

Aus dem Institut für Immunologie  
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**Untersuchungen zur Zusammensetzung des Tumormikromilieus unter Betrachtung des Transkriptoms, Proteoms und Sekretoms ausgewählter Tumorzelllinien**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von  
Friederike Kirschner  
aus Hannover

Mainz, 2025

CC-BY-4.0

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr.med. Philipp. Drees

Tag der Promotion: 19.02.2026

## Publikationen

**Kirschner F, Arnold-Schild D, Leps C, et al.** Modulation of cellular transcriptome and proteome composition by azidohomoalanine—implications on click chemistry–based secretome analysis. *J Mol Med.* 2023;(0123456789). doi:10.1007/s00109-023-02333-

**Riegel K, Yurugi H, Schlöder J, et al.** ERK5 modulates IL-6 secretion and contributes to tumor-induced immune suppression. *Cell Death Dis.* 2021;12(11). doi:10.1038/s41419-021-04257-8

# Inhalt

Publikationen .....	1
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Tumorentstehung und das Tumormikromilieu.....	1
1.2 „Omics“ basierte Analyse des Tumormikromilieus .....	2
1.2.1 Transkriptom.....	2
1.2.2 Proteom.....	2
1.2.3 Sekretom .....	3
1.3 Analyse des Sekretoms .....	4
1.3.1 Separation neu synthetisierter Proteine .....	4
1.3.2 Massenspektrometrische Analyse des Sekretoms und Proteoms.....	6
2 Zielsetzung .....	10
3 Material.....	11
3.1 Verwendete Zelllinien .....	11
3.2 Medien für die Zellkultur.....	12
3.3 Medien für die Sekretomanalyse.....	13
3.4 Puffer und Zusätze .....	14
3.5 Chemikalien/Reagenzien .....	15
3.6 Verbrauchsmaterialien .....	17
3.7 Laborgeräte .....	18
4 Methoden.....	19
4.1 Zellkulturmethoden .....	19
4.1.1 Lagerung der Zellen.....	19
4.1.2 Auftauen der Zellen .....	19
4.1.3 Anzucht der Zellen.....	19
4.1.4 Zählen der Zellen.....	20
4.2 Analysemethoden.....	20
4.2.1 Sekretomanalyse mittels SILAC-Labeling und Click-Chemistry .....	20
4.2.2 Bestimmung des Transkriptoms.....	23

4.2.3	Bestimmung des Proteoms.....	29
4.2.4	Massenspektrometrie und Analyse der massenspektrometrischen Daten .....	31
4.2.5	Durchflusszytometrie .....	33
4.2.6	Entwicklung einer alternativen Methode für die Sekretomanalyse.....	34
5	Ergebnisse.....	40
5.1	Sekretomanalyse humaner Tumorzelllinien .....	40
5.2	Ergänzung der Sekretomdaten durch Proteom- und Transkriptomdaten.....	44
5.3	L-Azidohomoalanin Effekt auf die Zellen.....	54
5.4	Entwicklung einer alternativen Methode für die Sekretomanalyse.....	62
6	Diskussion .....	69
6.1	Einfluss sekretorischer Proteine auf die Tumorentwicklung .....	69
6.2	Methoden zur Analyse sekretorischer Proteine.....	73
7	Zusammenfassung .....	78
8	Abstract .....	80
9	Abkürzungsverzeichnis .....	81
10	Literaturverzeichnis.....	82
11	Abbildungsverzeichnis .....	87
12	Tabellenverzeichnis .....	89
13	Curriculum Vitae .....	90
14	Danksagung .....	91

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Tumorentstehung und das Tumormikromilieu

Die Entstehung bzw. Entwicklung von Tumoren, auch Karzinogenese genannt, ist ein mehrstufiger Prozess, in dem sich normale gesunde Zellen des Körpers zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen entwickeln. Grund dafür sind Veränderungen in den Zellen, wie Genmutationen, die durch äußere Einflüsse, aber auch spontan entstehen können. Durch sie wird die Regulation des Zellwachstums und des Zellzyklus gestört, sodass die Zellen sich unkontrolliert teilen, dem programmierten Zelltod entgehen und in andere Gewebe einwandern können.<sup>1,2</sup>

Umgeben werden Tumoren von einem komplexen, sich stetig ändernden Umfeld, das als Tumormikromilieu bezeichnet wird. Dazu gehören neben gesunden, nicht entarteten Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und mesenchymalen Stromazellen auch Zellen des spezifischen (T- und B- Zellen) und unspezifischen (Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen) Immunsystems. Außerdem beinhaltet es lösliche, von den Zellen sekretierte Faktoren. Zwischen den verschiedenen Komponenten bestehen komplexe Beziehungen, die Einfluss auf das Wachstum und die Metastasierung der Tumoren haben. Zum einen können die Zellen des umgebenden Gewebes und des Immunsystems das Tumorstadium einschränken. Zum anderen können Botenstoffe, die vom Tumor in Form von Proteinen ausgeschüttet werden, die Funktion des Immunsystems behindern, die Zellen des umgebenden Gewebes beeinflussen und das Tumormikromilieu formen. Dabei werden die Zellen so beeinflusst, dass sie das Tumorstadium und die -entwicklung begünstigen. Auch im Hinblick auf die Effektivität von Antitumorthapien spielt das Tumormikromilieu eine entscheidende Rolle. Die von den Tumorzellen sekretierten Faktoren könnten hierbei mögliche therapeutische Angriffspunkte bieten<sup>3,4</sup> und deren Detektion in Körperflüssigkeiten, wie Blut, Urin und Liquor zu einer möglichst frühen Diagnose und einem damit verbundenem höheren Behandlungserfolg beitragen.<sup>5</sup>

## 1.2 „Omics“ basierte Analyse des Tumormikromilieus

Als Omics werden in der Biologie alle Analysemethoden zusammengefasst, deren Bezeichnung auf –omik bzw. im englischen auf –omics endet. Dazu gehören die Transkriptomik, die Proteomik, die Sekretomik, die Metabolomik, die Genomik und viele weitere.<sup>6</sup>

Die Bezeichnung Omics stellt dabei einen informellen Begriff dar.

### 1.2.1 Transkriptom

Das Transkriptom umfasst alle, in einer Zelle vorkommenden RNA-Moleküle die Anhand der DNA transkribiert worden sind. Dabei stellt es nur etwa 5% des gesamten genetischen Codes dar. Insgesamt enthält das humane Genom etwa 20.000 - 25.000 Gene, die für Proteine kodieren.<sup>7</sup>

Die Analyse des menschlichen Genoms wird durch DNA-Sequenzierungsverfahren erreicht. In dieser Arbeit wurde die Methode des Next Generation Sequencing (NGS) zur Analyse genutzt. Bei dieser Methode werden Millionen von DNA-Fragmenten mehrfach parallel analysiert und durch bioinformatische Methoden wieder zusammengesetzt. Als Abgleich dient ein menschliches Referenzgenom.<sup>8</sup>

Das Funktionsprinzip des NGS basiert darauf, dass zunächst die gesamte RNA der Zellen isoliert und anschließend die mRNA von der Gesamt-RNA separiert wird. Anschließend wird die mRNA fragmentiert und in DNA übersetzt, um eine DNA-Bibliothek zu erstellen. Für die Sequenzierung werden die DNA-Fragmente dann an ein Medium gebunden, z.B. einen Chip. Die Daten der Sequenzierung werden durch bioinformatische Verfahren analysiert und können für Auswertungen genutzt werden.<sup>9</sup>

### 1.2.2 Proteom

Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus die Anhand eines bestimmten Genoms exprimiert werden. Es wird vermutet, dass der menschliche Organismus etwa 19.670 Gene besitzt, die für Proteine kodieren (proteinatlas.org). Aufgrund der vielen posttranslationalen Modifikationen können aus einem einzelnen Gen unterschiedlich modifizierte Proteine mit verschiedenen Funktionen resultieren, sodass das Proteom um ein vielfaches

Komplexer ist als das zugehörige Genom.<sup>10,11</sup> Da die Synthese und der Abbau der synthetisierten Proteine ein stetiger Prozess sind, variiert das Proteom abhängig von der Zeit. Zudem wird es von äußeren Faktoren beeinflusst.<sup>11</sup>

Die Bestimmung des Proteoms kann mit Hilfe der Massenspektrometrie durchgeführt werden.

### 1.2.3 Sekretom

Das Sekretom bezeichnet die Gesamtheit der von einer Zelle oder eines Organismus sekretierten Proteine.<sup>12</sup> Die Sekretion der Proteine ist ein bedeutsamer physiologischer Prozess, der sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten zu finden ist. Neben weiteren Prozessen spielt er insbesondere bei der interzellulären Kommunikation sowie dem Wachstum der Zellen, der Zellhomöostase und der Abgabe von Hormonen und Transmittern eine wichtige Rolle. Dabei werden lösliche Proteine sowie Zellabfälle von den Zellen in den Extrazellularraum abgegeben.

Die Proteinsekretion findet über verschiedene Wege statt. Welche Proteine für die Sekretion bestimmt sind, über welchen Weg sie sekretiert werden und was ihr Zielort ist, wird durch ein Signalpeptid (engl.: signal peptide, SP) gekennzeichnet. Dieses befindet sich am N-terminalen Ende des Proteins und dirigiert es in Richtung des sekretorischen Wegs.<sup>13</sup> Insgesamt werden für menschliche Zellen, basierend auf ihrem Signalpeptid, etwa 2600 Proteine als potentiell sekretorisch vorhergesagt.<sup>14</sup> Jedoch wird nicht jedes Protein, das ein Signalpeptid enthält schlussendlich in den Extrazellularraum sekretiert.<sup>15</sup>

Der konventionelle Sekretionsweg (engl.: conventional protein secretion, CPS) führt nach der Proteinsynthese an den Ribosomen zum Endoplasmatischen Retikulum (ER), wo die Proteine modifiziert und gefaltet werden.<sup>16</sup> Für weitere Modifikationen werden sie anschließend zum Golgi-Apparat weitergeleitet. Von dort aus gelangen sie zum Transgolgi-Netzwerk, wo sie in Vesikel und Granula verpackt werden, bevor sie zu anderen Organellen oder für die Sekretion zur Plasmamembran gelangen. An der Plasmamembran fusionieren die sekretorischen Vesikel mit dieser und geben die enthaltenen Proteine in den Extrazellularraum frei.<sup>12</sup>

Neben dem konventionellen Sekretionsweg gibt es weitere unkonventionelle Sekretionswege (engl.: unconventional protein secretion, UPS), bei denen die Proteine zur Plasmamembran gelangen und sekretiert werden obwohl sie kein Signalpeptid enthalten und nicht über das Golgi-Netzwerk geleitet werden.<sup>17</sup>

Ein anderer Prozess, der zur Entstehung des Sekretoms beiträgt ist das sogenannte *Ectodomain Shedding*. Dabei werden extrazelluläre Domänen von Membranproteinen durch proteolytische Spaltung posttranslational modifiziert und die lösliche extrazelluläre Domäne als Spaltprodukte abgegeben. Dazu gehören Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, membrangebundene Wachstumsfaktoren und Cytokine. Die beteiligten Proteasen werden Sheddasen oder, im Falle der Sekretion des Spaltprodukts auch Sekretasen genannt.<sup>18</sup>

## 1.3 Analyse des Sekretoms

### 1.3.1 Separation neu synthetisierter Proteine

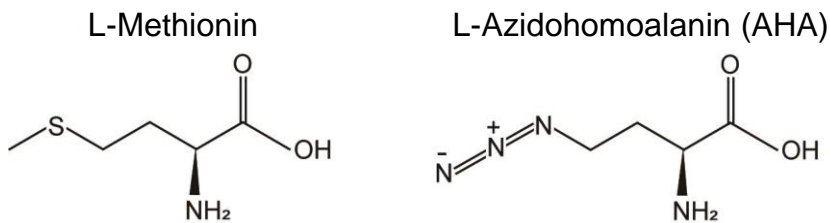
Bei der Analyse des Sekretoms spielt die Umgebung, in der die Zellen wachsen eine große Rolle. Sie hat Einfluss auf das Wachstum und die Vermehrung der Zellen und in ihr finden sich die sekretierten Proteine wieder. Abhängig von der Zelllinie wachsen die Zellen in verschiedenen Medien, die zum größten Teil mit Fötalem Kälberserum (FCS) versetzt sind, um optimale Wachstumsbedingungen zu bieten. Für die Analyse des Sekretoms mittels Massenspektrometrie stellt dies eine Herausforderung dar, da im Serum eine hohe Anzahl Proteine enthalten ist (im Bereich von mg/ml). Diese behindern bei der Messung die Detektion der von den Zellen sekretierten Proteine, die zu einem deutlich geringeren Anteil im Gesamtmedium zu finden sind (im Bereich von ng/ml) d.h.  $1 \times 10^6$  fach weniger als die Proteine die dem FCS entstammen.

Zur Analyse des Sekretoms haben sich verschiedene Methoden etabliert.

Ein häufig genutzter Ansatz um eine Detektion der sekretierten Proteine im Medium ohne Beeinträchtigung durch Serumproteine zu ermöglichen ist, die Zellen für einige Zeit in serumfreiem Medium zu kultivieren. Allerdings könnte die Abwesenheit von Serum zu Stresssituationen für die Zellen führen und deren Wachstum, Verhalten und somit auch das Sekretom verändern. Zudem führen intrazelluläre Proteine, die durch Zellsterben freigesetzt werden, zu Verunreinigungen des Sekretoms.<sup>19</sup>

Einen anderen Ansatz der Sekretomanalyse stellt eine 2012 von Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld etablierte Methode dar, bei der die Zellen in serumsupplementiertem Medium kultiviert werden können. Hierbei werden die von den Zellen sekretierten Proteine während ihrer Synthese markiert, um sie später von den im Serum enthaltenen Proteinen unterscheiden und separieren zu können. Dazu wird das Me-

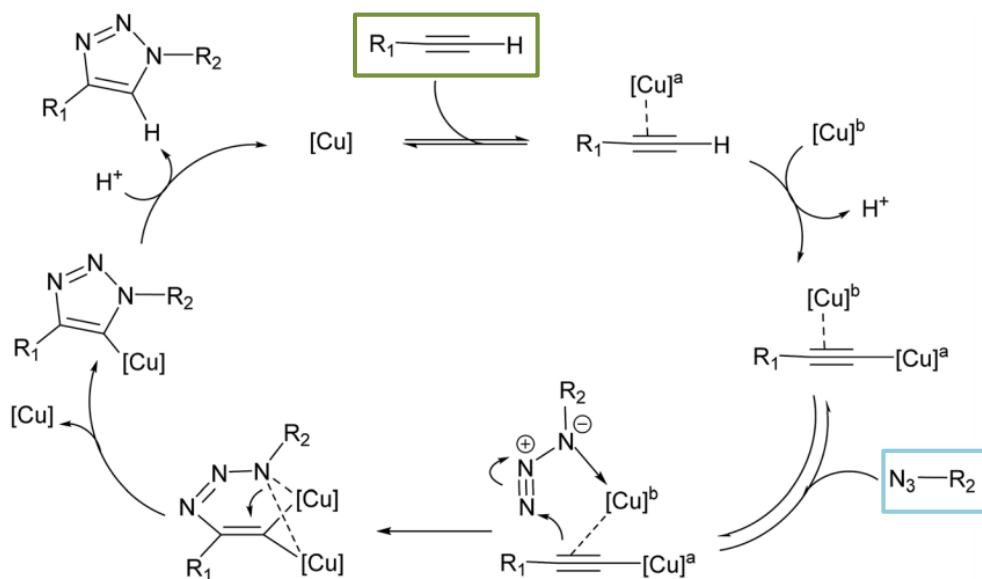
thioninanalogue L-Azidohomoalanin (AHA) eingesetzt, welches während der Proteinbiosynthese von den Zellen an Stelle des Methionins eingebaut wird.<sup>20</sup>



**Abbildung 1: Struktur von L-Methionin und L-Azidohomoalanin<sup>21</sup>**

Das L-Azidohomoalanin (AHA) ähnelt in seiner Struktur dem L-Methionin und kann in der Synthese von Proteinen anstelle des Methionins eingebaut werden. Es enthält eine Azidogruppe.

Die im AHA enthaltene Azidogruppe ermöglicht es im Weiteren, die sekretierten Proteine über eine kupferkatalysierte Azid- Alkin- Zyклоaddition (engl.: copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition= CuAAC) unter Bildung eines Triazolrings an die Alkin-Gruppe von Agarose-Beads zu binden und so aus dem Medium zu separieren.<sup>22,23,24</sup>



**Abbildung 2: Copper (I) – catalyzed azide- alkyne- cycloaddition<sup>25</sup>**

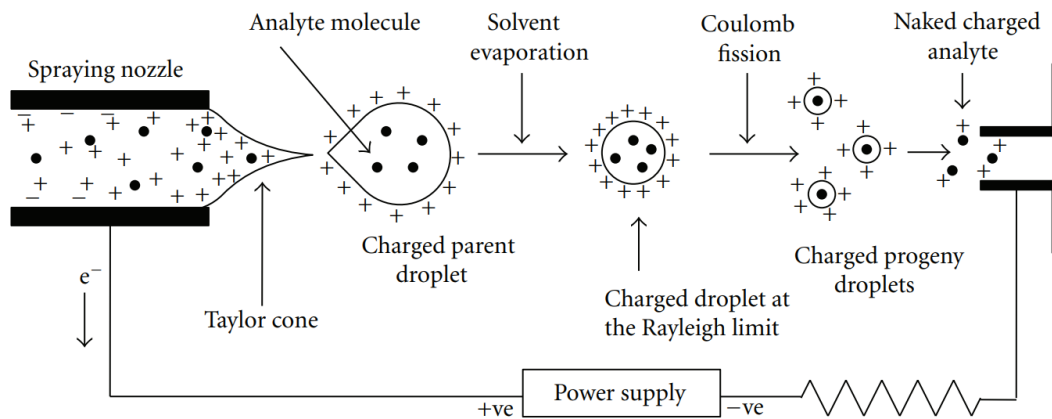
Bei der kupferkatalysierten Azid- Alkin- Zyклоaddition wird ein organisches **Azid**, hier das L-Azidohomalanin an ein **Alkin** gebunden. Die Reaktion wird durch Cu(I) katalysiert und führt zur Bildung eines Triazolrings. Häufig wird als Katalysator Cu(II) in Kombination mit einem Reduktionsmittel eingesetzt.

### 1.3.2 Massenspektrometrische Analyse des Sekretoms und Proteoms

Die Massenspektrometrie spielt eine wichtige Rolle bei der Analyse des Sekretoms und des Proteoms, da sie die Proteinanalyse komplexer Proben ermöglicht. Dabei können in einem *bottom up* Experiment, anders als bspw. mittels ELISA, bei dem spezifische Antikörper benötigt werden, der Großteil der in der Probe enthaltenen Proteine detektiert werden. Das dabei genutzte Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Für die Analyse werden die Proteine in der Probe zunächst mit Trypsin verdaut, welches die Peptidbindungen selektiv nach den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Für die Messung werden die tryptischen Peptide eingesetzt. Nach chromatografischer Auftrennung werden die Proben an der Ionenquelle ionisiert und in die Gasphase überführt. Anschließend können sie am Massenanalysator entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ( $m/z$ ) separiert werden. Der Detektor dient der Erfassung der Ionenanzahl zu jedem, vom Massenanalysator gemessenen Masse- zu-Ladungs-Verhältnis. Für die beschriebenen Abläufe stehen mehrere Methoden zur Verfügung, die in unterschiedlicher Kombination für verschiedene Analysen eingesetzt werden.<sup>26</sup> In dieser Arbeit wurde mit einer Orbitrap Exploris 480 von ThermoFisher gearbeitet.

Für die Ionisation der Moleküle nutzt diese die Elektrosprayionisation (ESI), welche eine besonders sanfte Methode darstellt. Dazu wird die Probe, wie in Abbildung 3 dargestellt, durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine elektrische Spannung angelegt ist. Zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode entsteht ein elektrisches Feld. Trifft das Analyt auf dieses Feld, bewegen sich die Ionen zur Gegenelektrode und an der Kapillarspitze entsteht ein Überschuss an gleichgeladenen Ionen. Dabei entsteht durch Abstoßung der gleichgeladenen Ionen der sogenannte Taylorkegel<sup>27</sup> und die Ionen treten als feines Aerosol aus der Kapillare aus. Welche Ladung die entstehenden Ionen haben, hängt dabei von der Polarität der an der Kapillare angelegten Spannung ab. Um die Vernebelung der Ionen zu unterstützen, wird oft ein Gas, z.B. Stickstoff, eingesetzt.

Die Größe der entstandenen Tropfen verkleinert sich dann durch Verdampfung des Lösungsmittels.<sup>28</sup> Dadurch nimmt die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfenoberfläche zu. Sobald der Radius der Tropfen kleiner als das sogenannte Rayleigh-Limit ist, kommt es zur Coulomb-Explosion, bei der die Tröpfchen durch Abstoßung gleicher Ladungen in wiederum kleinere zerfallen.<sup>29</sup>



**Abbildung 3: Darstellung des Verfahrens der Elektrospray Ionisation<sup>28</sup>**

Die Elektrosprayionisation dient der Erzeugung von Ionen mittels eines elektrischen Feldes. Das Feld wird zwischen einer unter Spannung stehenden Metallkapillare und einer Gegenelektrode erzeugt. Trifft die Analytlösung auf das elektrische Feld, bildet sich der sogenannte Taylor-Cone und die Ionen treten als feine Tröpfchen aus. Durch Verdampfung des Lösungsmittels werden die Tröpfchen kleiner, die Dichte der Ladung auf deren Oberfläche nimmt zu und es kommt, sobald der Radius kleiner als das Rayleigh-Limit ist zur Coulomb-Explosion. Das entstandene feine Spray trifft dann auf das Massenspektrometer.

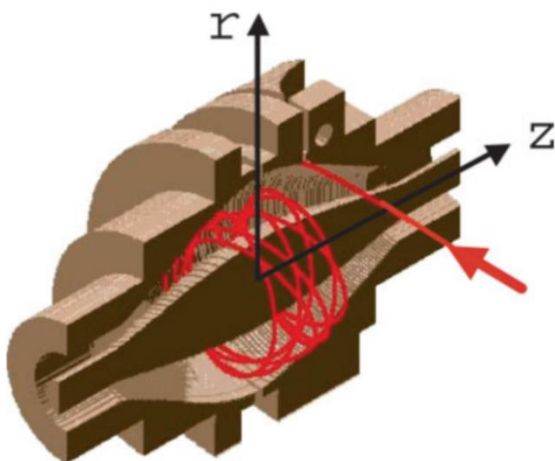
Anschließend gelangen sie als feines Spray in das Massenspektrometer und gelangen über die Ionentransferereinheit (High Capacity Transfer Tube und den Electrodynamic Ionfunnel) auf eine Art Filter. Dieser verhindert, dass neutrale Ionen auf den Massenanalysator treffen und erhöht somit die Sensitivität der Messung.

Die eingesetzte Orbitrap Exploris 480 arbeitet nach dem Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Das heißt, dass zwei Analysen miteinander verbunden werden. Der erste Masseanalysator, in den die Ionen geleitet werden, ist ein Quadrupol. Die Ionen werden über ein elektrisches Feld beschleunigt und fliegen dann durch den aus vier parallelen Stabelektroden bestehenden Quadrupol. Hier findet eine Selektion (*mass filtering*) der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis statt und stellt somit die erste massenspektrometrische Analyse dar (MS1/ *Full-scan*).<sup>30</sup> Im Anschluss werden die Ionen durch eine sogenannte *C-trap* geleitet, wo sie gebündelt werden bevor sie zur Kollisionszelle (*Ion-Routing Multipole, IRM*) des Gerätes geleitet werden. Dort werden die Vorläuferionen weiter fragmentiert, um anschließend erneut analysiert zu werden. Das zur Fragmentierung eingesetzte Verfahren nennt sich *Higher energy collisional dissociation (HCD)* und ist ein Verfahren, welches speziell in Orbitrap-Geräten genutzt wird. Es ähnelt sehr dem Verfahren der kollisionsinduzierten Dissoziation (engl.: *Collision-induced dissociation, CID*), bei dem die Ionen durch Kollision mit neutralen Stickstoffatomen fragmentiert werden. Bei

jeder Kollision mit einem Stickstoffmolekül nehmen die Ionen einen Teil der Kollisionsenergie auf, beschleunigen wieder und treffen erneut auf ein Gasmolekül. Dabei steigt die innere Energie der Ionen und führt letztendlich zur Fragmentierung. Die Besonderheit des HCD-Verfahrens ist, dass diese Kollisionen außerhalb der C-Trap stattfinden.<sup>28</sup>

Die entstandenen Fragmentionen kommen anschließend zurück zur Speichereinheit, bevor sie für die zweite Analyse (MS2) in die Ionenfalle des Gerätes, die Orbitrap, geleitet werden.<sup>31</sup>

Diese namensgebende Einheit des eingesetzten Massenspektrometers vereint den Analysator und den Detektor des Gerätes. Sie besteht aus einer zentralen und zwei äußeren Elektroden. Die eingeleiteten Ionen verhalten sich bei der Analyse so, wie in Abbildung 4 in Rot dargestellt. Sie bewegen sich zum einen in einem Orbit um die zentrale Elektrode (r-Richtung) und schwingen, da sie leicht dezentral eingeleitet werden, zusätzlich kreisförmig auf ihrer Bahn horizontal zwischen den beiden anderen Elektroden (z-Richtung).<sup>32</sup> Die Ionen werden in Abhängigkeit ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses unterschiedlich beschleunigt und bewegen sich in unterschiedlicher Distanz um die Orbitrap. Die äußeren Elektroden messen die Frequenz der radialen und axialen Oszillationen und dienen somit als Masseanalysator. Die so gesammelten Informationen werden anschließend in Massespektren übersetzt.<sup>33,34</sup>



**Abbildung 4: Orbitrap**<sup>32</sup>

Die Orbitrap ist eine Ionenfalle, die aus einer zentralen und zwei äußeren Elektroden besteht. Die zu analysierenden Ionen bewegen sich kreisförmig um die Zentralelektrode (r-Achse) und oszillieren horizontal (z-Achse) entlang der Achse der Zentralelektrode.

Zur Analyse komplexer Proben wird in der Massenspektrometrie häufig ein anderes Verfahren, die Flüssigkeitschromatographie (engl.: Liquid Chromatography, LC) vorgeschaltet, bei der die Proben vor der massenspektrometrischen Messung chromatographisch aufgetrennt werden. Dazu wird diese mit der Elektrosprayionisationseinheit des Massenspektrometers gekoppelt.<sup>35</sup> In dieser Arbeit wurde für die Flüssigkeitschromatographie die Dionex UltiMate 3000 eingesetzt.

Für die Akquisition der Daten können verschiedene Verfahren genutzt werden: die traditionelle datenabhängige Akquisition (engl.: data dependent acquisition, DDA), die datenunabhängige (engl.: data independent acquisition, DIA) oder die Fullscan Akquisition.<sup>36</sup> Bei der hier angewandten datenabhängigen Akquisition werden die Peptidionen, die in der ersten massenspektrometrischen Messung (MS1/Fullscan) die höchste Intensität haben, für die Fragmentierung und erneute Messung (MS2) ausgewählt und dieser zugeführt.<sup>34</sup> Die datenunabhängige Akquisition (DIA) hingegen nutzt für die Analyse alle Ionen, die sich in einem bestimmten definierten Masse-zu-Ladung-Bereich befinden. Das heißt, hierbei findet keine vorherige Analyse der Vorläuferionen statt.<sup>37</sup>

Zur Identifikation der mittels Massenspektrometrie ermittelten Massenspektren und deren anschließender Übersetzung in Peptide werden Datenbanken verwendet, in denen bekannte Proteinsequenzen gespeichert sind.<sup>38</sup> Mit den dort gespeicherten Proteinsequenzen können die detektierten Peptide verglichen werden, sodass es möglich ist, von den gefundenen Peptiden Rückschlüsse auf die in der Probe enthaltenen Proteine zu ziehen. Eine bekannte Datenbank, die in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat, ist UniProt.<sup>39</sup>

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis der Beziehungen und der Kommunikation zwischen Tumorzellen und nicht entarteten Zellen des Körpers zu gewinnen. Hierbei sollten die Mechanismen identifiziert werden, die einen Einfluss auf Zellen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems haben.

Dazu wurde das Sekretom verschiedener ausgewählter Tumorzelllinien *in vitro* erstellt und erstmals mit Transkriptom- und Proteomdaten der gleichen Zelllinien ergänzt, um die Untersuchungen zu vervollständigen und die Methode zu validieren. Dabei fand die von Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld etablierte Methode der Sekretomanalyse mittels Labeling der neu synthetisierten Proteine durch ein Methionin-Analog, deren Separation aus dem Medium durch *Click-Chemistry* und Messung mittels Massenspektrometrie Anwendung. Insgesamt sollten mindestens 10 verschiedene humane sowie einige Mauszelllinien untersucht werden. Des Weiteren sollte versucht werden, die Methode der Sekretomanalytik auf Tumorzellen, die direkt aus Tumorgewebe gewonnen wurden, anzuwenden. Die *in vitro* und *ex vivo* gewonnenen Transkriptom-, Proteom- und Sekretomdaten sollten zusammengeführt werden. Ziel war die Identifikation von therapeutischen Angriffspunkten, um das Wachstum und die Metastasierung der Tumorzellen zu inhibieren und die Funktion von Immunzellen im Tumor zu erhalten oder wiederherzustellen. Dabei sollte besonders nach Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Tumorzelllinien der gleichen Art sowie zwischen Maus- und Humanzelllinien gesucht werden.

### 3 Material

#### 3.1 Verwendete Zelllinien

Für die Sekretomanalyse wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Zellen verwendet. Die Zelllinien wurden vom *Institut für Immunologie* und von der *Cell Biology Unit* zur Verfügung gestellt. Die primären T-Zellen wurden aus transgenen Mäusen gewonnen, die von den *Charles River Laboratorien* gekauft wurden.

**Tabelle 1: Verwendete Zelllinien/ Zellen**

<b>Zelllinie</b>	<b>Art</b>	<b>Spezies</b>
MC38	Kolonkarzinom	Maus
Mel-Ho	Melanom	Human
SK-Mel-37	Melanom	Human
D41-Mel	Melanom	Human
HCT116	Kolonkarzinom	Human
SW48	Kolonkarzinom	Human
HT-29	Kolonkarzinom	Human
CCD841	Normales Kolongewebe	Human
A549	Lungenkarzinom	Human
NCI-H226	Lungenkarzinom	Human
NCI-H1650	Lungenkarzinom	Human
Jurkat	T-Lymphozyten	Human
OT-I-Splenozyten	Primäre T-Zellen	Maus

### 3.2 Medien für die Zellkultur

Für die Zellkultur wurden die für die entsprechenden Zellen optimalen Medien, auf 37°C erwärmt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Bezogen wurden die Medien von den hinter dem Namen genannten Firmen.

Für *MC38, A549, HCT116, SK-Mel37*

<b>DMEM</b> (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco ThermoFisher
+ FCS	10 %
+ Glutamin	2 mM
+ Natriumpyruvat	1 mM
+ Penicillin	100 units/ml
+Streptomycin	100 µg/ml

Für *Mel-Ho, D41-Mel, NCI-H226, NCI-H1650, Jurkat*

<b>RPMI</b> (Roswell Park Memorial Institute)	Gibco ThermoFisher
+ FCS	10 %
+ Glutamin	2 mM
+ Natriumpyruvat	1 mM
+ Penicillin	100 units/ml
+Streptomycin	100 µg/ml

Für *CCD841*

<b>EMEM</b> (Minimum Essential Medium Eagle)	Sigma Aldrich
+ FCS	10 %
+ Glutamin	2 mM
+ Natriumpyruvat	1 mM
+ Penicillin	100 units/ml
+Streptomycin	100 µg/ml

Für *HT-29*

<b>McCoy's</b>	Sigma Aldrich
+ FCS	10 %
+ Glutamin	2 mM
+ Natriumpyruvat	1 mM
+ Penicillin	100 units/ml
+Streptomycin	100 µg/ml

## Für SW48

<b>RPMI</b> (Roswell Park Memorial Institute)	Sigma Aldrich
+ FCS	10 %
+ Glutamin	2 mM
+ Penicillin	100 units/ml
+Streptomycin	100 µg/ml

## Für OT-I-Splenozyten

<b>RPMI</b> (Roswell Park Memorial Institute)	Sigma Aldrich
+ FCS	10 %
+ Glutamin	2 mM
+ Penicillin	100 units/ml
+Streptomycin	100 µg/ml
+ β-Mercaptoethanol	50 µM
+ IL-2 (Überstand von XL-63-Zellen)	1:250
+Ovalbumin-Peptid (SIINFEKL)	1 µg/ml

### 3.3 Medien für die Sekretomanalyse

#### SILAC-Medien

Das SILAC-Medium wurde entsprechend der verwendeten Zelllinie ausgewählt und mit den nötigen Zusätzen versetzt. (siehe 3.2). SILAC steht als Abkürzung für *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*.

Es enthält nicht die Aminosäuren Leucin, Arginin, Lysin und Methionin.

Sie können nach Bedarf in folgenden Konzentrationen hinzugefügt werden:

Leucin 0,8 mM

L-Arginin 0,4 mM

L-Lysin 0,8 mM

L-Methionin 0,2 mM

Statt des Methionins kann zur Markierung neu synthetisierter Proteine das Analog L-Azidohomoalanin eingesetzt werden. Es wird in der Konzentration 0,1 mM genutzt.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit die folgenden SILAC-Medien genutzt:

RPMI SILAC (Athena Enzyme Systems)

DMEM SILAC (Athena Enzyme Systems)

EMEM SILAC (Athena Enzyme Systems)

McCoy's SILAC (Athena Enzyme Systems)

### Depletionsmedium

Für das Verhungern der Zellen bei der Sekretomanalyse nach Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld (4.2.1) wurde das für die Zellen entsprechende SILAC-Medium mit allen Zusätzen, bis auf die Aminosäuren Arginin, Lysin und Methionin verwendet.

### Labeling-Medium

Zum Markieren der neu synthetisierten Proteine bei der Sekretomanalyse nach Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld (4.2.1) wurde das für die entsprechenden Zellen typische SILAC-Medium mit allen Zusätzen, bis auf Methionin, versetzt. Anstelle des Methionins wurde das L-AHA (0,1 mM) eingesetzt.

### X-VIVO 15 Medium (Lonza)

Das X-VIVO 15 Medium wurde in verschiedenen Titrationen eingesetzt. Dazu wurde es, mit den für die entsprechenden Zellen typischen Medien entsprechend 3.2, ohne Zusatz von FCS, verdünnt.

Außerdem wurde es laut 4.2.6.2 aufkonzentriert und anstelle von FCS als Zusatz im SILAC-Medium eingesetzt.

## 3.4 Puffer und Zusätze

### Annexin- Binding- Buffer 10x

+ HEPES	0,1 M	pH 7,4
+ NaCl	1,4 M	
+ CaCl <sub>2</sub>	25 mM	

Vor der Verwendung wurde der Puffer mit steril filtriertem destilliertem Wasser 1:10 auf 1x verdünnt.

### Fötale Kälberserum (FCS)

Das FCS wurde vor dem Gebrauch 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert und anschließend 45 min bei 1100 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

#### FASP Lysepuffer 1x

---

+ Harnstoff	7 M
+ Thioharnstoff	2 M
+ DTT	5 mM
+ CHAPS	2 %
In LC- MS- Wasser	

#### PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2

---

+ NaCl	140 mM
+ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
In VE- Wasser	

#### Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S)

---

+ Penicillin	100000 U/ml
+ Streptomycin	100 mg/ml
In PBS	

#### Trypanblau-Lösung

---

+ Trypanblau	0,5 %
+ Natriumazid	0,02 %
In PBS	

Vor der Verwendung wurde die Lösung 1:10 in PBS verdünnt

#### Trypsinlösung

1 µg/µl in 50 mM Essigsäure als Stocklösung (Aliquots bei -80°C gelagert)

Verdünnt mit 50 mM Ammoniumbicarbonat auf 0,1 µg/µl verwendet.

## 3.5 Chemikalien/Reagenzien

Die Chemikalien und Reagenzien wurden von den in der Tabelle 2 genannten Firmen bezogen.

Für die Analysen mittels Massenspektrometrie, wurden Chemikalien mit LC-MS-Qualität verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Accutase	Sigma Aldrich
Acetonitril	Carl Roth
Alkyne Agarose	Jena Bioscience
L-Azido-Homoalanine HCL	Jena Bioscience
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich
Ameisensäure (FA)	Thermo Fisher Scientific
Annexin-V-FITC	BD-Pharmingen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
CHAPS	Sigma-Aldrich
Click-Chemistry-Capture-Kit	Jena Bioscience
DTT (Dithiothreitol)	Carl Roth
Ethanol	Riedel-de Haen
FCS	Gibco by lifetechnologies
Glutamin	Carl Roth
Harnstoff (Urea)	Carl Roth
HCL	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
IAA (Iodacetamid)	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Penicillin	Serva
Pierce 660nm Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Proteaseinhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim, Deutschland)
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen
Streptomycin	Serva
TFA (Trifluoressigsäure)	Thermo Fisher Scientific
Thioharnstoff	Roth
TO-PRO3	Life technologies
TRIS-HCL	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin	Promega
Wasser LC-MS	Carl Roth
DMSO	Roth
Heavy Arginin	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
Heavy Lysin	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
IL-2	Zur Verfügung gestellt von Dr.Probst
Ovalbumin-Peptid (SIINFEKL)	ProteoGenix

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff wurden steril bezogen

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterial**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Amicon Ultra-15 Centrifugalfilter 3K	Merck Millipore
Bio-Spin Disposable Chromatography Columns	Bio-Rad
Protein LoBind Tubes 2ml	Eppendorf
RNase free Pipettenspitzen	Greiner
Filtereinheit 30 kDa	Nanosep Omega Pall
Ultrazentrifugen Eppendorftubes 1,5ml	Beckmann Coulter
Amicon Ultra 0,5 Centrifugalfilter 3K	Ultracel Merck Millipore
Protein LoBind Tube 1,5ml & 2ml	Eppendorf
Lo-bind Pipettenspitzen 1000ml	Axygen Scientific
Lo-bind Pipettenspitzen	Axygen Scientific
Cell Culture Flasks T75	Cellstar Greiner bio-one
6 Well Cell Culture Plate	Cellstar Greiner bio-one
Falcon 15ml	Greiner
Top 12 abundant protein depletion spin columns	Pierce
CryoPure 1,6ml	Sarstedt

### 3.7 Laborgeräte

Tabelle 4: Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Biorupter Plus	Diagenode (Liège, Belgien)
CO <sub>2</sub> Inkubator	Sanyo (München, Deutschland)
Heizblock	Thermo Scientific
Massenspektrometer (Orbitrap Exploris 480)	ThermoFisher
Mikroskop	Zeiss
Neubauer Zählkammer	Carl Roth
pH-Meter	Schott (Mainz, Deutschland)
Pipetboy	Integra
Pipetten	Gibco
Sterilbank	ThermoScientific
Kühlschrank 4°C	Bosch
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr
Tiefkühlschrank -80°C	ThermoScientific
Vortexer	NeoLab (Heidelberg, Deutschland)
Zentrifuge (Heraeus Megafuge R)	Thermo Fischer
Biofuge Fresco	Heraeus
NEBNext Poly(A) Magnetic Isolation Module	New England Biolabs
Photometer mit 660 nm- Filter	Tecan
Liquid Chromatography (Dionex UltiMate 3000)	ThermoFisher
ImageStream MKII	Amnis
Optima L-80 XP Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter
Thermocycler	Peqlab
TecanXFluor	Tecan
Univapo-100h	UniEquip
Oasis HLB plate	Waters

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkulturmethoden

#### 4.1.1 Lagerung der Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dafür wurden die Zellen nach dem Ernten gezählt und je  $4 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen in Einfriermedium gelöst. Das Einfriermedium bestand aus 1 ml FCS mit 10% DMSO. Um die Bildung von zellzerstörenden Eiskristallen beim Einfrieren zu verhindern, wurde dem Medium 10% DMSO zugefügt. Nach 24 Stunden konnten die Zellen für eine längere Lagerdauer in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

#### 4.1.2 Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Danach wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in 15 ml des für die entsprechenden Zellen typischen Mediums gelöst (siehe 3.2) und 3 min. bei 1.600 rpm zentrifugiert, um das für die Zellen toxische DMSO auszuwaschen. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert und die Zellen ausgesät.

#### 4.1.3 Anzucht der Zellen

Die Anzucht der Zellen erfolgte im Inkubator bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in wasserdampfgesättigter Umgebung mit 5%  $\text{CO}_2$ . Die Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen geführt.

Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen gesplittet. Zum Ablösen adhärenter Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und Accutase auf die Zellen gegeben, bis sie sich nach einer Inkubationszeit von wenigen Minuten ablösten. Bei 6-Loch-Platten wurden 300  $\mu\text{l}$  verwendet, bei T75-Flaschen 3 ml und bei T175-Flaschen 5 ml. Sobald die Zellen sich abgelöst hatten, wurde frisches Medium hinzugefügt um die Accutase zu verdünnen. Anschließend wurde das Medium mit den gelösten Zellen 3 min. bei 1.600 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in neues Medium aufgenommen und die gewünschte Menge neu ausgesät.

Nach einer Kultivierung der Zellen über etwa 1 Woche, wurden dann für den Versuch pro Zelllinie je 2 T75-Flaschen und als Backup je eine 6-Loch-Platte mit titrierter Zellkultur angesetzt.

#### 4.1.4 Zählen der Zellen

Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Zählgitter der Neubauer-Zählkammer besteht aus 3 x 3 Großquadraten, die sich jeweils aus 4 x 4 Kleinquadraten zusammensetzen. Im Regelfall wurden zur Bestimmung der Zellzahl je 16 Kleinquadrate ausgezählt.

Dafür wurden die zu zählenden Zellen in der Regel in 1 ml Medium aufgenommen, suspendiert und 10 µl der Zellsuspension für die Zählung eingesetzt. Für die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde diesen 90 µl 0,05 %-iges Trypanblau zugesetzt und gut vermischt. Trypanblau wird von abgestorbenen Zellen aufgenommen, sodass diese blau gefärbt unter dem Mikroskop erscheinen. Lebende Zellen erscheinen ungefärbt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel angewendet:  $N \times D \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$ .  $N$  beschreibt die Anzahl der gezählten Zellen,  $D$  den Verdünnungsfaktor der Zellsuspension (hier  $D=10$ ) und  $10^4$  den Verdünnungsfaktor der Neubauer-Zählkammer.

## 4.2 Analysemethoden

### 4.2.1 Sekretomanalyse mittels SILAC-Labeling und Click-Chemistry

Das Protokoll zur Sekretomanalyse, wie es hier in abgewandelter Form Anwendung findet, wurde bereits 2014 von *Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld* etabliert. Die Durchführung fand, wenn nicht anders benannt, bei Raumtemperatur statt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Am ersten Tag wurden zwei T75-Flaschen pro Zelllinie angesetzt und über Nacht auf 60- 70% Konfluenz wachsen gelassen. Dann wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml 37 °C warmem PBS gewaschen. Bei kaltem PBS besteht die Gefahr, dass sich adhärente Zellen ablösen. Bei adhärennten Zellen kann das Medium einfach abgesaugt werden, bei Suspensionszellen sind Zentrifugationen zwischen den Schritten notwendig. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 7 ml Depletionsmedium, für 30 min. hungern gelassen, um Reste von Arginin, Lysin und Methionin zu entfernen. Anschließend fand das Labeling statt. Dazu wurde das

Depletionsmedium abgenommen und eine der beiden Flaschen mit Labelingmedium (siehe 3.2), in dem die fehlenden Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin, sowie L-AHA enthalten sind, versorgt. Die andere Flasche diente als Kontrolle, sodass hier das gleiche Medium mit Methionin statt L-AHA eingesetzt wurde. Das Labeling fand 18 Stunden bei 37 °C statt.

Nach Ablauf der 18 Stunden wurde das Medium in ein 15 ml Falcon abgesammelt. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Um Zellreste aus dem Überstand zu entfernen, wurde 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Falcon überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden dem Überstand 280 µl Proteaseinhibitor hinzugefügt. An dieser Stelle ist es möglich, den Überstand bei -80 °C einzufrieren, um ihn zu einem späteren Zeitpunkt weiter zu untersuchen.

Um bei den folgenden Schritten nicht zu viel Proteinmaterial zu verlieren, wurde ab hier mit *LoBind*-Reaktionsgefäßen und -Pipettenspitzen gearbeitet. Für die Click-Reaktion wurde der Überstand zunächst durch Zentrifugation bei 4.600 rpm in 15 ml Amicons mit 3 kDa Cutoff auf 250 µl eingeeengt. Anschließend wurde der Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben und nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer mit 10 µl Proteaseinhibitor auf Eis gelagert, bis er weiter genutzt wurde.

Für den nächsten Schritt wurden die Alkyne-Agarose-Beads und die Katalyselösung vorbereitet. Für die Alkyne-Agarose-Beads wurde eine 200 µl Pipettenspitze abgeschnitten, die Agarose resuspendiert und pro Probe je ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl der Agarose-Beads vorbereitet. Um sie zu waschen, wurden den Agarose-Beads 900 µl Massewasser hinzugefügt, leicht gevortext und 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 100 µl verworfen.

Die Katalyselösung wurde folgendermaßen in einem 2 ml Eppendorf-Tube vorbereitet, wobei ein Ansatz für 2 Proben ausreicht:

+ Massewasser	860 µl
+ Additive1 (Reducing Agent)	100 µl
+ Kupfersulfat (Cu-2)	20 µl
+ Additive 2 (Cu-Chelating-Agent)	20 µl

Dann wurde die Click-Reaktion gestartet, indem je 500 µl Medium (250 µl eingeeengtes Zellkulturmedium mit 250 µl Lysepuffer und 10 µl Proteaseinhibitor) und 500 µl

der Katalyselösung zu den 100 µl Alkyne-Agarose-Beads gegeben wurden. Anschließend rotierte die Mischung 16 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur bei 10 rpm.

Für den nächsten Schritt wurde der SDS-Waschpuffer, der im Click-Chemistry-Capture-Kit enthalten ist, auf Raumtemperatur aufgewärmt. Dabei war es wichtig, darauf zu achten, dass der Waschpuffer vor Benutzung komplett homogen und klar war. Andernfalls hätte es zu Rückständen in den Proben kommen können, die die Messung im Massenspektrometer behindert und verfälscht hätten.

Die Reaktionsmischung des Vortages wurde 5 min. bei 1.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde mit 1,5 ml Massewasser gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Waschschrift war wichtig, da Rückstände des Lysepuffers in den folgenden Schritten mit dem SDS-Waschpuffer zur Bildung von Klumpen hätten führen können. Dem Rückstand im Eppendorf-Tube wurde 1 ml Waschpuffer mit 10 µl einer 1 M Dithiothreitollösung (DTT) hinzugefügt und alles vorsichtig gevortext. (Zum Erstellen der Lösung wurde in einem Milliliter Waschpuffer 1,54 mg DTT gelöst). Anschließend wurde die Mischung 15 min. bei 70 °C im Heizblock inkubiert und nach Beenden der Inkubationszeit 15-30 min. auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde 5 min. bei 100 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und dem Rückstand 1 ml Iodacetamid-Lösung (IAA) hinzugefügt. (Zum Ansetzen der IAA-Lösung wurden 7,4 mg IAA in 1 ml Waschpuffer gelöst). Die Mischung wurde 30 min. bei 500 rpm im Heizblock ohne Hitze geschüttelt. Da das IAA lichtempfindlich ist, war darauf zu achten, alle Schritte im Dunkeln durchzuführen.

Danach wurden die Agarose-Beads gewaschen. Dazu wurde der Bodenverschluss der im Click-Chemistry-Capture-Kit enthaltenen Zentrifugationssäulen entfernt und diese auf einen Ständer gestellt. Um die Agarose-Bead-Mischung auf die Säulen zu geben, wurde eine 1 ml Pipettenspitze abgeschnitten und die Beads gut resuspendiert. Die Reaktionsgefäße wurden mit 500 µl Massewasser gespült und das Gemisch auch auf die Säulen gegeben. Für den ersten Waschschrift wurde 5-mal mit 2 ml SDS-Waschpuffer gewaschen, indem der Puffer auf die Säulen gegeben wurde und per Schwerkraft diese durchlief. Dabei war es besonders wichtig, bei jeder Waschrunde den Puffer ganz durchlaufen zu lassen, bevor die nächste Waschrunde durchgeführt wurde.

Für den zweiten Waschschrift wurde 10-mal mit 2 ml 8 M Urea-100 mM Tris-Lösung gewaschen. Um die Lösung anzusetzen, wurden 24 g Urea in 5 ml 1 M Tris-Lösung mit pH 8 gelöst und mit Massewasser auf 100 ml aufgefüllt. Damit sich das Urea besser löste, wurde es auf dem Magnetrührer gerührt, bis die Lösung klar war.

Für den dritten Waschschrift wurden 10-mal 2 ml 20% Acetonitril-Lösung auf die Säule gegeben und durchlaufen gelassen. Im Anschluss wurde der Boden der Säulen verschlossen und 500 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat hinzugefügt. Um das Agarose-Granulat zu resuspendieren wurde eine 200 µl Pipettenspitze abgeschnitten, das Granulat resuspendiert und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Säulen wurden nochmals mit 500 µl Ammoniumbicarbonat gespült und das Gemisch ebenfalls mit in das Reaktionsgefäß gegeben. Nun wurde 5 min. bei 1.000 x g zentrifugiert und der Überstand bis auf 200 µl verworfen. Dem Rückstand wurden 0,5 µg Trypsin hinzugefügt, vorsichtig gevortext und 16 Stunden über Nacht bei 37 °C im Heizblock geschüttelt. Anschließend wurde 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Beads wurden mit 200 µl Massewasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand ebenfalls in das frische Reaktionsgefäß gegeben. Die Beads wurden verworfen.

Anschließend wurden die Proben für die Messung mittels Massenspektrometrie vorbereitet. Dazu wurden die Proben mit 5 µl 10% TFA angesäuert und mittels einer Oasis HLB Platte entsprechend dem Herstellerprotokoll entsalzen. Im Anschluss wurden die Proben lyophilisiert und in 0,1% FA gelöst.

Die weiteren Schritte erfolgten wie unter 4.2.4.

#### 4.2.2 Bestimmung des Transkriptoms

Zur Bestimmung des Transkriptoms wurden nach Abnahme des Mediums für die Sekretomanalyse die Zellen für die mit dem AHA markierte Probe und für die Negativkontrolle mit Methionin geerntet, mit PBS gewaschen, gezählt und Zellpellets von je  $1 \times 10^6$  Zellen lysiert. Für die Lyse wurden 350 µl Lysepuffer genutzt. Dieser wurde aus dem RLT Plus Lysepuffer, aus dem *RNeasy Plus Micro Kit von Qiagen*, durch Zugabe von 1% Beta-Mercaptoethanol hergestellt. Er diente dazu, die Proben zu homogenisieren und die RNase sowie andere Proteine, die das Transkriptom verändern, zu inaktivieren. Nach dem Lysieren ist eine Probenlagerung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C möglich.

Zur weiteren Bestimmung des Transkriptoms wurde zunächst die RNA der Proben mit Hilfe des RNeasy Plus Micro Kits nach dem im Kit enthaltenen Protokoll isoliert. Im ersten Schritt wurde mit Hilfe der im Kit enthaltenen *gDNA Eliminator columns* durch 30 sek. Zentrifugation bei 8.000 x g die genomische DNA aus den Proben entfernt. Mit dem Überstand, der im *Collectiontube* gesammelt wurde, wurde weitergearbeitet. Durch Zugabe von 350 µl Ethanol wurden optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an die Membran der *RNeasyMinElute spin columns* geschaffen. Die Probe wurde mit den genannten Säulen 15 sek. bei 8.000 x g zentrifugiert. Dabei wurden Kontaminanten ausgewaschen und RNA-Moleküle, die größer als 200 Nukleotide waren, wurden durch Bindung an die Membran gesammelt. Der Überstand im *Collectiontube* konnte verworfen werden. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit 500 µl RPE-Puffer aus dem Kit durch erneute Zentrifugation von 15 sek. bei 8.000 x g gewaschen. Der Überstand im *Collectiontube* wurde wieder verworfen. Dieser Waschschrift wurde, mit 500 µl 80% Ethanol wiederholt. Um das Ethanol restlos zu entfernen, wurde anschließend 5 min. mit offenem Deckel bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dann wurde die RNA mit RNasefreiem Wasser durch Zentrifugation von einer Minute bei maximaler Geschwindigkeit eluiert. Die Menge des eingesetzten Wassers war abhängig von der RNA-Menge. Im Protokoll des Kits werden 14 µl empfohlen. Da die Tumorzellen erfahrungsgemäß viel RNA enthalten, wurde mit 100 µl RNasefreiem Wasser eluiert. Das Eluat enthielt RNA-Moleküle, die größer als 200 Nukleotide waren. Die Konzentration der enthaltenen RNA wurde mit dem Qubit gemessen. Die Proben konnten an dieser Stelle bei -80 °C gelagert werden.

Die unten stehende Abbildung zeigt die Schritte der RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy Plus Micro Kits.

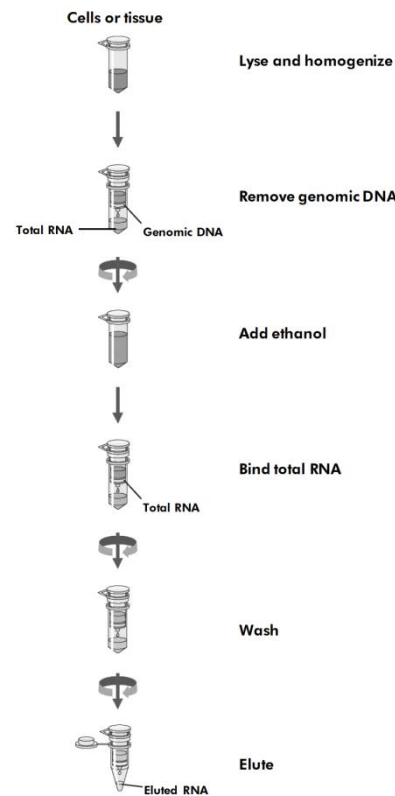


Abbildung 5: Ablauf der Probenvorbereitung für die Transkriptomanalyse

Für die weiteren Schritte wurde das *NEBNext Poly(A) mRNA-Magnetic-Isolation-Module* genutzt und 150 ng RNA eingesetzt. Die Proben wurden dann auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l mit RNasefreiem Wasser in 0,2 ml PCR-Röhrchen aufgefüllt. Um die mRNA aus der Probe zu isolieren, wurden 50  $\mu$ l *Oligo dT Beads*, die zuvor laut Protokoll gewaschen und mit 50  $\mu$ l *RNA-Binding-Buffer* gemischt worden sind, zur Probe hinzugegeben. Wie auch in allen folgenden Schritten, wurde durch hoch und runter pipettieren resuspendiert und gemischt. Anschließend wurden die Proben für 5 min. im *Thermocycler* auf 65 °C erhitzt um die RNA zu denaturieren und eine Bindung an die *Oligo dT Beads* zu ermöglichen. Nach Abkühlen des Cyclers auf 4 °C wurden die Proben herausgenommen, resuspendiert und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert damit die mRNA an die *Oligo dT Beads* binden konnte. Anschließend wurden die Proben auf einen magnetischen Ständer gestellt und gewartet, bis die Beads sich an den Magneten gesammelt hatten, sodass der Überstand abpipettiert werden konnte. Nach Entfernung vom Magneten wurde zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und nach jedem Mal der Überstand, während sich die Proben auf dem Magne-

ten befanden, abpipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, die Beads nicht zu berühren um ein Aufmischen zu verhindern. Nach Zugabe von 50 µl Tris-Puffer wurden die Proben 2 min. bei 80 °C im Thermocycler inkubiert, um die mRNA von den Beads zu eluieren. Nach Abkühlung auf 25 °C wurden die Proben entnommen, 50 µl RNA-Binding-Buffer hinzugefügt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert, damit die mRNA sich erneut an die Beads binden konnte. Anschließend wurden die Proben wieder auf den Magneten gestellt bis die Lösung klar war und der Überstand verworfen. Zum Waschen der Beads wurden die Proben vom Magneten entfernt, mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und wieder auf den Magneten gestellt um die Beads heraus zu fischen. Um eine Kontamination auszuschließen, wurde in diesem Schritt darauf geachtet, den Überstand restlos zu entfernen, damit nur an die Beads gebundene mRNA in die nächsten Schritte weitergetragen wurde.

Um die mRNA von den Beads zu eluieren und zu fragmentieren, wurden die Proben vom Magneten genommen, um mit 11,5 µl *First Strand Synthesis Reaction Buffer* und *Random Primer Mix*, die zuvor laut dem Kit beiliegenden Protokoll vorbereitet wurden, versetzt. Die Mischung wurde im Thermocycler bei 94 °C inkubiert und nach Ablauf von 15 min. und nach Abkühlen auf 65 °C direkt für eine min. auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben erneut auf den Magneten gestellt bis die Lösung klar war. 10 µl des Überstands wurden in ein neues nukleasefreies 0,2 ml PCR-Röhrchen überführt und direkt auf Eis gelagert.

Die folgende Synthese des ersten Strangs der cDNA wurde auf Eis durchgeführt. Dazu wurde den Proben 8 µl nukleasefreies Wasser und *NEBNext First Strand Synthesis Enzyme Mix* aus dem Kit zugegeben. Für die Synthese wurden die Proben dann für 10 min. bei 25 °C, 15 min. bei 42 °C und 15 min. bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und bei 4 °C gehalten.

Die Synthese des zweiten Strangs der cDNA wurde ebenfalls auf Eis durchgeführt. Dafür wurde zu den Proben 8 µl *NEBNext Second Strand Synthesis Reaction Buffer*, 4 µl *NEBNext Second Strand Synthesis Enzyme Mix*, beides aus dem Kit, und 48 µl nukleasefreies Wasser gegeben. Die Reaktion wurde 1 Stunde bei 16 °C im Thermocycler durchgeführt.

Um die doppelsträngige cDNA aus den Proben zu isolieren, wurden den Proben 144 µl Beads hinzugefügt, an die sich die cDNA während einer 5-minütigen Inkubationszeit band. Anschließend wurden die Proben erneut auf den Magneten gestellt und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Beads 2-mal mit 200 µl 80% Ethanol für 30 sek. gewaschen, während sie auf dem Magneten standen. Nach dem zweiten Waschen wurde das Ethanol restlos entfernt und die Beads für 3 min. getrocknet. Sobald sie nicht mehr glänzten, wurden die Proben vom Magneten entfernt und die DNA mit 53 µl TE Puffer aus dem Kit von den Beads eluiert. Um zu verhindern, dass DNA verloren ging, war es wichtig, die Beads nicht zu lange zu trocknen sodass sie nicht hell und rissig wurden. Um den Überstand in neue nukleasefreie 0,2 ml PCR-Röhrchen zu überführen, wurden die Proben auf den Magneten gestellt und der Überstand ab pipettiert, sobald er klar war. An diesem Punkt konnten die Proben bei -20 °C gelagert werden.

Um die Erstellung der cDNA Library zu beenden, wurden aus dem Kit 7 µl *NEBNext Ultra 2 End Prep Reaction Buffer* und 3 µl *NEBNext Ultra 2 End Prep Enzyme Mix* hinzugegeben. Die Reaktion lief im Thermocycler für 30 min. bei 20 °C und für 30 min. bei 65 °C ab. Anschließend wurde die Adapterligation durchgeführt. Dafür wurde zunächst der *NEBNext Adaptor* aus dem Kit gemäß dem, dem Kit beiliegenden Protokoll, abhängig von der anfangs eingesetzten RNA-Menge in eiskaltem *Adaptor Dilution Buffer* gelöst und auf Eis gelagert. Anschließend wurden davon 2,5 µl sowie 1 µl *NEBNext Ligation Enhancer* und 30 µl *NEBNext Ultra 2 Ligation Master Mix* zu den Proben gegeben. Die Reaktion erfolgte durch eine 15 minütige Inkubation bei 20 °C im Thermocycler. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 3 µl User Enzyme hinzugefügt und weitere 15 min. bei 37 °C inkubiert.

Zur Aufreinigung wurden die Proben mit 87 µl *NEBNext Sample Purification Beads* versetzt, 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf den Magneten gestellt, um den Überstand zu entfernen. Um die Beads zu reinigen, wurde zwei Mal mit 200 µl 80% Ethanol gewaschen, während die Beads an die Magneten gebunden waren. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Beads für 3 min. getrocknet, bis sie nicht mehr glänzten. Danach wurden die Proben vom Magneten genommen und die DNA mit 17 µl *TE Puffer* eluiert. Nach 2 min. Inkubationszeit, wurden die Beads durch den Magneten vom Überstand getrennt und 15 µl des Überstandes in neue nukleasefreie 0,2 ml PCR-Röhrchen überführt.

An diesem Punkt konnten die Proben bei -20 °C eingefroren und gelagert werden.

Als nächstes wurden die Proben für die PCR vorbereitet. Dazu wurden 25 µl *NEB-Next Ultra 2 Q5 Master Mix* aus dem Kit und je 5 µl *Index/i7 Primer* und *Universal PCR Primer/i5 Primer* zu den Proben gegeben. Die Primer wurden so kombiniert, dass die Kombination für nur eine Probe spezifisch war, sodass die Proben nach dem Sequenzieren durch ihre Primerkombination zugeordnet werden konnten. Die PCR der Proben wurde für 1 Zyklus von 30 sek. bei 98 °C, 12 Zyklen je 10 sek. bei 98 °C gefolgt von 75 sek. bei 65 °C und 1 Zyklus von 5 min. bei 65 °C durchgeführt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Anzahl der Zyklen war von der eingesetzten RNA-Menge abhängig.

Anschließend wurde das Produkt der PCR mit *NEBNext Sample Purification Beads* aufgereinigt. Dafür wurden 45 µl der Beads zur Probe hinzugefügt, 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ablauf der Zeit der Überstand entfernt. Dafür wurden die Proben wieder auf dem Magneten platziert und der Überstand abpipetiert. Danach wurden die Beads, während sie auf dem Magneten standen, zwei Mal mit 200 µl 80% Ethanol gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift, wurden sie für 3 min. an der Luft getrocknet, um sicher zu sein, dass das komplette Ethanol von den Proben entfernt wurde. Sobald die Beads nicht mehr glänzten, wurden die Proben vom Magneten entfernt und die DNA mit 23 µl *TE-Puffer* aus dem Kit eluiert. Davon wurden 20 µl in ein neues Tube überführt.

Abschließend wurde die Qualität der Proben mittels des *Agilent Bioanalyzer* bestimmt, die Konzentration mit dem *Qubit* gemessen und für alle Proben auf 4 nM eingestellt. Danach wurden 3 µl jeder Probe zu einer Gesamtprobe gepoolt und zur Analyse zu *NovoGene* (Cambridge, Großbritannien) geschickt, wo die Sequenzierung mit dem *NovaSeq 6000* von *Illumina* erfolgte. Die erhaltenen *raw-sequencing reads* wurden anhand des *Illumina* Standardprotokolls weiterverarbeitet, mittels Adaptersequenzen eingeordnet und mit der Software *CLC Genomics Workbench 20.0* von *Qiagen* analysiert. Dazu wurden CLC Standardeinstellungen für RNA-Sequenz-Analysen genutzt.

Um die Gene zu detektieren, die im Vergleich der Methionin- und der AHA-Proben differentiell exprimiert wurden, wurden verschiedene Filter angewendet. Zunächst wurden nur Gene mit einer durchschnittlichen Expression von  $\geq 4$  TPM (*transcript per million*) für jede der beiden Vergleichsgruppen (Meth vs. AHA) in die Analyse einbezogen. Dann wurde für jede Zelllinie ein Zweigruppenvergleich, AHA- gegen die Methionin-Bedingung, nach *Robinson und Smith* durch die CLC Software durchgeführt.

Zur späteren Darstellung der Gene, die im Vergleich der beiden Bedingungen durch den Einfluss von AHA signifikant hoch- oder herunterreguliert wurden, wurde nach einer Faltungsänderung (engl. *fold change*) von  $\geq 2$  und einem p-Wert  $<0,05$  gefiltert.

## 4.2.3 Bestimmung des Proteoms

### 4.2.3.1 Probenvorbereitung

Zur Bestimmung des Proteoms wurden Proben mit je einer Million Zellen vorbereitet. Dazu wurden die Zellen aus dem Sekretomversuch geerntet, gezählt und zwei Mal durch 5-minütige Zentrifugation bei 3.000 rpm mit PBS gewaschen um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Proben bis zur weiteren Verwendung trocken bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen mittels Ultraschall im Biorupter lysiert. Dazu wurden sie in  $500\text{ }\mu\text{l}$  *FASP-Lysepuffer* aufgenommen, resuspendiert und für 15 alternierende Zyklen mit je 30 sek. Time-on und 30 sek. Time-off bei  $4\text{ °C}$  in den Biorupter gegeben. Nach Ablauf der 15 Zyklen wurden die Proben 5 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein frisches *Lo-bind*-Reaktionsgefäß gegeben und der Proteingehalt der Proben bestimmt.

### 4.2.3.2 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde das *660 nm Protein-Kit* von *Pierce* verwendet. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von  $0,0\text{-}2,0\text{ mg/ml}$  angesetzt. Von den Verdünnungen sowie von den Proben wurden je  $10\text{ }\mu\text{l}$  in doppelter Ausführung in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Anschließend wurden  $150\text{ }\mu\text{l}$  des *Pierce 660 nm Protein Assay Reagent* auf jedes Loch gegeben. Nach 5 min. Inkubationszeit wurde dann die Absorbanz bei  $660\text{ nm}$  drei Mal pro Loch mit *TecanXFluor* gemessen.

Aus den Doppelbestimmungen wurden dann die Mittelwerte der Absorbanz für jede Probe bestimmt und die Konzentrationen der Proben in Excel mittels einer Regressionsgeraden berechnet. Für den FASP-Proteinverdau wurden dann pro Probe  $2\text{ }\mu\text{g}$  Protein eingesetzt.

#### 4.2.3.3 Filtergestützte Probenvorbereitung (FASP, filter-aided sample preparation)

Für die Bestimmung des Proteoms mittels Massenspektrometrie, wurden die Proben durch filtergestützte Probenvorbereitung verarbeitet.

Hierzu wurden pro Probe je 2 µg Protein eingesetzt. Die Probenvorbereitung wurde mit 30 kDa-Cutoff-Filtern durchgeführt, deren Membran von Proteinen, die ein kleineres Molekulargewicht haben, passiert werden konnten, während sich die größeren Proteine auf der Membran sammelten. Vor Beginn wurden die Filter mit 100 µl 1%iger FA durch 5 minütige Zentrifugation bei 12.500 x g gereinigt. Dann wurden 20 µg jeder Probe auf die Filtereinheiten gegeben und, wie auch in allen weiteren Schritten, wenn nicht anders benannt, 10 min. bei 12.500 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl Harnstoff-Waschpuffer gewaschen. Um die Disulfidbrücken der Proteine zu lösen und sie zu entfalten, wurden die Proben mit 100 µl DTT-Lösung als Reduktionsmittel versetzt und 15 min. bei 56 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das DTT abzentrifugiert. Anschließend wurde erneut zwei Mal mit 100 µl Harnstoff-Waschpuffer gewaschen. Um ein neues Falten der Proteine zu verhindern, folgte eine Alkylierung der Cysteinreste. Dazu wurde den Proben 100 µl IAA-Lösung hinzugefügt und für 20 min. im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das IAA abzentrifugiert und 2-mal mit 100 µl Harnstoff-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden erneut 100 µl DTT-Lösung für 15 min. bei 56 °C auf die Proben gegeben, um IAA-Rückstände zu entfernen. Im Anschluss wurden die Proben 2-mal mit 100 µl Harnstoff-Puffer und 3-mal mit Ammoniumbicarbonat gewaschen. Der Verdau der Proteine wurde über Nacht mit 40 µl verdünnter Trypsinlösung bei 37 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Um den tryptischen Verdau zu beenden wurden die Proben angesäuert. Dazu wurden pro Probe 10 µl 10%iges TFA in je ein 1,5 ml *Lo-Bind*-Reaktionsgefäß gegeben, die Filtereinheiten vom Vortag in diese überführt und zentrifugiert. Dann wurden die Proteine mit 40 µl Ammoniumbicarbonatpuffer durch Zentrifugation eluiert. Im Anschluss wurden sie bei -80 °C für mindestens 30 min. oder bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. (siehe 4.2.3.4)

#### 4.2.3.4 Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Zur weiteren Vorbereitung für die massenspektrometrische Messung wurden die bei -80 °C eingefrorenen Proben durch Vakuum-Konzentrations-Zentrifugation mit der Univapo-100h eingengt, bis sie trocken waren. Anschließend wurden sie in 20 µl 0,1% FA aufgenommen um etwa eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl zu erreichen. Für die Vormessung per Massenspektrometrie wurden 10 µl der Probe mit 40 µl 0,1% FA auf etwa 0,2 µg/µl weiter verdünnt und etwa 0,5 µl eingesetzt.

Die Lademenge für die Hauptmessung wurde nach der Vormessung anhand eines HeLa-Standards angepasst.

#### 4.2.4 Massenspektrometrie und Analyse der massenspektrometrischen Daten

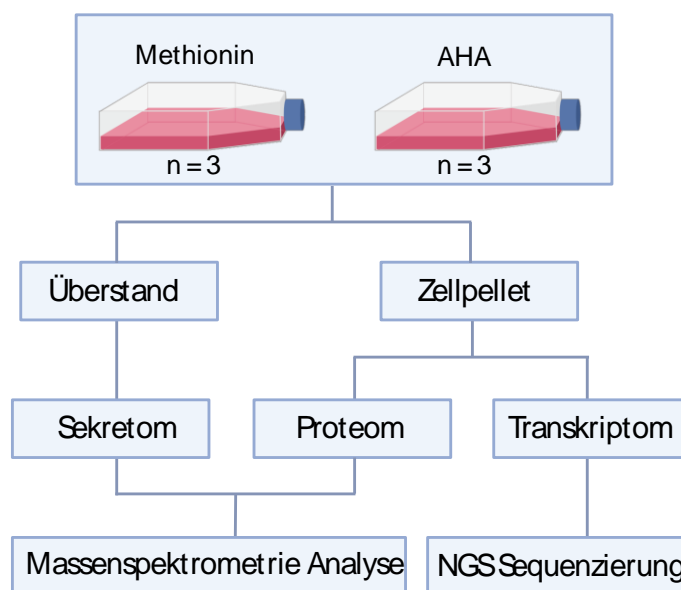
Für die Flüssigkeitschromatographie (engl.: liquid chromatographie, LC) wurde die *Dionex Ultimate 3000* von ThermoFisher mit einer Umkehrphasen-Säule (HSS-T3 C18 1.8 µm, 75 µm × 250 mm, Waters Corporation) eingesetzt. Für die Analyse der Proben wurde die Lademenge der Proteine entsprechend dem *Total Ion Count* (TIC) von 50 ng HeLa-Probe angepasst. Dabei wurden die Proben vor der Injektion über ein Trap-Setup laufen gelassen, um sie weiter aufzureinigen.

Die Elution der Peptide erfolgte über die Dauer von 60 min. bei 55 °C mit einer Flussrate von 300 nl/min und einem Elutionsgradienten von 5% Eluent A (0,1% TFA / 3% DMSO / Water) zu 35% Eluent B (0,1% TFA / 3% DMSO / ACN). Anschließend wurden die Proben mittels einer *Orbitrap Exploris 480* von ThermoFisher massenspektrometrisch analysiert. Die Verbindung zwischen der LC und dem Massenspektrometer wurde durch eine nanoESI-Quelle (*electrospray ionization*) hergestellt. Die Analyse wurde im datenabhängigen Modus (engl.: *data dependent acquisition*, DDA) durchgeführt, wobei alle Proben in technischen Triplikaten gemessen wurden.

Zur Auswertung der Daten wurde für die Prozessierung der Rohdaten mit dem Programm MaxQuant<sup>40</sup> gearbeitet. Zur Identifikation der Peptide/ Proteine wurde die Datenbank UniProtKB/SwissProt<sup>38</sup> verwendet und dort gegen Referenzdaten der entsprechenden Spezies (Homo sapiens oder Mus musculus) gesucht. Dabei wurden Carbamidomethylierung an Cystein als feste, Oxidation an Methionin und N-terminale Acetylierung als variable Modifikation eingestellt. Als Enzym wurde Trypsin

angegeben. Es wurden nur Peptidfragmente mit maximal zwei fehlenden tryptischen Spaltungen akzeptiert.

Die erstellten Datensätze wurden im Anschluss in Excel exportiert und analysiert. Dazu wurden anhand der LFQ-Intensitäten zweiseitig ungepaarte T-Tests über alle technischen und biologischen Replikate mit anschließender Benjamini-Hochberg-Korrektur durchgeführt. Für jede Zelllinie wurde das  $\log_2$ -Verhältnis berechnet, indem die durchschnittliche  $\log_2$ -LFQ-Intensität aller technischen und biologischen Replikate der AHA-Proben von denen der Methionin-Proben abgezogen wurde. Wurde bei der Messung in einer der beiden Gruppen, AHA oder Methionin, kein Wert detektiert, wurden die Werte ergänzt, indem die minimal erreichte Intensität des entsprechenden Datensatzes durch zwei geteilt wurde. Anschließend wurde sowohl für die Proteomdaten als auch für die Transkriptomdaten ein Filter angewendet. Der finale Sekretomdatensatz enthält nur Proteine, dessen  $\log_2$ -Verhältnis zwischen Methionin und AHA  $\leq -1$  ist und somit als signifikant unterschiedlich exprimiert definiert wurde. Für den Proteomdatensatz wurde ein  $\log_2$ -Verhältnis von  $\leq -1$  oder  $\geq 1$  als signifikant festgelegt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs zur Erstellung des Sekretoms, Proteoms und Transkriptoms mittels *SILAC-Labelings***

### 4.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von einzelnen Partikeln, meist Zellen, in einer Suspension. Dies geschieht, indem die einzelnen Partikel an einer Lichtquelle und einem oder mehreren Lasern unterschiedlicher Wellenlänge vorbei fließen. Dabei werden sie erregt und die Streuung des auftreffenden Lichts bzw. die emittierte Strahlung der Laser gemessen. Dadurch können die relative Größe der Zellen, die Granularität und mögliche Oberflächenmarker bestimmt werden.<sup>41</sup> Die Streuung des sichtbaren Lichts ist dabei unabhängig von Fluoreszenz, während es für die Messung durch Laser notwendig ist, dass die Zellen mit fluoreszierenden Proteinen transfiziert wurden oder fluoreszierende Antikörper und Färbungen eingesetzt werden um bestimmte Eigenschaften sichtbar zu machen.<sup>42</sup> Ein Beispiel dafür ist, wie in dieser Arbeit angewendet, die Färbung von Zellen mit fluoreszierenden Apoptosemarkern wie Annexin-V-FITC. Annexin-V bindet calciumabhängig an Phospholipide bzw. Phosphatidylserin, welches sich an der inneren Membran von Zellen befindet und freigelegt wird, wenn Zellen apoptotisch sind. Das an das Annexin gebundene FITC (Fluorescein isothiocyanate) ist ein Fluoreszein. Es wird in der Durchflusszytometrie von Lasern mit einer Wellenlänge von 495 nm angeregt. Durch die emittierte Strahlung mit einer Wellenlänge von 519 nm erscheint es grün und ermöglicht somit die Detektion apoptotischer Zellen.<sup>43</sup> Ein anderes, hier angewendetes Beispiel ist TO-PRO-3, ein Farbstoff mit dem tote Zellen sichtbar gemacht werden können. Dabei macht man sich zu Nutze, dass bei abgestorbenen Zellen die Zellmembran durchlässig wird und das TO-PRO-3 dann an die DNA bindet. Bei Anregung mit Lasern von etwa 640nm Wellenlänge erscheinen die toten Zellen rot.<sup>44</sup>

In dieser Arbeit hat der *ImageStream MKII* von Amnis/ Luminex/ Millipore mit drei Lasern Anwendung gefunden. Er verbindet die Durchflusszytometrie mit der Fluoreszenzmikroskopie. Diese bildgebende Durchflusszytometrie ermöglicht es, zusätzlich von jeder Zelle Bilder aufzunehmen, die Morphologie der Zelle zu beurteilen und die gemessenen Daten visuell zu validieren.<sup>45</sup>

Für die Datenauswertung wurden das Programm *IDEAS (ImageStream Data Exploration and Analysis Software* von Millipore) und die *FlowJo Software* genutzt.

#### 4.2.5.1 Zellfärbung mit TO-PRO3 und Annexin-V-FITC

Zur Bestimmung des Anteils der toten bzw. apoptotischen Zellen in den verschiedenen Kulturen unter verschiedenen Bedingungen, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen geerntet. Dafür wurden sie mit Accutase abgelöst und 3 min. bei 1.600 rpm zentrifugiert, um sie vom Medium zu trennen. Anschließend wurden sie mit 500  $\mu$ l Annexin-Binding-Buffer 1x gewaschen, 5 min. bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Färbung wurde mit Annexin-V-FITC als Farbstoff für die apoptotischen Zellen und TO-PRO-3 als Lebend- /Todfarbstoff durchgeführt. Dazu wurden 50  $\mu$ l Annexin-V-FITC-Färbelösung (Annexin-V-FITC 1:20 mit Annexin-Binding-Buffer 1x) zum Zellpellet gegeben, gut resuspendiert und 15 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension mit 2,5  $\mu$ l 10%-igem BSA versetzt (d.h. einer finalen BSA- Konzentration von 0,5%), um ein Verklumpen der Zellen während der Messung zu vermeiden.

TO-PRO-3 wurde erst unmittelbar vor der Messung zu den Proben gegeben. Dafür wurden 2  $\mu$ l einer 1  $\mu$ M Lösung eingesetzt um ein finales Verhältnis von 40 nM zu erhalten.

Die Messung der Proben wurde am *Amnis ImageStream MKII* durchgeführt. Zur Anregung des Annexin-V-FITC wurde der Laser mit 488 nm Wellenlänge mit 100,00 mW eingesetzt, für das TO-PRO-3 der Laser mit 642 nm Wellenlänge mit 150,00 mW. Es wurden jeweils 15  $\mu$ l der Proben für die Messung verwendet. Für die Analyse wurde die *FlowJo Software* verwendet.

#### 4.2.6 Entwicklung einer alternativen Methode für die Sekretomanalyse

Als Alternative zur Methode der *Sekretomanalyse mittels SILAC-Labeling und Click-Chemistry von Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld* wurde in dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt, bei der keine Aminosäure- oder Zuckermanaloga zur Markierung und Separation der neu synthetisierten Proteine eingesetzt werden.

Als Grundlage wurde das X-VIVO 15 Medium von Lonza verwendet, welches nicht mit FCS versetzt wurde.

Zur Etablierung der Methode wurde die Zelllinie MC38 verwendet und alle Medien aus Tabelle 5 getestet.

Am ersten Tag des Versuchs wurden Löcher mit je  $0,2 \times 10^6$  Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten in dem für die Zellen typischen Medium ausgesät und, wie beim vorherigen Protokoll (siehe 4.2.1), über Nacht auf 60-70% Konfluenz wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen 2-mal mit 2 ml PBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Das PBS wurde dazu vorher auf 37 °C erwärmt, um zu vermeiden, dass die adhärennten Zellen sich ablösen.

Nach dem Waschen wurden pro Loch je 1,2 ml Medium, wie in Tabelle 5 aufgeführt, auf die Zellen gegeben.

Mit den Proben passend zu den Medien Nummer drei und vier wurde so verfahren wie bei dem Ursprungsprotokoll (siehe 4.2.1). Das heißt, nach dem Waschen wurden die Zellen zunächst mit dem SILAC Medium ohne die Aminosäuren Arginin, Lysin und Methionin (siehe 3.2) versorgt und für 30 min. hungern gelassen. Anschließend wurde das Medium gegen das SILAC Medium mit den entsprechenden Aminosäuren ausgetauscht.

Für die Proben zu den Medien mit den Nummern neun bis zwölf wurde das X-VIVO 15 Medium, wie unter 4.2.6.2 beschrieben, aufkonzentriert und dem SILAC-Medium in genannter Menge anstelle des FCS hinzugefügt.

Tabelle 5: Medien zum Vergleich der Sekretommethode

1.	DMEM + 10% FCS (+ Glut, + NaPyr, + P/S) (= <i>Standardmedium</i> )
2.	DMEM ohne FCS (+ Glut, + NaPyr, + P/S)
3.	SILAC + Methionin (+ Leucin, +Lysin, + Arginin, + Glut, + NaPyr, + P/S)
4.	SILAC + L-AHA (+ Leucin, +Lysin, + Arginin, + Glut, + NaPyr, + P/S)
5.	X-VIVO 15
6.	X-VIVO 7,5
7.	X-VIVO 5
8.	X-VIVO 2,5
9.	SILAC + 12 µl aufkonzentriertes X-VIVO 15 (+ Leucin, +Lysin, + Arginin, + Glut, + NaPyr, + P/S) (= <i>SSPA 15</i> )
10.	SILAC + 6 µl aufkonzentriertes X-VIVO 15 (+ Leucin, +Lysin, + Arginin, + Methionin, + Glut, + NaPyr, + P/S) (= <i>SSPA 7,5</i> )
11.	SILAC + 4 µl aufkonzentriertes X-VIVO 15 (+ Leucin, +Lysin, + Arginin, + Methionin, + Glut, + NaPyr, + P/S) (= <i>SSPA 5</i> )
12.	SILAC + 2 µl aufkonzentriertes X-VIVO 15 (+ Leucin, +Lysin, + Arginin, + Methionin, + Glut, + NaPyr, + P/S) (= <i>SSPA 2,5</i> )

Die Zusätze, die hinter den Medien in der Tabelle genannt sind, wurden in den Konzentrationen, wie unter 3.2 und 3.3 aufgeführt, eingesetzt.

#### 4.2.6.1 Bestimmung des Proteoms und der Viabilität der Zellen beim Wachstum in den verschiedenen Medien

Nach 18 Stunden wurde die Morphologie der Zellen die, wie unter 4.2.6 beschrieben, behandelt wurden und unter den genannten Bedingungen gewachsen waren, unter dem Mikroskop begutachtet. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen und die sich im Medium befindenden Zellen pelletiert. Die adhären Zellen wurden geerntet und zu den bereits pelletierten Zellen gegeben.

Pro Medium aus Tabelle 5 wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen auf Proteomebene untersucht und je  $1 \times 10^6$  Zellen entsprechend 0 mit TO-PRO-3 und Annexin-V-FITC gefärbt um die Zellviabilität im ImageStream zu messen.

Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt.

#### 4.2.6.2 Aufkonzentration von X-VIVO 15 Medium

Um X-VIVO 15 Medium als FCS-Ersatz in SILAC-Medium in der Zellkultur einzusetzen, wurden 50 ml X-VIVO 15-Medium mit *Amicon Ultra 15 Filtern mit 3 kDa Cut-off* durch Zentrifugation bei 4.600 rpm auf 500 µl aufkonzentriert. Dabei sind die im X-VIVO-Medium enthaltenen Aminosäuren herausgefiltert worden.

#### 4.2.6.3 Finales Sekretomprotokoll

Für die finale Sekretommethode, wurde mit dem SSPA 2,5-Medium (Nr.12 aus Tabelle 5) gearbeitet.

Die neu synthetisierten Proteine wurden zusätzlich mit den schweren Isotopen der Aminosäuren Arginin und Lysin markiert.

An Tag 1 wurden für den Versuch pro Probe zwei Löcher mit  $0,2 \times 10^6$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und über Nacht auf 60-70% Konfluenz wachsen gelassen. An Tag 2 wurden die Zellen 2-mal mit 2 ml 37 °C warmem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 1,2 ml des beschriebenen SILAC-Mediums mit 2 µl aufkonzentriertem X-VIVO 15 und allen Zusätzen außer Arginin und Lysin versetzt und 1 Std. hungern gelassen. Anschließend wurde das Medium gegen 1,2 ml des gleichen Mediums, mit 0,4 mM schwerem Arginin und 0,8 mM schwerem Lysin ausgetauscht.

Nach 18 Std. wurde das konditionierte Medium abgenommen.

Die folgenden Schritte wurden dann bei 4 °C durchgeführt.

Zum Entfernen von abgestorbenen Zellen wurde das Medium 5 min. bei 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 48 µl Proteaseinhibitor versetzt. Anschließend wurde 10 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein Ultrazentrifugenreaktionsgefäß überführt. Um kleine Zellreste zu entfernen wurde dann 60 min. bei 40.000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Im Anschluss wurden pro Probe je 1,8 ml Medium mit 3 kDa Zentrifugationsamicons bei 13.000 rpm auf 80 µl aufkonzentriert.

Das aufkonzentrierte Medium wurde dann mit den *Pierce Top 12 abundant protein depletion spin columns* depletiert. (siehe 4.2.6.4)

Nach der Depletion wurde die Proteine der Probe mittels FASP-Verdau (siehe 4.2.3.3) verdaut und weiter für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet (siehe 4.2.3.4).

#### 4.2.6.4 Depletion von Albumin, Transferrin und Haptoglobin

Vor der massenspektrometrischen Bestimmung des Sekretoms wurde eine Depletion mit dem konditionierten SILAC-Medium mit Zusatz von 2 µl X-VIVO 15 durchgeführt, also mit dem Medium, das von den Zellen abgenommen und für die Sekretomanalyse genutzt wurde. Dies diente dazu, das im X-VIVO-Medium enthaltene Albumin, Transferrin und Haptoglobin zu entfernen. Albumin und Transferrin stellen Störfaktoren bei der massenspektrometrischen Messung dar.

Die folgenden Schritte fanden, wenn nicht anders beschrieben, bei 4 °C statt.

Dazu wurden die Proben zunächst 15 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert um Zellreste zu pelletieren. Der Überstand wurde in 1,5 ml Ultrazentrifugenreaktionsgefäß überführt. Um kleinere verbliebene Zellreste und –organellen zu entfernen, wurden die Proben dann 60 min. bei 35.000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Anschließend wurden 1,8 ml des Überstandes in Amicon Ultra 0,5 Filter mit 3 kDa Cut-off gegeben und durch Zentrifugation bei 13.000 rpm auf 80 µl aufkonzentriert.

Mit dem aufkonzentrierten Medium wurde dann die Depletion durchgeführt. Dafür wurden die *Top 12 abundant protein depletion spin columns* von *Pierce* verwendet. Vor Beginn wurden pro Säule 150 µl des Puffers oberhalb der Beads abgenommen und in einem separaten Reaktionsgefäß verwahrt. Dann wurde das aufkonzentrierte Medium auf die Säulen gegeben. Die Filter, die zur Aufkonzentration genutzt wurden, wurden mit 50 µl des abgenommenen Säulenpuffers gespült, der dann ebenfalls auf die Säulen gegeben wurde. Anschließend wurden die Säulen verschlossen, invertiert bis sich das Medium gut mit dem Säuleninhalt vermischt hatte und für weitere 60 min. bei Raumtemperatur rotiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Bodenverschluss der Depletionssäulen entfernt, die Säulen in 2 ml Lo-Bind-Reaktionsgefäßes gestellt und 2 min. bei 1.000 x g zentrifugiert, bis der flüssige Säuleninhalt in die Reaktionsgefäßes durchgelaufen war.

Die entstandene 500 µl Probe, bestehend aus Säulenpuffer (10 mM PBS; 0,15 M NaCl; 0,02% Azide; pH 7,4) und Medium mit sekretierten Proteinen, wurde im Anschluss mittels FASP verdaut (siehe 4.2.3.3).

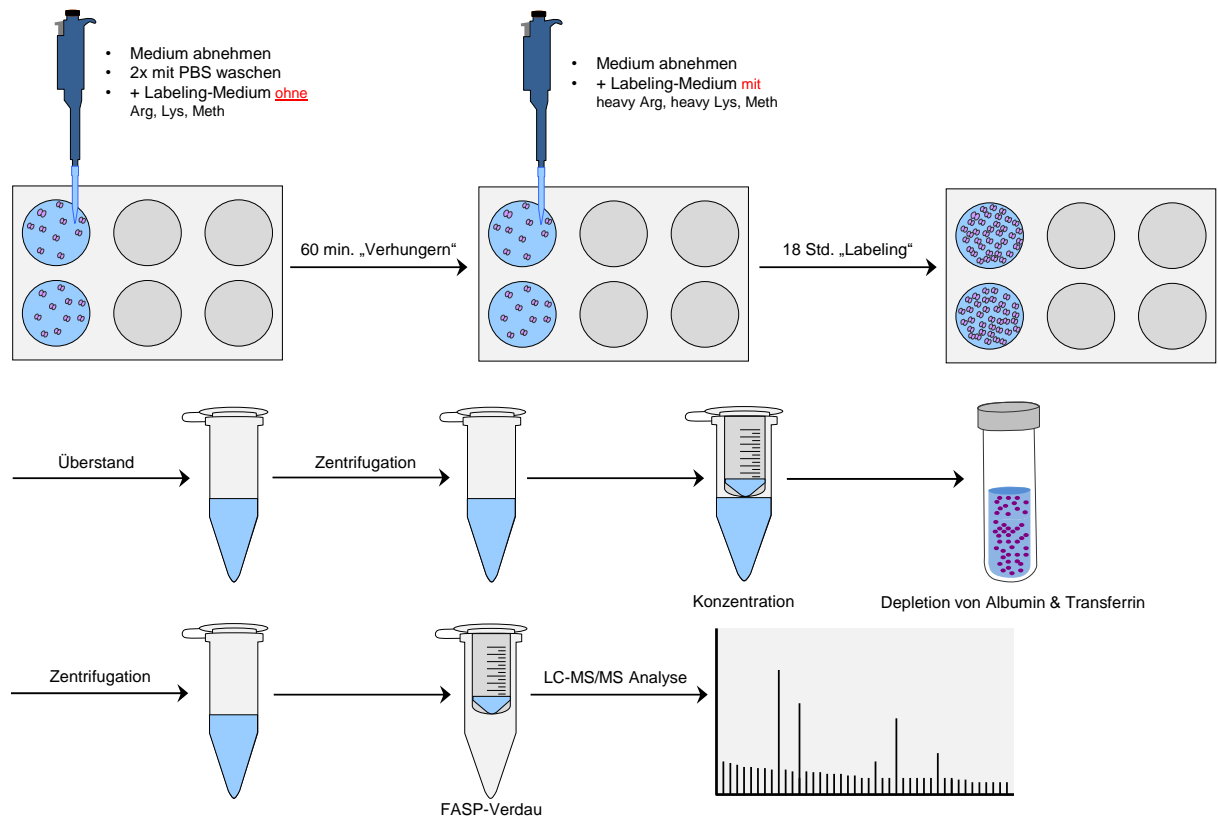


Abbildung 7: Schematische Darstellung der, in dieser Arbeit entwickelten, Methode zur Sekretomanalyse

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Sekretomanalyse humaner Tumorzelllinien

Im Hinblick auf eine mögliche Krebsfrüherkennung und damit verbundene gezielte Antitumorthherapie ist das Sekretom von Tumorzellen in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Mehrere Arbeitsgruppen erstellten Sekretomdaten zu einzelnen Tumorzelllinien, teilweise mit experimentellen, teilweise mittels bioinformatischer Methoden.

Die vorliegende Arbeit diente dazu, eine umfassendere Übersicht mit anschließendem Vergleich zwischen ausgewählten Tumorzelllinien zu ermöglichen.

Hierzu wurden neun verschiedene humane Tumorzelllinien und eine Zelllinie aus gesundem Gewebe (siehe Tabelle 1) unter Berücksichtigung des Herkunftsgewebes ausgewählt und mit der derzeitigen State-Of-The-Art-Methode von Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld untersucht (4.2.1). Dabei wurden insgesamt drei Gruppen (Lungenkarzinome, Melanome, Kolonkarzinome) mit je drei verschiedenen Tumorzelllinien des entsprechenden Gewebes gebildet. Die Zelllinie des gesunden Gewebes entstammte dem Kolon.

Für die massenspektrometrische Analyse wurde die Orbitrap Exploris 480 von ThermoFisher eingesetzt. Pro Zelllinie wurden je drei biologische Replikate erzeugt, die wiederum in je drei technischen Replikaten gemessen wurden. Zusätzlich zu den Proben, in denen L-AHA in die Proteine eingebaut wurde, um sie aus dem Medium separieren zu können, wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt. In dieser waren Zellen unter Normalbedingungen, d.h. mit Methionin, gewachsen.

Als aussagekräftig für das Sekretom wurden die Proteine angesehen, die in zwei von drei technischen und in zwei von drei biologischen Replikaten detektiert worden sind. Insgesamt konnten, wie in Abbildung 8 dargestellt, für die untersuchten Zelllinien zwischen 234 und 692 sekretierte Proteine identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl sekretierter Proteine zwischen den verschiedenen Zelllinien variierte. Die größte Anzahl sekretierter Proteine konnte in der Gruppe der Melanome gefunden werden.



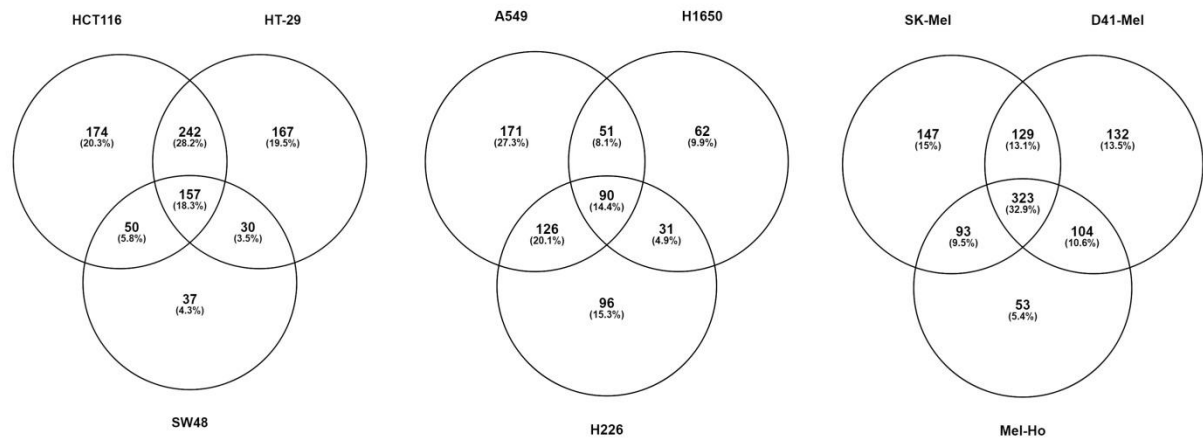
**Abbildung 8: Anzahl detektierter sekretierter Proteine in 10 humanen Zelllinien**

Gezeigt ist die Anzahl der identifizierten Proteine im Sekretom der 9 Tumorzelllinien, sowie für die Zelllinie, die von gesundem Kolongewebe abstammt (CCD841). Untersucht wurden pro Zelllinie 3 biologische Replikate, die wiederum in technischen Triplikaten gemessen wurden. Für die Messung wurde die Orbitrap Exploris 480 von ThermoFisher eingesetzt.

Zwischen den biologischen Replikaten jeder Zelllinie ließ sich eine hohe Korrelation feststellen, die sich in Abbildung 10 widerspiegelt. Zudem zeigte sich, dass die Zelllinien, die zu einer Tumorgruppe gehörten, größtenteils zusammen clusterten. Besonders deutlich zeigte sich dies bei den Melanomen (D41-Mel, Mel-Ho, SK-Mel-37), die sich unmittelbar nebeneinander wiederfanden. Das heißt, dass die Sekretome innerhalb dieser Gruppe sich ähnlicher waren, als im Vergleich zu einer anderen Gruppe. Bei den Kolonkarzinomen zeigten die beiden Zelllinien HT-29 und HCT116 ein gemeinsames Cluster. Bei den Lungenkarzinomen bildeten ebenfalls zwei der Zelllinien, die A549 und die H226, ein gemeinsames Cluster, während die H1650 in einem Cluster mit den SW48 aus der Gruppe der Kolonkarzinome zu finden waren.

Um Gemeinsamkeiten innerhalb jeder Gruppe genauer zu identifizieren und zu charakterisieren, wurden die Sekretionsprofile der Tumorzelllinien innerhalb jeder Gruppe miteinander verglichen (Abbildung 9). Dazu wurde das frei verfügbare Programm *Venny 2.1.0* verwendet.<sup>46</sup> Hierbei zeigten sich Übereinstimmungen aller drei Zelllinien von 18,3% innerhalb der Kolonkarzinome, 14,4% innerhalb der Lungenkarzinome und 32,9% innerhalb der Melanome. Zusätzlich fanden sich in jeder Gruppe auch Überlappungen zwischen je zwei von drei Zelllinien.

Insgesamt wurden 28 Proteine detektiert, die von allen neun untersuchten Tumorzelllinien sekretiert wurden. Die Gennamen dieser Proteine sind in Tabelle 6 zu finden.

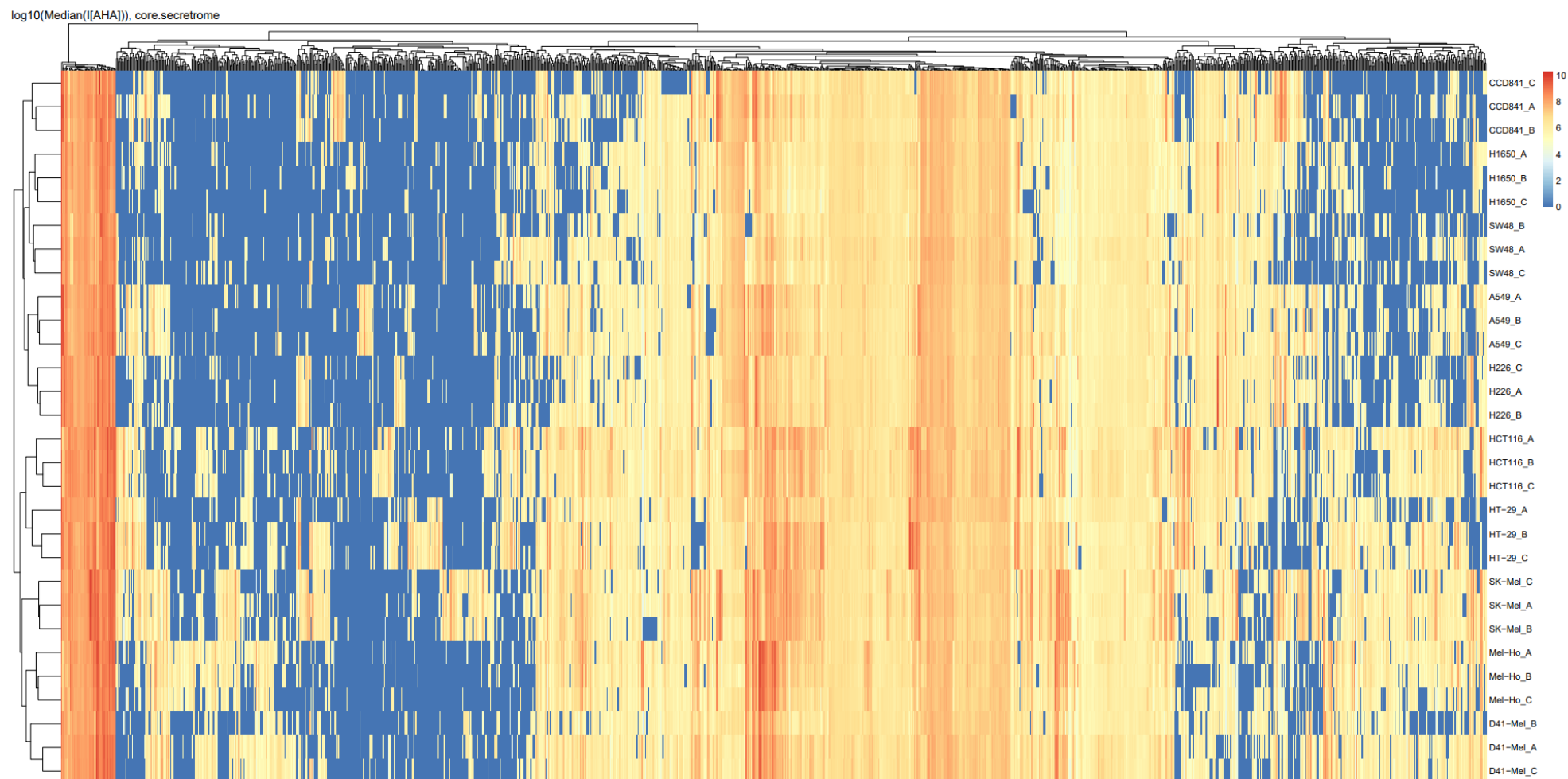


**Abbildung 9: Venn-Diagramme Sekretomvergleich**

Die Sekretionsprofile der Tumorzelllinien innerhalb der Tumorguppen wurden mittels des Programms Venny 2.1.0 miteinander verglichen. Dabei zeigten sich die dargestellten Überlappungen zwischen den Zelllinien. Von links nach rechts sind die Venn-Diagramme der Kolonkarzinome, der Lungenkarzinome und der Melanome dargestellt.

**Tabelle 6: Gennamen der Proteine, die von allen 9 Tumorzelllinien sekretiert wurden**

Gennamen
ITM2B
NUCB1
FUCA2
CST3
ATP6AP1
GM2A
ADAM9
CHST14
IGFBP2
TMED2
DAG1
TNFRSF12A
MMP1
SLIT1
PAM
PSAP
CCDC80
APLP2
UXS1
QSOX1
FSTL3
TIMP2
CYR61
GPC1
APP
PVR
SHISA5
PLOD1



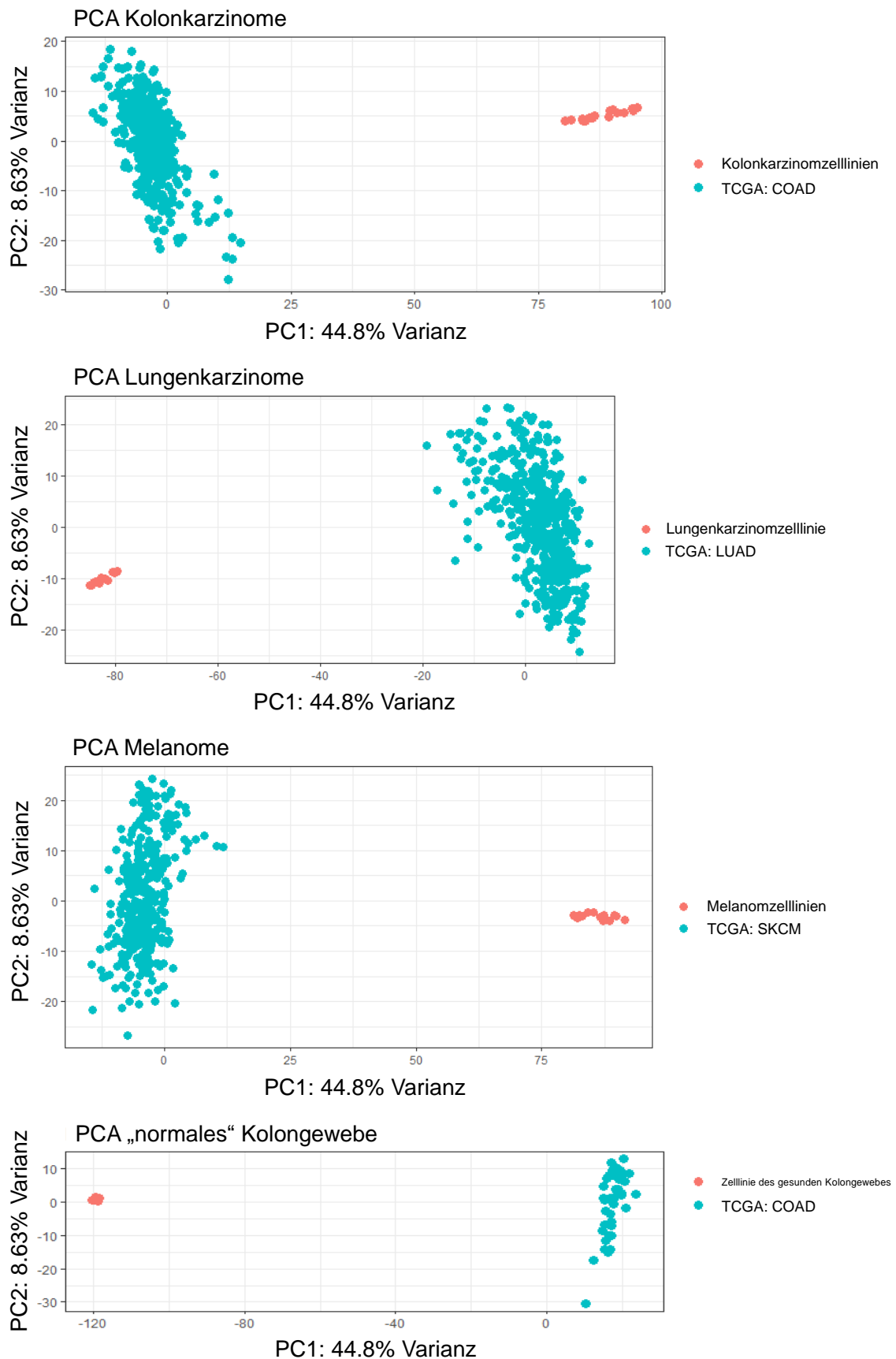
**Abbildung 10: Übersicht über das Sekretom der 10 humanen Zelllinien**

Die Abbildung zeigt eine Übersicht und einen Vergleich über die Sekretionsprofile der einzelnen Zelllinien und der biologischen Replikate jeder Zelllinie. Die gute Reproduzierbarkeit der Sekretomanalyse spiegelt sich in der engen Korrelation der Replikate wider. Auch Innerhalb der Zelllinien einer Tumorguppe zeigen sich gemeinsame Cluster.

## 5.2 Ergänzung der Sekretomdaten durch Proteom- und Transkriptomdaten

Als Ergänzung zu den Sekretomdaten und zur Validierung der genutzten Methode, wurden die Zellen, deren Überstand zur Analyse des Sekretoms genutzt wurde, geerntet und auf Proteom- und Transkriptomebene untersucht. Es wurden sowohl die Zellen der Positiv- (AHA-Bedingung) als auch der Negativkontrolle (Methionin-/Normalbedingung) untersucht. Pro Zelllinie wurden dazu je  $1 \times 10^6$  Zellen geerntet und lysiert. Alle Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse wurden anschließend mit Transkriptomdaten aus „*The Cancer Genome Atlas*“ (TCGA) des *National Cancer Institute* verglichen. Dieser enthält Transkriptomdaten die von mehr als 20.000 Primärtumoren aus Patienten zu 33 Tumortypen, sowie von gesunden Geweben als Vergleichsmaterial, erstellt worden sind.<sup>47</sup> Der Vergleich zwischen den Transkriptomdaten der in dieser Arbeit untersuchten 10 Zelllinien und den ex vivo gewonnenen Daten aus dem TCGA diente der Überprüfung, in wie fern die in vitro gewonnenen Erkenntnisse zum Sekretom auf das Tumormikromilieu in vivo übertragbar sind. Gezeigt werden die Daten in Form von Hauptkomponentenanalysen (engl. *Principal Component Analysis, PCA*), die es ermöglichen, die komplexen Datensätze durch Zusammenfassen vieler Variablen zu wenigen Hauptkomponenten, zu visualisieren. (Abbildung 11)

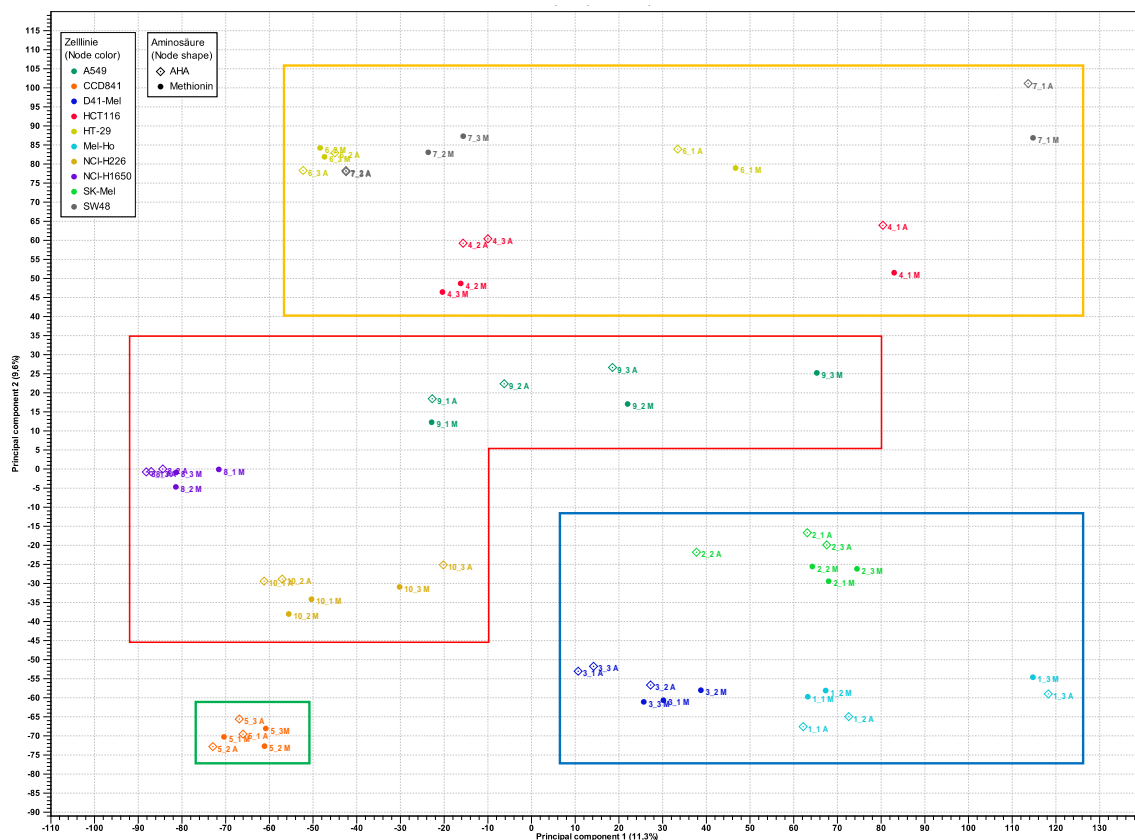


**Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten der 10 Zelllinien und der ex vivo Tumore aus dem TCGA**

Gezeigt ist der Vergleich von Transkriptomdaten, der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien mit Transkriptomdaten von ex vivo Tumormaterial von Patienten aus dem TCGA.

In Abbildung 12 sind die Transkriptomdaten aller Zelllinien beider Bedingungen zusammen in einer Hauptkomponentenanalyse dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass alle biologischen Replikate einer Zelllinie zusammen clustern. Die Daten der beiden Bedingungen, Methionin und AHA, liegen für eine Zelllinie jeweils näher zusammen als die verschiedenen Zelllinien zueinander. Ebenso zeigen alle Tumorzelllinien, die zu einer Gewebsgruppe gehören, bei der Analyse eine enge räumliche Beziehung. Jede Zelllinie wird von einer Farbe repräsentiert. Die beiden Bedingungen, Methionin und AHA, werden durch einen Punkt bzw. eine Raute vor der Probenbezeichnung gekennzeichnet.

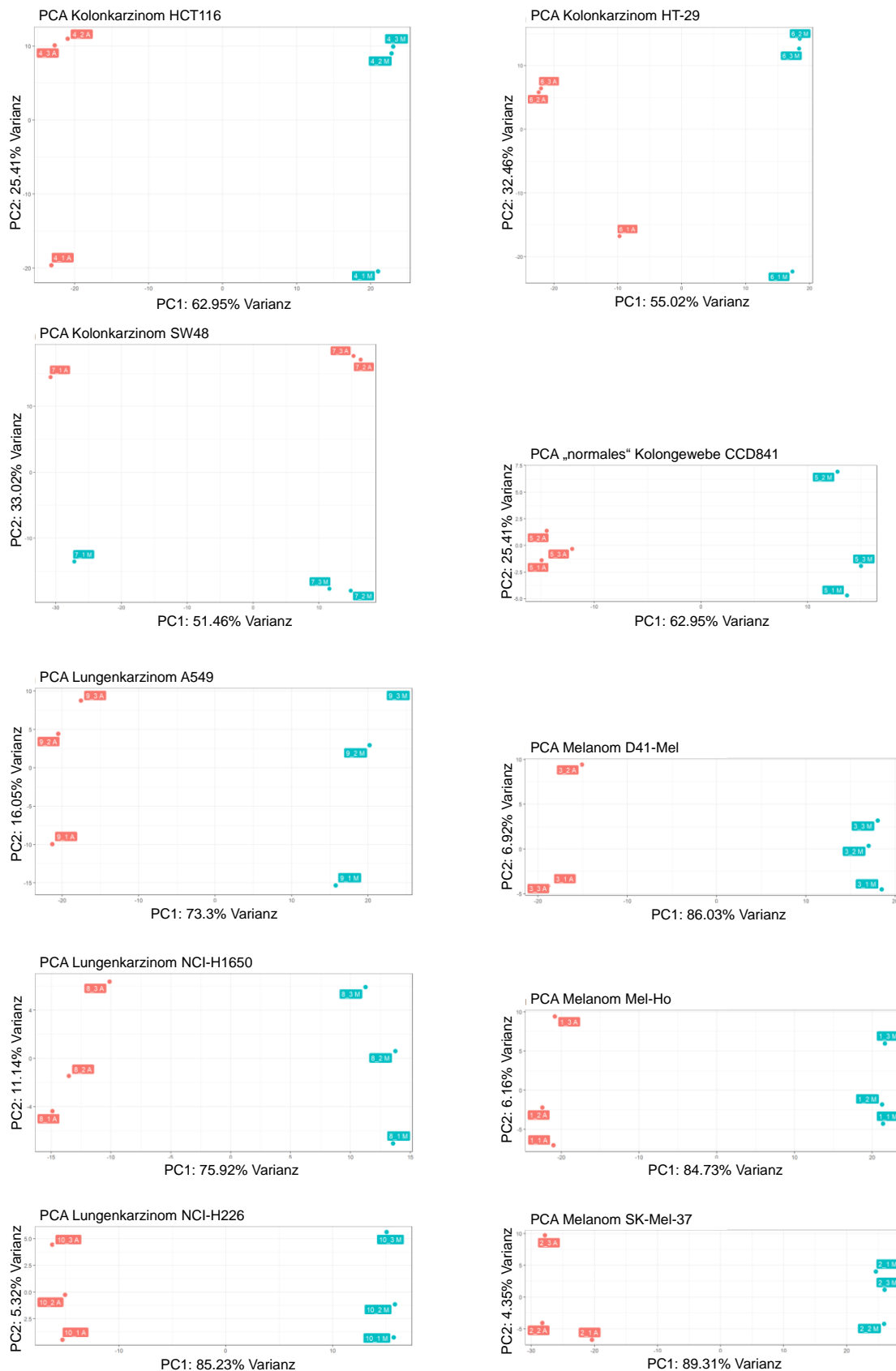
Die Gruppen wurden durch farbige Kästen markiert. Im gelben Kasten befinden sich alle Kolonkarzinome, im roten alle Lungenkarzinome und im blauen alle Melanome. Die Zelllinie, die vom gesunden Kolongewebe abstammt, wird von einem grünen Kasten umrahmt.



**Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten aller 10 Zelllinien**

In der dargestellten Hauptkomponentenanalyse sind die Beziehungen der Transkriptomdaten der drei Replikate der Methionin- und AHA-Bedingung jeder Zelllinie zu sehen. Jede Farbe repräsentiert eine andere Zelllinie. Der Punkt vor der jeweiligen Probenbezeichnung kennzeichnet die Methionin-Bedingung, die Raute für die AHA-Bedingung. Die Proben aller Zelllinien einer Gewebsgruppe sind durch die farbigen Rahmen markiert. (Gelb=Kolonkarzinome, Rot= Lungenkarzinome, Blau= Melanome, Grün= „Normales Kolongewebe“)

Stellt man die Transkriptomdaten der Methionin- und der AHA-Proben für jede Zelllinie einzeln in Form einer Hauptkomponentenanalyse dar (Abbildung 13), ist ein Unterschied zwischen den Proben der Zellen, die mit AHA gewachsen waren zu den Proben, bei denen die Zellen mit Methionin gewachsen waren zu erkennen. Die Replikate einer Bedingung liegen bei jeder Zelllinie deutlich näher bei einander, als die Replikate der beiden Bedingungen zueinander. Das bedeutet, dass sich die Zellen, die mit AHA gewachsen waren, um eine Separation der von ihnen sekretierten Proteine für die Sekretomanalyse aus dem Medium zu ermöglichen, in ihrer Genexpression von den gleichen Zellen, die mit Methionin gewachsen waren unterscheiden. Auch innerhalb der biologischen Triplikate einer Bedingung gab es kleine Varianzen.



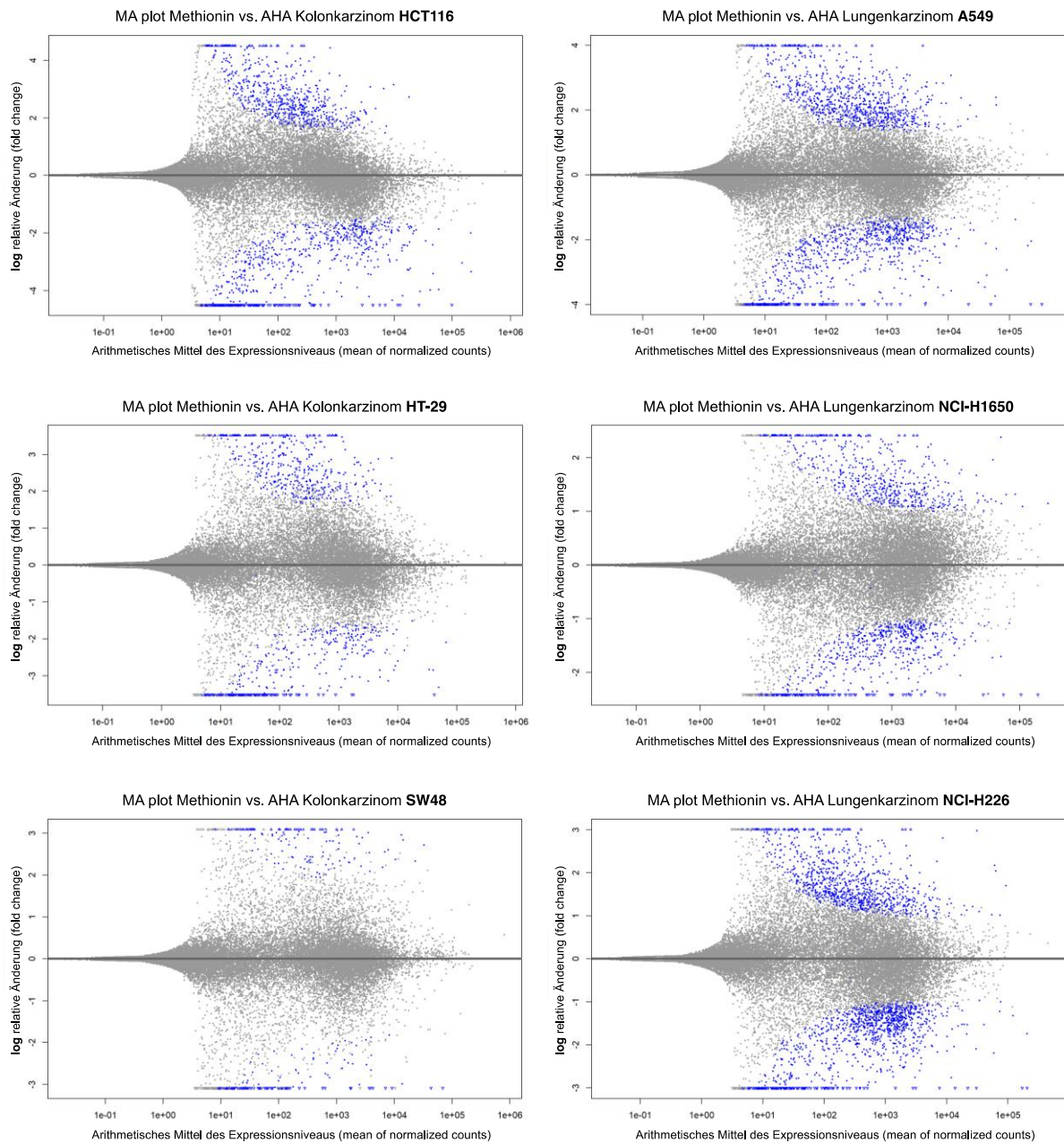
**Abbildung 13: Hauptkomponentenanalysen der biologischen Replikate der Methionin und AHA- Bedingung für jede Zelllinie**

Die Hauptkomponentenanalysen zeigen die Transkriptomdaten für jede der 10 Zelllinien. In Rot sind die biologischen Triplikate dargestellt, bei denen die Zellen mit AHA gewachsen waren, in Türkis die, bei denen die Zellen unter Normalbedingung (Methionin) gewachsen waren.

Zur weiteren Analyse der Genexpressionsmuster zwischen den Zellen, die mit AHA, im Vergleich zu denen, die mit Methionin (Normalbedingung) gewachsen waren, wurden für jede Zelllinie *MA Plots* erstellt. Diese ermöglichen eine zweidimensionale Veranschaulichung der Transkriptomdaten und einen Vergleich der Genexpression der beiden Konditionen. Auf der Y-Achse ist die relative Änderung (engl. *fold change*) und auf der X-Achse das arithmetische Mittel des Expressionsniveaus (engl. *mean of normalized counts*) der Gene, die verglichen werden, dargestellt.

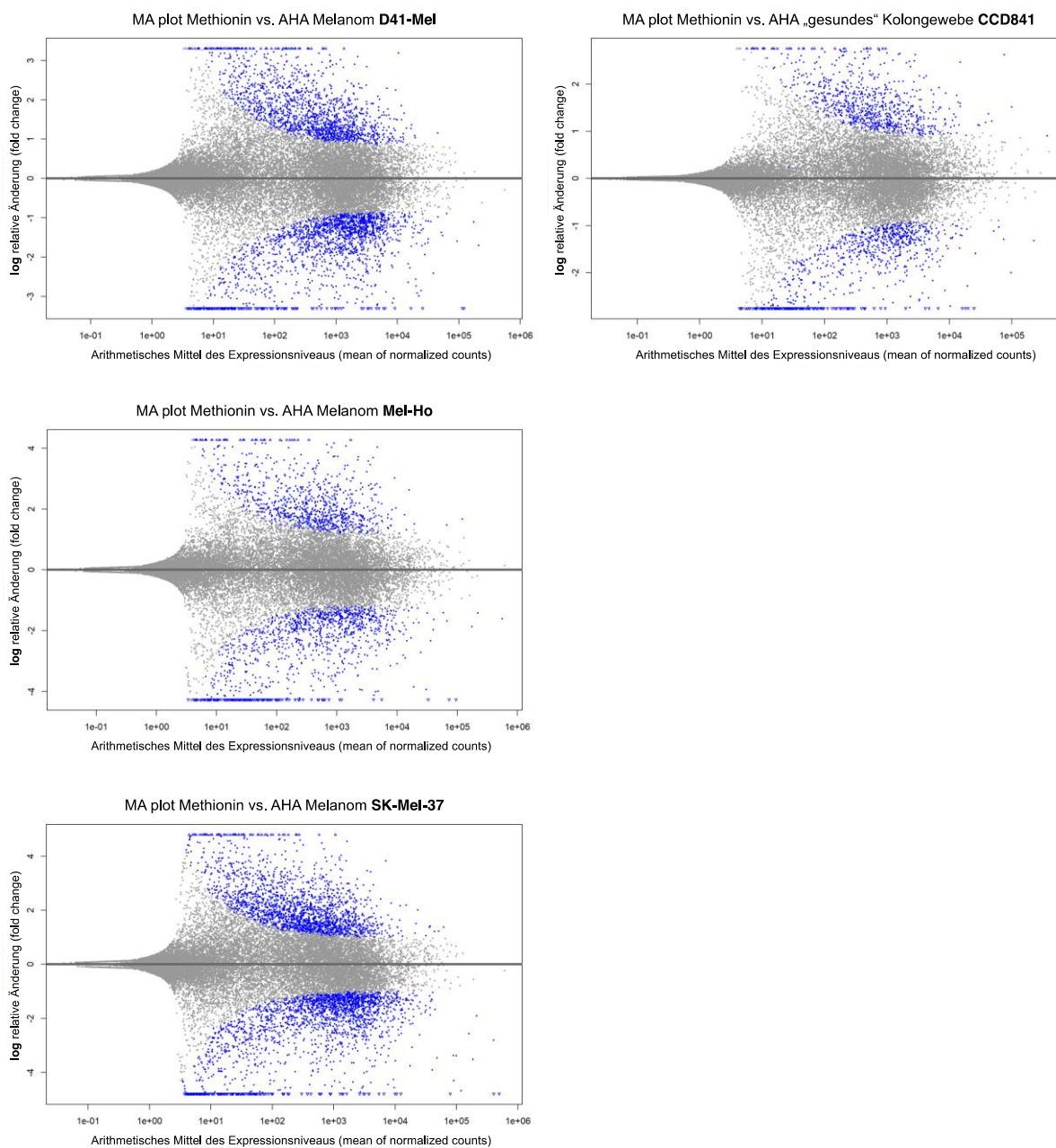
Gene, die in beiden Konditionen ähnlich stark exprimiert werden, finden sich in Form eines Punktes nahe der 0 auf der Y-Achse wieder. Gene, die in einer Bedingung eine höhere oder niedrigere Expression zeigen, liegen weiter von  $Y=0$  entfernt.

Die *MA Plots* sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 gezeigt. Bei jeder Zelllinie ist ein Unterschied in der Genexpression zwischen beiden Bedingungen erkennbar, der je nach Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Insgesamt variiert der Anteil differentiell exprimierter Gene, basierend auf einer relativen logarithmischen Änderung von  $<$  bzw.  $>0$  und einem Signifikanzwert von 0,05, im Vergleich zwischen der AHA- und der Methionin-Bedingung über alle 10 Zelllinien etwa zwischen 0,8% (SW48) und 13,8% (SK-Mel-37).



**Abbildung 14: MA Plots Kolon- und Lungenkarzinome**

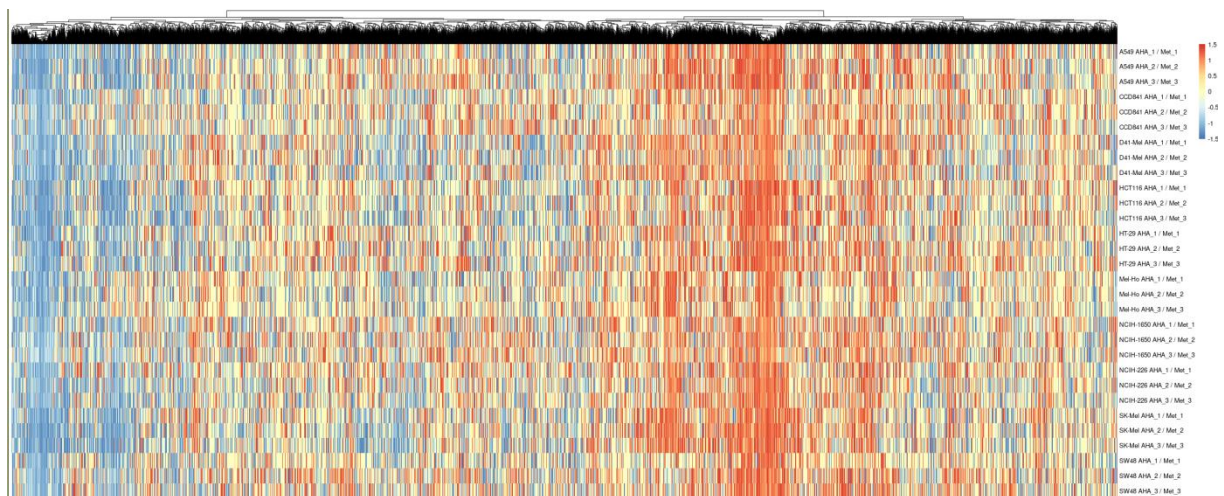
Die MA Plots zeigen die Veränderungen im Transkriptom zwischen den Methionin- und AHA-Bedingungen für die drei Kolonkarzinomzelllinien und die drei Lungenkarzinomzelllinien. Die signifikant differentiell exprimierten Gene sind in den MA Plots jeweils blau dargestellt.



**Abbildung 15: MA Plots Melanome und „gesundes“ Kolongewebe**

Die MA Plots zeigen die Veränderungen im Transkriptom zwischen den Methionin- und AHA-Bedingungen für die drei Melanomzelllinien und die Zelllinie, die von gesundem Kolongewebe abstammt. Die signifikant differentiell exprimierten Gene sind in den MA Plots jeweils blau dargestellt.

Eine Übersicht über die Transkriptomdaten bietet die Heatmap in Abbildung 16. Sie zeigt für alle Zelllinien die Gene, die pro Zelllinie im Vergleich beider Bedingungen differentiell oder gleich exprimiert wurden. Dabei werden pro Zelllinie die biologischen Replikate dargestellt. Gene, die im Transkriptom der Zellen, die mit AHA gewachsen waren stärker exprimiert wurden, sind in Rot dargestellt, die die in den Zellen, die mit Methionin gewachsen waren stärker exprimiert wurden, in Blau. Die gelben Bereiche repräsentieren die Gene, die in beiden Bedingungen gleich exprimiert wurden.



**Abbildung 16: Heatmap zu den Transkriptomdaten der 10 Zelllinien (Methionin vs. AHA)**

Die Heatmap präsentiert für jede Zelllinie farblich die Gene, die im Transkriptom der jeweiligen Zelllinie zwischen der Methionin und der AHA-Bedingung unterschiedlich exprimiert wurden. Blau präsentiert die Gene, die unter AHA-Bedingungen herunterreguliert, Rot die Gene, die hochreguliert waren. Die gelben Bereiche präsentieren die Gene, die gleich exprimiert wurden. Pro Zelllinie sind jeweils die Triplikate abgebildet. Berechnet wurde  $\log_{10}(\text{AHA}/\text{Meth})$ .

Um einen Eindruck zu bekommen, welchen Möglichen Effekt der AHA-Einsatz auf die Sekretomproteine hat, sind in Abbildung 17 nur die Gene in Form einer Heatmap dargestellt, die für Proteine kodieren, die im Sekretom der jeweiligen Zelllinie gefunden wurden.

Abbildung 18 zeigt für jede der 10 Zelllinien den Einfluss des AHA auf die Sekretomproteine auf Proteomebene.

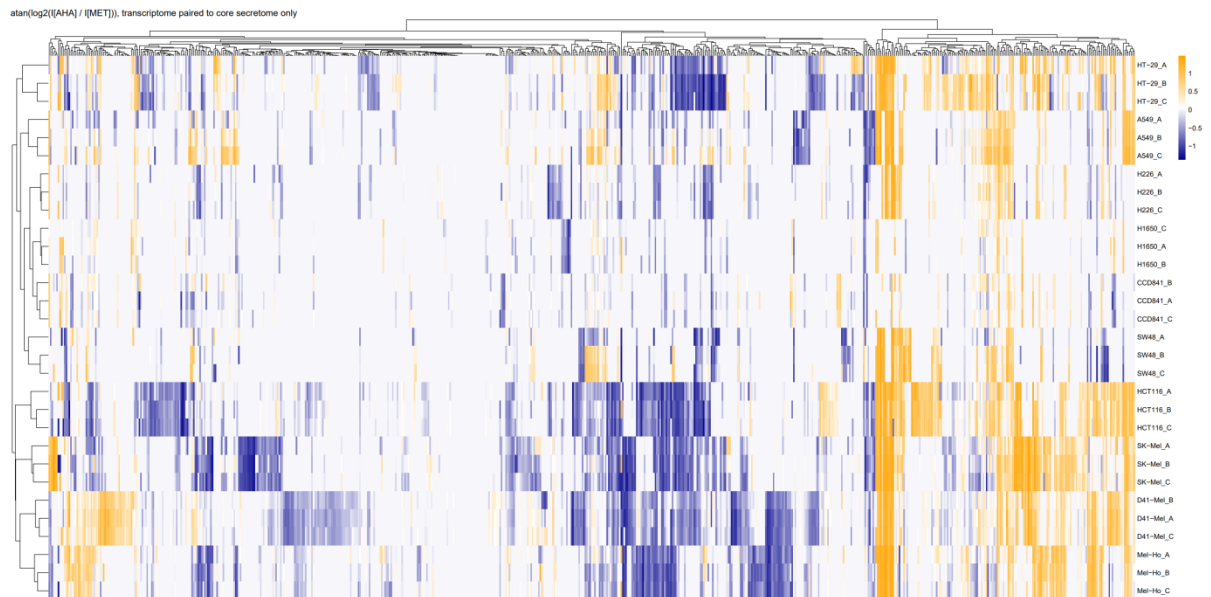


Abbildung 17: Heatmap der Transkriptomdaten der 10 Zelllinien, von Genen die für Proteine kodieren, die im Sekretom gefunden wurden

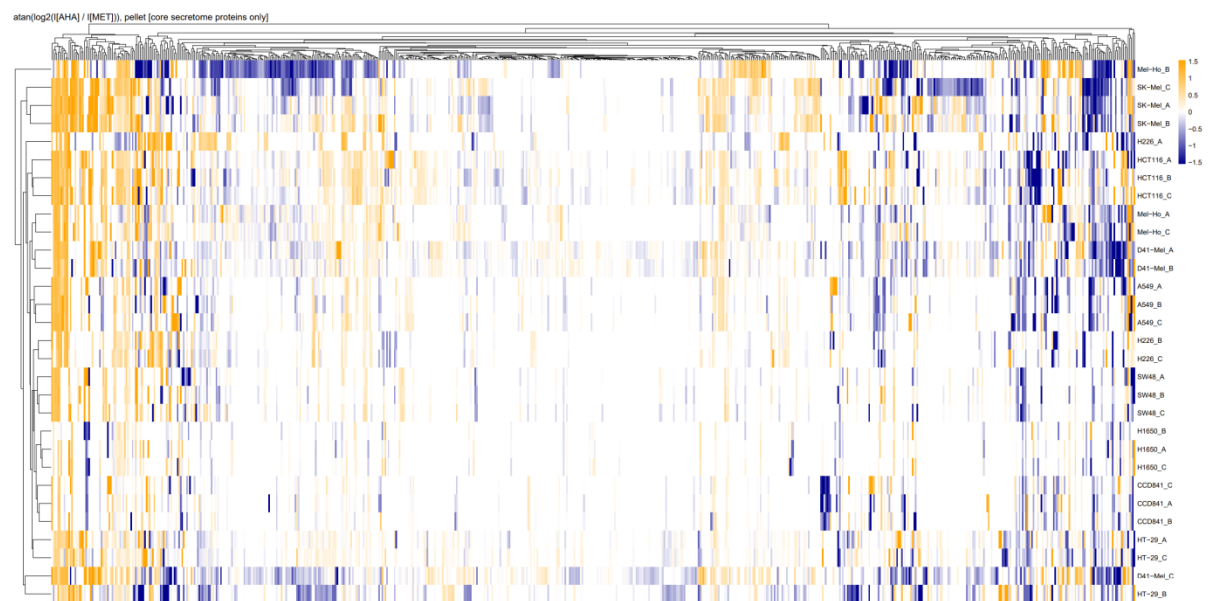


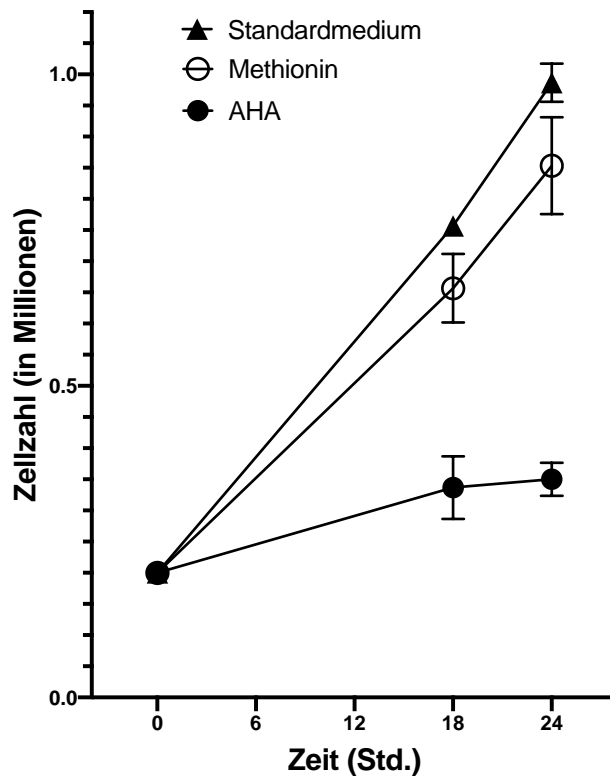
Abbildung 18: Heatmap für alle 10 Zelllinien von Proteinen auf Proteomebene, die im Sekretom gefunden wurden

### 5.3 L-Azidohomoalanin Effekt auf die Zellen

Der zuvor beobachtete und beschriebene Effekt des AHA auf die Zellen konnte mit der Mauskolonkarzinomzelllinie MC38 reproduziert und weiter untersucht werden. Zusätzlich zu dem mit AHA substituierten SILAC-Medium wurden die Zellen in serumfreiem Medium, wie es teilweise auch für Sekretomanalysen verwendet wird, in ihrem Standardmedium sowie in SILAC-Medium mit Methionin kultiviert. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 5 zu finden.

Bereits bei mikroskopischer Betrachtung konnten Unterschiede im Wachstum der Zellen in den verschiedenen Medien festgestellt werden. Für jede Bedingung wurden  $0,1 \times 10^6$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und eine Nacht in ihrem Standardmedium kultiviert. Am nächsten Tag lag die Zellzahl bei  $0,2 \times 10^6$  Zellen. Diese wurden zwei-mal mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht (18 Stunden) in den verschiedenen Medien kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 10x/0,25 Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet. Die Zellen, die in serumfreiem Medium gewachsen waren, erschienen deutlich runder, die die mit AHA gewachsen waren zeigten insgesamt ein geringeres Wachstum.

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden die Zellen nach 18 und nach 24 Stunden geerntet und gezählt. Abbildung 19 zeigt die Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit in Form einer Wachstumskurve. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen in SILAC-Medium mit Methionin ähnlich wie die Zellen in ihrem Standardmedium gewachsen waren. Die Zellen, die in SILAC-Medium mit AHA gewachsen waren zeigen ein, um etwa einen Faktor 2 reduziertes Wachstum, bei dem die Wachstumskurve zum Ende abflacht.

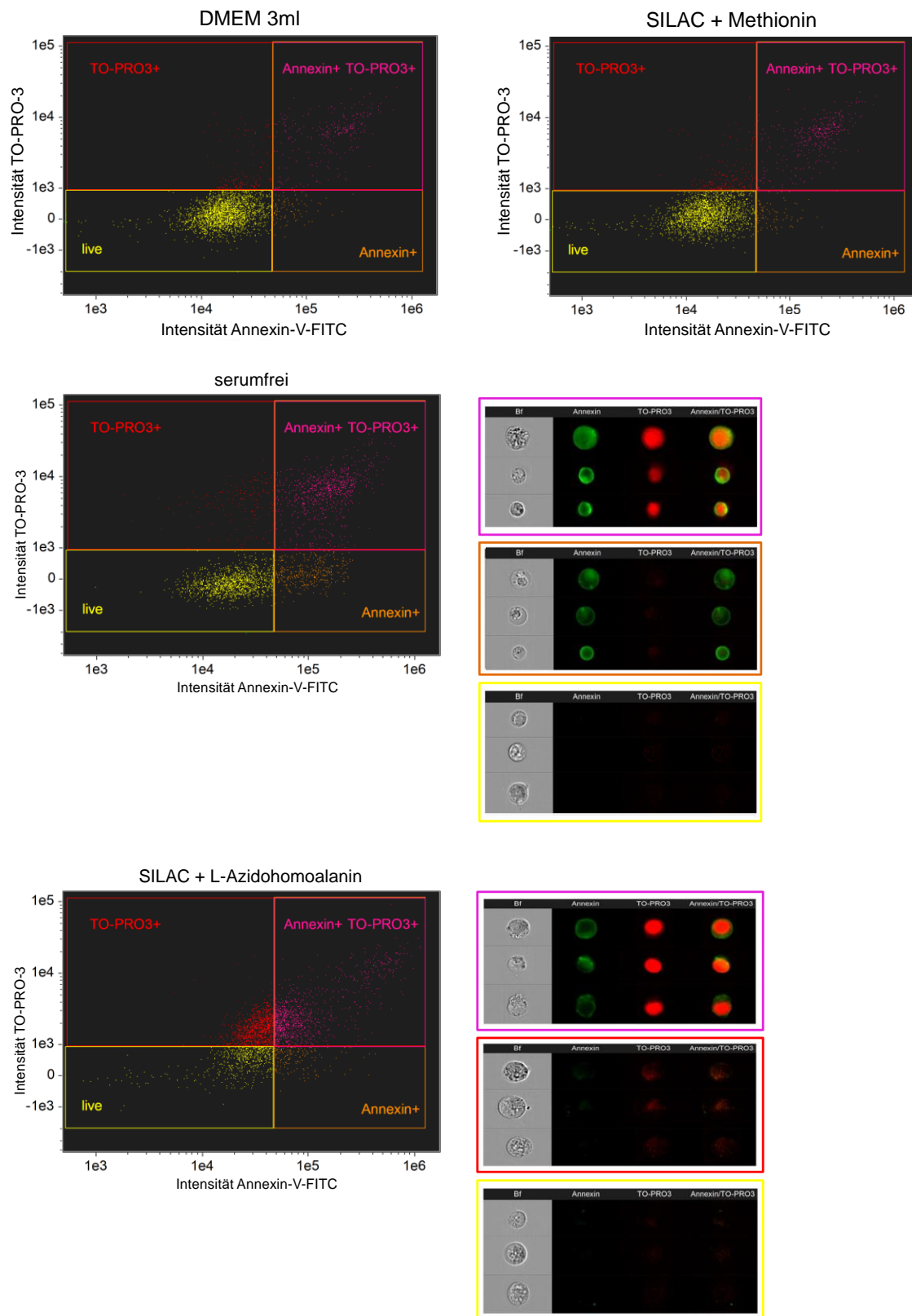


**Abbildung 19: Wachstumskurve MC38 in verschiedenen Medien**

Zur Erstellung der Wachstumskurve wurden  $0,2 \times 10^6$  MC38-Zellen in ihrem Standardmedium, in SILAC-Medium mit Methionin und in SILAC-Medium mit AHA in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach 18 Stunden und nach 24 Stunden wurden die Zellen jeweils geerntet und gezählt. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Triplikate für jede Bedingung und jeden Zeitpunkt.

Um den Zustand der Zellen näher zu bestimmen, wurden die Zellen, die in den verschiedenen Medien gewachsen waren, geerntet, mit Annexin-V-FITC als Apoptosemarker und TO-PRO-3 als Farbstoff für tote Zellen gefärbt und ihre Viabilität mittels Durchflusszytometrie gemessen. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt. Alle Ergebnisse wurden 3-mal reproduziert.

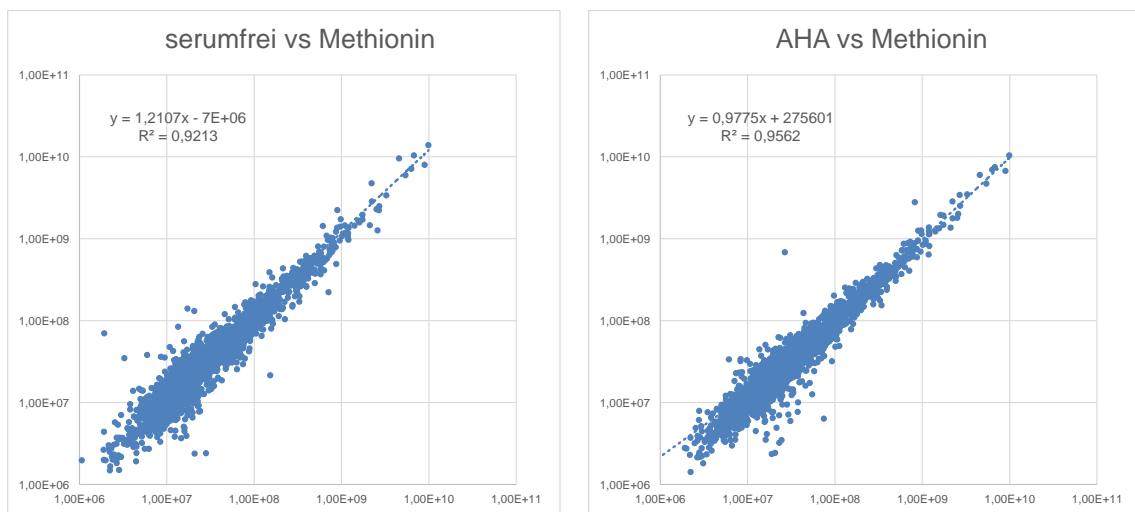
Es zeigte sich, dass bei den Zellen, die in 3 ml ihres Standardmediums gewachsen waren, zu den Zellen, die in 1,2 ml SILAC-Medium mit Methionin gewachsen waren, kein signifikanter Unterschied bestand. Bei beiden lag der Anteil lebendiger Zellen zwischen 76 und 80%, sodass die Annahme, dass das SILAC-Medium mit allen Zusätzen und Methionin dem Standardmedium entspricht, bestätigt wurde. Im serumfreien Medium lag der Anteil lebendiger Zellen bei 48%. Beim SILAC-Medium mit AHA zeigte sich der deutlichste Unterschied. Nur etwa 20% der Zellen waren lebendig. Etwa 7% waren Annexin-V-FITC gefärbt, 38% waren TO-PRO-3 gefärbt und 35% zeigten eine doppelte Färbung.



**Abbildung 20: Zellviabilitätsvergleich mittels Durchflusszytometrie (1)**

Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen, die in ihrem Standardmedium (DMEM) bzw. dem Äquivalent, dem SILAC-Medium mit Methionin oder in serumfreiem Medium und in SILAC-Medium mit AHA als Methioninersatz gewachsen waren, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen geerntet, mit Annexin-V-FITC und TO-PRO-3 gefärbt und am Image-Stream gemessen. Die abgebildeten Fotos der Zellen sind farblich umrandet, um zu kennzeichnen, welcher Population sie zugehörig sind.

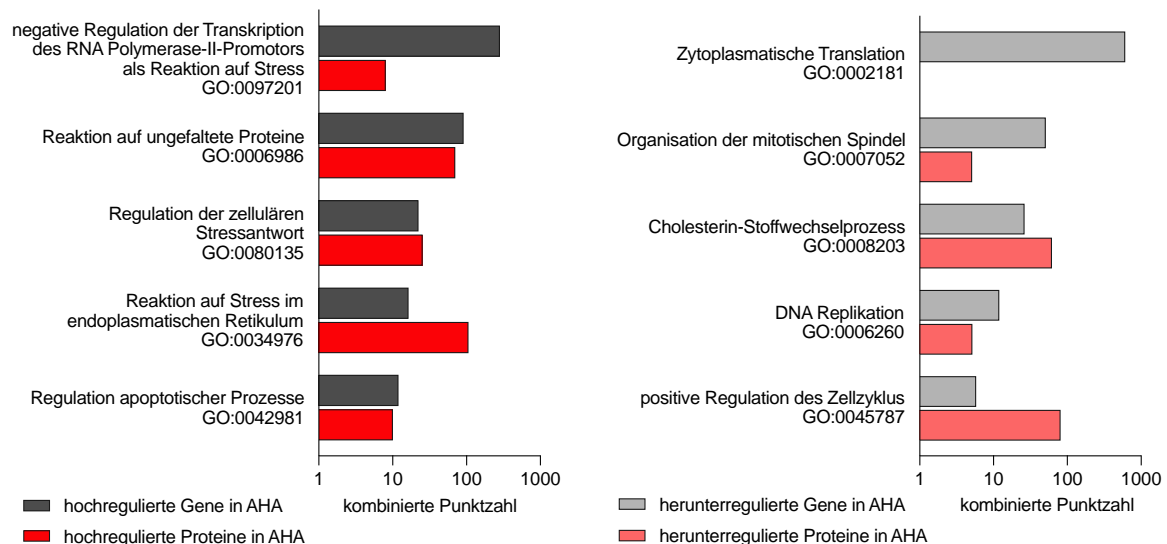
Auch auf Proteomebene zeigten sich Unterschiede in der Proteinexpression. In Abbildung 21 wurden die Ergebnisse der Proteomanalyse von Zellen, die in serumfreiem Medium bzw. Medium mit AHA gewachsen waren, in Korrelation mit dem Proteom der Zellen, die mit Methionin gewachsen waren gesetzt. Dabei zeigte sich für die AHA-Bedingung eine höhere Korrelation ( $R^2=0,956$ ) als für die Bedingung ohne Serum ( $R^2=0,92$ ). Insgesamt waren in der serumfreien Bedingung 202 (91 stärker, 101 weniger stark exprimiert) und in der AHA Bedingung 208 Proteine (95 stärker, 113 weniger stark) im Vergleich zur Methionin-Bedingung verändert.



**Abbildung 21: Proteomkorrelation**

Die Darstellung zeigt die Korrelation der Proteinexpression von Zellen, die in serumfreiem Medium (links) bzw. Medium mit AHA anstatt Methionin gewachsen waren (rechts) zu Zellen, die in Medium mit Methionin (Standardbedingung) gewachsen waren.

Zur genaueren Identifikation, welche Prozesse in den Zellen durch das AHA beeinflusst werden, wurden *Gene Ontology* Analysen durchgeführt, die in Abbildung 22 dargestellt sind. Dazu wurde die *Enrichr*-Software genutzt. Betrachtet wurden die Gene und Proteine, die im Transkriptom bzw. Proteom der im Medium mit AHA gewachsenen Zellen im Vergleich zur Methioninbedingung hoch- bzw herunterreguliert waren. Dabei zeigte sich, dass vor allem Prozesse, die mit zellulärem Stress und Apoptose assoziiert sind, in Zellen, die mit AHA gewachsen waren, hochreguliert wurden. Prozesse, die mit Zellwachstum assoziiert sind, wurden hingegen herunterreguliert.



**Abbildung 22: Gene Ontology Analyse regulierter Gene und Proteine der MC38 Zellen kultiviert in AHA-Medium**

In dieser Abbildung sind für die Zelllinie MC38 verschiedene biologische Prozesse dargestellt, die durch das Kultivieren der Zellen in AHA-Medium beeinflusst werden. Das linke Diagramm zeigt, welche Proteine bzw. Gene, die für die jeweiligen Prozesse relevant sind, hochreguliert wurden, das rechte Diagramm, welche herunterreguliert wurden. Die grauen Balken repräsentieren jeweils die Gene, die roten die Proteine. Für die Analyse wurde die Software *Enrichr* genutzt.

Dieser Einfluss wirkt sich auch auf Proteine aus, die mit Tumoren assoziiert sind. Tabelle 7 zeigt eine Auswahl dieser Proteine, die von allen neun untersuchten Tumorzellen sekretiert werden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Expression auf Transkriptomebene für jeweils die Methionin- und die AHA-Bedingung. Der *fold change* (FC) gibt dabei die x-fache Veränderung an. Der größte Einfluss von AHA auf die Expression eines tumorassoziierten Proteins wurde dabei für das MMP1 beobachtet. Dieses wurde durch den Einfluss von AHA um das 34,4-fache bei den HCT116 und um das 1.172-fache bei den SK-Mel-37 höher exprimiert.

Während die AHA-Markierung und anschließende massenspektrometrische Analyse bei der Erstellung eines Sekretoms der MC38- und der humanen Zelllinien unter Beachtung der zuvor beschriebenen Effekte anwendbar war, zeigten sich bei dem Versuch, diese Methode in der Analyse des Sekretoms von Jurkat-Zellen und primären T-Zellen aus OT-I-Mäusen anzuwenden, weitere Einschränkungen.

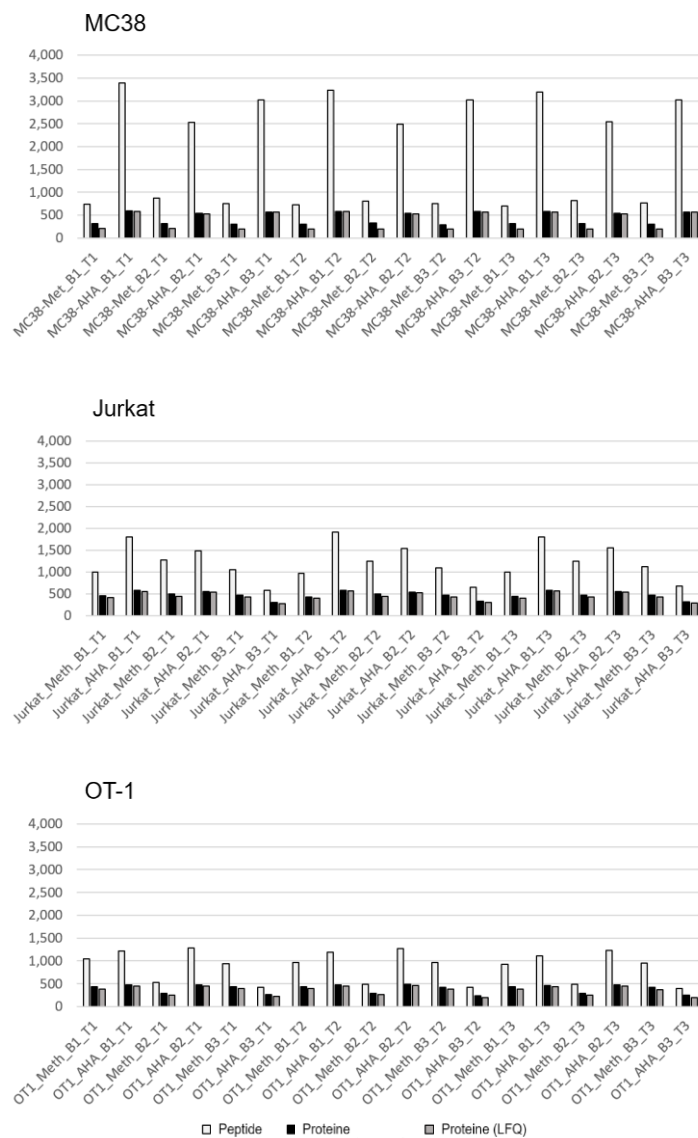
In der massenspektrometrischen Analyse des Sekretoms der Jurkat-Zellen war die Anzahl der detektierten Proteine und Peptide, anders als bei den MC38-Zellen, in der AHA-Bedingung im Vergleich zur Methionin-Bedingung nicht signifikant erhöht. Die-

ser Effekt zeigte sich bei der Analyse des Sekretoms der OT-1-Zellen noch deutlicher (Abbildung 23), weshalb davon auszugehen ist, dass diese Zellen das AHA nicht effektiv als Methioninersatz in ihre Proteine einbauen. Dadurch ist eine Bestimmung neu synthetisierter, sekretierter Proteine nicht eindeutig möglich.

	ADAM9 Met / AHA Mittel- werte der Expres- sion	CST3	MMP1	IGFBP2	SLIT1	FSTL3	QSOX1	CCDC80
MEL-HO	88,18 / 116,59	78,45 / 74,28	Schwache Ex- pression	11,66 / 7,49	Schwache Ex- pression	5,58 / s 3,87	36,16 / 32,36	Schwache Ex- pression
SK-MEL-37	38,94 / 30,83	49,87 / 35,04	<b>0,08 / 93,79</b> <b>FC +++</b>	Schwache Ex- pression	Schwache Ex- pression	9,66 / 7,34	60,90 / 60,79	<b>1,71 / 6,86</b> <b>FC 4,01</b>
D41-Mel	92,50 / 126,46	76,05 / 83,99	<b>203,14 / 433,59</b> <b>FC 2,13</b>	108,74 / 101,78	Schwache Ex- pression	8,79 / 9,00	99,53 / 108,43	Schwache Ex- pression
HCT116	119,12 / 76,78	78,54 / 59,32	<b>0,30 / 10,32</b> <b>FC 34,4</b>	125,63 / 105,90	Schwache Ex- pression	16,79 / 21,50	61,85 / 55,87	Schwache Ex- pression
CCD841	428,87 / 452,46	156,92 / 152,10	38,96 / 57,66	Schwache Ex- pression	Schwache Ex- pression	98,20 / 116,82	739,24 / 729,01	67,29 / 86,93
HT-29	73,67 / 60,57	89,75 / 80,02	Schwache Ex- pression	24,41 / 22,51	Schwache Ex- pression	3,57 / 5,91	52,57 / 85,08	Schwache Ex- pression
SW48	49,61 / 40,78	72,30 / 85,02	Schwache Ex- pression	39,31 / 54,90	<b>25,32 / 2,68</b> <b>FC -9,45</b>	50,33 / 34,73	75,02 / 104,45	Schwache Ex- pression
NCI-H1650	147,20 / 167,40	128,32 / 112,63	Schwache Ex- pression	317,07 / 225,73	Schwache Ex- pression	35,43 / 57,43	237,75 / 215,76	23,44 / 39,15
A549	190,30 / 203,44	127,98 / 138,41	Schwache Ex- pression	24,96 / 27,50	Schwache Ex- pression	<b>77,11 / 173,63</b> <b>FC 2,25</b>	<b>33,16 / 61,88</b> <b>FC 1,87</b>	<b>7,51 / 13,30</b> <b>FC 1,77</b>
NCI-H226	620,83 / 602,04	58,48 / 60,95	Schwache Ex- pression	7,55 / 6,79	Schwache Ex- pression	209,82 / 176,85	337,49 / 389,54	240,86 / 191,30

**Tabelle 7: Mittelwerte der Expression ausgewählter tumorassoziierter Proteine auf Transkriptomebene**

Die Tabelle zeigt die Expression einer Auswahl von Proteinen, die von allen neun Tumorzellen sekretiert werden und mit Tumoren assoziiert sind. Dargestellt sind die Mittelwerte der Expression auf Transkriptomebene für jeweils die Methionin- und die AHA-Bedingung. Der *fold change* (FC) gibt die x-fache Veränderung an.



**Abbildung 23: LFQ-Intensitäten der massenspektrometrischen Analyse des Sekretoms der MC38-, OT-I- und Jurkat-Zellen**

Diese Abbildungen stellen die LFQ-Intensitäten der massenspektrometrischen Analyse des Sekretoms der MC38-, der Jurkat- und der OT-I-Zellen dar, die mittels der Methode nach Eichelbaum et al. mit AHA-Markierung gewonnen wurden. Für jede Probe sind drei technische und drei biologische Replikate für jeweils die Methionin- und die AHA-Bedingung dargestellt.

## 5.4 Entwicklung einer alternativen Methode für die Sekretomanalyse

Auf Grund der zuvor beschriebenen Artefakte, die bei der Sekretomanalyse mit der derzeitigen State-of-the-Art-Methode nach dem Protokoll der *Sekretomanalyse mittels SILAC-Labeling und Click-Chemistry* von *Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld* durch den Einsatz von L-Azidohomoalanin entstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt. Dabei wurden keine Aminosäure- oder Zuckermanaloga zur Markierung und Separation der neu synthetisierten Proteine eingesetzt.

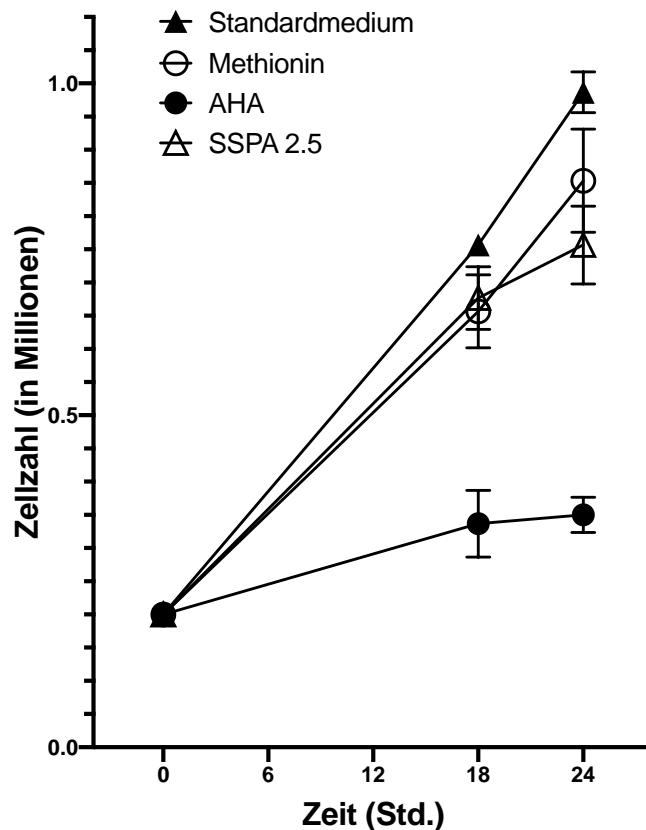
Zur Etablierung wurde die Mauskolonkarzinomzelllinie MC38 verwendet.

Für die Entwicklung der Methode wurde nach einem Medium gesucht, in dem die Zellen ohne Zusatz von FCS oder anderen Substanzen, die die massenspektrometrische Analyse behindern, wachsen können, ohne ihre Eigenschaften zu verändern. Dazu wurden  $0,1 \times 10^6$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und eine Nacht in ihrem Standardmedium kultiviert. Am nächsten Tag lag die Zellzahl bei  $0,2 \times 10^6$  Zellen. Diese wurden zwei-mal mit PBS gewaschen und in den verschiedenen Medien kultiviert. Nach 18 Stunden wurden zunächst ihre Morphologie und die Viabilität bestimmt. Im Anschluss wurden die Zellen auf Proteomebene untersucht, um einen Vergleich der Proteinexpressionen der Zellen zu ermöglichen.

Als Grundlage wurde das X-VIVO 15-Medium von Lonza verwendet. Es enthält nur drei bei der Massenspektrometrie störende Proteine, Albumin, Transferrin und Haptoglobin. Um den Anteil dieser Proteine im Medium zu reduzieren und somit die Depletion effizienter zu machen, wurden verschiedene Konzentrationen des Mediums getestet.

Zusätzlich wurde das X-VIVO 15-Medium mit 3 kDa Zentrifugationsfiltern auf 1/100 aufkonzentriert und an Stelle des FCS als Zusatz für das SILAC-Medium verwendet. Auch hier wurden verschiedene Titrationen getestet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dieses Medium „SSPA-Medium“ genannt als Abkürzung für „*SILAC-medium supplemented with protein additives*“. Die der Abkürzung folgende Zahl bezeichnet die X-VIVO-Konzentration, der die zugesetzte Menge des X-VIVO-Konzentrats entspricht. Insgesamt wurden alle Medienkombinationen aus Tabelle 5 getestet, um einen Vergleich zwischen dem Medium der bereits etablierten, zuvor genutzten Methode und den möglichen Medien für die neue Methode zu ermöglichen.

In Abbildung 24 sind die Wachstumskurven der Zellen von vier der getesteten Medien unter dem Mikroskop zu sehen. Dabei lässt sich bereits erkennen, dass sich die Zellen im Medium mit Zusatz von AHA von ihrem Wachstum stärker von den Zellen im Medium mit Zusatz von Methionin unterscheiden, als die Zellen, die in X-VIVO 2,5-Medium bzw. in SSPA 2,5-Medium gewachsen waren. Die Zellen, die mit AHA gewachsen waren, haben sich deutlich weniger vermehrt.



**Abbildung 24: Wachstumskurve MC38 in verschiedenen Medien (2)**

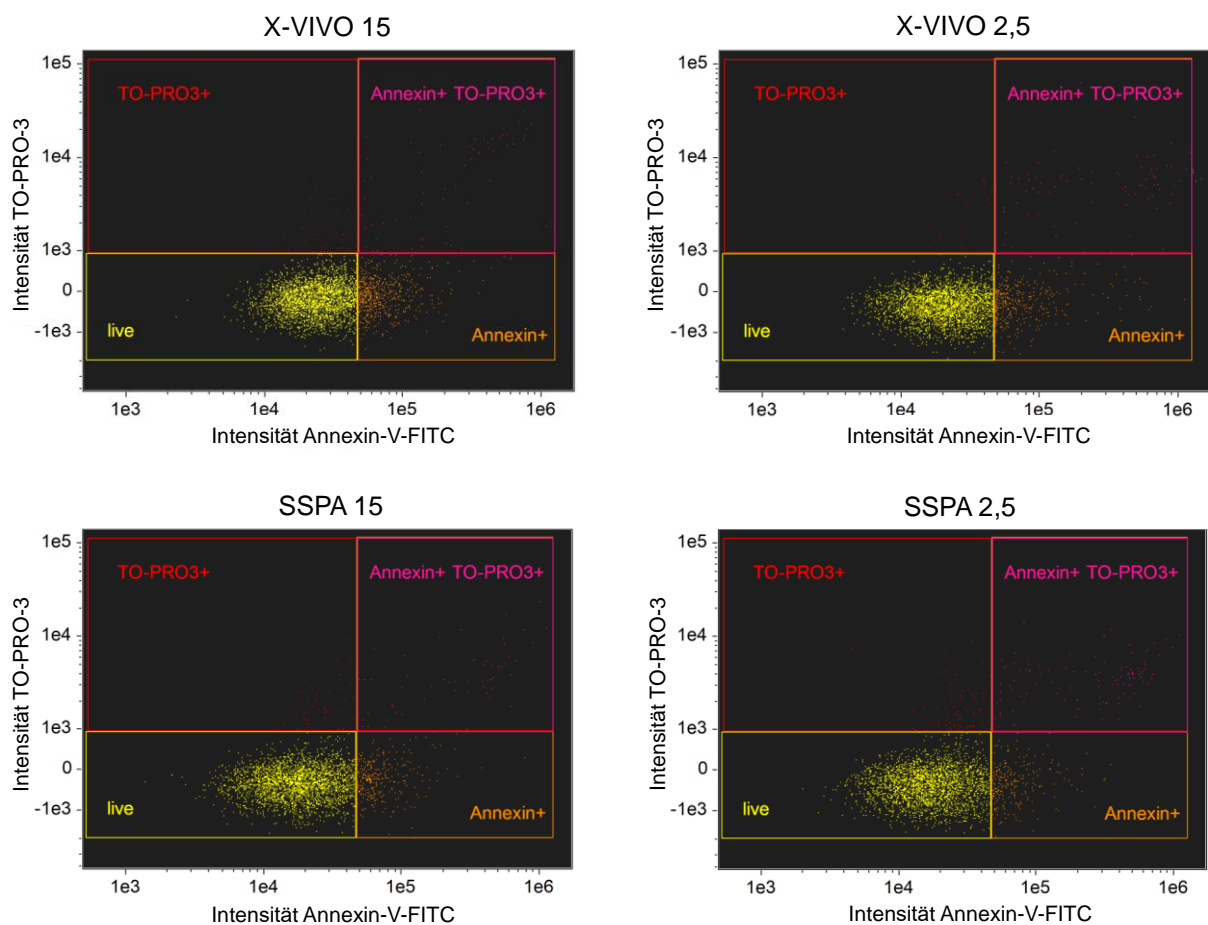
Zur Erstellung der Wachstumskurve wurden  $0,2 \times 10^6$  MC38-Zellen in ihrem Standardmedium, in SILAC-Medium mit Methionin, in SILAC-Medium mit AHA und in SSPA 2,5-Medium in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach 18 Stunden und nach 24 Stunden wurden die Zellen jeweils geerntet und gezählt. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Triplikate für jede Bedingung und jeden Zeitpunkt.

Zur Bestimmung der Zellviabilität mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen wieder geerntet und mit Annexin-V-FITC und TO-PRO-3 gefärbt.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt.

Dabei zeigte sich, dass der Anteil lebendiger Zellen zwischen den Titrationen des X-VIVO-Mediums und des SSPA-Mediums, kaum variierte. Innerhalb der Titrationen des X-VIVO-Mediums zeigten die Zellen im X-VIVO 15-Medium mit 81,4% den ge-

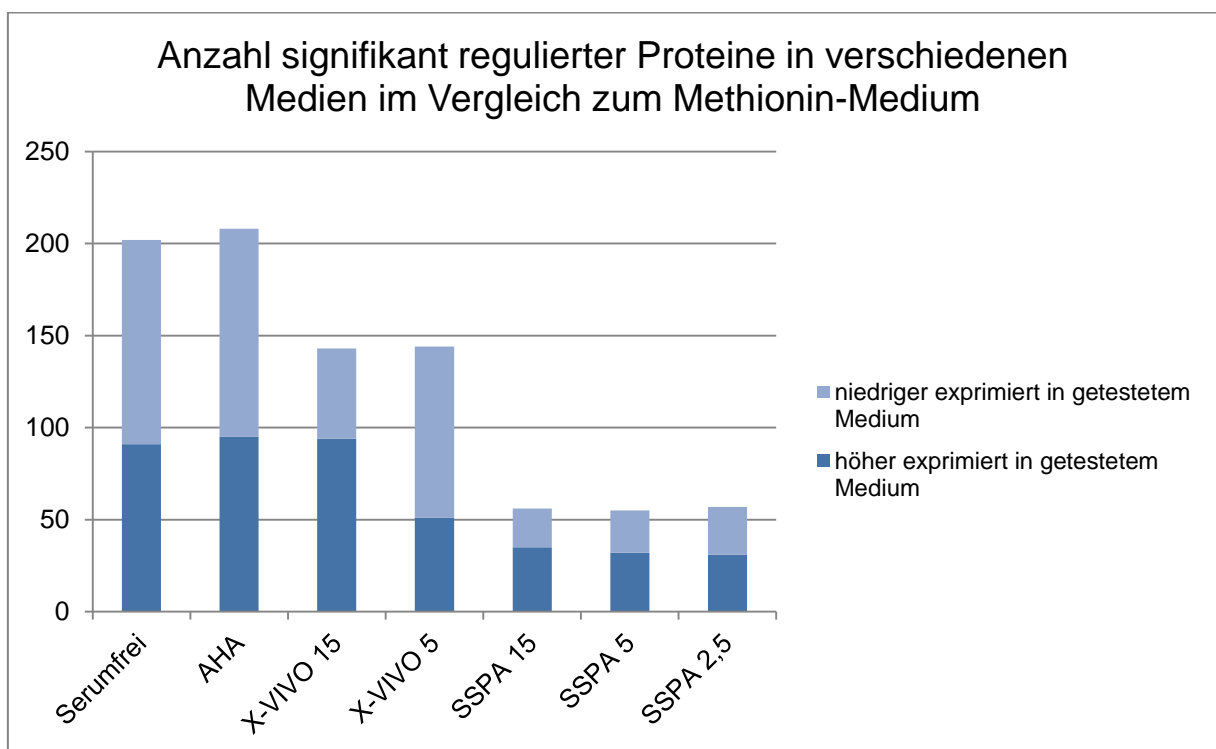
ringsten Anteil lebendiger Zellen, während der Anteil bei dem X-VIVO 2,5-Medium 86,3% betrug. Innerhalb der Titrationsreihe des SSPA-Mediums war der Anteil lebendiger Zellen im SSPA 15-Medium am höchsten. Er betrug 87,2%. Die Probe des SSPA 2,5 zeigte immer noch einen Anteil von 86% lebendiger Zellen. Damit lag der Anteil lebendiger Zellen in diesen Medien in einem ähnlichen Bereich wie bei den Zellen, die in ihrem Standardmedium gewachsen waren. Der Anteil lag hier bei 80%. Das entspricht einem vierfach höheren Anteil als bei den Zellen, die mit Zusatz von AHA gewachsen waren (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 25: Zellviabilitätsvergleich mittels Durchflusszytometrie (2)**

Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen, die in verschiedenen Medien gewachsen waren, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen geerntet, mit Annexin-V-FITC und TO-PRO-3 gefärbt und am ImageStream gemessen.

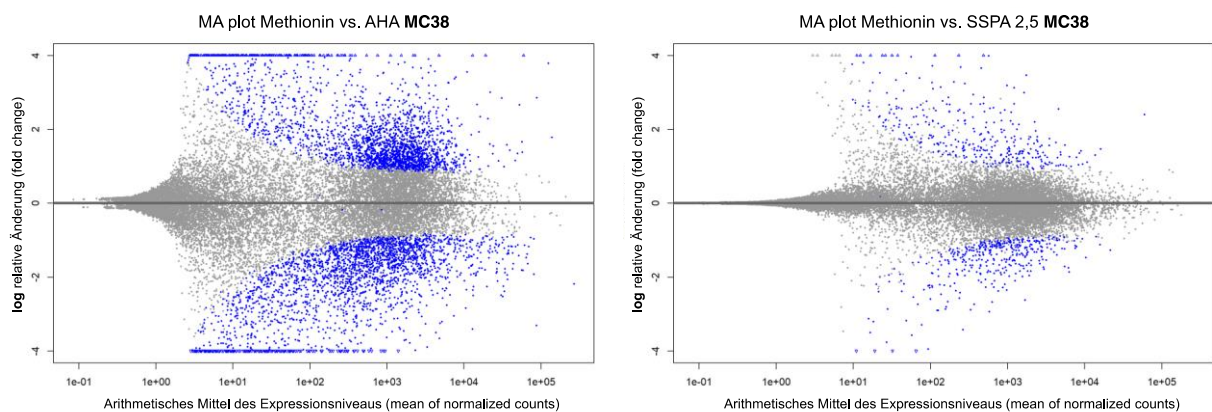
Auf Proteomebene zeigten sich die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse. Dabei wurden die Proteomdaten der Zellen, die in serumfreiem Medium, in X-VIVO 15 und X-VIVO 5 Medium sowie in SSPA 15-, 5- und 2,5-Medium als auch in SILAC-Medium mit AHA gewachsen waren, mit Proteomdaten von Zellen, die in ihrem Standardmedium gewachsen waren, verglichen. Dabei war zu sehen, dass unter AHA-Bedingungen 208 und unter serumfreien Bedingungen 202 Proteine im Vergleich zur Standardbedingung signifikant verändert waren. Im Proteom von Zellen, die unter X-VIVO-Bedingungen gewachsen waren, waren es 143 bzw. 144 Proteine. Der geringste Unterschied zur Standardbedingung zeigte sich im Proteom der Zellen, die in SSPA-Medium gewachsen waren. Im Vergleich zur AHA-Bedingung waren die Proteine mit einer Anzahl von 55-57 signifikant veränderten Proteinen hier um einen Faktor von etwa 3,7 weniger verändert.



**Abbildung 26: Anzahl signifikant veränderter Proteine in verschiedenen Medien im Vergleich zum Methionin-Medium auf Proteomebene**

Der Graph zeigt die Proteine, die auf Proteomebene bei MC38 Zellen, die in verschiedenen Medien gewachsen waren, im Vergleich zu Zellen, die in ihrem Standardmedium (mit Methionin) gewachsen waren, signifikant verändert waren. Zur Ermittlung der Daten wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen, nach Kultivierung für 18 Stunden in den verschiedenen Medien, geerntet, lysiert und per Massenspektrometrie analysiert.

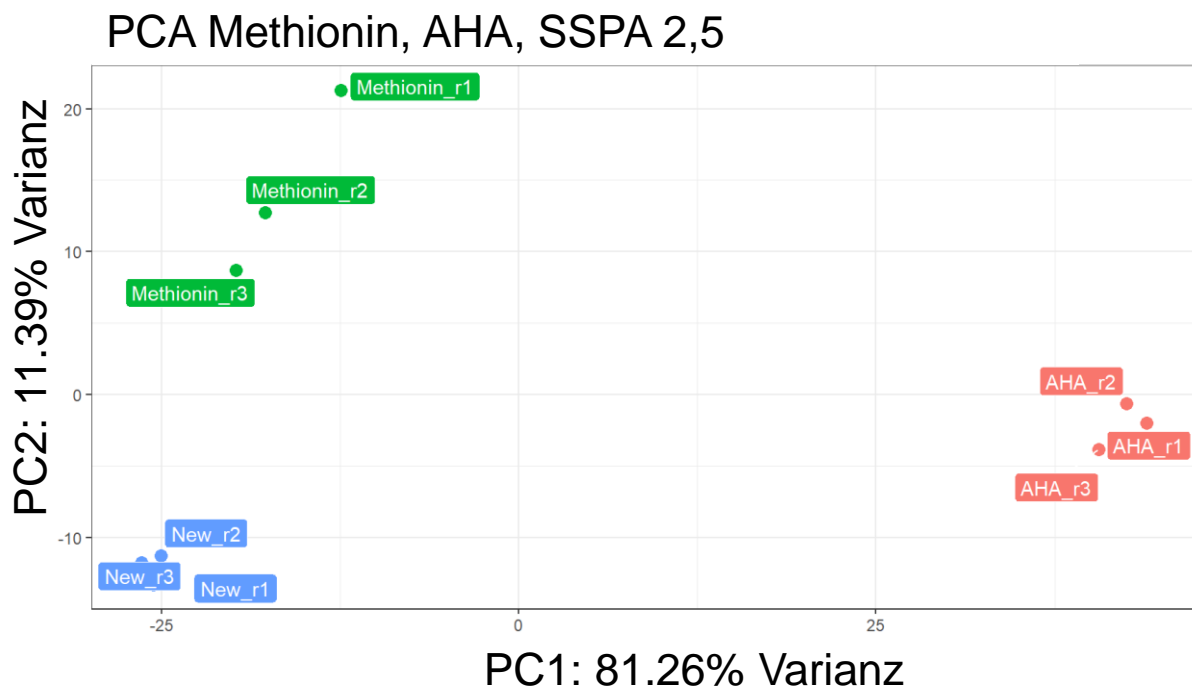
Zur Bestätigung der am ImageStream und auf Proteomebene gemachten Beobachtungen, wurden zusätzlich Transkriptomanalysen von den Zellen, die in SILAC-Medium mit Methionin, mit AHA oder im SSPA 2,5-Medium gewachsen waren gemacht. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse in Form von MA-Plots. Es wurden jeweils die Bedingung „AHA“ und „SSPA 2,5“ mit der Standardbedingung „Methionin“ verglichen. Im Falle des AHA (links) waren im Vergleich 8,8% der Gene durch das AHA hochreguliert, 9,3% herunter. Bei dem SSPA 2,5-Medium lag der Anteil regulierter Gene bei 1,3% bzw. 1,4%. (bei einer logarithmischen relativen Änderung von  $>0$  bzw.  $<0$  und einem Signifikanzwert von  $p=0,05$ )



**Abbildung 27: Transkriptomanalyse von Zellen, die mit Methionin versus AHA oder versus SSPA 2,5-Medium gewachsen waren**

Dargestellt sind die Transkriptomdaten von Zellen, die mit AHA (links) bzw. SSPA 2,5 (rechts) gewachsen waren im Vergleich zu Transkriptomdaten von Zellen, die in ihrem Standardmedium mit Methionin gewachsen waren.

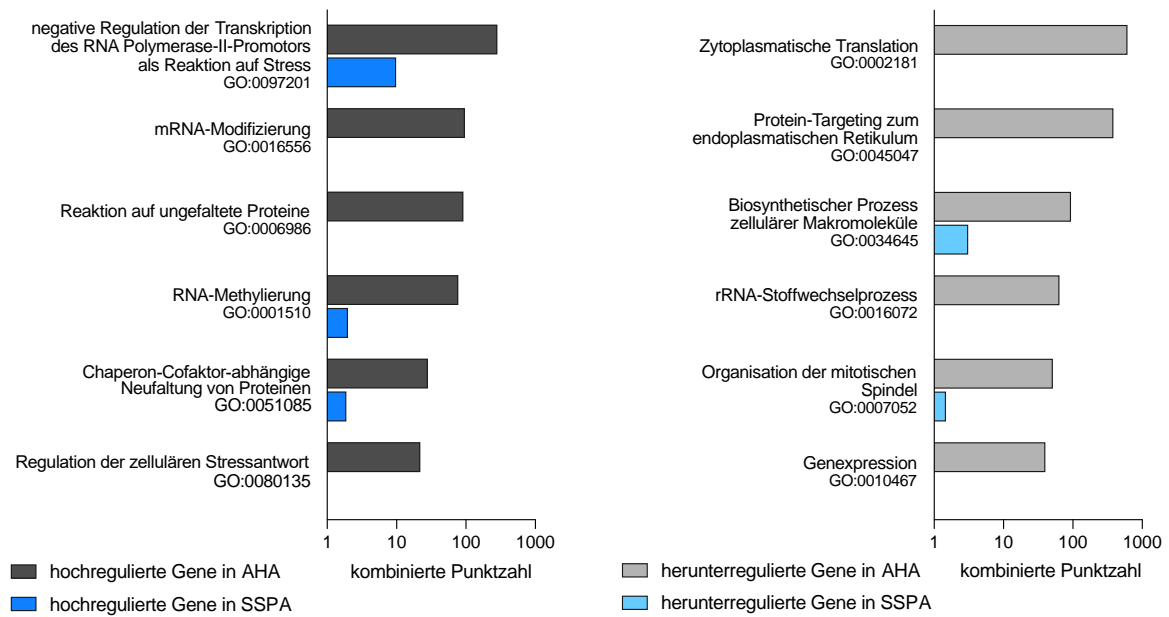
Bei Darstellung der Daten in Form einer Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 28) ist zu sehen, dass die biologischen Replikate für jede der drei Bedingungen nah beieinander liegen und somit eine geringe Varianz aufweisen. Innerhalb der Bedingungen zeigt sich eine deutlich größere Varianz zwischen der AHA-Bedingung und der Methionin-bedingung, als zwischen dieser und der Bedingung mit SSPA 2,5-Medium.



**Abbildung 28: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten von MC38 in verschiedenen Medien**

Die Hauptkomponentenanalyse zeigt die Transkriptomdaten von Zellen, die in ihrem Standardmedium (Methionin) gewachsen waren in grün, die der Zellen, die mit AHA gewachsen waren in Rot und die, die im SSPA 2,5-Medium gewachsen waren in Blau. Für jede Bedingung sind jeweils die drei biologischen Replikate dargestellt.

Auch bei der *Gene Ontology*-Analyse der Gene, die in den Zellen, die im AHA-Medium bzw. im SSPA 2,5-Medium kultiviert wurden, zeigten sich im Vergleich zu Genen der Zellen, die im Methionin-Medium gewachsen waren, deutliche Unterschiede in der Hoch- bzw. Herunterregulation. Wie in Abbildung 29 dargestellt, werden durch das SSPA 2,5-Medium deutlich weniger Prozesse, die mit Stress assoziiert sind, hochreguliert als durch das AHA-Medium. Auch der negative Einfluss auf Zellwachstumsprozesse ist geringer.



**Abbildung 29: Gene Ontology Analyse regulierter Gene der MC38 Zellen kultiviert in AHA- oder SSPA-Medium im Vergleich zu Methionin-Medium**

In dieser Abbildung sind für die Zelllinie MC38 verschiedene biologische Prozesse dargestellt, die durch das kultivieren der Zellen in AHA- oder SSPA-Medium beeinflusst werden. Das linke Diagramm zeigt, welche Gene, die für die jeweiligen Prozesse relevant sind, hochreguliert wurden, das rechte Diagramm, welche herunterreguliert wurden. Die grauen Balken repräsentieren die AHA-Bedingung, die blauen die SSPA-Bedingung. Für die Analyse wurde die Software *Enrichr* genutzt

Zusammenfassend lässt sich aus den zuvor gezeigten Daten schließen, dass die Kultivierung von Zellen in SSPA 2,5-Medium und Markierung der neu synthetisierten Proteine durch die schweren Isotope der Aminosäuren Arginin und Lysin eine deutlich schonendere Alternative der Sekretomanalyse darstellen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Einfluss sekretorischer Proteine auf die Tumorentwicklung

Die Detektion, Identifikation und Analyse der von Zellen an ihre Umgebung abgegebenen Proteine ist ein elementarer Punkt in der Erforschung des Tumormikromilieus. Ihre Funktion als Kommunikationsmedium und die damit verbundene Steuerung diverser Wachstums- und Regulationsprozesse bietet zum einen potentielle Angriffspunkte in der Tumorthherapie, zum anderen könnten tumorspezifische sekretorische Proteine frühe Hinweise in der Krebsdiagnostik geben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 28 Proteine detektiert, die von den neun in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien gleichermaßen sekretiert werden und an tumorassoziierten Prozessen beteiligt sind (Tabelle 6). Im Folgenden werden beispielhaft zwei Proteine hinsichtlich ihrer Funktion und Rolle bei der Tumorentwicklung diskutiert.

Ein Beispiel stellt das *Disintegrin und Metalloproteinase enthaltende Protein 9*, kurz ADAM9, dar. Es ist ein membrangebundenes Enzym, dessen, durch alternatives Spleißen entstehende, sekretorische Form (ADAM9-S) im Sekretom der neun Tumorzelllinien dieser Arbeit detektiert werden konnte. Exprimiert wird ADAM9 in unterschiedlicher Ausprägung von diversen Zelltypen und Geweben. Bestehend aus einer Prodomäne, einer Metalloproteinasedomäne, einer Disintegrindomäne, einer cysteinreichen Domäne, einer Transmembrandomäne, einer EGF-ähnlichen Domäne und einem intrazellulären Schwanz, ist sie an der proteolytischen Spaltung von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Membranmolekülen beteiligt und beeinflusst so diverse biologische Prozesse und Signalwege. Dazu gehören sowohl physiologische Entwicklungsprozesse als auch pathologische Abläufe wie Entzündungsreaktionen, allergische Reaktionen und degenerative Erkrankungen.<sup>48</sup> Auch im Rahmen von Tumorerkrankungen scheint ADAM9 eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird beschrieben, dass es die Funktion von Molekülen wie EGF, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, beeinflussen kann und an der Tumormetastasierung durch Begünstigung von Tumorzellmigration und –invasion beteiligt ist.<sup>49</sup> Insbesondere eine erhöhte Expression von ADAM9 scheint hier relevant zu sein. Verschiedene Publikationen beschreiben eine Überexpression in Tumoren der Brust<sup>50</sup>, der Ovarien<sup>51</sup>, der Leber, des Pankreas<sup>52</sup>, des Magens<sup>53</sup>, der Prostata, der Nieren<sup>54</sup>, in Gliomen<sup>49</sup> und in Melano-

men<sup>55</sup>. Diese Überexpression wurde sowohl in den Tumorzellen selbst, als auch in den, den Tumor umgebenden Zellen nachgewiesen. Außerdem wird beschrieben, dass die Höhe der Expression zum einen mit der Aggressivität und der Prognose der Tumorerkrankung korreliert, zum anderen Hinweise bezüglich des Therapieansprechens geben kann.<sup>49,51</sup>

Ein weiteres Protein, welches von allen in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien sekretiert wird, ist die Matrix-Metalloprotease 1, MMP1, deren Struktur der der Proteine aus der ADAM-Familie ähnelt und die zu den Kollagenasen zählt.<sup>56</sup> Matrix-Metalloproteasen sind Enzyme, die Extrazellulärmatrix abbauen und unter physiologischen Bedingungen beispielsweise an Prozessen wie der Wundheilung, der embryologischen Entwicklung, der Angiogenese, der Apoptose sowie des Knochenumbaus beteiligt sind. Störungen in der Regulation dieser Enzyme werden im Rahmen verschiedener Krankheitsentitäten wie Arthritis, Arthrose, Diabetes, aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, sklerotischen sowie fibrotischen Krankheitsbildern beobachtet, bei denen die MMPs für Gewebeumbau und -schädigung verantwortlich sind. Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wird beschrieben, dass MMPs die Tumorerkrankung, Metastasierung und Tumorangio-genese begünstigen, aber auch potentielle Angriffspunkte für zielgerichtete inhibitorische Therapien bieten. Sekretomanalysen bieten, wie in dieser Arbeit anhand einer Auswahl von Zelllinien dargestellt, die Möglichkeit, für Tumore verschiedener Gewebe Übersichten aller von den entsprechenden Geweben sekretierten Proteine zu erstellen. So können umfangreiche Datenbanken aufgebaut werden, die eine gewebsspezifische Suche nach tumorassoziierten Proteinen ermöglichen. Des Weiteren können durch Vergleich der Sekretionsprofile Gemeinsamkeiten zwischen Tumorgeweben abgebildet werden, um unter anderem bisher nicht beachtete, möglicherweise tumorassoziierte, Proteine zu identifizieren und näher zu untersuchen. Perspektivisch könnten außerdem Tumorzellen aus Patientenmaterial spezifisch mittels Sekretomanalyse untersucht werden, um genaue patientenspezifische Sekretionsprofile zu erstellen, die zum einen Aussagen zur Prognose der Erkrankung geben, zum anderen bei der Therapiewahl entscheidend sein könnten.

Da durch die Sekretomanalyse nur nachgewiesen werden kann, dass die entsprechenden Proteine von den Tumorzellen sekretiert werden, nicht aber, ob die Sekretion dieser Proteine im Zusammenhang mit der Entartung der Zellen zu Tumorzellen steht, stößt dieses Verfahren hier an seine Grenzen. Beispielsweise bei der Detekti-

on des zuvor beschriebenen Proteins ADAM9 ist die Aussagekraft eingeschränkt, da dieses Protein auch in geringerer Menge von nicht entarteten Zellen an die Umgebung abgegeben wird.

Um insbesondere bei der Anwendung dieser Methode auf Patientenmaterial eine Aussage treffen zu können, ob die Sekretion der betrachteten Proteine im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe reguliert ist, könnte neben dem Sekretom der Tumorzellen die Erstellung eines Sekretoms nicht entarteter Zellen desselben Gewebes zielführend sein.

Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft des Sekretoms stellen die bisher eingesetzten Methoden zur Sekretomanalyse dar, die, wie im folgenden Abschnitt (6.2 Methoden zur Analyse sekretorischer Proteine) diskutiert, Einfluss auf die Zellen und damit auf das Sekretom nehmen. In Bezug auf die zuvor beschriebenen, tumorassoziierten Proteine wurde auf Transkriptomebene beobachtet, dass der Einsatz von AHA zur Markierung der neu synthetisierten Proteine, der bisher als Goldstandard betitelten Methode von Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld<sup>23</sup> folgend, teilweise erheblichen Einfluss auf die Expression der Proteine nimmt und somit zu vermuten ist, dass auch deren Sekretion verändert ist. Mit Blick auf das zuvor beschriebene tumorassoziierte Protein MMP1 zeigte sich beispielsweise, dass der Mittelwert der Expression in manchen Zelllinien durch den Einfluss von AHA um das 34,4-fache bei den HCT116 und um das bis zu 1.172-fache bei den SK-Mel-37 (Tabelle 7) erhöht war. In der Folge ist zu erwarten, dass auch die Sekretion des entsprechenden Proteins durch den Einfluss von AHA erhöht wird, was einen Rückschluss auf die natürliche Sekretion durch die Tumorzelle erschwert. Da also nicht eindeutig differenziert werden kann, ob die Sekretion durch die untersuchte Tumorzelle auch in vivo stattfindet oder in vitro dem Einsatz von AHA geschuldet ist, ist eine Nutzung der so gewonnenen Daten zur Therapieentscheidung bei Untersuchung von Patientenmaterial somit limitiert. Auch die Aussagekraft der entstehenden Datenbank wäre durch diesen Effekt eingeschränkt.

Die Sekretion anderer Proteine, beispielsweise die des oben beschriebenen ADAM9, scheint hingegen nur in geringem Maß durch den Einsatz von AHA beeinflusst zu werden. Auf Transkriptomebene zeigten sich hier keine signifikanten Änderungen der Expression.

Des Weiteren ist zu beachten, dass durch Zelllinien in vitro gewonnene Sekretionsprofile nicht das exakte Sekretionsverhalten von Tumoren im Körper widerspiegeln.

In Abbildung 11 wurden die gewonnenen Transkriptomdaten der Tumorzelllinien mit Transkriptomdaten aus „*The Cancer Genome Atlas*“ (TCGA) des *National Cancer Institute* verglichen, die aus Primärtumoren von Patienten erstellt wurden. Die beobachteten Unterschiede können dadurch erklärt werden, dass Tumoren nicht rein aus einer Zellart bestehen, sondern eine Mischung aus unterschiedlich differenzierten Tumorzellen, nicht entarteten Zellen und Zellen des Immunsystems darstellen. Dies wirkt sich somit auch auf das Sekretom und damit auf das Mikromilieu in Tumoren aus.

An dieser Stelle ist festzuhalten, dass durch die Sekretomanalyse von Tumorzellen, beziehungsweise die Übersicht über die von ihnen sekretierten Proteine, wesentliche Informationen für die weitere Tumorforschung gewonnen werden können. Außerdem bietet sie im Hinblick auf Prognosemarker oder zielgerichtete Therapien Potential für den klinischen Einsatz. Wie oben dargestellt stoßen die bisher angewandten Methoden der Sekretomgewinnung an ihre Grenzen. Dies gilt es zu erkennen und zu minimieren.

## 6.2 Methoden zur Analyse sekretorischer Proteine

Zur Erstellung von Sekretionsprofilen haben sich die Kultivierung von Tumorzellen, insbesondere von Tumorzelllinien, und die anschließende massenspektrometrische Analyse der Proteine im Zellkulturüberstand etabliert. Um die Bedingungen *in vivo* nachzustellen, werden Zellkulturmedien häufig mit Serum versetzt, dessen hoher Proteinanteil im Bereich von mg/ml eine Detektion der von den Zellen sekretierten Proteine (ng/ml) erschwert.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden verschiedene Methoden entwickelt.

Ein häufig genutzter, naheliegender Ansatz ist, Zellen für eine gewisse Zeitspanne in serumfreiem Medium zu kultivieren. Dadurch wird die Erstellung eines Sekretoms ohne Kontaminationen durch Serumproteine möglich.<sup>57</sup> Dieser wird aber seit längerem kontrovers diskutiert. Während Villarreal *et al.* 2012 auf Grundlage von Durchflusszytometrischen Daten, nach Färbung mit Annexin-V und Propidiumiodid, bekunden, dass Serumentzug in den ersten 24 Stunden keinen nennenswerten Effekt auf die Zellviabilität und Apoptose hat<sup>58</sup>, beschreiben zahlreiche andere Studien, dass sich bereits ein kurzer Serumentzug stark auf die Zellen auswirkt. Dies umfasst Änderungen in der Expression sowie Phosphorylierung von Proteinen, Zellproliferationsminderung und erhöhtes Zellsterben.<sup>59,60</sup> Auch in dieser Arbeit konnte der Effekt des Serumentzugs auf die Zellviabilität durch Färbung mit Annexin-V-FITC und To-Pro-3 per Analyse mittels ImageStream anhand von MC38-Zellen gezeigt werden. Bei Kultivierung in serumfreiem Medium lag der Anteil lebendiger Zellen nach 18 Stunden bei nur noch etwa 48% (5.3). Durch Freisetzung intrazellulärer Proteine führt der hohe Anteil apoptotischer und toter Zellen zu Verunreinigungen des Sekretoms mit normalerweise nicht-sekretorischen Proteinen.<sup>24</sup>

Außerdem zeigte sich im Vergleich auf Proteomebene ein Unterschied in der Expression von 202 Proteinen (Abbildung 26). 91 dieser Proteine wurden unter serumfreien Bedingungen stärker exprimiert, darunter 10 Proteine, die dafür bekannt sind, an apoptotischen Prozessen beteiligt zu sein, und 30 Proteine, die mit Zellstress assoziiert sind.

Eine Alternative bietet die in dieser Arbeit angewandte Methode von Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld<sup>23</sup>, die auf der 2006 von Dietrich *et.al.* als „*BioOrthogonal Non-Canonical Amino acid Tagging (BONCAT)*“ vorgestellten Methode basiert. Dabei werden synthetische Aminosäuren zur Markierung neu synthetisierter Proteine eingesetzt.<sup>61</sup> Hier wird das L-Azidohomoalanin (AHA) genutzt. Es ähnelt in seiner Struktur dem Methionin und wird anstelle dessen von den Zellen während der Synthese in

Proteine eingebaut. Im Unterschied zum Methionin besitzt es eine Azidogruppe über die während einer bestimmten Zeit neu synthetisierte und sekretierte Proteine an Alkyn-Agarose gebunden und für die Analyse aus dem Zellkulturmedium separiert werden können. Dadurch wird die Erstellung eines Sekretoms in serumhaltigem Medium möglich.<sup>20</sup> Allerdings kann es durch unspezifische Bindungen der Serumproteine an die Alkyn-Agarose trotzdem zu Verunreinigungen des Sekretoms kommen.<sup>24</sup>

Zudem beschränken sich auf diese Weise gewonnene Daten nur auf Proteine, die Methionin enthalten, welches durch AHA ersetzt werden kann. Die Proteine, die kein oder nur ein einzelnes N-terminales Methionin enthalten, welches durch posttranslationale Modifikation abgespalten wird, können nicht erfasst werden. Im Hinblick auf humane Zellen erfasst dieser Ansatz mit 94% methioninhaltiger Proteine aber den größten Teil der Proteine<sup>61</sup> und stellt den derzeitigen Goldstandard dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei der Anwendung dieses Protokolls auf 10 humane sowie eine Mauszelllinie weitere Schwächen dieser Methode festgestellt.

Zellen, die unter Einfluss von AHA gewachsen waren, wiesen, anders als von Dietrich *et al.* postuliert<sup>61</sup>, ein signifikant geringeres Wachstum auf (Abbildung 19). Dieser Effekt war über alle 10 humanen Zelllinien sowie die murine Zelllinie in ähnlichem Ausmaß zu beobachten. Somit ist anzunehmen, dass der Effekt nicht zelllinienspezifisch ist. Eine Erklärung dafür bietet die 2002 von Krick *et al.* veröffentlichte Arbeit, in der sie den Einbau von Aziden in Proteine untersucht haben. Es wird beschrieben, dass AHA, kontrolliert durch die Methionyl-tRNA-Synthetase, langsamer in Proteine eingebaut wird als Methionin.<sup>62</sup> Laut Eichelbaum *et al.* könnte sich diese Tatsache auf Proteinexpressionen auswirken, habe aber keinen wesentlichen Effekt auf die sekretierten Proteine.<sup>20</sup> Gestützt wird diese Aussage unter anderem von Bagert *et al.* anhand von HeLa-Zellen.<sup>63</sup>

Tieferegehende Untersuchungen innerhalb dieser Dissertation bekräftigen jedoch die zuvor gemachte Beobachtung. Bei imagestreambasierten Analysen von mit AHA kultivierten MC38-Zellen zeigte sich, dass der Anteil lebendiger Zellen sich deutlich in Richtung der toten Zellen bewegte (Abbildung 20). Eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Populationen stellte sich, anders als im serumfreien Medium, aber nicht dar. Eine Hypothese ist daher, dass das AHA einen Stresszustand der Zellen auslöst, der verantwortlich für mehr tote Zellen ist. Im Anschluss erstellte Transkriptomdaten untermauern diese These. Bezogen auf die MC38-Zelllinie zeigten sich AHA-induzierte Änderungen der Genexpression von 18,1% (entspricht 5.031 von

27.765 Genen mit einer logarithmischen relativen Änderung  $>$  oder  $<0$  und einem Signifikanzwert von  $p=0,05$ ). Die *Gene Ontology*-Analysen (Abbildung 22) zeigten, dass die durch den Einfluss von AHA hochregulierten Gene mit einer zellulären Stressantwort (*engl. cellular response to stress*) und Apoptose assoziiert sind. Gene, die mit Wachstumsprozessen assoziiert sind, werden durch den Einfluss von AHA herunterreguliert.

Dieser Effekt konnte in unterschiedlich starker Ausprägung auch bei den 10 humanen Zelllinien festgestellt werden, bei denen zwischen 0,8 und 13,8% der Gene betroffen waren (Abbildung 14, Abbildung 15). Zelllinien, die schneller wachsen, zeigten einen größeren Anteil differentiell exprimierter Gene. Somit ist davon auszugehen, dass das Ausmaß des AHA-Einflusses auf die Zellen mit der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie korreliert.

Zudem wurde beobachtet, dass manche Zellen, hier anhand von Jurkat-Zellen und primärer OT-I-Zellen gezeigt (Abbildung 23), das AHA nicht effektiv aufnehmen und in ihre Proteine einbauen, sodass die Methode der Sekretomanalyse mittels *Click-Chemistry* durch AHA-Markierung auf diese Zellen nur beschränkt anwendbar ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Weiteren das Verfahren der Sekretomanalyse anhand der murinen Kolonkarzinomzelllinie (MC38) auf Grundlage einer Medienkombination optimiert werden. Diese basiert auf Proteinzusätzen, die es ermöglichen, Zellen ohne Zusatz von FCS zu kultivieren. Dabei kann auf den Einsatz von Aminosäure- oder Zuckeranaloga zur Markierung der neu synthetisierten, sekretierten Proteine verzichtet werden.

Die im Medium enthaltenen Proteine, insbesondere Albumin, Transferrin und Haptoglobin, werden zur Vermeidung von Interferenzen vor der massenspektrometrischen Analyse des Sekretoms mittels spezifischer immobilisierter Antikörper depletiert.

Um die Menge der zu depletierenden Proteinen möglichst gering zu halten, wurde das X-VIVO 15-Medium in unterschiedlicher Menge mit dem Standardmedium der Zellen, ohne FCS, verdünnt und die Zellen darin kultiviert. Auffällig war hier, dass mit steigender Verdünnung des X-VIVO 15-Mediums die Zellviabilität höher war, obwohl der Anteil im Medium enthaltener Proteine insgesamt abnahm. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Zellen für ihr Wachstum einen größeren Anteil des Grundmediums bevorzugen, an das sie adaptiert sind.

Eine Verdünnung des X-VIVO 15-Mediums um das 6-fache (entspricht X-VIVO 2,5-Medium) erwies sich nach Bestimmung der Zellviabilität durch imagestreambasierte Analysen mit einem Anteil von 86,3% lebendiger Zellen als geeignet (Abbildung 25). Das Proteinmengen-Äquivalent zum X-VIVO 2,5-Medium stellt das SSPA 2,5-Medium dar, in dem die zusätzliche Markierung der neu synthetisierten Proteine mittels der schweren Isotope der Aminosäuren Arginin und Lysin möglich ist. Dies ermöglicht die Unterscheidung dieser in einem bestimmten Zeitraum neu synthetisierten, sekretierten Proteine von durch natürliches Zellsterben freigesetzten intrazellulären Proteinen. Dadurch werden Verunreinigungen des Sekretoms minimiert. Wie 2007 von *Ong et al.* beschrieben, hat die Markierung der sekretorischen Proteine durch Aminosäureisotope keine Auswirkungen auf die Zellen.<sup>64</sup>

Die Zellviabilität war in diesem Medium mit einem Anteil von 86% lebendiger Zellen ähnlich der des Standardmediums und lag deutlich über der des AHA-Mediums (Abbildung 25). In der anhand der Zellzahl erstellten Wachstumskurve spiegelt sich dies ebenfalls wider (Abbildung 24). Zellen, die in SSPA 2,5-Medium kultiviert wurden, zeigten ein ähnliches Wachstum wie Zellen in ihrem Standardmedium und damit ein um etwa einen Faktor 2 besseres Wachstum als Zellen, die mit AHA kultiviert wurden. Diese Beobachtungen belegen, dass die in dieser Arbeit entwickelte Methode der Sekretomanalyse schonender für die Zellen ist und dadurch der zuvor diskutierte negative Effekt auf die Zellen reduziert werden kann.

Proteom- und Transkriptomdaten untermauern dies. Die Zahl der signifikant regulierten Proteine ist in Zellen, die in SSPA 2,5-Medium kultiviert wurden, um einen Faktor von 3,7 geringer, als in Zellen, die mit AHA kultiviert wurden (Abbildung 26). Auf Transkriptomebene konnte der Effekt von 18,1% beim Einsatz von AHA auf 2,7% beim Einsatz von SSPA 2,5-Medium reduziert werden. Die weiterhin bestehenden geringen Unterschiede im Verhalten der Zellen im SSPA 2,5-Medium im Vergleich zum Standardmedium könnten sich darin erklären, dass durch die Aufkonzentration des X-VIVO 15-Mediums kleinere Proteine und Aminosäuren verloren gehen, die somit den Zellen nicht mehr zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der verringerte Zellstress die Gewinnung eines natürlicheren Sekretoms ermöglicht. Außerdem können mit der hier entwickelten Methode theoretisch alle Proteine detektiert werden, die im Zeitraum einer 18-stündigen Sekretomanalyse von den Zellen sekretiert werden, während bei der AHA Methode nur Proteine detektiert werden können, deren Aminosäuresequenz Methionin beinhaltet. Eine Beobachtung über 18 Stunden hinaus, um weitere Proteine zu

detektieren, die erst später sekretiert werden, ist mit beiden Methoden nicht zielführend, da absterbende Zellen durch Freisetzung intrazellulärer Proteine das Sekretom verunreinigen.

Verunreinigungen durch Serumproteine treten bei der hier entwickelten Methode, anders als bei der AHA-Methode, nicht auf. Allerdings können unspezifische Bindungen der sekretierten Proteine an die genutzten Depletionssäulen zu Artefakten führen. Um diesen Effekt zu minimieren, könnten in Zukunft anstelle der bisherigen „*top 12 abundant depletion columns*“, welche spezifisch für 12 Proteine sind, Depletionssäulen genutzt werden, die nur Albumin, Transferrin und Haptoglobin spezifisch binden. Außerdem ist es möglich, die Zellen vor der Sekretomanalyse längere Zeit im X-VIVO 2,5-Medium zu kultivieren und so durch eine Gewöhnung an das Medium die Artefakte durch Medienwechsel zu reduzieren.

## 7 Zusammenfassung

Die Erforschung des Tumormikromilieus ist entscheidend, um Kommunikations- und Signalwege zwischen Tumorzellen und ihrer Umgebung besser zu verstehen und potentielle therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Die Sekretomanalyse mittels massenspektrometrischer Messung bietet dabei die Möglichkeit, von Tumorzellen sekretierte Proteine zu detektieren und Übersichten über die Sekretome verschiedener Tumorzellen zu erstellen. Hierzu wurden bereits verschiedene Methoden etabliert. In dieser Arbeit hat die Methode des „*SILAC labelings und der Click-Chemistry*“ von Kathrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld Anwendung gefunden, die bislang den Goldstandard der Sekretomanalyse darstellte. Bei der Anwendung auf zehn humane Tumorzelllinien wurden zwischen 234 und 692 Proteine pro Zelllinie identifiziert, die miteinander verglichen wurden, wodurch eine Übersicht über die gemeinsam sekretierten Proteine erstellt werden konnte.

Ergänzend wurden neben dem Sekretom auch Transkriptom- und Proteomdaten erstellt, um die Methode näher zu untersuchen und zu validieren. *GO-Analysen* dieser Daten zeigten, dass das bei dieser Methode zur Markierung der neu synthetisierten Proteine eingesetzte Aminosäureanalogon L-Azidohomoalanin Stress- und Apoptosereaktionen in den Zellen auslöst, die sich auch auf das Sekretom auswirken könnten. Untermauert wurde diese Beobachtung durch tiefergehende Untersuchungen der Mauszelllinie MC38. Die Erstellung von Wachstumskurven und der Einsatz durchflusszytometrischer Untersuchungen von mit Apoptosemarkern gefärbten Zellen in der Kultur bestätigten diese Erkenntnis. Insbesondere bei langsam wachsenden oder empfindlichen Zelllinien sowie primären Zellen stößt diese Methode der Sekretomanalyse an ihre Grenzen. Ursächlich hierfür ist, dass das L-Azidohomoalanin nicht nur eine Stressreaktion in den Zellen auslöst sondern auch nicht effektiv in die sekretierten Proteine eingebaut wird. Um diese Effekte zu reduzieren wurde in dieser Arbeit eine alternative Methode der Sekretomanalyse entwickelt, bei der keine, die Zellen irritierenden Aminosäureanaloge zur Markierung der neu synthetisierten Proteine eingesetzt werden. Dazu wurde eine Medienkombination ermittelt, in der die Zellen ohne den Zusatz von fötalem Kälberserum, das bislang die massenspektrometrische Messung behinderte, kultiviert werden können, sodass auf eine Markierung zur Differenzierung verzichtet werden kann. Die hier entwickelte Methode ermöglicht es somit, durch einen geringeren Stresseinfluss auf die Zellen

ein natürlicheres Sekretom zu erstellen. Außerdem erweitert diese Methode das Spektrum der detektierbaren Proteine auch auf die, deren Aminosäuresequenz kein Methionin enthält.

## 8 Abstract

The analysis of the tumor microenvironment is crucial for a better understanding of the communication and signaling pathways between tumor cells and their environment and for the identification of potential therapeutic targets. Secretome analysis using mass spectrometry offers the possibility to detect proteins secreted by tumor cells and to create overviews of the secretome of various tumor cells. For this purpose, various methods have already been established. In this work, the method of “SILAC labeling and click chemistry” by Kathrin Eichelbaum and Jeroen Krijgsveld was used, which represents the gold standard for secretome analysis. When applied to the ten human tumor cell lines, examined in this work, between 234 and 692 secreted proteins per cell line were identified, compared to each other and an overview of the co-secreted proteins was created.

In addition to the secretome, transcriptome and proteome data were generated in order to examine and validate the method in detail. GO analyzes of these data showed, that the amino acid analogue L-azidohomoalanin, used in this method to label newly synthesized proteins, triggers stress and apoptosis reactions in the cells, which could have an effect on the secretome. This was supported by in-depth studies of the mouse cell line MC38, specifically analyzing growth curves and using cytometric-based examinations of the cells stained with apoptosis markers. Particularly with slowly growing or sensitive cell lines as well as primary cells, this secretome analysis method seems to reach its limits, as the L-azidohomoalanine not only triggers a stress reaction in the cells, but is also not effectively incorporated into the secreted proteins. In order to reduce this effect, an alternative method of secretome analysis was developed in which no amino acid analogues are used to label the newly synthesized proteins. Therefore a media combination was determined in which the cells can be cultured without the addition of fetal calf serum, which interferes with the mass spectrometric analysis.

This new method enables to create a more natural secretome by reducing the impact of stress on the cells and also to detect proteins whose amino acid sequence does not contain methionine.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphate-buffered saline
FCS	Fetal calf serum/ Fötales Kälberserum
AHA	L-Azidohomoalanine
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
DTT	Dithiothreitol
IAA	Iodacetamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
TFA	Trifluoressigsäure
FASP	filter-aided-samplepreparation
BSA	Bovine serum albumine
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
AMBIC	Ammoniumbicarbonat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FA	Ameisensäure
g	Erdbeschleunigung
HCL	Salzsäure
LS	Liquid chromatography
M	molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>	Ammoniumbicarbonat
nm	Nanometer
SILAC	Stable isotope labeling in cell culture
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
°C	Grad Celsius
kDa	Kilodalton
SSPA	SILAC supplemented with protein additives
LFQ	Label-free-Quantification
ADAM9	A Disintegrin and Metalloprotease 9
EGF	Endothelial Growth Factor/ Endothelialer Wachstumsfaktor
FC	Fold change/ x-fache Veränderung

## 10 Literaturverzeichnis

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
2. Hoffmann MJ, Taubert H, Junker K. Molekulare Grundlagen der Karzinogenese und molekularbiologische Untersuchungsmethoden. doi:10.1007/978-3-662-54652-9\_11-1
3. Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett*. 2017;387:61-68. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.043
4. Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res*. 2019;79(18):4557-4567. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3962
5. Robinson JL, Feizi A, Uhlén M, Nielsen J. A Systematic Investigation of the Malignant Functions and Diagnostic Potential of the Cancer Secretome. *Cell Rep*. 2019;26(10):2622-2635.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.02.025
6. Gr E. Was sind Omics? *PSYCH up2date*. 2014;8(06):343-346. doi:10.1055/s-0034-1387400
7. Frith MC, Pheasant M, Mattick JS. The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(8):894-897. doi:10.1038/sj.ejhg.5201459
8. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013;98(6):236-238. doi:10.1136/archdischild-2013-304340
9. Selzer PM, Marhöfer RJ, Koch O. *Angewandte Bioinformatik*. 2.Auflage. Springer Verlag Heidelberg; 2018. doi:10.1007/978-3-662-54135-7
10. Garrels JI. Proteome. *Encycl Genet*. 2001;(1998):1575-1578. doi:10.1006/rwgn.2001.1042
11. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and their applications. *J Chromatogr Sci*. 2017;55(2):182-196. doi:10.1093/chromsci/bmw167
12. Viotti C. ER to golgi-dependent protein secretion: The conventional pathway. *Methods Mol Biol*. 2016;1459:3-29. doi:10.1007/978-1-4939-3804-9\_1
13. Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, Hajiebrahimi A, Ghasemi Y. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *Eur J Cell Biol*. 2018;97(6):422-441. doi:10.1016/j.ejcb.2018.06.003
14. Uhlen M, Tegel H, Sivertsson Å, et al. The human secretome – the proteins secreted from human cells. Published online 2018:1-14.
15. Nielsen H. Predicting secretory proteins with signalP. *Methods Mol Biol*. 2017;1611:59-73. doi:10.1007/978-1-4939-7015-5\_6

16. Yusong Guo, Feng Yang and XT. An Overview of Protein Secretion in Yeast and Animal Cells. *Methods Mol Biol.* 2017;1662(An Overview of Protein Secretion in Yeast and Animal Cells). doi:10.1007/978-1-4939-7262-3\_1
17. Rabouille C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.* 2017;27(3):230-240. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.007
18. Lichtenthaler SF, Lemberg MK, Fluhrer R. Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals—hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J.* 2018;37(15):1-24. doi:10.15252/embj.201899456
19. Brandi J, Manfredi M, Speziali G, Gosetti F, Marengo E, Cecconi D. Proteomic approaches to decipher cancer cell secretome. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;78:93-101. doi:10.1016/j.semcd.2017.06.030
20. Eichelbaum K, Winter M, Diaz MB, Herzig S, Krijgsveld J. Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat Biotechnol.* 2012;30(10):984-990. doi:10.1038/nbt.2356
21. Imami K, Yasuda T. Measuring Protein Synthesis during Cell Cycle by Azidohomoalanine (AHA) Labeling and Flow Cytometric Analysis. *BIO-PROTOCOL.* Published online 2019. doi:10.21769/bioprotoc.3215
22. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chemie - Int Ed.* 2001;40(11):2004-2021. doi:10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5
23. Eichelbaum K, Krijgsveld J. Combining pulsed SILAC labeling and click-chemistry for quantitative secretome analysis. *Methods Mol Biol.* 2014;1174:101-114. doi:10.1007/978-1-4939-0944-5\_7
24. Shin J, Rhim J, Kwon Y, et al. Comparative analysis of differentially secreted proteins in serum-free and serum-containing media by using BONCAT and pulsed SILAC. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-019-39650-z
25. Ben El Ayouchia H, Bahsis L, Anane H, Domingo LR, Stiriba SE. Understanding the mechanism and regioselectivity of the copper(i) catalyzed [3 + 2] cycloaddition reaction between azide and alkyne: A systematic DFT study. *RSC Adv.* 2018;8(14):7670-7678. doi:10.1039/c7ra10653j
26. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics: Abstract: Nature. *Nature.* 2003;422(6928):198-207. <http://www.nature.com/articles/nature01511>  
<http://www.nature.com/nature/journal/v422/n6928/abs/nature01511.html>
27. Moroshkin P, Leiderer P, Möller TB, Kono K. Taylor cone and electrospraying at a free surface of superfluid helium charged from below. *Phys Rev E.* 2017;95(5):1-9. doi:10.1103/PhysRevE.95.053110
28. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem.* 2012;2012:1-40. doi:10.1155/2012/282574
29. Wilm MS, Mann M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int J Mass Spectrom Ion Process.* 1994;136(2-3):167-180. doi:10.1016/0168-1176(94)04024-9

30. Bekker-jensen DB, Martínez-val A, Steigerwald S, et al. A Compact Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with FAIMS Interface Improves Proteome Coverage in Short LC Gradients Authors A Compact Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with FAIMS Interface Improves Proteome Coverage in Short LC Gradients \* □. 2020;(April):716-729. doi:10.1074/mcp.TIR119.001906
31. Nagaraj N, D'Souza RCJ, Cox J, Olsen J V., Mann M. Feasibility of large-scale phosphoproteomics with higher energy collisional dissociation fragmentation. *J Proteome Res.* 2010;9(12):6786-6794. doi:10.1021/pr100637q
32. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG. The Orbitrap: A new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005;40(4):430-443. doi:10.1002/jms.856
33. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem.* 2000;72(6):1156-1162. doi:10.1021/ac991131p
34. Kalli A, Smith GT, Sweredoski MJ, Hess S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: Focus on LTQ-orbitrap mass analyzers. *J Proteome Res.* 2013;12(7):3071-3086. doi:10.1021/pr3011588
35. Šesták J, Moravcová D, Kahle V. Instrument platforms for nano liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2015;1421:2-17. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.090
36. Guo J, Huan T. Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Anal Chem.* 2020;92(12):8072-8080. doi:10.1021/acs.analchem.9b05135
37. Doerr A. DIA mass spectrometry. *Nat Methods.* 2014;12(1):35. doi:10.1038/nmeth.3234
38. Bateman A, Martin MJ, O'Donovan C, et al. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D158-D169. doi:10.1093/nar/gkw1099
39. Alpi E, Griss J, da Silva AWS, et al. Analysis of the tryptic search space in UniProt databases. *Proteomics.* 2015;15(1):48-57. doi:10.1002/pmic.201400227
40. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc.* 2016;11(12):2301-2319. doi:10.1038/nprot.2016.136
41. Givan AL. Chapter 1 Flow cytometry: An Introduction. *Methods Mol Biol.* 699:1-29. doi:10.1007/978-1-61737-950-5
42. Villas BH. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis.* 1998;5(1):56-61. doi:10.1007/978-94-017-0623-0\_1
43. Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry.*

- 1999;37(3):197-204. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19991101)37:3<197::AID-CYTO6>3.0.CO;2-L
44. Milanovich N, Suh M, Jankowiak R, Small GJ, Hayes JM. Binding of TO-PRO-3 and TOTO-3 to DNA: Fluorescence and hole-burning studies. *J Phys Chem.* 1996;100(21):9181-9186. doi:10.1021/jp9600625
  45. Basiji D, O’Gorman MRG. Imaging flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2015;423:1-2. doi:10.1016/j.jim.2015.07.002
  46. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. Bioinfogp.Cnb.Csic.Es/Tools/Venny/Index.Html. Published 2007. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
  47. The Cancer Genome Atlas. Definitions. doi:10.32388/e1plqh
  48. Hotoda N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. A secreted form of human ADAM9 has an  $\alpha$ -secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(2):800-805. doi:10.1016/S0006-291X(02)00302-9
  49. Fan X, Wang Y, Zhang C, et al. ADAM9 expression is associate with glioma tumor grade and histological type, and acts as a prognostic factor in lower-grade gliomas. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9). doi:10.3390/ijms17091276
  50. O’Shea C, McKie N, Buggy Y, et al. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. *Int J Cancer.* 2003;105(6):754-761. doi:10.1002/ijc.11161
  51. Ueno M, Shiomi T, Mochizuki S, et al. ADAM9 is over-expressed in human ovarian clear cell carcinomas and suppresses cisplatin-induced cell death. *Cancer Sci.* 2018;109(2):471-482. doi:10.1111/cas.13469
  52. Oria VO, Lopatta P, Schmitz T, et al. ADAM9 contributes to vascular invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Oncol.* 2019;13(2):456-479. doi:10.1002/1878-0261.12426
  53. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Röcken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol.* 2005;26(1):17-24. doi:10.3892/ijo.26.1.17
  54. Fritzsche FR, Wassermann K, Jung M, et al. ADAM9 is highly expressed in renal cell cancer and is associated with tumour progression. *BMC Cancer.* 2008;8:1-9. doi:10.1186/1471-2407-8-179
  55. Zigrino P, Mauch C, Fox JW, Nischt R. ADAM-9 expression and regulation in human skin melanoma and melanoma cell lines. *Int J Cancer.* 2005;116(6):853-859. doi:10.1002/ijc.21087
  56. Medizin S. Matrix-Metalloproteinasen. [https://www.springermedizin.de/emedpedia/detail/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/matrix-metalloproteinasen?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9\\_2044](https://www.springermedizin.de/emedpedia/detail/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/matrix-metalloproteinasen?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9_2044)
  57. Brown KJ, Formolo CA, Seol H, et al. Advances in the proteomic investigation

- of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9(3):337-345.  
doi:10.1586/epr.12.21
58. Villarreal L, Méndez O, Salvans C, Gregori J, Baselga J, Villanueva J. Unconventional secretion is a major contributor of cancer cell line secretomes. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(5):1046-1060. doi:10.1074/mcp.M112.021618
59. Hasan NM, Adams GE, Joiner MC. Effect of serum starvation on expression and phosphorylation of PKC- $\alpha$  and p53 in V79 cells: Implications for cell death. *Int J Cancer*. 1999;80(3):400-405. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990129)80:3<400::AID-IJC11>3.0.CO;2-U
60. Pirkmajer S, Chibalin A V. Serum starvation: Caveat emptor. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2011;301(2):272-279. doi:10.1152/ajpcell.00091.2011
61. Dieterich DC, Link AJ, Graumann J, Tirrell DA, Schuman EM. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(25):9482-9487. doi:10.1073/pnas.0601637103
62. Kiick KL, Saxon E, Tirrell DA, Bertozzi CR. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):19-24. doi:10.1073/pnas.012583299
63. Bagert JD, Xie YJ, Sweredoski MJ, et al. Quantitative, time-resolved proteomic analysis by combining bioorthogonal noncanonical amino acid tagging and pulsed stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(5):1352-1358. doi:10.1074/mcp.M113.031914
64. Ong SE, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*. 2007;1(6):2650-2660. doi:10.1038/nprot.2006.427

# 11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von L-Methionin und L-Azidohomoalanin <sup>21</sup> .....	5
Abbildung 2: Copper (I) – catalyzed azide- alkyne- cycloaddition <sup>25</sup> .....	5
Abbildung 3: Darstellung des Verfahrens der Elektrospray Ionisation <sup>28</sup> .....	7
Abbildung 4: Orbitrap <sup>32</sup> .....	8
Abbildung 5: Ablauf der Probenvorbereitung für die Transkriptomanalyse .....	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs zur Erstellung des Sekretoms, Proteoms und Transkriptoms mittels <i>SILAC-Labelings</i> .....	32
Abbildung 7: Schematische Darstellung der, in dieser Arbeit entwickelten, Methode zur Sekretomanalyse .....	39
Abbildung 8: Anzahl detektierter sekretierter Proteine in 10 humanen Zelllinien .....	41
Abbildung 9: Venn-Diagramme Sekretomvergleich .....	42
Abbildung 10: Übersicht über das Sekretom der 10 humanen Zelllinien .....	43
Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten der 10 Zelllinien und der ex vivo Tumore aus dem TCGA .....	45
Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten aller 10 Zelllinien .....	46
Abbildung 13: Hauptkomponentenanalysen der biologischen Replikate der Methionin und AHA- Bedingung für jede Zelllinie .....	48
Abbildung 14: MA Plots Kolon- und Lungenkarzinome .....	50
Abbildung 15: MA Plots Melanome und „gesundes“ Kolongewebe .....	51
Abbildung 16: Heatmap zu den Transkriptomdaten der 10 Zelllinien (Methionin vs. AHA) ....	52
Abbildung 17: Heatmap der Transkriptomdaten der 10 Zelllinien, von Genen die für Proteine kodieren, die im Sekretom gefunden wurden .....	53
Abbildung 18: Heatmap für alle 10 Zelllinien von Proteinen auf Proteomebene, die im Sekretom gefunden wurden .....	53
Abbildung 19: Wachstumskurve MC38 in verschiedenen Medien .....	55
Abbildung 20: Zellviabilitätsvergleich mittels Durchflusszytometrie (1) .....	56
Abbildung 21: Proteomkorrelation .....	57
Abbildung 22: <i>Gene Ontology</i> Analyse regulierter Gene und Proteine der MC38 Zellen kultiviert in AHA-Medium .....	58
Abbildung 23: LFQ-Intensitäten der massenspektrometrischen Analyse des Sekretoms der MC38-, OT-I- und Jurkat-Zellen .....	61
Abbildung 24: Wachstumskurve MC38 in verschiedenen Medien (2) .....	63
Abbildung 25: Zellviabilitätsvergleich mittels Durchflusszytometrie (2) .....	64
Abbildung 26: Anzahl signifikant veränderter Proteine in verschiedenen Medien im Vergleich zum Methionin-Medium auf Proteomebene .....	65

Abbildung 27: Transkriptomanalyse von Zellen, die mit Methionin versus AHA oder versus SSPA 2,5-Medium gewachsen waren.....	66
Abbildung 28: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten von MC38 in verschiedenen Medien.....	67
Abbildung 29: Gene Ontology Analyse regulierter Gene der MC38 Zellen kultiviert in AHA- oder SSPA-Medium im Vergleich zu Methionin-Medium .....	68

## 12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien/ Zellen.....	11
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.....	16
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial .....	17
Tabelle 4: Laborgeräte.....	18
Tabelle 5: Medien zum Vergleich der Sekretomethoden .....	36
Tabelle 6: Gennamen der Proteine, die von allen 9 Tumorzelllinien sekretiert wurden.....	42
Tabelle 7: Mittelwerte der Expression ausgewählter tumorassoziierter Proteine auf Transkriptomebene .....	60

## 13 Curriculum Vitae

## 14 Danksagung