

Aus den Universitätskliniken für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
Der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Diagnostische und funktionelle Bedeutung der  
Mikroheterogenität von Transthyretin**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Beate Gericke  
aus Weimar

Gutachter: 1. Prof. Dr. med Kaisers  
2. Prof. Dr. med. J. Weimann  
3. PD Dr. H. Rawel

Datum der Disputation: 14.07.2008

## **Inhalt**

<b><i>Peptide and protein patterns in serum and follicular fluid of women undergoing IVF</i></b>	<b>5</b>
<b><i>Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients</i></b>	<b>34</b>
<b><i>Elevated S-cysteinylglycine modification of transthyretin in serum of patients after multiple trauma</i></b>	<b>59</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
Abstract	84
Einleitung	86
Zielstellung	86
Methodik	87
Ergebnisse	90
Diskussion	94
Literaturangaben	103
<b><i>Selbstständigkeitserklärung</i></b>	<b>109</b>
<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>110</b>

## **Peptide and protein patterns in serum and follicular fluid of women undergoing IVF**

Florian J. Schweigert<sup>1</sup>, Beate Gericke<sup>1</sup>, Wiebke Wolfram<sup>1</sup>, Udo Kaisers<sup>2</sup>,  
Joachim W. Dudenhausen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, Germany

<sup>2</sup>Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Charité,  
Campus Virchow-Klinikum, University Medicine Berlin, Germany

<sup>3</sup>Department of Obstetrics, Charité, Campus Virchow-Klinikum, University  
Medicine Berlin, Germany

Aus urheberrechtlichen Gründen wird vom Abdruck des vollständigen Artikels  
hier abgesehen. Deswegen wird hier verwiesen:

Journal: Human Reproduction. **21**;11: 2960-8.(2006).

**Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid  
of ovarian cancer patients**

Beate Gericke<sup>1</sup>, Jens Raila<sup>1</sup>, Jalid Sehoul<sup>2</sup>, Sophie Haebel<sup>3</sup>, Dominique Könsgen<sup>2</sup>, Alexander Mustea<sup>2</sup>, Florian J. Schweigert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, Arthur-Scheunert-Allee 114-116; D-14558 Nuthetal, Germany

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Campus Virchow-Klinikum, Charité Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

<sup>3</sup>Interdisciplinary Center for Mass Spectrometry of Biopolymers, University of Potsdam, Karl-Liebnecht-Str. 24-25, D-14476 Golm, Germany

Aus urheberrechtlichen Gründen wird vom Abdruck des vollständigen Artikels hier abgesehen. Deswegen wird hier verwiesen:

Journal: BMC Cancer. **17**;5:133. (2005)

## **Elevated S-cysteinylglycine modification of transthyretin in serum of patients after multiple trauma**

B. Gericke<sup>1\*</sup>, J. Raila<sup>1</sup>, M. Deja<sup>2</sup>, S. Rohn<sup>3</sup>, B. Donaubaue<sup>2</sup>, B. Nagl<sup>1</sup>, S. Haebel<sup>4</sup>, F. J. Schweigert<sup>1</sup>, U. Kaisers<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Nutritional Science, University of Potsdam

<sup>2</sup>Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Universitaetsmedizin Berlin

<sup>3</sup>Department of Food Analysis, Institute of Food Technology and Food Chemistry, Technical University of Berlin

<sup>4</sup>Interdisciplinary Center for Mass Spectrometry of Biopolymers, University of Potsdam

Aus urheberrechtlichen Gründen wird vom Abdruck des vollständigen Artikels hier abgesehen. Deswegen wird hier verwiesen:

Journal: Biomarker Insights. 2;1-8. (2007).

## Zusammenfassung

Thema: Diagnostische und funktionelle Bedeutung der Mikroheterogenität von Transthyretin

Publikation 1 (P1): Peptide and protein patterns in serum and follicular fluid of women undergoing IVF (Journal: Human Reproduction; Autoren: Florian J. Schweigert, Beate Gericke, Wiebke Wolfram, Udo Kaisers, Joachim W. Dudenhausen)

Publikation 2 (P2): Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascites fluid of ovarian cancer patients (Journal: BMC Cancer; Autoren: Beate Gericke, Jens Raila, Jalid Sehouli, Sophie Haebel, Dominique Könsgen, Alexander Mustea, Florian J. Schweigert)

Publikation 3 (P3): Alteration of transthyretin microheterogeneity in serum of multiple trauma patients (Journal: Biomarker Insights; Autoren: Beate Gericke, Jens Raila, Maria Deja, Sascha Rohn, Bernd Donaubauer, Britta Nagl, Sophie Haebel, Florian J. Schweigert, Udo Kaisers)

## Abstract

Transthyretin ist ein multifunktionales Protein, welches hauptsächlich hinsichtlich seiner Rollen als Transportprotein, negatives Akutphasenprotein, biochemischer Marker, Enzym und als Komponente amyloidogener Prozesse bekannt ist. In der vorliegenden Dissertation soll der komplexe Zusammenhang von funktionellen und diagnostischen Aspekten in der TTR-Forschung dargestellt werden und dabei die Mikroheterogenität des Protein im Rahmen von drei Publikationen in den Vordergrund gestellt werden. Die erste Studie befasst sich mit der intrafollikuläre Eizellreifung während hormoninduzierter Superovulation (P1), eine weitere mit dem Ovarialkarzinom (P2) und die dritte mit polytraumatisierten Patienten (P3).

Methodisch wurde nach einer Immunopräzipitation die massenspektrometrische Analytik genutzt, um die Qualität des Proteins abbilden zu können, für die quantitative Bestimmung von TTR wurde ein ELISA zur Anwendung gebracht.

Die vier Hauptpeaks (natives TTR, S-cysteinyliertes TTR, S-cysteinylglyciniertes TTR und S-glutathionyliertes TTR) konnten in Serum, Follikelflüssigkeit und Aszites detektiert werden (P1, P2, P3). Eine vermehrte Dominanz des S-cysteinylglycinierten TTR konnte innerhalb der ersten 24 Stunden nach einem Trauma nachgewiesen werden (P3). Die Serumkonzentrationen von TTR sind assoziiert mit den CRP-Konzentrationen (P2, P3). Gesunde Kontrollen und Patienten unterscheiden sich hinsichtlich ihres Serumgehaltes an TTR (P2, P3).

Posttranslationale Modifikationen des TTR treten am freien Cysteinrest in Position 10 des monomeren TTR (Cys<sub>10</sub>) auf<sup>12,13</sup> und konnten sowohl in Serum und FF hormonstimulierter Frauen (P1), als auch in Serum und Aszites von Frauen mit einem Ovarialkarzinom (P2) und im Serum von Patienten nach einem Polytrauma (P3) nachgewiesen werden. Solche Modifikationen können Interaktionen mit anderen



Plasmaproteinen beeinträchtigen und Einfluss auf Rezeptorbindung, Gewebeaufnahme, Abbau und Ausscheidung des Proteins nehmen. Bereits in früheren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Modifikationen der Mikroheterogenität von TTR und oxidativem Stress hergestellt. Die funktionellen Konsequenzen der passageren Änderungen des TTR-Moleküls nach einem Polytrauma sind derzeit noch unklar, es ist aber mit Spätfolgen zu rechnen. Kürzlich wurde eine Veränderung des Ratios von nativem TTR zu cystTTR als hilfreich für die Diagnose von Alzheimer postuliert. Weiterhin ist bewiesen, dass Modifikationen, wie sie bei den Polytraumapatienten beschrieben werden konnten, die Amyloidogenität von TTR beeinflussen.

Zusammenfassend kann durch die drei Studien belegt werden, dass in jedem Fall posttranslationale Modifikationen am TTR Molekül auftreten, dass die Mikroheterogenität des Proteins in den verschiedenen untersuchten Körperflüssigkeiten identisch ist, und dass ein akuter oxidativer Stress Veränderungen im TTR-Molekül induziert, während diese beim Ovarialkarzinom nicht beobachtet werden konnten.

## **Einleitung**

Das Protein Transthyretin (TTR) erfüllt unterschiedliche Funktionen. TTR ist ein Transportprotein für die Thyroidhormone und vermittelt über das Retinol-Bindungsprotein am Transport von Vitamin A beteiligt. Als biochemischer Marker für Malnutrition reagiert TTR sensibel auf die Versorgung des Organismus mit Nährstoffen. Neben seiner Funktion als Enzym stellt TTR weiterhin eine funktionelle Komponente bei der pankreatischen Insulinfreisetzung dar und ist beteiligt am Metabolismus polyhalogener Biphenyle. Die Serumkonzentrationen von TTR werden durch akute und chronische Erkrankungen beeinflusst und so konnte davon ausgehend TTR in Kombination mit zwei weiteren Proteinen als Biomarker für Tumore beschrieben werden. Darüber hinaus ist TTR aufgrund seiner Bedeutung für die Fibrillenbildung direkt an amyloidogenen Prozessen beteiligt. Auch Änderungen der Mikroheterogenität des Proteins weisen auf Amyloidose sowie auf Alzheimer-Krankheit hin. Es ist daher zu vermuten, dass dieses Protein noch ein enormes – bisher ungenutztes – diagnostisches Potential birgt.

## **Zielstellung**

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Darstellung des komplexen Zusammenhanges von funktionellen und diagnostischen Aspekten in der TTR-Forschung. Drei verschiedene Studien veranschaulichen hierbei die Mikroheterogenität des Proteins. Die erste Studie befasst sich mit der intrafollikuläre Eizellreifung während hormoninduzierter Superovulation (P1), eine weitere mit dem Ovarialkarzinom (P2) und die dritte mit polytraumatisierten Patienten (P3). TTR ist ein negatives Akute-Phase-Protein und die Serumspiegel reagieren empfindlich auf

Stresszustände. Untersuchungen, inwiefern akute oder chronische Erkrankungen die Mikroheterogenität des Proteins verändern können, sind allerdings bisher nicht durchgeführt worden. Um sowohl einen akuten als auch einen chronischen Stresszustand, sowie die physiologische Situation während der In-Vitro-Fertilisation (IVF) hinsichtlich posttrans-lationaler Änderungen des TTR-Moleküls beschreiben zu können, wurde das Protein aus dem Serum isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Dabei ist es bedeutsam, neben dem Serum auch die Follikelflüssigkeit (FF) bzw. den Aszites zu betrachten, um sicher zu stellen, das eventuell auftretende Veränderungen nicht durch intrakompartimentäre Synthese bedingt sind.

## **Methodik**

### *Patienten*

P 1: Für den Vergleich zwischen Serum und FF standen Proben von 15 Patientinnen zur Verfügung, die Teilnehmer eines IVF-Programmes waren. Nach hormoneller Stimulation mit Gonadotropinen fand 36 Stunden nach Gabe von humanem Choriongonadotropin (hCG) eine transvaginale Aspiration der FF des dominanten Follikels unter sonographischer Kontrolle statt. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch das Serum gewonnen.

P 2: Um das TTR in Serum und Aszites von Frauen mit einem Ovarialkarzinom zu untersuchen, standen Proben von 48 Patientinnen zur Verfügung. Klassifiziert nach International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) befanden sich vier Patientinnen im Stadium I, zwei Stadium II, 28 Stadium III und 14 Stadium IV. Während der Erstoperation wurden unter sterilen Bedingungen Aszites und Gewebeproben des Tumors gewonnen. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch das Serum

abgenommen. Als Kontrollen dienten Serumproben 20 gesunder, postmenopausaler Frauen.

P 3: Es wurde das Serum von 18 polytraumatisierten Patienten (Injury Severity Score [ISS]: 34-66) mit verschiedensten Verletzungen untersucht. Dabei wurden die Blutproben innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Unfallereignis gewonnen, eine weitere Blutabnahme erfolgte am Tag 20 nach Trauma. Als Kontrolle dienten Serumproben von 20 gesunden Probanden, die in Bezug auf Alter und Geschlecht mit dem Patientenkollektiv vergleichbar waren.

#### *Immunopräzipitation von TTR und RBP und Analyse mittels Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF-MS)*

15 µl Serum und FF oder Aszites wurden mit 15 µl TTR- oder RBP-Antikörper und 15 µl Sephadex G15 versetzt und für zwei Stunden bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation (15.000 x g; 15 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet drei Mal mit Phosphate Buffer Saline (PBS) gewaschen und letztlich in 5 µl PBS resuspendiert. Die Massenspektren wurden mittels Reflex II MALDI-TOF-MS im linearen Modus bei 20kV Beschleunigungsspannung mit gesättigter Sinapinsäure als Matrix ermittelt. Für die Ionisation wurde ein Nitrogenlaser verwendet. Der Probenauftrag erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde 1µl der Probe auf dem Probenhalter getrocknet, im Anschluss zweimal 0,5 µl gesättigte Sinapinsäure als Matrix auf die Probe gegeben.

#### *Quantitative Analytik für TTR, RBP und CRP*

Mittels enzyme-linked-sorbent-immunoassay (ELISA) wurden für die Studien P2 und P3 die Konzentrationen an TTR in Serum bzw. Aszites bestimmt. Zusätzlich wurde für die Publikation 2 in Serum und Aszites der Gehalt an RBP mittels ELISA

determiniert. Ein semiquantitativer Nachweis von RBP und TTR mittels Western-Blot erfolgte in Serum und Follikelflüssigkeit der Frauen nach Hormonsstimulation (P1). Die Konzentrationen an CRP in Serum und Aszites (P2 und P3) wurden mittels hochsensitivem turbimetrischem Immunoassay, unter Verwendung von latexgekoppeltem Antikörper, bestimmt.

#### *weitere Methoden*

P1: Ein massenspektrometrisches Proteinscreening wurde mittels oberflächenabhängiger Chiptechnologie (surface enhanced laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry [SELDI-TOF-MS]) durchgeführt.

P2: Immunohistochemisch wurde mittels indirekter Peroxidaseimmunfärbung TTR im Tumorgewebe visualisiert.

P3: Um die antioxidative Kapazität zu messen, kam ein Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) – Assay zum Einsatz. Die Carotenoidgehalte ( $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin, Lutein, Zeaxanthin, Canthaxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin, Lycopin) und  $\alpha$ -Tocopherol wurden unter Verwendung einer reversed phased (rp)-High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Anlage, beruhend auf einem Gradienten, determiniert.

#### *Statistik*

Zur statistischen Analyse der Daten wurde die Statistiksoftware SPSS (Hersteller SPSS, Version 10.01) verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Daten zu P2 konnten aufgrund des Vorliegens einer Normalverteilung mittels t-Test statistisch bewertet werden. Die Bewertung der Datengruppen P1 und P3 erfolgte mittels nichtparametrischer Tests (Mann-Whitney U-Rank Test, Wilcoxon Test). Ein  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant bewertet.

## Ergebnisse

P1: Zwischen Serum und FF konnten signifikante Unterschiede im Proteinspektrum massenspektrometrisch detektiert werden. Vier Proteine, Haptoglobin  $\alpha$ 1, Haptoglobin  $\alpha$ 2, Haptoglobin 1 und Transthyretin wurden identifiziert. TTR zeigte im Rahmen des Proteinscreenings in der FF ein intensiveres Signal als im Serum, wurde anschließend isoliert und seine Mikroheterogenität untersucht. In Serum und FF führte die Immunopräzipitation von RBP zur Anreicherung des typischen RBP-TTR-Komplexes, während die Immunopräzipitation von TTR ausschließlich zur Anreicherung von TTR führte. Es zeigten sich ein identisches TTR-Muster in Serum und FF (Abbildung 1). Vier Hauptpeaks wurden in der FF registriert. Diese Signale stellen die native, die S-cysteinylierte, die S-cysteinglycinierte und die S-glutathionylierte Form des TTR dar (Tabelle 1). Die Modifikation des TTR-Moleküls an Position Cys10 wurde verifiziert mittels einer Behandlung mit Dithioeritol (DTT). Dies resultierte in einem Shift zur nativen TTR-Form.

P2: Bei Frauen mit einem Ovarialkarzinom sind die Serumkonzentrationen an TTR und RBP signifikant niedriger als bei gesunden postmenopausalen Frauen ( $p < 0.01$ ). Steigende CRP-Gehalte im Serum sind assoziiert mit geringeren TTR- ( $P = 0.08$ ) und RBP-Konzentrationen ( $p < 0.05$ ). Die Konzentrationen an TTR und RBP im Aszites sind substantiell kleiner als im Serum ( $p > 0.01$ ). In der Aszitesflüssigkeit konnten keine FIGO-Stadium-abhängigen Änderungen der TTR- oder RBP-Spiegel nachgewiesen werden, während im Serum mit steigendem Stadium der Erkrankung die Konzentrationen an TTR und RBP tendenziell sinken.

Die Immunopräzipitation von TTR führte zu einer Anreicherung des Proteins, welches massenspektrometrisch aufgearbeitet die typischen vier Hauptpeaks (Tabelle 1) zeigte. Zwischen Serum und Aszites konnte hinsichtlich der Mikroheterogenität von

TTR kein Unterschied dargestellt werden (Abbildung 1). Nach Behandlung des TTR mit DTT zeigte sich ein Shift zur nativen Form. Im Tumorgewebe konnten diffuse Immunfärbungen lediglich in den Blutgefäßen, Einblutungen oder Plasmainsudationen visualisiert werden. Keine positive Reaktion auf TTR-Antikörper konnte innerhalb von Epithelzellen der Tumorgewebeproben gezeigt werden.

P3: Bei den polytraumatisierten Patienten konnten hinsichtlich der Serumkonzentrationen von TTR kein Unterschied zwischen den ersten 24 Stunden und dem Tag 20 nach dem Trauma festgestellt werden, während die CRP-Spiegel sich im Verlauf der 20 Tage tendenziell verringerten. Nach Immunopräzipitation des TTR wurden massenspektrometrisch die typischen vier Hauptpeaks detektiert (Tabelle 1). Die Modifikation des TTR-Moleküls an Position Cys10 wurde verifiziert mittels einer Behandlung mit DTT, was in einem Shift zur nativen TTR-Form resultierte. Die Molekulargewichte der einzelnen TTR-Modifikationen zeigten keinen Unterschied zwischen den zwei Messzeitpunkten, während 14 von 18 Patienten eine vermehrte Dominanz des S-cysteinglycinylierten TTR aufwiesen, welche sich innerhalb der 20 Tage wieder normalisierte (Abbildung 1). Dies wurde verdeutlicht durch die Berechnung der Peakhöhen in Relation zum S-cysteinylierten TTR (100%). Während diese Relation für die S-cysteinglycinylierte TTR-Form gesunder Kontrollen  $39 \pm 8 \%$  betrug, ergab sich bei polytraumatisierten Patienten innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Unfall eine signifikant unterschiedliche Relation von  $90 \pm 49 \%$  ( $p < 0.05$ ). Nach 20 Tagen betrug diese Relation lediglich noch  $65 \pm 30 \%$  und unterschied sich statistisch nicht mehr von der Kontrollgruppe. Die 14 Patienten, die diese Veränderung der Mikroheterogenität verstärkt aufwiesen, unterschieden sich in den Konzentrationen an Trolox signifikant ( $p < 0.05$ ). An Tag 20 nach dem Unfallgeschehen waren die Troloxwerte der Patienten signifikant höher als innerhalb

der ersten 24 Stunden nach dem Unfall ( $p < 0.05$ ). Die Carotenoidkonzentrationen waren unabhängig von der posttranslationalen Veränderung des TTR und vom Zeitpunkt nach dem Unfall, während die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Serum der Patienten kurz nach der Aufnahme in die Klinik signifikant geringer waren als 20 Tage später. Sieben der Patienten entwickelten nach dem Unfall eine Infektion, alle Patienten mit Infektion zeigten die Modifikation am TTR.

Tabelle 1: Molekulargewichte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der vier relevanten Hauptpeaks des TTR-Moleküls nach interner Kalibrierung auf der MALDI-TOF-MS in Dalton.

	Serum IVF	FF	Serum OCA	Aszites	Serum PT
TTR	13756 $\pm$ 11	13776 $\pm$ 18	13758 $\pm$ 7	13753 $\pm$ 17	13757 $\pm$ 6
cysTTR	13881 $\pm$ 9	13900 $\pm$ 16	13876 $\pm$ 13	13877 $\pm$ 13	13877 $\pm$ 7
cysglycTTR	13934 $\pm$ 6	13961 $\pm$ 20	13924 $\pm$ 21	13927 $\pm$ 11	13934 $\pm$ 6
glutTTR	14077 $\pm$ 6	14101 $\pm$ 18	14062 $\pm$ 24	14043 $\pm$ 27	14056 $\pm$ 15

*FF = Follikelflüssigkeit*

*IVF = In-Vitro-Fertilisation*

*OCA = Ovarialkarzinom*

*PT = Polytrauma*



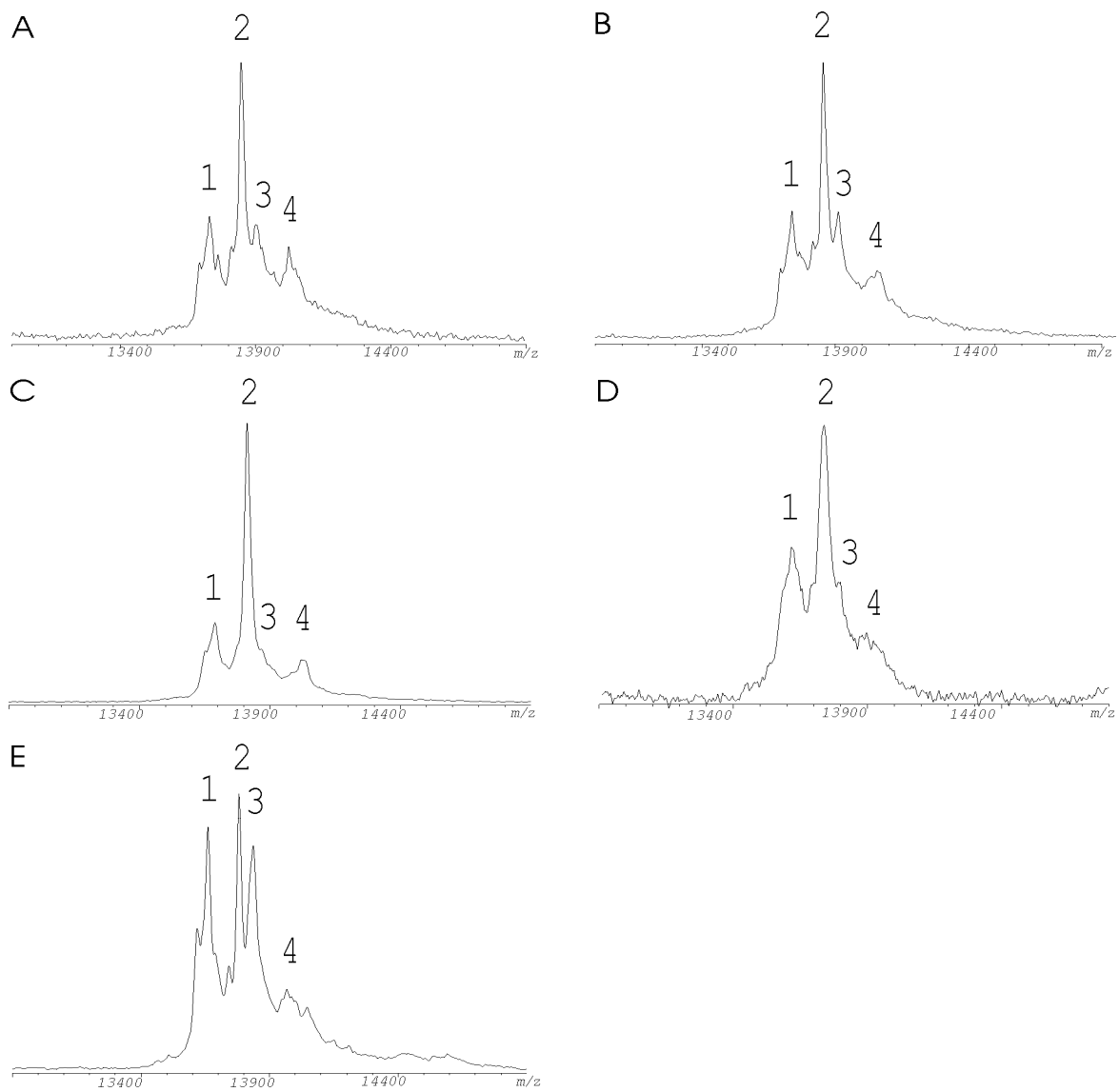


Abbildung 1: Vergleichende Darstellung der Mikroheterogenität von TTR (1 = natives TTR; 2 = S-cysteinyliertes TTR; 3 = S-cysteinglycinyliertes TTR; 4 = S-glutathionyliertes TTR) im Serum gesunder, hormonstimulierter Frauen (A), in der FF (B), im Serum von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom (C), im Aszites (D) und im Serum polytraumatisierter Patienten (E).

## Diskussion

Die drei vorgelegten Studien setzen sich mit der physiologischen und/oder der diagnostischen Bedeutung der Mikroheterogenität von TTR auseinander. Physiologisch ist TTR vor allem an Transportprozessen im Blut beteiligt. Das TTR-Molekül ist ein Tetramer mit einer Molmasse von 55 kD, welches aus vier Monomeren zusammengesetzt ist. Je TTR-Tetramer können zwei Moleküle Thyroxin gebunden werden und an jedem Monomer kann theoretisch ein – mit Retinol beladenes – RBP angelagert werden, physiologisch liegt aber ein 1:1 molares Verhältnis vor<sup>1</sup>. Als viszerales Protein wird TTR zunächst als Einzelstrangpolypeptid zu circa 90 Prozent in der Leber synthetisiert und hauptsächlich im Endoplasmatischen Reticulum zu Tetrameren umgelagert. Für die Oligomerisation von Transthyretin sind die Spaltung eines Signalpeptides und einige zelluläre Faktoren notwendig, wie zum Beispiel das luminaire Umfeld des Endoplasmatischen Retikulum<sup>2</sup>. Die TTR-Synthese der Leber kann durch proteinaufnahme, Glucocorticoide und Cytokine, wie Interleukin 1 und Interleukin 6 reguliert werden. Solche Cytokine rufen ein Absinken der Plasmakonzentrationen hervor<sup>3</sup>, sind beteiligt an der Akutphasenantwort und verantwortlich für Fieber, Proteolyse der Muskulatur und für ein breites Spektrum synergistischer und/oder antagonistischer Effekte während der Immunantwort des gestressten Individuums<sup>4</sup>. Oxidativer Stress entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen Systemen, die reaktive Sauerstoffspezies auf- bzw. abbauen, gestört ist. Die metabolischen Konsequenzen von akuten Stresszuständen sind umfangreich in der Literatur beschrieben. Chronisch oxidativer Stress ist ebenfalls mitursächlich für zahlreiche Erkrankungen, andererseits stellen chronische Erkrankungen selbst einen andauernden Stressfaktor dar. Oxidativer Stress führt vermutlich zu Änderungen der Mikroheterogenität von TTR. Die Publikationen der vorliegenden Dissertationsschrift stellen das negative

Akutphasenprotein TTR in den Kontext eines physiologischen Ausnahmezustandes (hormoninduzierte Superovulation), eines chronischen Stresszustandes (Ovarialkarzinom) und eines akuten Stresszustandes beim Polytraumatisierten und beleuchten dabei neben den bekannten Quantitätsänderungen auch die Mikroheterogenität des Proteins vor dem Hintergrund moderner Proteomforschung.

Das Proteom ist eine hochdynamische Größe, die abhängig vom physiologischen oder pathophysiologischen Status einer Zelle oder eines Gewebes ist. Der Begriff *Proteomics* umfasst die Untersuchung exprimierter Proteine, inklusive ihrer Identifizierung und der Aufklärung der Beziehung zwischen Struktur und Funktion. Modifikationen an Proteinen können auf verschiedenen Ebenen entstehen. So kann es einerseits zu einer Veränderung auf Genebene durch einen Austausch von Aminosäuren kommen, andererseits besteht die Möglichkeit posttranslationaler Modifikationen auf Proteinebene beispielsweise durch Phosphorylierungen oder Glykosylierungen<sup>5</sup>. Posttranslationale Modifikationen von Proteinen können deren Interaktionen mit anderen Plasmaproteinen beeinträchtigen und Einfluss auf Aspekte des Metabolismus des Proteins nehmen, wie zum Beispiel auf dessen Rezeptorbindung, Gewebeaufnahme, Abbau und Ausscheidung. Durch die Anwendung von Proteomics ergibt sich auf Proteinebene die Möglichkeit individuelle Erkrankungsprozesse gezielt zu bewerten<sup>6</sup>. Es ist bekannt, dass sich unter Umständen die Konzentration eines spezifischen Proteins nicht signifikant ändert, wobei dessen Funktion durch das Entstehen posttranslationaler Modifikationen beeinflusst sein kann<sup>7-9</sup>. Das negative Akutphasenprotein TTR ist im Kontext unterschiedlichster Erkrankungen hinsichtlich seiner empfindlichen Reaktion auf akute und chronische Belastungen des Organismus untersucht worden<sup>10,11</sup>. Thiolkomponenten spielen eine signifikante Rolle bei der Minimierung der

zerstörerischen Konsequenzen sauerstoffaktivierender Prozesse in der Zelle, die sie durch ihre Oxidation zu Disulfiden reduzieren. Einmal gebildet, können gemischte Disulfide entstehen, die dann gebunden an Thiolreste von Proteinen vorliegen können und dort das Protein vor weiteren, irreversiblen Modifikationen schützen. Posttranslationale Modifikationen des TTR treten am freien Cysteinrest in Position 10 des monomeren TTR (Cys<sub>10</sub>) auf<sup>12,13</sup> und konnten sowohl in Serum und FF hormonstimulierter Frauen (P1), als auch in Serum und Aszites von Frauen mit einem Ovarialkarzinom (P2) und im Serum von Patienten nach einem Polytrauma (P3) nachgewiesen werden. Im normal gefalteten tetramerschen Protein befindet sich ein Cys<sup>10</sup>-Rest an den offenen Seiten am Beginn der helicalen Regionen, wo Cysteinylierungen und Gluthationylierungen zu beobachten sind<sup>14</sup>. Man unterscheidet unter anderem neben dem unmodifizierten TTR die S-sulfonierte Form, die S-cysteinylierte Form, die S-homocysteinylierte Form, die S-cysteinglycinierte Form und die S-gluthationylierte Form des TTR<sup>15,16</sup>. Zwischen den untersuchten Seren und den Körperflüssigkeiten FF (P1) und Aszites (P2) konnte kein Massenunterschied hinsichtlich dieser Strukturen detektiert werden.

Für die Veröffentlichung P1 wurde in Serum und FF neben der Mikroheterogenität des TTR auch die des Retinol-Bindungsproteins (RBP) analysiert, welches in Bezug auf die Massen mit Ergebnissen von Jaconi et al. korrespondiert<sup>17</sup>, der drei verschiedene molekulare RBP-Formen beschreibt: die Vollängenform und die beiden verkürzten Formen des(<sup>182</sup>Leu)RBP und des(<sup>182</sup>Leu-<sup>183</sup>Leu)RBP, welche auch als RBP<sub>1</sub> und RBP<sub>2</sub> bezeichnet werden. RBP ist ein Protein aus 183 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von 21 kDa<sup>18</sup>. TTR und RBP waren zuvor in einer Studie, die Serum und FF mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersuchte, als Marker für Follikelqualität postuliert worden<sup>19</sup>. Beide Proteine sind am

Retinoltransport beteiligt. Retinol ist für die Reproduktion essentiell und Retinoide spielen eine Rolle bei der ovariellen Steroidsynthese, der Eizellreifung und der frühembryonalen Entwicklung<sup>20</sup>. Schweigert & Zucker<sup>21</sup> und später Brown et al.<sup>22</sup> wiesen Retinol und RBP im bovinen Follikel nach. Interessanterweise konnten beide Studien belegen, dass die Konzentrationen an Retinol und RBP im nichtatretischen Graaf'schen Follikel höher sind als in den kleinen atretischen Follikeln. RBP-mRNA und immunreaktives RBP konnten in Granulosazellen, Thekazellen, Kumuluszellen und Blutgefäßen um den Follikel nachgewiesen werden<sup>22,23</sup>, so dass neben einem passiven Transfer eine lokale Synthese nicht auszuschließen ist. Da die Mikroheterogenität von RBP und TTR in Serum und FF identisch ist, könnten die quantitativen Differenzen durch die Permeabilität der Blut-Follikel-Schranke begründet werden, trotzdem bedeutet aber auch eine Synthese an verschiedenen Orten (z.B. Leber und Granulosazellen) nicht unbedingt eine Modulation der Mikroheterogenität.

Neben der Untersuchung der Mikroheterogenität von TTR und RBP wurde für die erste Veröffentlichung (P1) ein Peptid- und Proteinscreening mittels oberflächenabhängiger Chiptechnologie massenspektrometrisch (SELDI-TOF-MS) durchgeführt. Genaue Kenntnisse der Peptid- und Proteinzusammensetzung der FF könnten nicht nur ein weitergehendes Verständnis der Funktionen des Ovars liefern, sondern auch neue Einblicke in die Möglichkeiten der Nutzung solcher Peptide und Proteine als Biomarker, vor allem im Hinblick auf die Optimierung des Selektionsprozesses während der IVF, liefern.

Im Rahmen der zweiten Publikation wurde ein chronischer Stresszustand für den Organismus im Hinblick auf Änderungen der Mikroheterogenität von TTR untersucht.

Das Ovarialkarzinom ist in Westeuropa und den USA der dritthäufigste maligne Tumor der Frau. Für den Bereich der Europäischen Union geht man von 15-20 Neuerkrankungen/100.000/Jahr aus<sup>24</sup>. Die Mehrzahl der Ovarialkarzinome (über 90 Prozent) sind sporadische Erkrankungen ohne genetischen Hintergrund. Der gegenwärtig akzeptierte Serummarker (Cancer Antigen-125) hat den großen Nachteil, nicht sensitiv genug zu sein. Lediglich 50 Prozent der Ovarialkarzinome im Frühstadium können mit diesem Marker erkannt werden<sup>25</sup>. Die meisten Biomarker haben geringe Sensitivitäten und Spezifitäten und nur einen kleinen prädiktiven Wert<sup>26</sup>. Derzeit wird das Ovarialkarzinom bei mehr als 80 Prozent der Patienten in einem späten Stadium diagnostiziert, zwei Drittel dieser Frauen überleben die nächsten fünf Jahre nicht<sup>27</sup>. Die Überlebenschance von Frauen mit einem Stadium I des Ovarialkarzinoms beträgt für die selbe Zeitspanne über 90 Prozent und die meisten dieser Patienten werden allein durch den chirurgischen Eingriff geheilt<sup>27-29</sup>. Eine Diagnose im Frühstadium ist daher erstrebenswert, auch weil eine Behandlung ohne chemotherapeutische Methoden neben dem direkten Einfluss auf die Mortalität sich positiv auf die Ökonomie auswirken würde<sup>30</sup>.

Die in Serum und Aszitesflüssigkeit von 48 Frauen mit einem Ovarialkarzinom diagnostizierten, im Vergleich zu gesunden postmenopausalen Frauen reduzierten Serumkonzentrationen an TTR und RBP reflektieren die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen<sup>31</sup>. Da TTR traditionell ein Marker für Malnutrition ist, müssen die reduzierten Serumkonzentrationen Krebskranker an TTR im engen Zusammenhang mit deren Appetitlosigkeit und dem daraus resultierenden Gewichtsverlust diskutiert werden, was zusätzlich zu einem verminderten Ansprechen der Patientinnen auf die Chemotherapie und einer geringeren Lebenserwartung führt<sup>32,33</sup>. In der Studie P2 konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen TTR- und RBP-Konzentrationen

im Serum und dem inflammatorischen Status (definiert anhand des CRP-Gehaltes im Serum) hergestellt werden, was als Konsequenz einer cytokininduzierten reduzierten Synthese der negativen Akute-Phase-Proteine in der Leber zu bewerten ist<sup>34</sup>. Neben der klassischen Bewertung der Konzentrationen, konnte im Rahmen der Analyse der Mikroheterogenität von TTR und RBP kein Unterschied zwischen gesunden Frauen und solchen mit einem Ovarialkarzinom detektiert werden und dementsprechend auch keine stadienabhängige Modifizierung der Proteine nachgewiesen werden. Die identische Mikroheterogenität von TTR und RBP in Serum und Aszites und das Fehlen von immunreaktiven TTR im Tumorgewebe weisen darauf hin, dass beide Proteine mittels passiven Transfers in die Aszitesflüssigkeit gelangen. Die Anwesenheit von TTR und RBP beruht auf einer zunehmenden Permeabilität der Kapillaren und findet wahrscheinlich nicht individuell, sondern als RBP/TTR-Komplex statt<sup>35</sup>. Der TTR-RBP-Komplex ist ein klassisches Beispiel für eine Protein-Protein-Interaktionen, deren Verständnis Voraussetzung für die Charakterisierung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse ist<sup>36</sup>. Neuere Untersuchungen zeigen z. B., dass TTR proteolytische Aktivität besitzt, die jedoch bei einer Komplexbildung mit RBP verloren geht<sup>37</sup>. Modifikationen an verschiedenen Stellen des TTR-Moleküls können sowohl die Monomerbildung des TTR und die Interaktion von RBP und Retinol als auch die Komplexbildung zwischen TTR und RBP beeinflussen. Durch Modifikationen am Cys<sub>10</sub> kann es zu einer Destabilisierung der S-Hydrogen-Bindung zwischen Cys<sub>10</sub> und Gly<sub>57</sub> des TTR und damit zu einer Destabilisierung des gesamten RBP/TTR-Komplexes kommen<sup>38</sup>.

Um den chronischen Stress bei Erkrankung an einem Ovarialkarzinom einem akuten Stresszustand gegenüber stellen zu können, wurde die Mikroheterogenität von TTR im Serum von polytraumatisierten Patienten untersucht (P3). Das Polytrauma ist als

Kombinationsverletzung definiert, wobei mehrere Körperregionen oder mindestens zwei Organsysteme betroffen sind, mindestens eine der Verletzungen oder die Kombination mehrerer ist potentiell lebensbedrohlich. Das Trauma ist die häufigste Todesursache in der Altersgruppe der ein- bis 34-jährigen<sup>39</sup> und von allen Traumen hat das Polytrauma die ungünstigste Prognose, da es unter anderem das Verletzungsmuster des Schädel-Hirn-Traumas einschließt, welches in der Regel prognoselimitierend ist<sup>40,41</sup>. Aus dem Polytrauma ergeben sich gesundheitliche, soziale und wirtschaftliche Folgen. Neben den sichtbaren Verletzungsfolgen haben auch die psychischen Störungen mit Angstzuständen, Depression oder Schuldgefühlen ganz erhebliche Bedeutung, die unter dem Begriff der posttraumatischen Stresstörungen zusammengefasst werden. Die dritte Publikation greift auf der Basis der Bewertung der Mikroheterogenität von TTR die Diskussion um das Langzeitoutcome polytraumatisierter Patienten auf. Die für P2 beschriebene negative Korrelation zwischen CRP und TTR im Serum wurde bei den Polytraumapatienten zu beiden untersuchten Zeitpunkten (innerhalb der ersten 24h und nach 20 Tagen) bestätigt. Der zweite Zeitpunkt, der Tag 20 nach dem Unfall, zeigt noch keine Normalisierung in den CRP- und TTR-Konzentrationen verglichen mit Kontrollwerten. Zu beiden Messzeitpunkten unterscheiden sich die Serumgehalte an TTR nicht. Die Mikroheterogenität des Proteins wurde dagegen beeinflusst. Es wurde ein signifikanter Shift zur Dominanz der cysglycTTR-Variante direkt nach dem Unfall detektiert, der am Tag 20 nach dem Unfall nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Normalerweise ist in gesunden humanen Serumproben cystTTR dominant. Interessant ist, dass sich die Konzentrationen an Trolox (ein hydrophiles Vitamin-E-Analogon) signifikant unterscheiden bei Patienten mit dieser Modifikation von denen ohne Modifikation. Dies legt die Vermutung nahe, dass es einen engen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem Auftreten der



posttranslationalen TTR-Modifikation gibt. Der Organismus von Mensch und Tier hat Abwehrmechanismen, um den Körper vor oxidativen Schädigungen zu schützen. Antioxidantien, wie z. B. Carotenoide und  $\alpha$ -Tocopherol, binden reaktive Sauerstoffverbindungen, indem sie stabile Radikale formen<sup>42</sup>. Teilweise zeigten sich bei den untersuchten polytraumatisierten Patienten substanzielle negative Effekte in Bezug auf den Caroteinidgehalt des Serum im Vergleich zu gesunden Menschen. Es bleibt aber zusätzlich festzuhalten, dass diese Ergebnisse assoziiert sind mit einer verminderten Aufnahme mit der Nahrung und mit metabolischen Veränderungen während der Akutphase. Im Zuge der parenteralen Ernährung der ICU-Patienten wird lediglich  $\alpha$ -Tocopherol verabreicht und es ist anzunehmen, dass die leichte Besserung des antioxidativen Status der Patienten am Tag 20 nach dem Unfall vor allem dadurch bedingt wird.

Bereits in früheren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Modifikationen der Mikroheterogenität von TTR und oxidativem Stress hergestellt<sup>43,44</sup>. Die in P3 publizierte Veränderung des Ratios von cystTTR zu cysglycTTR ist außer mit dem Auftreten von oxidativen Stress auch mit dem Auftreten von Entzündungen assoziiert. Bei allen Patienten, die eine Inflammation entwickelten, konnte ein verändertes TTR-Molekül nachgewiesen werden. Die funktionellen Konsequenzen dieser vorübergehenden Modifikation nach einem Polytrauma sind derzeit noch unklar, es ist aber mit Spätfolgen zu rechnen. Kürzlich wurde eine Veränderung des Ratios von nativem TTR zu cystTTR als hilfreich für die Diagnose von Alzheimer postuliert<sup>45</sup>. Die Alzheimer Erkrankung ist charakterisiert durch die Bildung intrazellulärer Neurofibrillenbündel<sup>46</sup> und extrazellulärer amyloider Plaques, die durch die Ablagerung unlöslicher Amyloidfibrillen<sup>47</sup> entstehen. Weiterhin ist bewiesen, dass Modifikationen, wie sie bei den Polytraumapatienten beschrieben

werden konnten, die Amyloidogenität von TTR beeinflussen<sup>13,15</sup>. Bis zu 70 verschiedene Punktmutationen sorgen beim TTR in zahlreichen Fällen dafür, dass es bei den betroffenen Menschen zum Auftreten von Amyloidosen kommt<sup>38,48,49</sup>. Die Bildung amyloidogener TTR-Fibrillen ist bedingt durch eine Destabilisierung des Homotetramers. Diese Destabilisierung kann durch eine Modifizierung der zentralen Bindungsseite des Thyroxin mittels kleiner Moleküle<sup>50</sup> oder durch eine posttranslationale Modifikation am Cys10 entstehen. Solche posttranslationalen Modifikationen, die genetische Gründe haben können, verändern die dreidimensionale Struktur<sup>12</sup>. Modifikationen wie S-Sulfonierung, S-Thiolation und ein vermehrtes Auftreten von doppelt oxidiertem TTR wurden bereits in den Kontext amyloidogener Erkrankungen gestellt<sup>16,51</sup>. Zu diesem Zeitpunkt bleibt es spekulativ, ob und inwieweit eine Modifikation des TTR-Moleküls auf lange Zeit mit posttraumatischen Stresstörungen, dem Auftreten von Amyloidose, der Alzheimer Erkrankung oder anderen neurologischen Störungen assoziiert ist.

Zusammenfassend kann durch die drei diskutierten Studien belegt werden, dass erstens in jedem Fall posttranslationale Modifikationen am TTR Molekül auftreten (cysTTR, cysglycTTR, glutTTR), dass zweitens die Mikroheterogenität des Proteins in den verschiedenen untersuchten Körperflüssigkeiten (Serum, FF, Aszites) identisch ist und dass drittens ein akuter oxidativer Stress Veränderungen im TTR-Molekül induziert, während diese bei chronischer Erkrankung (Ovarialkarzinom) nicht beobachtet werden konnten.

## Literaturangaben

1. Blake, C. C. & Oatley, S. J. Protein-DNA and protein-hormone interactions in prealbumin: a model of the thyroid hormone nuclear receptor? *Nature* 268, 115-20. (1977).
2. Bellovino, D., Morimoto, T., Pisaniello, A. & Gaetani, S. In vitro and in vivo studies on transthyretin oligomerization. *Exp Cell Res* 243, 101-12. (1998).
3. Murakami, T. et al. Acute-phase response of mRNAs for serum amyloid P component, C-reactive protein and prealbumin (transthyretin) in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 155, 554-60. (1988).
4. O'Brien, S. M., Scott, L. V. & Dinan, T. G. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Hum Psychopharmacol* 19, 397-403. (2004).
5. Veenstra, T. D., Prieto, D. A. & Conrads, T. P. Proteomic patterns for early cancer detection. *Drug Discov Today* 9, 889-97. (2004).
6. Chambers, G., Lawrie, L., Cash, P. & Murray, G. I. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol.* 192, 280-8. (2000).
7. Haynes, P. et al. Proteins of rat serum: I. Establishing a reference two-dimensional electrophoresis map by immunodetection and microbore high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis.* 19, 1484-92. (1998).
8. Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C. & Appel, R. D. Proteomics and its trends facing nature's complexity. *Proteomics.* 2, 807-12. (2002).
9. Molloy, M. P. & Witzmann, F. A. Proteomics: technologies and applications. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 1, 23-39. (2002).

10. Ingenbleek, Y. Historical aspects and perspectives in transthyretin research. *Clin Chem Lab Med* 40, 1181-2. (2002).
11. Ingenbleek, Y. & Young, V. R. Significance of transthyretin in protein metabolism. *Clin Chem Lab Med* 40, 1281-91. (2002).
12. Zhang, Q. & Kelly, J. W. Cys10 mixed disulfides make transthyretin more amyloidogenic under mildly acidic conditions. *Biochemistry* 42, 8756-61. (2003).
13. Kishikawa, M., Nakanishi, T., Miyazaki, A. & Shimizu, A. A simple and reliable method of detecting variant transthyretins by multidimensional liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Amyloid*. 6, 48-53. (1999).
14. Schweigert, F. J., Wirth, K. & Raila, J. Characterization of the microheterogeneity of transthyretin in plasma and urine using SELDI-TOF-MS immunoassay. *Proteome Sci* 2, 5. (2004).
15. Lim, A. et al. In vitro and in vivo interactions of homocysteine with human plasma transthyretin. *J Biol Chem* 278, 49707-13. Epub 2003 Sep 24. (2003).
16. Lim, A. et al. Identification of S-sulfonation and S-thiolation of a novel transthyretin Phe33Cys variant from a patient diagnosed with familial transthyretin amyloidosis. *Protein Sci*. 12, 1775-85. (2003).
17. Jaconi, S., Rose, K., Hughes, G. J., Saurat, J. H. & Siegenthaler, G. Characterization of two post-translationally processed forms of human serum retinol-binding protein: altered ratios in chronic renal failure. *J Lipid Res*. 36, 1247-53. (1995).
18. Goodman, D. S. Plasma retinol-binding protein. *Ann N Y Acad Sci* 348, 378-90. (1980).
19. Anahory, T. et al. Identification of new proteins in follicular fluid of mature human follicles. *Electrophoresis*. 23, 1197-202. (2002).

20. Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C. & De Luca, L. M. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 80, 1021-54. (2000).
21. Schweigert, F. J. & Zucker, H. Concentrations of vitamin A, beta-carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. *J Reprod Fertil.* 82, 575-9. (1988).
22. Brown, J. A., Eberhardt, D. M., Schrick, F. N., Roberts, M. P. & Godkin, J. D. Expression of retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev.* 64, 261-9. (2003).
23. Mohan, M., Thirumalapura, N. R. & Malayer, J. Bovine cumulus-granulosa cells contain biologically active retinoid receptors that can respond to retinoic acid. *Reprod Biol Endocrinol.* 1, 104. (2003).
24. Runnebaum, I. B., Mollenkopf, A., Kreienberg, R. & Meerpoh, H. G. Epidemiologische und molekulargenetische Risikofaktoren beim Ovarialkarzinom. *Onkologe* 4, 1096-1100 (1998).
25. Jones, M. B. et al. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics.* 2, 76-84. (2002).
26. Hu, W., Wu, W., Kobayashi, R. & Kavanagh, J. J. Proteomics in cancer screening and management in gynecologic cancer. *Curr Oncol Rep* 6, 456-62. (2004).
27. Ozols, R. F. Outcome issues in ovarian cancer. *Oncology (Williston Park).* 9, 135-9. (1995).
28. Menon, U. & Jacobs, I. J. Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 12, 39-42. (2000).
29. Cohen, L. S., Escobar, P. F., Scharm, C., Glimco, B. & Fishman, D. A. Three-dimensional power Doppler ultrasound improves the diagnostic accuracy for ovarian cancer prediction. *Gynecol Oncol* 82, 40-8. (2001).

30. Petricoin, E. F. et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359, 572-7. (2002).
31. Mahlick, C. G. & Grankvist, K. Plasma prealbumin in women with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* 37, 135-40. (1994).
32. Zhang, Z. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 64, 5882-90. (2004).
33. Slaviero, K. A., Read, J. A., Clarke, S. J. & Rivory, L. P. Baseline nutritional assessment in advanced cancer patients receiving palliative chemotherapy. *Nutr Cancer* 46, 148-57. (2003).
34. Abraham, K., Muller, C., Gruters, A., Wahn, U. & Schweigert, F. J. Minimal inflammation, acute phase response and avoidance of misclassification of vitamin A and iron status in infants--importance of a high-sensitivity C-reactive protein (CRP) assay. *Int J Vitam Nutr Res* 73, 423-30. (2003).
35. Blomhoff, R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev* 52, S13-23. (1994).
36. Rost, B., Liu, J., Nair, R., Wrzeszczynski, K. O. & Ofran, Y. Automatic prediction of protein function. *Cell Mol Life Sci.* 60, 2637-50. (2003).
37. Liz, M. A., Faro, C. J., Saraiva, M. J. & Sousa, M. M. Transthyretin, a new cryptic protease. *J Biol Chem.* 279, 21431-8. Epub 2004 Mar 19. (2004).
38. Takaoka, Y. et al. Cysteine 10 is a key residue in amyloidogenesis of human transthyretin Val30Met. *Am J Pathol* 164, 337-45. (2004).
39. White, R. J. & Likavec, M. J. The diagnosis and initial management of head injury. *N Engl J Med* 327, 1507-11. (1992).
40. Lehr, D. et al. Management of patients with severe head injury in the preclinical phase: a prospective analysis. *J Trauma* 42, S71-5. (1997).

41. Regel, G. et al. Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I Trauma Center. *J Trauma* 38, 70-8. (1995).
42. Jaeschke, H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 209, 104-11. (1995).
43. Kishikawa, M. et al. The peak height ratio of S-sulfonated transthyretin and other oxidized isoforms as a marker for molybdenum cofactor deficiency, measured by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta.* 1588, 135-8. (2002).
44. Tajiri, T. et al. Amyloid formation in rat transthyretin: effect of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 323, 129-37. (2002).
45. Biroccio, A. et al. Differential post-translational modifications of transthyretin in Alzheimer's disease: A study of the cerebral spinal fluid. *Proteomics.* 6, 2305-2313. (2006).
46. Bossy-Wetzler, E., Schwarzenbacher, R. & Lipton, S. A. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med.* 10, S2-9. (2004).
47. Serpell, L. C. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta.* 1502, 16-30. (2000).
48. Schwarzman, A. L. et al. Amyloidogenic and anti-amyloidogenic properties of recombinant transthyretin variants. *Amyloid.* 11, 1-9. (2004).
49. Saraiva, M. J. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum Mutat.* 17, 493-503. (2001).
50. Olofsson, A. et al. Capture of a dimeric intermediate during transthyretin amyloid formation. *J Biol Chem.* 276, 39592-9. Epub 2001 Aug 22. (2001).
51. Heegaard, N. H., Hansen, M. Z., Sen, J. W., Christiansen, M. & Westermark, P. Immunoaffinity chromatographic and immunoprecipitation methods combined with

mass spectrometry for characterization of circulating transthyretin. *J Sep Sci.* 29, 371-7. (2006).



## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Beate Gericke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Diagnostische und funktionelle Bedeutung der Mikroheterogenität von Transthyretin“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt hab.

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mitveröffentlicht.