin inhibitor and subsequent effects on tumor cell invasion and metastasis. *Cancer Res.* **54**, 844–9 (1994).
 219. Franck, C. & Pedersen, J. Z. Trypsin-inhibitory activities of acid-stable fragments of the inter-alpha-trypsin inhibitor in inflammatory and uraemic conditions. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **43**, 151–5 (1983).
 220. Pugia, M. J., Valdes, R. & Jortani, S. A. Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv. Clin. Chem.* **44**, 223–45 (2007).
 221. Tsui, K.-H. *et al.* Down-regulation of matriptase by overexpression of bikunin attenuates cell invasion in prostate carcinoma cells. *Anticancer Res.* **28**, 1977–83 (2008).
 222. Takahashi, S. *et al.* A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 1019–26 (1993).
 223. Franks, I. IBD: CRP is a good long-term biomarker. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 359 (2011).
 224. Lei, T. *et al.* Discovery of potential bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics and analysis. *Clin. Genitourin. Cancer* **11**, 56–62 (2013).
 225. Tsui, K.-H. *et al.* Bikunin loss in urine as useful marker for bladder carcinoma. *J. Urol.* **183**, 339–44 (2010).
 226. Huang, H. *et al.* High level of serum AMBP is associated with poor response to paclitaxel-capecitabine chemotherapy in advanced gastric cancer patients. *Med. Oncol.* **30**, 748 (2013).
 227. Cohen, A. *et al.* A mass spectrometry-based plasma protein panel targeting the tumor microenvironment in patients with breast cancer. *J. Proteomics* **81**, 135–47 (2013).
 228. Kusano, E. *et al.* Human alpha 1-microglobulin and its relationship to renal function. *Nephron* **41**, 320–4 (1985).
 229. Olsson, M. G. *et al.* Up-regulation of A1M/ α 1-microglobulin in skin by heme and reactive oxygen species gives protection from oxidative damage. *PLoS One* **6**, e27505 (2011).
 230. Anderson, N. L. *et al.* A human proteome detection and quantitation project. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 883–6 (2009).
 231. Ramos, M. *et al.* Knowledge and attitudes of primary healthcare patients regarding population-based screening for colorectal cancer. *BMC Cancer* **11**, 408 (2011).
-

10 Publikationen

11 Danksagung

12 Lebenslauf

