



Doctoral Thesis

Proteomic and transcriptomic investigations for the discovery of markers of pathology

Author(s):

Scheurer, Simone Barbara

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004938551> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 15813

**Proteomic and Transcriptomic Investigations for the
Discovery of Markers of Pathology**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

SIMONE BARBARA SCHEURER

Eidg. Dipl. Pharm. ETH – ETH Zürich

born 12.12.1974

Citizen of Aarberg/Seedorf, BE

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Prof. Dr. Renato Zenobi, co-examiner

Dr. Giuliano Elia, co-examiner

Zürich, November 2004

1. Summary

The vast majority of approaches for the treatment of solid tumors are limited by lack of specificity. As a consequence, the development of therapeutic agents which preferentially accumulate in solid tumors by means of binding molecules (e.g., human antibodies) specific for tumor-associated markers represents a main focus of modern anticancer research. Due to their accessibility, tumor-associated markers located around new blood vessels within the tumor mass (but absent in normal tissues) represent ideal targets for the development of more selective therapeutic strategies against cancer. Membrane proteins on tumoral endothelial cells, if present in sufficient abundance and if specific enough, are attractive targets for diagnostic or therapeutic intervention because of their accessibility from the blood stream.

In the first part of the work presented here, we aimed at discovering potential target proteins for the selective delivery of therapeutic or diagnostic agents to the tumor site. A genome-wide analysis of the modulation of gene expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a function of time of exposure to hypoxic growth conditions (12, 24 and 48 hours), compared to control cells maintained for 48 hours in normoxic growth conditions, was performed by means of the Affymetrix Gene Chip technology. Several regions in tumors are hypoxic, including vessels, which experience transient or acute hypoxia as a consequence of intermittent closure for a period of a few seconds, minutes or even hours. Our analysis identified an interesting up-regulated gene, Del-1 (developmentally regulated, endothelial locus 1). Del-1 is completely absent in practically all adult tissues, but it has been shown, that Del-1 is strongly expressed in the modified extracellular matrix of solid tumor in breast carcinoma, melanoma and colon carcinoma specimens, being associated with both, tumor cells and angiogenic endothelial cells. The transcriptomic study was completed by a proteomic study, where proteins from a whole-cell lysate and from subcellular fractions of normoxic or hypoxic HUVEC were investigated by one- or two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. The most

striking observation of the proteomic study was the extremely small number of differentially expressed proteins detected. We observed that membrane proteins were underrepresented on the 2D-gels.

The second part presents an analysis of HUVEC cells exposed to hypoxic and normoxic conditions respectively using two-dimensional peptide mapping (2D peptide mapping), a method developed by us for the simultaneous recovery, separation, identification and relative quantification of membrane proteins. 2D peptide mapping is based on the modification of cell surface proteins with a cleavable biotin derivative, followed by their solubilization and purification on streptavidin resin. The biotinylated proteins are eluted from streptavidin and proteolytically digested. Resulting peptides are then separated by reversed phase HPLC and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS), thus yielding a two-dimensional peptide map (2D-peptide map). A 2D peptide map allows the relative quantification of surface proteins in parallel cell cultures exposed to different experimental conditions. In the course of this study, the VE-cadherin/actin/catenin complex was detected, revealing an increased accumulation of beta-catenin at 2% oxygen.

Strategies for the improvement of the 2D peptide mapping technique and a comparison analysis between LC-MALDI-TOF/TOF and μ LC-ESI-MS/MS methodologies are the subject of the third part. We show that a large number of proteins are detected when LC-MALDI-TOF/TOF is implemented in the workflow of 2D peptide mapping, furthermore, the analysis time is substantially shortened. We observed, that LC-MALDI-TOF/TOF is superior to μ LC-ESI-MS/MS in terms of sensitivity and confidence level of protein identifications.

1. Zusammenfassung

Die meisten Ansätze für die Behandlung von soliden Tumoren sind durch eine mangelnde Spezifität limitiert. Deswegen ist ein Hauptziel der modernen Krebsforschung die Entwicklung von Therapeutika, die mit Hilfe von Molekülen, welche spezifisch an tumor-assoziierte Marker binden (z.B. menschliche Antikörper), im Tumorgewebe akkumulieren. Wegen ihrer potentiell leichten Erreichbarkeit vom Blut her, stellen tumor-spezifische Marker, die um neugebildete Blutgefäße herum in Tumoren (nicht aber in gesundem Gewebe) lokalisiert sind, ideale Ziele für die Entwicklung von selektiveren Therapiestrategien gegen Krebs dar. Daher sind Membranproteine auf der Oberfläche von Tumor-Endothelzellen attraktive Ziele für eine diagnostische oder therapeutische Intervention, falls sie spezifisch und in genügender Menge vorhanden sind.

Das Ziel des ersten Teiles der vorliegenden Arbeit war die Entdeckung von Proteinen, die möglicherweise als Ziele für therapeutische oder diagnostische Wirkstoffe dienen können, welche spezifisch Tumor-Gewebe erkennen und sich dort selektiv anreichern. Mit Hilfe der Affymetrix Gen-Chip-Technologie wurde eine genom-weite Analyse der Genexpression in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) unter dem Einfluss von Hypoxie (Sauerstoffmangel) durchgeführt. Dabei wurde untersucht, wie sich die Genexpression in Abhängigkeit der Zeit (12, 24 und 48 Stunden), während der die Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden, veränderte im Vergleich zu Kontroll-Zellen, die unter normalen Wachstumsbedingungen 48 Stunden kultiviert wurden. Verschiedene Bereiche im Tumor erleiden Hypoxie, darunter auch Blutgefäße, die einer transienten oder akuten Hypoxie ausgesetzt sind, wenn es zeitweilig zu einem Gefäßverschluss kommt, der einige Sekunden, Minuten oder sogar Stunden andauern kann. In dieser Analyse konnte ein interessantes Gen identifiziert werden, dessen Expression unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wurde: Del-1 (developmentally regulated endothelial locus 1). Del-1 wird in praktisch allen erwachsenen Geweben überhaupt nicht exprimiert, aber es wurde gezeigt, dass Del-1 in der veränderten extra-zellulären Matrix von diversen

soliden Tumoren (Proben von Brustkarzinom, Melanom und Kolonkarzinom) stark exprimiert ist, wobei es sowohl mit den Tumorzellen als auch mit Endothelzellen der neugebildeten Blutgefäße assoziiert ist. Die transkriptomische Studie wurde mit einer proteomischen Analyse komplettiert, in welcher die Proteine in einem Gesamtzell-Lysat sowie in subzellulären Fraktionen von normoxischen und hypoxischen HUVEC mit Hilfe von ein- und zweidimensionaler Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) und anschliessender massenspektrometrischer Protein-Identifizierung untersucht wurden. Das bemerkenswerteste Ergebnis dieser Proteom-Analyse war die äusserst geringe Zahl von unterschiedlich exprimierten Proteinen, die detektiert werden konnten. Wir stellten fest, dass Membranproteine in den zweidimensionalen Gelen unterrepräsentiert waren.

Der zweite Teil dieser Arbeit zeigt die Analyse von HUVEC, die hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden, mit Hilfe von zwei-dimensionalem Peptid-Mapping (2D Peptid-Mapping), einer Methode, die wir für die simultane Isolierung, Auftrennung, Identifizierung und relative Quantifizierung von Membranproteinen entwickelt haben. 2D Peptid-Mapping basiert auf der Modifizierung von Zell-Oberflächen-Proteinen mit einem spaltbaren Biotin-Derivat, ihrer anschliessenden Solubilisierung und ihrer Aufreinigung mit Hilfe von Streptavidin. Die Proteine werden vom Streptavidin eluiert und proteolytisch verdaut. Die dabei entstehenden Peptide werden mittels Reversed-Phase-HPLC aufgetrennt (erste Dimension) und mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert (zweite Dimension), wodurch eine zwei-dimensionale Peptid-Karte generiert werden kann. Diese 2D-Peptidkarte ermöglicht die relative Quantifizierung von Zell-Oberflächen-Proteinen in parallel kultivierten Zellkulturen, die verschiedenen experimentellen Bedingungen ausgesetzt werden können. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde der VE-Cadherin-Actin-Catenin-Komplex detektiert, wobei eine erhöhte Akkumulierung von beta-Catenin unter hypoxischen Bedingungen festgestellt wurde.

Der dritte Teil beinhaltet Strategien für die Optimierung der 2D-Peptid-Mapping-Technik sowie einen Vergleich der LC-MALDI-TOF/TOF- und der μ LC-ESI-MS/MS-Methode. Wir konnten zeigen, dass eine grosse Zahl Proteine detektiert werden können, wenn LC-

MALDI-TOF/TOF für die 2D-Peptid-Mapping-Analyse angewandt wird, wodurch zudem die Analyse-Zeit deutlich verringert werden kann. Wir fanden heraus, dass LC-MALDI-TOF/TOF der μ LC-ESI-MS/MS-Methode überlegen ist hinsichtlich Sensitivität und statistischer Sicherheit der Protein-Identifizierungen.