

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Massenspektrometrische Untersuchung posttranslationaler
Modifikationen**

-

Deamidierung als ubiquitäres Phänomen

vorgelegt von

Hakan Sarioglu

aus Geislingen an der Steige

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. phil. Dr. med. habil. F. Lottspeich durchgeführt und von Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 22.5.2003

Hakan Sarioglu

Dissertation eingereicht am: 23.5.2003

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

2. Berichterstatter: PD Dr. Christoph Eckerskorn

Mündliche Prüfung am: 11.11.2003

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Sarioglu, H., F. Lottspeich, T. Walk, G. Jung, and C. Eckerskorn. 2000. Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins. *Electrophoresis* 21: 2209-2218.

Inhalt

Kapitel 1: Einleitung.....	1
1.1 Stand der Forschung.....	1
1.2 Aufgabenstellung dieser Arbeit.....	2
Kapitel 2: Theoretische Grundlagen.....	5
2.1 Von der Proteinanalytik zur Proteomanalyse.....	5
2.1.1 Strategien der Proteomanalyse	8
2.1.1.1 Überlegungen zur praktischen Durchführung eines Proteomansatzes.....	9
2.1.2 Definition der Fragestellung und exakte Festlegung der Ausgangs- bedingungen für die Proteomanalyse.....	10
2.1.3 Probenvorbereitung.....	11
2.1.4 Trennung der Proteine.....	11
2.1.5 Detektion und Quantifizierung der Proteine.....	12
2.1.6 Proteinchemische Charakterisierung der veränderten Proteine.....	13
2.1.7 Datenbankanalyse der Proteinmuster (Bioinformatik).....	15
2.1.8 Ausblick.....	16
2.2 Grundlagen und Bedeutung der 2D-Gelelektrophorese.....	20
2.2.1 Historisches.....	20
2.2.2 Theoretische Grundlagen.....	21
2.2.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	24
2.2.4 Ausblick: Die zukünftige Bedeutung der 2D-Gelelektrophorese.....	27
2.3 Posttranslationale Modifikationen und ihre Analytik.....	28
2.3.1 Analytik der posttranslationalen Modifikationen.....	28
2.3.2 Glykosylierungen.....	29

2.3.3 Analytik der an Proteinen gebundenen Oligosaccharide.....	31
2.3.4 Deamidierungen	31
2.4 Massenspektrometrie.....	34
2.4.1 Grundlagen und Übersicht über die verwendeten Techniken.....	34
2.4.1.1 Ionisierungsprinzip.....	35
2.4.1.1.1 Ionisierung von Biomolekülen mittels ESI-Technik.....	35
2.4.1.1.2 Ionisierung mittels der MALDI-Technik.....	38
2.4.1.2 Prinzip der Massentrennung.....	40
2.4.1.2.1 Massentrennung mit einem Quadrupolinstrument.....	40
2.4.1.2.2 Massentrennung mit einem Time-of-Flight-Instrument.....	41
2.4.2 Anwendungen in der Biotechnologie heute.....	42
2.4.2.1 Strukturanalyse mit ESI-Quadrupol-MS.....	44
2.4.2.2 Strukturanalyse mit MALDI-MS.....	47
2.4.2.3 Gebräuchliche Massenspektrometer und ihre Charakteristika.....	47
2.5 Bedeutung und Vorkommen der untersuchten Proteine.....	49
2.5.1 Haptoglobin	49
2.5.1.1 Geschichtliches.....	49
2.5.1.2 Struktur.....	49
2.5.1.3 Phänotypen.....	51
2.5.1.4 Biochemische Eigenschaften.....	52
2.5.1.5 Funktion.....	52
2.5.1.6 Haptoglobin-Hämoglobin-Bindung.....	53
2.5.2 β_2 -Microglobulin.....	55
2.6 Herstellung rekombinanter Proteine.....	57
2.6.1 Grundlagen und Stand der Technik.....	57
2.6.2 Prinzip der DNA-Klonierung	58
2.6.3 Restriktionsenzyme.....	60
2.6.4 Ligation der DNA-Moleküle.....	61
2.6.5 Klonierungsvektoren und ihre wichtigsten Merkmale	61

2.6.6 Anwendungen.....	62
------------------------	----

Kapitel 3: Experimenteller Teil.....64

3.1 Proteinchemische Methoden.....64

3.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel, Proteine und Enzyme.....	64
3.1.2 Geräte	67
3.1.2.1 Allgemeiner Laborbedarf.....	67
3.1.2.2 Gelelektrophorese.....	68
3.1.3 Reduktion und Alkylierung der untersuchten Proteine.....	68
3.1.4 Gelelektrophorese.....	69
3.1.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gele.....	69
3.1.4.1.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen.....	69
3.1.4.2 Native Gele.....	72
3.1.4.2.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-SDS-PAGE).....	72
3.1.4.2.1.1 Native Eindimensionale-Polyacrylamidgelelektrophorese (Native 1D-PAGE).....	73
3.1.4.3 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-SDS-PAGE).....	74
3.1.4.3.1 Probenvorbereitung.....	74
3.1.4.3.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	74
3.1.4.3.3 Äquilibration der fokussierten IEF-Streifen.....	76
3.1.4.3.4 Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	77
3.1.4.3.4.1 Vorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE.....	77
3.1.4.4 Gelfärbungen.....	78
3.1.4.4.1 Coomassie Blue.....	78
3.1.4.4.2 Silberfärbung.....	78
3.1.4.5 Elution aus IEF-Streifen.....	79
3.1.5 Enzymatische Spaltung von Proteinen in der Gelmatrix.....	80
3.1.6 Abtrennung der N-glykosidisch gebundenen Zuckereinheiten: Deglykosylierung mit PNGase F.....	80

3.1.7 Proteinsequenzanalyse:.....	81
3.1.7.1 N-Terminale Sequenzanalyse nach Edman:	81
3.1.8 Massenspektrometrie:	81
3.1.8.1 MALDI-MS.....	81
3.1.8.2 LC-ESI-MS.....	82
3.1.8.3 Nano-ESI-MS.....	83
3.1.8.4 FT-ICR-MS.....	84
3.1.9 Ausschlußchromatographie.....	85
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	86
3.2.1 Chemikalien, Enzyme, Medien und kommerziell erhältliche Kits.....	86
3.2.2 Enzymatische Modifikation von DNA.....	87
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	88
3.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	89
3.2.5 Polymerasekettenreaktion.....	89
3.2.6 DNA-Sequenzierung.....	90
3.2.7 Herstellung eines rekombinanten β_2 -Microglobulin.....	90
3.2.8 Proteinchemische Methoden II.....	91
3.2.8.1 Gewinnung von Lysaten aus E. coli und Aufreinigung des 6xHis-Tag- Proteins.....	91
3.2.8.2 SDS-PAGE von Proteinen.....	91
Kapitel 4: Ergebnisse.....	92
4.1 Vergleich von enzymatischen Spaltungen der untersuchten Proteine.....	92
4.1.1 Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine und deren einzelner Untereinheiten.....	92
4.1.2 Sequenzen aus Spaltungen mit Endoproteinasen (Lys-C, Asp-N, Trypsin) und deren Abdeckung mittels massenspektrometrischer Techniken.....	93
4.1.2.1 β_2 -Microglobulin.....	94
4.1.2.1.1 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus	

Spaltungen mit Lys-C.....	94
4.1.2.1.2 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Asp-N.....	95
4.1.2.1.3 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Trypsin.....	95
4.1.2.2 α_2 -Haptoglobin.....	96
4.1.2.2.1 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Lys-C.....	96
4.1.2.2.2 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Asp-N.....	97
4.1.2.2.3 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Trypsin.....	97
4.1.2.3 β -Haptoglobin.....	98
4.1.2.3.1 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Lys-C.....	98
4.1.2.3.2 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Asp-N.....	99
4.2 Glykosylierung als mögliche Ursache der Leiterbildung im Falle der Haptoglobin-β-Kette:.....	103
4.2.1 Oligosaccharidanalytik.....	103
4.2.2 Deglykosylierung des Proteins und anschließende Analytik.....	105
4.3 Ausschlußchromatographie zur Untersuchung möglicher Oligomerisierungsreaktionen der Haptoglobine.....	108
4.4 Bestimmung der Gesamtproteinmasse.....	111
4.5 Deamidierungen als chemischer Alterungsprozess.....	119

4.5.1 LC-ESI-MS im Neutralpuffersystem.....	119
4.5.2 Vergleich der Proteinpattern bei chemischen und enzymatischen Deamidierungsversuchen.....	123
4.5.3 Vergleich der Proteinpattern von rekombinanten und gepoolten Proteinproben anhand des β 2-Microglobulin.....	126
Kapitel 5: Diskussion.....	131
5.1 Strukturelle Aspekte der Deamidierungsreaktionen.....	131
5.2 In vitro Deamidierung von Proteinen.....	136
5.3 In vivo Deamidierung von Proteinen.....	137
5.4 Modell einer partiellen Deamidierung zur Erklärung der erhaltenen Spotpattern im 2D-Gel.....	139
5.5 Analytik der deamidierten Spezies.....	141
5.6 Deamidierung als ubiquitäres Phänomen.....	142
5.7 Zusammenfassung.....	146
Kapitel 6: Literaturverzeichnis.....	147

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

Mit der Bekanntgabe Craig Venters am 8. April 2000, die Firma Celera habe das menschliche Erbgut zu 99% sequenziert, ging eines der größten wissenschaftlichen Projekte der letzten Jahre erfolgreich zu Ende, das im Oktober 1990 mit dem Human Genome Project begonnen hatte. Ziel des ganzen Vorhabens war es die auf 100000 geschätzte Anzahl von menschlichen Genen mit seinen circa 3 Milliarde Basenpaare komplett durchzusequenzieren. Zwischenzeitlich sind schon komplette Genome einfacher Organismen, wie Bakterien (*Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*) oder Hefe als Eukaryontenvertreter durchsequenziert worden. Mittlerweile wurde das Erreichen des Zieles auch seitens des Human Genome Project offiziell bestätigt und die Sequenzierungsergebnisse am 12. Februar 2000 in einer Sonderausgabe der Zeitschrift Nature, die sich komplett dem Thema widmet veröffentlicht. Die Ergebnisse wurden in öffentlich zugänglichen Datenbanken gespeichert, und mit Hilfe von Bioinformatikern sollen „Softwaretools“ entwickelt werden, um Datenbanken sinnvoll nach gewünschten Informationen durchsuchen zu können.

Im Laufe des letzten Jahrzehntes hat sich jedoch zunehmend die Erkenntnis durchgesetzt, dass Informationen auf der Genomebene allein nicht für sämtliche Fragestellung der Biologie und Medizin ausreichend sind. Das lange vertretene Dogma „ein Gen, ein Protein, eine Funktion“ gilt heute nicht mehr. So kam es in den letzten Jahren zu einer Wiederentdeckung der Proteinanalytik (Lottspeich 1999). Dies liegt an den grundsätzlichen Unterschieden zwischen DNA- und Proteinebene und beinhaltet z. B. die Unmöglichkeit einer quantitativen Aussage über Proteinexpression von der mRNA-Ebene aus. Der Begriff Proteom fand deswegen großen Anklang, als ihn Marc Williams 1994 beim „2D Gel Elektrophoresis“-Meeting in Siena als „Proteinäquivalent zum Genom“ einführte. Während das Genom ein eher statisches Bild des Potentials eines Organismus geben kann, beschreibt das Proteom auf der Proteinebene mit seinen komplexen Regulationsnetzwerken sehr viel

dynamischere Prozesse. Die Proteomanalyse ist heutzutage von unschätzbare Bedeutung. Sie beschäftigt sich mit dem Proteinmuster eines Organismus, einer Zelle oder eines Organells unter den entscheidenden Faktoren Quantifizierung und exakt gefassten Definitionen der Randbedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt. Um dies zu erreichen, wird häufig ein subtraktiver Ansatz angewendet, der zwei oder mehrere definierte Zustände miteinander vergleicht und Aussagen über die Veränderungen an dem System treffen lässt.

Vor allem spielen posttranslationale Modifikationen bei diesen dynamischen Prozessen eine entscheidende Rolle und haben auf die Funktionen und Eigenschaften eines Proteins einen erheblichen Einfluss.

Aus diesem Grund ist die Aufklärung posttranslatonaler Modifikationen immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, und stellt aufgrund der Vielzahl und Art an möglichen Veränderungen eine große analytische Herausforderung dar.

1.2 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Die Thematik der vorliegenden Arbeit lässt sich anschaulich anhand der Abbildung eines silbergefärbten 2D-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese-(2D-Gel) Pattern von Blutplasma proteinen zeigen:

Wie man erkennen kann gibt es eine große Anzahl an Proteinen, speziell im höhermolekularen Bereich, die eine Auftrennung in mehrere Spots zeigen, auch Leitern oder „trains of spots“(Anderson 1991) genannt. Die Proteine, die zu einer Leiter gehören, wurden in Abbildung 1.1 zur besseren Übersicht mit einer Linie verbunden.

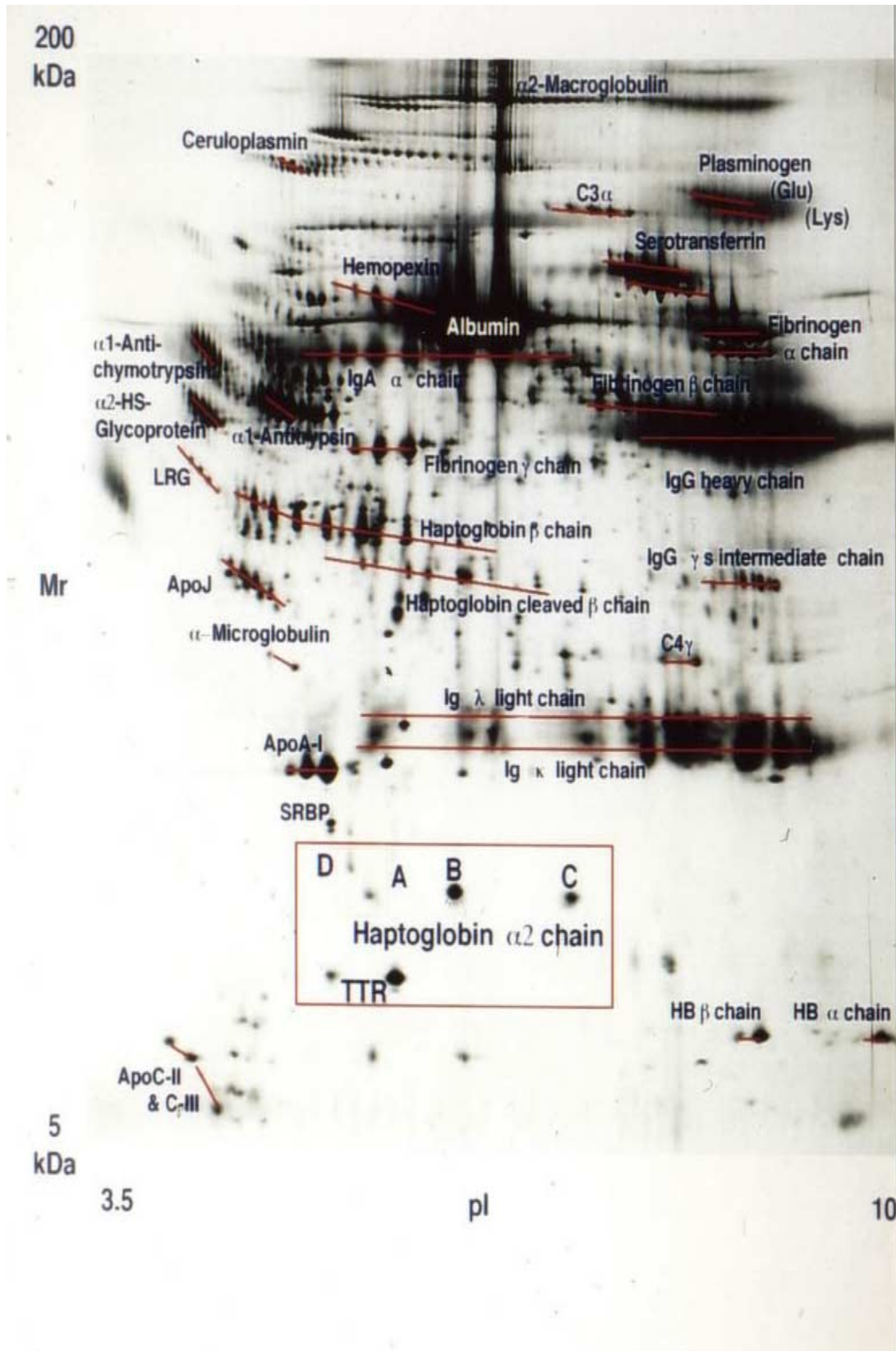


Abbildung 1.1.: Silbergefärbtes 2D-Gel Pattern von Blutplasma (Hochstrasser 1993)

Diese “charge-trains” sind Leitern von Proteinspots, die einem einzigen Protein jedoch mit unterschiedlicher Nettoladung zugeordnet werden können. Daher werden sie in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF) nach ihrer Gesamtladung aufgetrennt. Vor allem in 2D-Gelen von Blutplasma sind eine ganze Reihe solcher Leitern zu beobachten. In vielen Fällen lassen sich diese Aufspaltungen mit gängigen und häufig auftretenden posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen oder Acetylierungen erklären (Anderson 1977; Anderson 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine untersucht, für die es keine plausible Erklärung für das Auftreten der Leitern gab. Als Modellproteine wurden dabei das Haptoglobin mit seinen drei Untereinheiten α_1 -, α_2 - sowie β -Kette (siehe Abbildung 1.1.) und das β_2 -Microglobulin ausgewählt. Letzteres ist aufgrund geringerer Konzentrationen im Blutplasma in obiger Abbildung nicht zu sehen.

Für diesen Ansatz wurde als grundsätzliche Analysestrategie die Verbindung 2D-Gelelektrophorese mit der Flüssigchromatographie (LC)-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) angewandt. Die genaue Vorgehensweise dieser Strategie wird nachfolgend sowohl im Kapitel 2.1. „Von der Proteinanalytik zur Proteomchemie“ theoretisch als auch im Kapitel 3.1. „Methoden der Proteinchemie“ praktisch näher erläutert.

Eine schon bekannte posttranslationale Modifikation an der β -Kette des Haptoglobins, die N-Glykosylierung (Gerbeck 1967), erforderte eine an Proteine, die mit Zuckerketten modifiziert sind angepasste Analysestrategie.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit kristallisierte sich erst im Laufe der Arbeit heraus. Zur besseren Veranschaulichung der bis dahin gewonnenen Ergebnisse sollte ein rekombinantes β_2 -Microglobulin auf seine mögliche Leiterbildung untersucht werden. Um das β_2 -Microglobulin aus einer cDNA-Bibliothek zu klonieren und aufzureinigen, wurden molekularbiologische Techniken angewendet.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Von der Proteinanalytik zur Proteomanalyse

Das Wort "Protein" stammt aus dem Griechischen („proteos“) und kann mit „erstrangig“ übersetzt werden. Die Untersuchung dieser Makromoleküle, ihrer Struktur, Eigenschaften und Funktion beschäftigt Wissenschaftler schon seit mindestens zwei Jahrhunderten. 1777 wurde der Begriff Albumin zum ersten Mal erwähnt und beschrieb Substanzen, die beim Erwärmen vom flüssigen in den festen Zustand übergangen. Untersucht wurden dabei Casein, das Hühnereiweiß sowie der Blutbestandteil Globulin.

So waren es im Laufe der Jahrhunderte vor allem die Erfindungen neuer instrumenteller Methoden, wie Mikroskopie, Chromatographie oder Spektroskopie, die einen tieferen Einblick in die Welt der Proteine ermöglichten.

Ein großer Schritt zur modernen Analytik und zum Verständnis des Aufbaus von Proteinen waren die Arbeiten von Pehr Edman und Frederic Sanger zur Sequenzanalyse von Proteinen und Peptiden in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts (Edman 1950, Sanger 1951). Hiermit konnte gezeigt werden, dass Proteine eine gemeinsame und definierte Struktur aus kovalent gebundenen Einzelbausteinen, den Aminosäuren, aufweisen.

Einen regelrechten Boom in der Proteinanalytik lösten 1975 O'Farrell und Klose aus, als sie nie zuvor gesehene Bilder von Trennungen Tausender Proteine mittels zweidimensionaler (2D) Gelelektrophorese zeigten (Klose 1975, O'Farrell 1975). Eine hochauflösende Trennmethode, die Proteine selbst aus komplexen Gemischen wie Zellen, Geweben oder Körperflüssigkeiten trennen konnte, stand plötzlich zur Verfügung.

Ein Problem stellte jedoch die Analytik der aufgetrennten Proteine dar. Hier gab es erst Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wiederum eine Art Quantensprung, als man mit Hilfe der schon seit langem bekannten Massenspektrometrie Techniken entwickelte, die es ermöglichten, auch schwerflüchtige Biomoleküle in die Gasphase zu bringen und damit massenspektrometrisch messbar zu machen. Dies waren die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und die Matrix-unterstützte

Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS). Damit standen neben der N-terminalen Sequenz durch Proteinsequenatoren mit der Massenspektrometrie weitere umfassende Methoden zur Strukturaufklärung zur Verfügung.

Trotzdem mussten auch auf diesem Gebiet die Analysestrategien und -methoden weiter verfeinert werden, was im Laufe der Zeit durch Entwicklungen wie die genauere Analyse von enzymatisch aufgespaltenen Proteinen und deren Peptidgemisch, von MS-MS-Fragmentierungen oder Nanospray-ESI-Massenspektrometrie auch gelang.

Zugleich gab es auf dem Gebiet der Genomanalyse weltweite gemeinsame Anstrengungen, komplette Genome verschiedener Spezies durchzusequenzieren. So sind bereits seit geraumer Zeit komplette genomische Sequenzdaten von einfacheren Organismen wie Bakterien und darunter Prokaryonten wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Haemophilus influenza* (1995) sowie Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* (1996) oder *Caenorhabditis elegans* vorhanden.

Das ehrgeizigste Projekt war die Sequenzierung des kompletten humanen Genoms im Rahmen des „Human Genome Project“, das 1990 ins Leben gerufen wurde (<http://www.ornl.gov/hgmis>) und ursprünglich 2005 beendet sein sollte, aufgrund enormer Fortschritte in Instrumentierung und Automatisierung bereits im Jahr 2000 beendet werden konnte. Sequenzierungsprojekte für unterschiedlichste Spezies, wie Reis, Maus oder *Drosophila* sind mittlerweile ebenfalls weit vorangeschritten. Für die wissenschaftliche Welt sind dabei die daraus resultierenden zumeist öffentlich zugänglichen Genomdatenbanken von höchstem Interesse.

Mit den immer erfolgreicherer Projekten der Genomanalyse und deren Resultaten kam man schließlich zu der Erkenntnis, dass allein mit molekularbiologischen Methoden nicht sämtliche Phänomene biologischer Vorgänge erklärt werden konnten. Die Zeit war reif, nun komplexere Fragestellungen im Bereich der Proteinanalytik in Angriff zu nehmen. Ein äußerst einleuchtendes und plakatives Beispiel für Auswirkungen von Veränderungen in der Proteinexpression zeigt das Bild eines Schmetterlings und einer Raupe. Auf der Genomebene identisch, führen die Unterschiede auf der Proteinebene zur Ausbildung von verschiedenen Phänotypen.

So wurde sogar ein eigener Begriff für den neuen Forschungszweig aus der Taufe gehoben: „Proteomics“.

Dieser Begriff wurde von Marc Wilkins 1994 erstmals als ein Proteinäquivalent zu einem Genom auf der 2D-Gelelektrophorese-Tagung in Siena vorgestellt und wurde rasch zu einem äußerst beliebten Begriff.

Er musste aber in der Folgezeit genauer definiert werden und so versteht man heute unter dem Begriff Proteom „das zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter exakt definierten Randbedingungen quantitativ ermittelte Proteinmuster eines Organismus, einer Zelle, einer Organelle oder auch einer Körperflüssigkeit“ (Lottspeich 1999).

Diese Definition zeigt schon einige der Grenzen der Genomforschung auf und weist auf die Notwendigkeit, aber auch auf Probleme eines Proteomansatzes hin:

- Im Gegensatz zu dem statischen, exakt definierbaren Genom ist das Proteom ein sehr dynamisches Gebilde, das von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst wird.
- Eine vollständige Sequenzierung eines Organismus bedeutet noch nicht, dass man weiß, wo sich die „coding“ Regionen innerhalb der Nukleotidsequenz befinden. Die Bioinformatik allein ist (noch) nicht in der Lage, mit Sicherheit Exons oder Spleißingvarianten zu entdecken. Im Vergleich zu den weniger als 50000 Genen beim Menschen geht man heutzutage von mehreren hunderttausend unterschiedlichen Proteinspezies aus. Gründe hierfür sind unter anderem posttranslationale Modifikationen, von denen man heutzutage über 200 verschiedene kennt (siehe Theoriekapitel 2.3), sowie alternatives Spleißen auf mRNA-Ebene (Graveley 2001) oder „mRNA-Editing“. Zudem geben selbst diese Informationen noch keinen Einblick in die Funktion des Proteins oder deren Positionierung in komplexen Funktionsnetzwerken.
- Für die biologische Aktivität und Wirkung eines Proteins sind seine Menge und die genaue Kenntnis seiner posttranslationalen Modifikationen von großer Bedeutung.
- Es existiert keine direkte Korrelation zwischen Genexpression, Proteinkonzentration und Proteinaktivität. Hierbei spielen eine Vielzahl von komplexen und hochvernetzten Funktionsabläufen eine Rolle.
- Es gibt keinen biologischen Zustand, in dem alle im Genom kodierten Proteine zur gleichen Zeit exprimiert werden.

- Das Proteom ist neben diesen endogenen Faktoren ebenso von exogenen Parametern wie Temperatur, Stress, Pharmaka, Interaktionen, zellspezifischer Expression abhängig (Lottspeich 1998).
- Es gibt auf der Proteinebene wesentlich größere Mengenunterschiede als auf der Genomebene. Dies bedeutet es liegen Proteine in sehr geringer Kopienzahl neben Proteinen mit sehr hoher Kopienzahl vor. Analytisch betrachtet ist es jedoch äußerst schwierig schwach exprimierte Proteine neben stark exprimierten Proteinen nachzuweisen (Corthals 2000).

Trotz dieser Schwierigkeiten, auf die später noch im Detail eingegangen wird, spricht man schon jetzt vom Jahrzehnt der Proteomforschung (Anderson 2000, Baron 2001). Bei allen berechtigten Erwartungen an die Proteomanalyse darf jedoch nicht der Eindruck entstehen, sie könne isoliert von sämtlichen anderen Techniken eingesetzt werden. Nur das Zusammenspiel der Proteomanalyse mit den Methoden der Genom-, sowie Transkriptomanalyse, der Molekularbiologie aber auch der klassischen Biochemie etc. wird uns einen besseren Einblick in die komplexen funktionellen Regulations- und Stoffwechselnetzwerke der Biologie eröffnen.

2.1.1 Strategien der Proteomanalyse

Vor circa 20 Jahren begann man damit, in einer gemeinsamen Initiative sämtliche menschliche Proteine zu katalogisieren, den „Human Protein Index“ (Anderson 1980). Dies geschah bevor die meisten genomischen Sequenzierungsprojekte begonnen hatten, und beruhte hauptsächlich auf 2D-Gelelektrophoresedaten, stellte aber trotzdem eine große Hilfe für Proteinforscher dar, schließlich sind Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt charakteristische Merkmale eines Proteins.

Über dieses reine Katalogisieren von Proteinspots bzw. deren unterschiedlichster chemischer und physikalischer Daten geht der Anspruch der Proteomforschung heutzutage weit hinaus.

Die vollständige Aufklärung der Organisation und des dynamischen Verhaltens von metabolischen, Signal- und Regulationsnetzwerken (Anderson 2000) sind die großen

Ziele, die durch die Verknüpfung sämtlicher Biowissenschaften erreicht werden sollen.

Bis dahin ist es noch ein weiter Weg, es zeigen sich jedoch schon heute erste erfolgsversprechende Anwendungen auf den verschiedensten Gebieten:

Eines der kommerziell interessantesten Gebiete ist das Gesundheitswesen. Man schätzt, dass heute mehr als fünf Millionen Deutsche an genetisch bedingten Krankheiten leiden. Neben der Korrektur „kranker“ Gene durch gezielte Gentherapie ermöglicht das detaillierte Verständnis von Proteinregulationsnetzwerken, Krankheiten auch auf der Proteinebene zu bekämpfen. Dies kann z. B. durch die Beeinflussung der Proteintranslation mittels „Anti-Sense-Technik“, bei der die Bildung eines Proteins innerhalb der Zelle gezielt blockiert wird, erreicht werden (Baron 2001).

Der Agrarbereich ist ebenfalls ein wichtiges Anwendungsgebiet. Genauere Kenntnis über quantitative Proteinzusammensetzung und deren Auswirkungen können zur Optimierung der Produktqualität und Ertragssteigerung sowie zu einem besseren Verständnis von Pflanzenkrankheiten und der Wirkung von Pestiziden beitragen.

Unter der Vielzahl an Beispielen sei noch die Verbesserung von Fermentationsprozessen über die Identifizierung der Stoffwechselwege und gezielte Beeinflussung der Schlüsselenzyme genannt, an deren Ende wieder vermarktbarere Produkte, wie z. B. Insulin stehen.

2.1.1.1 Überlegungen zur praktischen Durchführung eines Proteomansatzes

Wenn man die vorher genannten Punkte zusammenfasst, kann man sämtliche Anforderungen nur mittels eines quantitativen subtraktiven Ansatzes erfüllen.

Die Proteinmuster von zwei oder mehr wohldefinierten Zuständen werden sowohl qualitativ als auch quantitativ miteinander verglichen, sämtliche andere Rahmenbedingungen sollten möglichst konstant bzw. identisch sein. Die beiden Zustände können kranke oder pathologische Zellen im Vergleich zu gesunden sein, oder Zellen vor und nach Zugabe eines Medikamentes, etc.

Der Ablauf einer Proteomanalyse lässt sich in verschiedene logisch aufeinanderfolgende Schritte untergliedern (Lottspeich 1999):

- Definition der Fragestellung und exakte Festlegung der Ausgangsbedingungen für die Proteomanalyse
- Probenvorbereitung
- Trennung der Proteine
- Detektion und Quantifizierung der Proteine
- Proteinchemische Charakterisierung der veränderten Proteine
- Datenbankanalyse der Proteinmuster (Bioinformatik)

2.1.2 Definition der Fragestellung und exakte Festlegung der Ausgangsbedingungen für die Proteomanalyse

Der Erfolg eines Ansatzes hängt elementar von der genauen Definition der Fragestellung ab. Diese schließt erst einmal die biologische Fragestellung ein, aber im weiteren Verlauf auch den Aufwand und damit die Kosten des Projektes.

Zu klären ist, welche Proteine bei dem zu untersuchenden Problem eine funktionale Rolle spielen, bzw. wenn es unbekannte Proteine sind, auf welche Veränderungen des biologischen Zustandes sie reagieren. In den meisten Fällen wird man zuerst die genauen Rahmenbedingungen festsetzen, unter denen zu erwarten ist, dass die zu untersuchenden Proteine sich quantitativ deutlich verändern. Ein gutes Beispiel ist die Zugabe eines Medikamentes, und die Untersuchung der Proteine, deren Konzentration sich nach Zugabe des Medikamentes signifikant ändert und die eventuell vom Wirkspektrum des Medikaments beeinflusst werden. Des Weiteren ist zu klären, ob dieses Ergebnis ausreichend ist, da über den Wirkmechanismus des Medikamentes alles bekannt ist oder ob zusätzlich die toxikologische und pharmakologische Wirkung der Medikamente auf die Proteine und deren Konzentration zu untersuchen ist.

Welche Bestandteile des Medikamentes führen zu diesen Ergebnissen? Sind es Nebenwirkungen des Medikamentes, die diese Auswirkungen auf der Proteinebene haben? Dies sind nur einige der Überlegungen, die vor Beginn des Projektes angestellt werden müssen.

2.1.3 Probenvorbereitung

Aufgrund der großen Komplexität unterschiedlichster chemischer und physikalischer Eigenschaften der Proteine ist die Probenvorbereitung ein wesentlicher Schritt und beginnt mit dem Anspruch, sämtliche Proteine vollständig in Lösung zu bringen. Die natürliche Vielfalt der Proteine beinhaltet jedoch unter anderem wasserlösliche Proteine, wasserunlösliche Proteinkomplexe oder auch Membranproteine, die sehr schnell ausfallen können. Daher kann es keine allgemeingültige Vorschrift zur vollständigen Solubilisierung der Proben geben. Es ist vielmehr wichtig, die Probenvorbereitung im Hinblick auf die Fragestellung zu optimieren. In der Praxis ist es nicht zu vermeiden, dass bestimmte Proteine aufgrund von Proteolyse oder Präzipitationen während eines Fraktionierungs- oder Aufarbeitungsschrittes modifiziert werden oder der Analyse verloren gehen. Inwieweit dies dem Ergebnis der Analyse schadet, ist jeweils abzuwägen.

2.1.4 Trennung der Proteine

Um komplexe Proteingemische wie z. B. einen Zellextrakt oder eine Körperflüssigkeit wie Blut mit ihren mehreren tausend Bestandteilen zu analysieren, bedarf es hochauflösender Trennmethoden, was nur durch gekoppelte, mehrdimensionale- Trennverfahren (Lottspeich 1998) erreicht werden kann. Die nach wie vor beste Trennmethode hierfür mit einem Trennraum von mehreren tausend Komponenten stellt die zweidimensionale Gelelektrophorese dar. Sie ist eine Kombination zweier Trennverfahren und nutzt die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften von Proteinen aufgrund ihres Aufbaus aus einzelnen Aminosäuren, die durch eine Peptidbindung verbunden sind. In der ersten Dimension erfolgt eine isoelektrische Fokussierung (IEF), bei der die Proteine aufgrund ihrer Ladung getrennt werden. In der zweiten Dimension werden die Proteine aufgrund ihrer Größe durch eine Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) getrennt. Diese Technik wird im nächsten Kapitel ausführlich vorgestellt. Aufgrund der später dargestellten Limitationen versucht man in letzter Zeit, diese Techniken zu ersetzen bzw. weiter zu verbessern. Als Alternativen stehen chromatographische und elektrophoretische Techniken und deren Kombinationsmöglichkeiten zur Auswahl

(Issaq 2001). So sind in letzter Zeit einige Versuche unternommen worden, mittels multidimensionaler HPLC (zumeist Kombinationen aus Ionenaustausch- und Reversed-Phase-Chromatographie (Yates 2001), sowie Ausschlußchromatographie) oder der Kopplung von HPLC und Kapillarelektrophorese (Manabe 1999) diese komplexen Gemische aufzutrennen.

2.1.5 Detektion und Quantifizierung der Proteine

Die Detektion kann mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden, wobei im Falle der 2D-Gele Färbungen angewendet werden. Die wichtigsten Parameter sind eine möglichst hohe Detektionsempfindlichkeit, ein möglichst breiter, linearer dynamischer Bereich für Proteine mit unterschiedlichen Mengen und die Kompatibilität mit der nachfolgenden Analytik. Am häufigsten verwendet werden die Silberfärbung mit einem linearen Arbeitsbereich von ca. 0.5-20 ng/mm² und die Färbungen mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Blue mit einem Arbeitsbereich von 50 ng- 1 µg/mm². Vor allem die Silberfärbung ist schwierig zu reproduzieren, und lange Zeit gab es auch kein Protokoll für den „In Gel“-Verdau von silbergefärbten Gelen, was mittlerweile aber möglich ist (Shevchenko 1996). In den letzten Jahren werden zunehmend Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (Patton 2000; Patton 2002), da sie äußerst empfindlich sind, einen großen linearen, dynamischen Bereich haben und sich gut für Automatisierungen eignen. In allen Fällen erfolgt die Auswertung heutzutage computerunterstützt. Softwareprogramme verschiedener Firmen ermöglichen eine automatische Spoterkennung, Spotquantifizierung und Gelvergleiche.

Ein neuer Ansatz für die Quantifizierung liegt in der Isotopenmarkierung bestimmter Aminosäuren und bedient sich anschließend der Massenspektrometrie für den quantitativen Vergleich. Diese Methoden werden später noch im Detail erläutert.

2.1.6 Proteinchemische Charakterisierung der veränderten Proteine

Die Proteine werden durch die Kombination verschiedener hochauflösender Trennmethode behandelt. Wenn sie zu diesem Zeitpunkt in einer Gelmatrix vorliegen, gibt es zwei Möglichkeiten, die Problemstellung anzugehen. Ein Schema einer grundsätzlichen Analysestrategie ist in Abbildung 2.1. dargestellt. Entweder wird das intakte Protein untersucht, was heute nur noch selten praktiziert wird, oder das Protein wird direkt in der Gelmatrix enzymatisch in Peptide gespalten. Anschließend gibt es hauptsächlich drei Analysemethoden, mit denen die Proteinsequenz identifiziert werden kann. Dies sind die Aminosäuresequenzanalyse, die Aminosäureanalyse und die unterschiedlichen Techniken der Massenspektrometrie, die später im Detail vorgestellt werden.

Die Aminosäuresequenzanalyse nach Edman verliert zunehmend an Bedeutung, da sie sehr zeit- und kostenaufwendig ist. Hierbei wird die N-terminale Sequenz eines geblotteten oder gelösten Proteins bestimmt. Eine N-terminale Sequenz von bis zu 40 Aminosäuren ermöglicht eine Proteinidentifizierung über eine Datenbankrecherche, aber über einen großen Bereich des Proteins mit möglichen posttranslationalen Modifikationen kann keine Aussage getroffen werden. Da zudem eine große Zahl an Proteinen N-terminal modifiziert und damit für diese Technik blockiert sind, kann für diese Proteine keine Sequenzinformation gewonnen werden.

Noch weniger von Bedeutung ist heutzutage die Aminosäureanalyse, bei der die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Aminosäuren analysiert werden und dabei eine für das Protein charakteristische Aminosäurezusammensetzung bestimmt wird. Fast jedes Protein lässt sich allein über das Verhältnis seiner Aminosäuren zueinander in einer Proteindatenbank mit hoher Wahrscheinlichkeit identifizieren. Aussagen über posttranslationale Modifikationen lassen sich auch hier nicht treffen. Die Vorteile dieser Technik sind die absolute Mengenangabe und eine vergleichbare Sensitivität wie bei der Aminosäuresequenzanalyse. Zudem gibt es keine Probleme bei N-terminal blockierten Proteinen wie bei der Sequenzierungstechnik. Problematisch ist jedoch die Chemie, die dieser Analysetechnik zugrunde liegt, bei der die Peptide oder Proteine durch Hydrolyse in ihre Einzelaminosäuren gespalten werden. Dabei können empfindlichere Aminosäuren zerstört werden, wodurch das Ergebnis der prozentualen Zusammensetzung fehlerbehaftet ist. Ein weiteres Problem, das zu Fehlern im

relativen Verhältnis der Aminosäuren zueinander führt sind Kontaminationen der Probe. Die Analysemethoden kann nicht zwischen Hauptbestandteil und Verunreinigung durch ein anderes Protein unterscheiden.

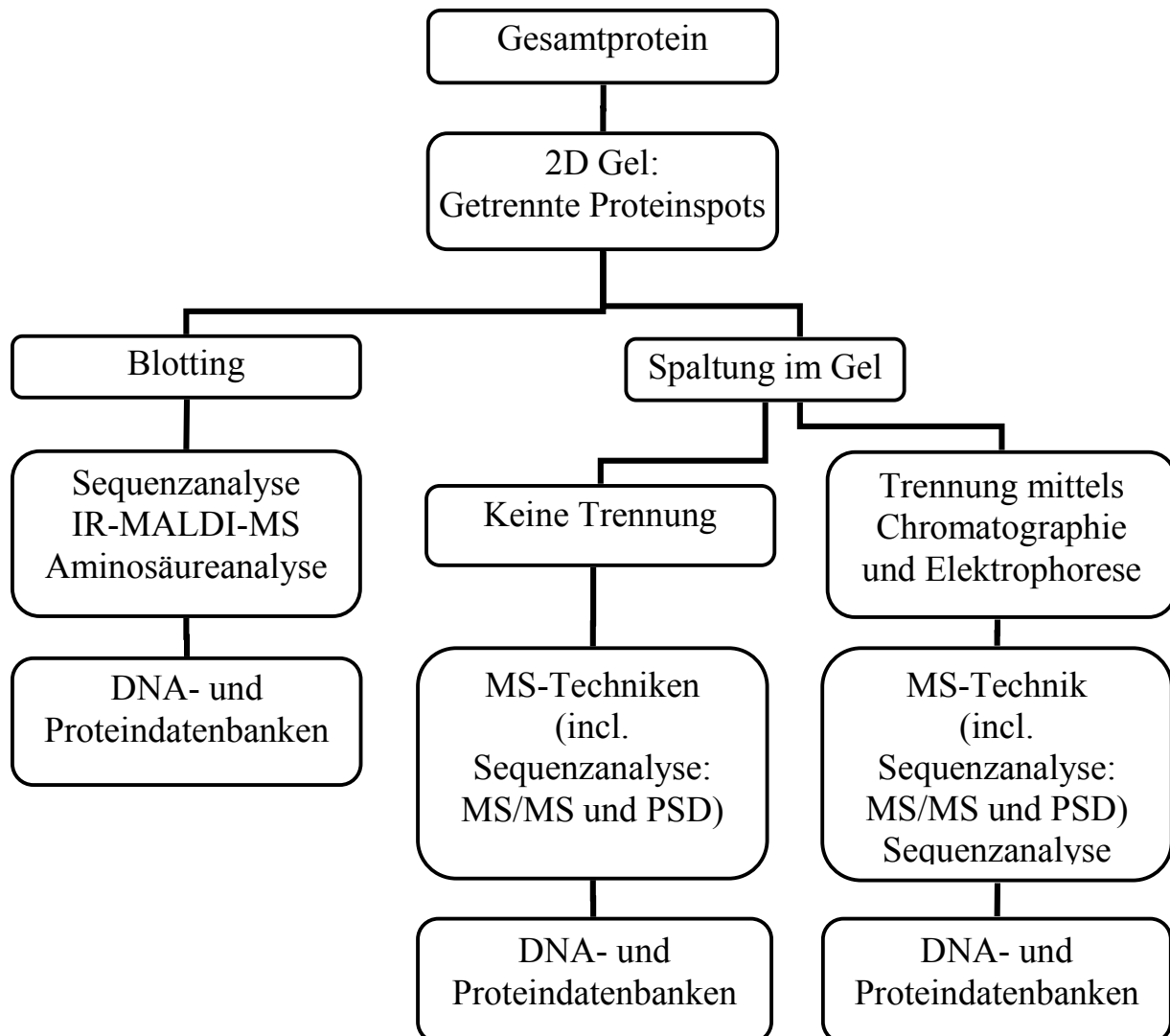


Abbildung 2.1: Strategien zur Proteinidentifizierung

2.1.7 Datenbankanalyse der Proteinmuster (Bioinformatik)

Für einen erfolgreichen Abschluß eines Proteomprojektes ist die Bioinformatik (Fenyo 2000, Vihinen 2001, Goodman 2002) essentiell. Sie umfasst heutzutage einen großen Bereich und beginnt mit der Datenauswertung. Dabei wird zumeist ein Datenbankvergleich der gefundenen Peptidmassen- oder -sequenzen, sei es auf Protein-oder DNA-Ebene durchgeführt (Mann 2001).

In der Praxis werden die ermittelten Daten mit Hilfe einer Software, die entweder öffentlich zugänglich im Internet zu finden oder auf einem eigenen Server offline vorhanden ist, eingegeben und eigene oder öffentlich zugängliche Protein- oder DNA-Datenbanken durchsucht. Das Programm liefert nach Eingabe der massenspektrometrischen Daten Vorschläge für Aminosäuresequenzen und die zugrundeliegenden Proteine.

Als Beispiele für solche Programme sind die Programme Mascot (<http://www.matrixscience.com>), ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu>) und PeptideSearch (<http://www.mann.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptide-searchpage.html>) für die Proteinebene sowie das Programm Blast (<http://www.ch.embnet.org/software/BottomBLAST.html>) für die DNA-Ebene zu nennen. Die Homepages der Programme kann man alle über die Plattform „www.expasy.ch“ erreichen.

Bei umfangreichen Proteomprojekten ist man mit den erhaltenen Proteintreffern noch nicht am Ziel. In einem Proteomprojekt wird eine ungeheuer große Zahl an Daten und Informationen generiert, die ohne die Hilfe der Bioinformatik nicht überblickt, ausgewertet und verwaltet werden kann. Diese Datenflut ist sicher typisch für die sogenannten „-omics“-Technologien. Eine intelligente Datenverwaltung ist somit ein weiterer Beitrag, den die Bioinformatik leisten muss. Eine vollständige Kombination sämtlicher unterschiedlicher Informationen ist notwendig. Dabei sind nicht nur offensichtlich wichtige Daten wie Masse oder Konzentration der Peptide und deren Spotposition im Gel, sondern auch unstrukturierte Daten über Herkunft, Herstellung und Probenaufarbeitungshistorie, sowie Literaturdaten und biologische oder medizinische Daten von enormer Bedeutung (Lottspeich 1999). Wie zu Beginn erläutert, spielt hierbei vor allem das Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Teilbereichen der Lebenswissenschaften eine große Rolle.

Letztendlich bildet die Bioinformatik die große Klammer um alle Resultate, die dann im Zusammenwirken mit Systemtheoretikern den Weg zu einer umfassenden Systembiologie ebnen kann (Lottspeich 2002).

2.1.8 Ausblick

Nachdem sich die Stimmen mehren, die von einem Jahrzehnt der Proteomforschung sprechen und der Proteomforschung ähnliche, wenn nicht größere Erfolge als der Genomforschung prophezeien, gilt es noch einmal die derzeitigen Grenzen der Proteomforschung und anschließend aktuelle Trends aufzuzeigen, die sich mit der Lösung der Probleme beschäftigen (Kellner 2000).

Die Probleme beginnen schon bei der Probenvorbereitung (Haynes 2000). Hier gilt nach wie vor ein Hauptaugenmerk den Membranproteinen und deren Löslichkeit (Santoni 2000, Molloy 2000), da die Bedeutung der Membranproteine in vielen Bereichen der Biologie unbestritten ist.

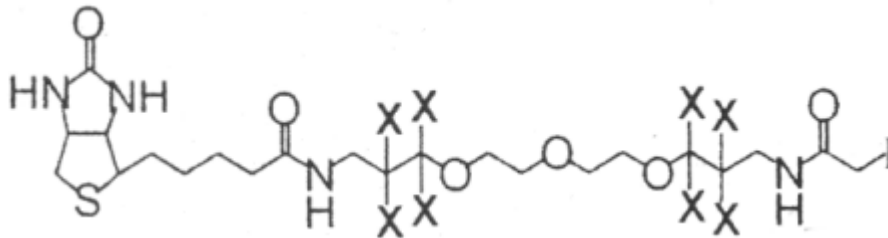
Schwierigkeiten liegen immer noch in den verschiedenen analytischen Methoden, speziell in der 2D-Gelelektrophorese. Der zeitliche Aufwand, die Notwendigkeit einer qualifizierten Probenbearbeitung, die nach wie vor unbefriedigende Reproduzierbarkeit, die komplizierte Quantifizierung der Proteinspots durch Färbungen der Proteine im Gel sowie die mangelhaften Automatisierungsmöglichkeiten sind Hauptkritikpunkte.

Da die 2D-Gelelektrophorese in der nahen Zukunft ein wichtiges Trenninstrument bleiben wird, gibt es einige Verbesserungsansätze für diese Technik.

Das Auflösungsvermögen der 2D-Gelelektrophorese wird beispielsweise durch den Einsatz von engeren pH-Gradienten in der isoelektrischen Fokussierung, den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen oder apparatetechnische Veränderungen verbessert. (Celis 1999, Lilley 2002).

Ein weiterer Punkt, an dem intensiv optimiert wird, ist die Quantifizierung, die bis vor kurzem ausschließlich densitometrisch durch Färbungen der Gelspots erfolgte. Diese ungenaue und schwer zu reproduzierende Analyseverfahren versucht man zu ersetzen und der derzeit erfolgversprechendste Weg ist die Isotopenmarkierung bestimmter Aminosäuren mit anschließender Quantifizierung durch die Massenspektrometrie. Die Verwendung stabiler Isotope und die Quantifizierung von nicht deuterierten und

deutierten Peptidpaare wurde mit einem neuen chemischen Reagenz-, „isotope-coded affinity tag“ (ICAT) von Aebersold 1999 vorgestellt. Das in der Abbildung 2.2 gezeigte Reagenz wird einmal mit Deuterium und einmal ohne Deuterium verwendet und an die vorhandenen Cysteine der Proteine gebunden. Die beiden Spezies sind chemisch nahezu identisch, haben aber einen definierten Massenunterschied von 8 Dalton pro Cystein. Aufgrund dieser Eigenschaft können die Intensitäten der Peptidpaare in einem Massenspektrometerspektrum direkt miteinander verglichen werden. Eine schematische Darstellung, wie diese Technik funktioniert, ist in der Abbildungen 2.3 zu sehen.



Biotinlabel

Heavy (H): d8-ICAT (X=D)

Light (L): d0-ICAT (X=H)

Abbildung 2.2: Aussehen des ICAT-Reagenz

In der Praxis sieht der Ablauf eines ICAT-Ansatzes folgendermaßen aus: Zwei Zustände einer Zelle (z. B. mit und ohne Zugabe eines Medikamentes, kranker Patient im Vergleich zu einem gesunden Patienten) werden einmal mit „schwerem“ und einmal mit „leichtem“ ICAT-Reagenz modifiziert. Beide Proben werden vereinigt und von da an der gleichen Prozedur unterzogen. Dies ist wichtig für eine korrekte Quantifizierung am Ende der Analyse. Sie werden enzymatisch gespalten, anschließend werden die Biotin gelabelten Peptide auf einer Avidin-Biotin-Affinitätssäule von den restlichen Peptiden getrennt, und mittels Massenspektrometrie analysiert. Hier erfolgt die Quantifizierung durch den Vergleich der Intensitätsverhältnisse des Peptidpaares.

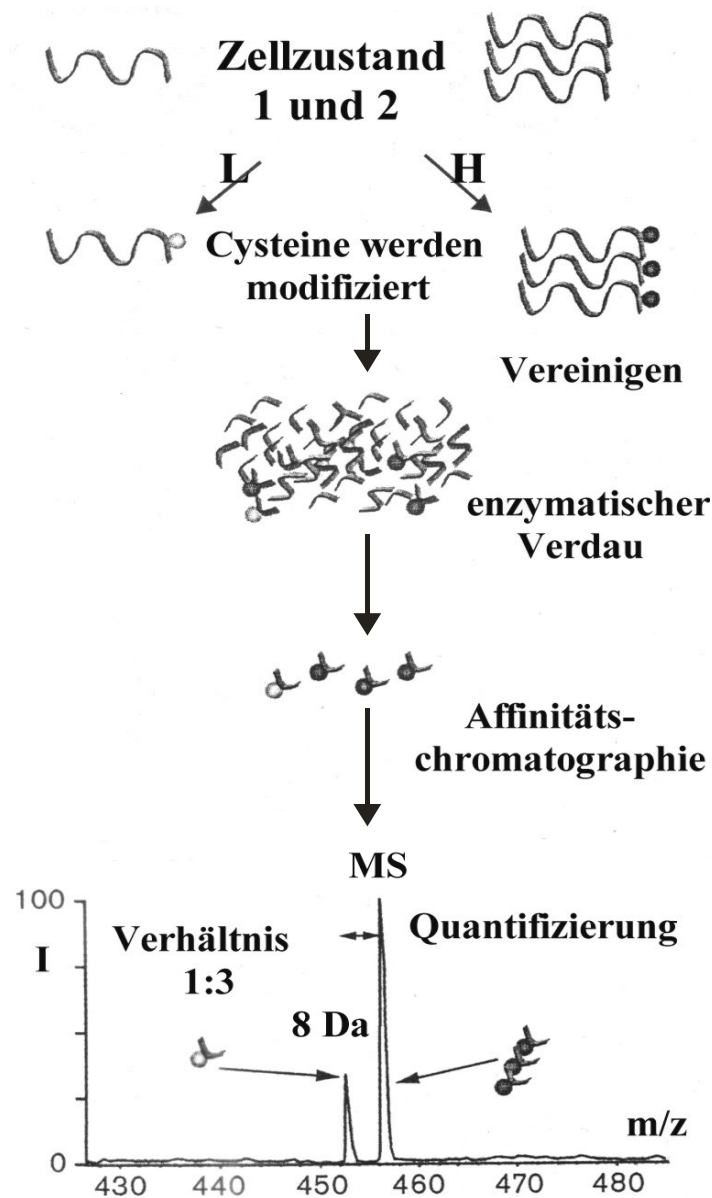


Abbildung 2.3: Funktionsprinzip der ICAT-Methode (modifiziert nach Gygi 2000)

Diese Technik hat aber auch Nachteile, so sind Cysteine in vielen Spezies relativ selten oder gar nicht vorhanden. Proteine ohne Cysteine sind demnach so nicht analysierbar. Bei Proteinen mit wenigen Cysteinen kann über einen großen Bereich des Proteins keine Information erhalten werden, die für einen Proteomansatz wichtig ist wie z. B. posttranslationale Modifikationen. Deshalb werden auch andere Aminosäuren mit radioaktiv gelabelten Reagenzien modifiziert. Die Möglichkeiten hierfür sind mannigfaltig: Man kann nicht nur das Problem der geringen Häufigkeit von Cysteinen in Proteinen umgehen, sondern auch zusätzliche gewünschte

Eigenschaften in die Peptide einbringen, die bei der späteren MS-Analyse hilfreich sind, wie z.B. höhere Basizität für die Protonierung der Peptide oder hydrophile Gruppen zur besseren Löslichkeit bei sehr hydrophoben Peptiden für die RP-Chromatographie.

Statt die Proteine chemisch zu modifizieren, ist z. B. bei Bakterienkulturen ein anderer Ansatz möglich: Oda ließ 1999 seine Hefekulturen auf ^{15}N -Isotopenmarkierten Medien wachsen und verglich diese Probe mit normal gewachsenen mittels MS. Die prozentuelle Abweichung lag bei $\pm 10\%$ und war damit deutlich besser als die Quantifizierung mittels Färbungen von Proteinspots im Gel. Ähnliche Ansätze gibt es auch mit ^{13}C , ^2H in radioaktiv gelabelten Medien (Pasatolic 1999).

Aktuelle Fortschritte in der Proteomforschung finden auf dem Gebiet der Automatisierung und dem Einbinden von Robotsystemen statt. Die Automatisierung der einzelnen Arbeitsschritte sowie Fortschritte auf dem Gebiet der Bioinformatik sollen den Weg für eine für eine hochparallele High-Troughput Proteomanalyse ebnen. Ein möglicher Weg dies zu bewerkstelligen ist die Verknüpfung der Proteomanalyse mit der Microchip-Technologie, eine Art „Proteomics on a Chip“ (Mouradian 2002, Nelson 2000, Figey 2001, Schweiter 2002).

Abschließend lässt sich sagen, dass vor allem der Aspekt der Kosten eines umfassenden Proteomansatzes ein großes Problem darstellt, und verantwortlich ist für die noch fehlenden spektakulären Ergebnisse. In der momentan angespannten wirtschaftlichen Lage sind die wenigsten universitären Einrichtungen oder kleineren Forschungslabors in der Lage Investitions- und personelle Mittel zur Verfügung zu stellen, um diese Art von Forschung zu betreiben.

Zudem ist eine Zusammenarbeit von Forschern auf der ganzen Welt inklusive intensivem Austausch von Daten, der bei dem Human Genome Projekt maßgeblich zum Erfolg beigetragen hat, in der Proteomanalyse nicht ohne weiteres möglich. Zwar gibt es heute schon in einer Parallele zu den Genomdatenbanken öffentlich oder kommerziell zugänglichen Proteomdatenbanken, aber zumeist können diese Ergebnisse für den eigenen Proteomansatz nicht verwendet werden. Wie zuvor schon erläutert ist der Grund die schwere Vergleichbarkeit zweier unterschiedlicher Proben, ihrer Zustände, aber auch ihrer Rahmenbedingungen. Trotzdem sollen die Beispiele

HumanPSDTM, eine Proteomdatenbank für die Spezies Mensch, Ratte und Maus, sowie YPDTM für *Saccharomyces cerevisiae* und WormPDTM für *Caenorhabditis elegans* genannt werden, die von der Plattform <http://www.incyte.com/sequence/proteome/index.shtml> zu erreichen sind. Aber auch einige einzelne Arbeitsgruppen stellen ihre Ergebnisse öffentlich ins Netz, so z.B. für das Mausproteom in der Arbeitsgruppe Klose (Gauss 1999/ http://www.charite.de/humangenetik/klose_public1).

Trotz all der aufgezählten Probleme, die die Wissenschaft derzeit beschäftigen kann die Proteomforschung in ein paar Jahren hoffentlich das Verständnis des komplexen Netzwerkes aus Genom, Transkriptom (mRNA-Ebene), Proteom und Metabolom ermöglichen (Kettman 2001).

2.2 Grundlagen und Bedeutung der 2D-Gelelektrophorese

2.2.1 Historisches

Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. In den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts gelang es dem Schweden Arne Tiselius erstmals, mittels Elektrophorese von wandernden Grenzschichten menschliches Serum in vier Hauptkomponenten aufzutrennen: Albumin, α -, β -, γ -Globuline. Dies gelang ihm mit einem U-förmigen Rohr, das mit Puffer gefüllt war und an eine Gleichstromquelle angeschlossen war. Unter anderem für diese Arbeit erhielt er 1948 den Nobelpreis.

Die Elektrophorese wurde rasch weiterentwickelt, und antikonvektive Trägermaterialien wie Papier, Agargele und Kieselgele kamen zum Einsatz, um dem Problem einer Bandenverbreiterung entgegenzuwirken. Der Nachteil der Eigenladung dieser Materialien und der daraus resultierenden diffusen Banden wurde durch den Einsatz einer inerten Trägermatrix verbessert. Dies waren 1955 Stärkegele (Smithies 1955), 1957 Celluloseacetatfolien, 1959 Polyacrylamidgele und 1961 Agarosegele. Einige dieser Materialien, wie z.B. Agarosegele werden auch heute noch routinemäßig in der DNA-Analytik eingesetzt.

Wichtig für die heute verwendete 2D-Gel Technik war 1966 die isoelektrische Fokussierung, die durch die Verwendung von Trägerampholyten möglich wurde. Dabei wird ein pH-Gradient etabliert, in dem die zwitterionischen Proteine aufgrund ihrer Nettoladung bis zu einem pH-Wert wandern, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist, dem für jedes Protein charakteristischen isoelektrischen Punkt (pI).

Der nächste wichtige Schritt war 1967 die Einführung der Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Molekulargewichtsbestimmung.

Zu einem großen Fortschritt in der Analytik von Biomolekülen kam es 1975 durch die Kombination der isoelektrischen Fokussierung und der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zur zweidimensionalen (2D) Elektrophorese durch Klose und O'Farrell. Weiter vorangebracht wurde diese Technik durch die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten von Görg 1982. Eine der größten Vorteile dieses neuen Ansatzes war eine deutlicher reproduzierbarere Trennung der Probenmoleküle. Bis heute ist sie sicherlich die am häufigsten gebrauchte Technik mit einem Trennraum von mehreren tausend Proteinen. Eine gute Zusammenfassung dieser elektrophoretischen Techniken in Theorie und Praxis, ihrer historischen Entwicklung und aktueller biochemischer und klinischer Anwendungen findet sich in einer Reihe von Büchern (z.B.: Simpson 1983, Andrews 1986, Westermeier 2001).

2.2.2 Theoretische Grundlagen

Man betrachtet die Bewegung eines elektrisch geladenen Teilchens in einem elektrischen Feld. Auf dieses Teilchen wirkt ein Kräftegleichgewicht aus einer beschleunigenden Kraft (F_1):

$$F_1 = qE \quad (1)$$

mit:

q:	Ladung
E:	elektrische Feldstärke

und einer Reibungskraft (F_2), die bremsend auf das Teilchen einwirkt:

$$F_2 = f v \quad (2)$$

mit: f: Reibungskoeffizient
v: Wanderungsgeschwindigkeit

Es gilt: $F_1=F_2 \Rightarrow v = \frac{qE}{f} = \mu E$ (3)

mit: μ : Mobilität (elektrophoretische Beweglichkeit)

Um „griffigere“ Parameter in der Formel (3) zu erhalten, wendet man das Stokesche Gesetz an, das für kleine kugelförmige Teilchen näherungsweise gilt:

$$\mu_{(EPH)} = \frac{q}{f} = \frac{ze}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

mit: z: Ladungszahl
e: Elementarladung
 η : Viskosität der Lösung
r: Stokes-Radius

Die elektrophoretische Mobilität ist demzufolge abhängig von der Ladung der Teilchen und näherungsweise vom Molekulargewicht (abgeleitet von dem Stokes-Radius) und damit eine substanzspezifische Größe.

Für die praktische Anwendung müssen aber noch andere Effekte wie Grenzflächenpotentiale berücksichtigt werden. Eine Vielzahl gebräuchlicher Materialien wie Glas, fused silica, Papier oder Agarose bildet bei Kontakt mit einer Elektrolytlösung eine elektrochemische Doppelschicht aus, wie am Beispiel einer fused silica-Kapillare in der folgenden Abbildung gezeigt wird.

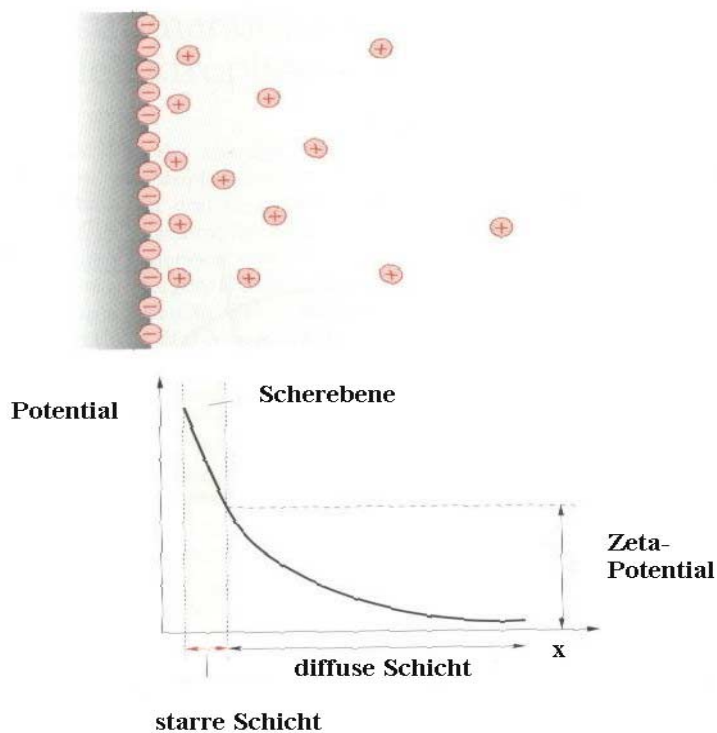


Abbildung 2.4: Aufbau und Potentialverlauf der elektrochemischen Doppelschicht (aus Lottspeich 1998)

An der Grenze Elektrolytlösung- Kapillare bilden sich durch Dissoziation der Silanolgruppen negative Ladungen an der Kapillarwand aus. Die negativen Ladungen werden durch den Elektrolyten in der Lösung durch vermehrte positive Ladungen in der unmittelbaren Nähe zur Doppelschicht ausgeglichen. Der Potentialabfall in Abhängigkeit zur Distanz von der Kapillarwand ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt und lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: Eine starre Schicht mit linearem Potentialabfall und eine diffuse Schicht mit exponentiellem Abfall.

Bei Anlegen einer Spannung wandern die Kationen in Richtung Kathode. Dadurch kommt es zu einer Bewegung innerhalb der gesamten Lösung. Dies wird als elektro-(endo)osmotischer Fluss bezeichnet.

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (5)$$

mit:

μ_{EOF} :	elektroosmotische Mobilität
ε :	Dielektrizitätskonstante
ζ :	Zetapotential

Dieser elektroosmotische Fluss kann auch entgegengesetzt zu der Wanderungsrichtung der Probenmoleküle fließen. Die Richtung und Geschwindigkeit berechnet sich durch Vektoraddition der Geschwindigkeitsvektoren der beiden Mobilitäten:

$$\mu_{(Ges)} = \mu_{(EPH)} + \mu_{(EOF)} \quad (6)$$

Die gegensätzlichen Strömungsprofile führen zu unerwünschten Veränderungen der aufgetrennten Zonen, z.B. zu Bandenverbreiterungen. Auch bei der isoelektrischen Fokussierung stört der Effekt des elektroosmotischen Flusses. Da die elektroosmotische Mobilität pH-abhängig ist, kommt es bei der Verwendung freier Trägerampholyte zur Ausbildung eines pH-Gradienten und damit zu einer weiteren Durchmischung der Probenmoleküle.

2.2.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist nach wie vor die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen für Trennungen komplexer Proteingemische. Dies liegt in der für Proteine nahezu perfekten Kombination zweier orthogonaler Trennprinzipien. In der ersten Dimension beruht die Trennung auf der unterschiedlichen Eigenladung der Proteine. Die zweite Trenngröße ist das Molekulargewicht der Proteine. Die nachfolgende Abbildung zeigt schematisch die Verknüpfung der beiden Trennprinzipien.

In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, werden mittels immobilisierter pH-Gradienten die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI)

getrennt. Die Proteine haben solange eine elektrophoretische Mobilität, bis sie zu dem Punkt (pH) wandern, an dem ihre Nettoladung Null beträgt (Abbildung 2.5). Da die elektrophoretische Mobilität von der Ladung abhängt, beträgt an diesem Punkt auch die Mobilität Null und das Protein bewegt sich nicht mehr, es kommt zur Ausbildung von Proteinbanden. Der isoelektrische Punkt ist substanzspezifisch und hängt von der Zahl an basischen und sauren Aminosäuren ab.

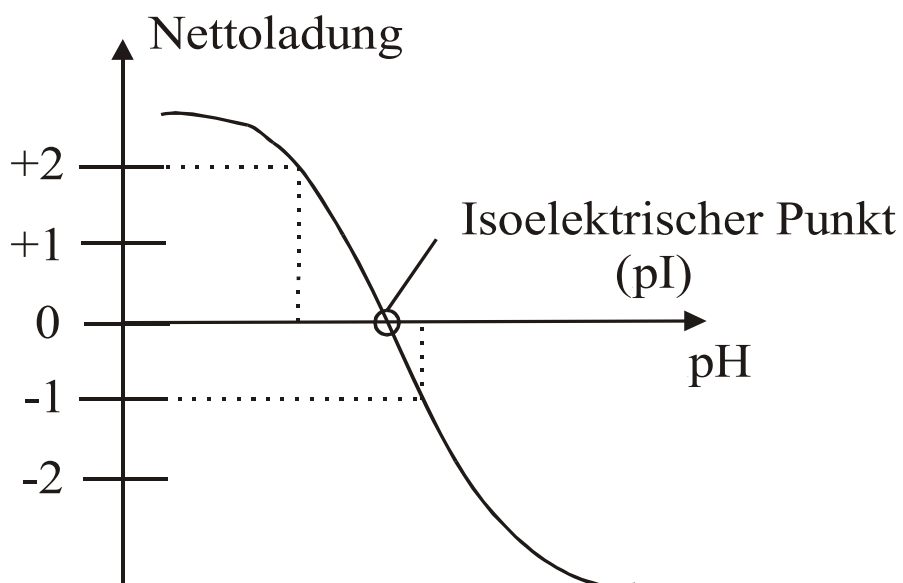


Abbildung 2.5: Abhängigkeit der Nettoladung eines Proteins von dem pH-Wert

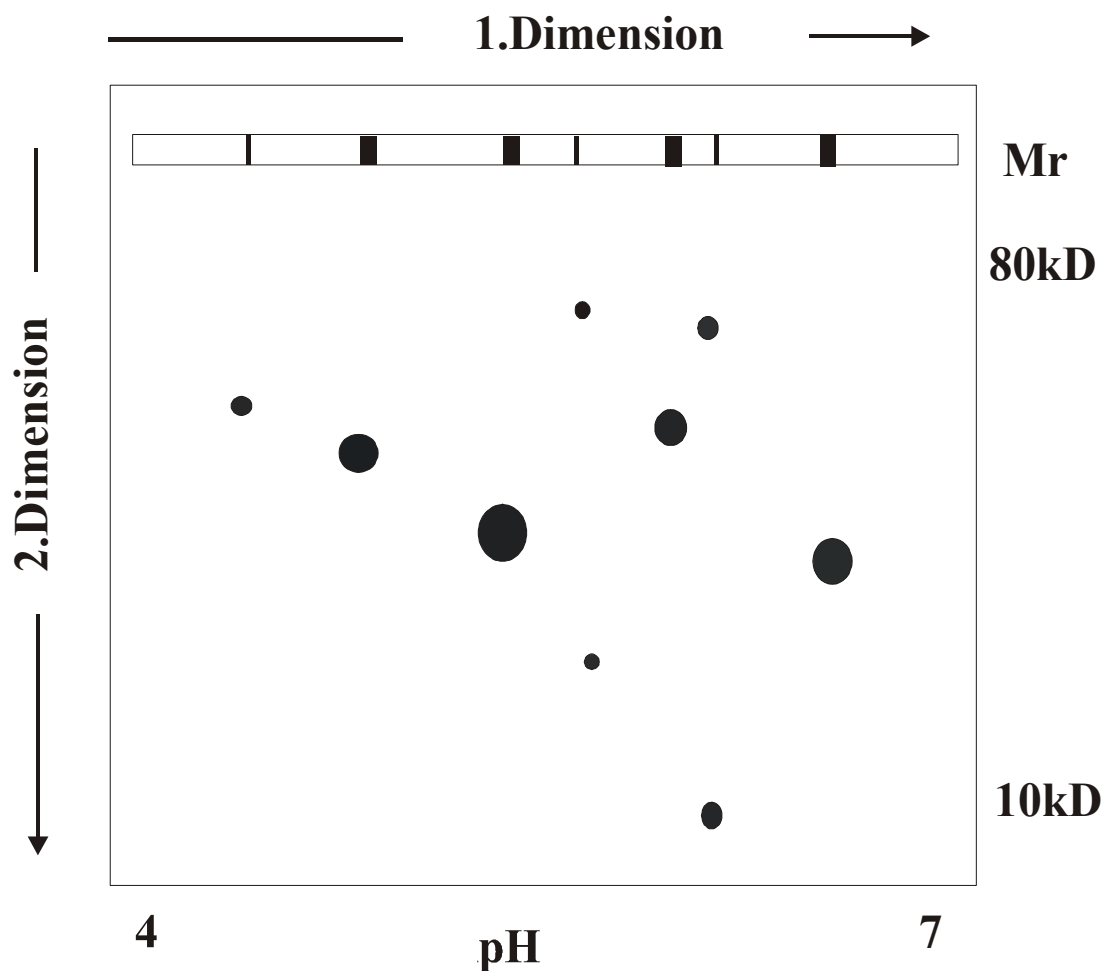


Abbildung 2.6: Trennprinzipien der 2D-Gelelektrophorese

In der zweiten Dimension benutzt man Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergens, um die Eigenladung der Proteine effektiv abzuschirmen. Dabei bilden sich ab einer bestimmten SDS-Konzentration Micellen aus, bei denen sich die Proteine im Inneren befinden. Nach außen sind nur die negativen Ladungen der SDS-Moleküle zu sehen, dies verhindert eine Aggregation der Proteine. Um eine effektive Trennung nach der Größe und um deswegen möglichst gestreckte Probenmoleküle zu erhalten, werden die Proteine durch Aufkochen denaturiert. In einem bestimmten Größenbereich erhält man näherungsweise eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus

der Molekulargewichte und der Wanderungsstrecken der Micellen. Daher lassen sich diese Gele mit Proteinstandards kalibrieren.

Anschließend werden die Proteinspots durch verschiedenste Methoden (siehe Gelfärbungen) angefärbt und mittels einer Computersoftware quantitativ ausgewertet. Aufgrund der praktischen Probleme und damit einhergehender mangelhafter Reproduzierbarkeit gibt es sehr viele Veröffentlichungen, die sich mit den Nachteilen und Beschränkungen der 2D-Technik und Lösungsvorschlägen für diese Probleme beschäftigen (Molloy 2000; Corthals 2000; Lilley 2002). Da bei Auftrennungen komplexer Proteingemische viele Proteine ähnliche pI-Werte besitzen, werden Trennungen mit sehr engen pH-Gradienten durchgeführt (Fey 2001).

2.2.4 Ausblick: Die zukünftige Bedeutung der 2D-Gelelektrophorese

Durch die zunehmende Bedeutung der Proteomforschung sucht man nach alternativen Trenntechniken zur 2D-Gelelektrophorese. Eine vergleichbare Trennleistung ist eine Voraussetzung für diese Techniken, jedoch sollen die Trennungen deutlich schneller stattfinden, sowie leichter zu reproduzieren und zu automatisieren sein. Die Ansätze gehen dabei in Richtung mehrdimensionaler Chromatographie, bei der z.B. Ionenaustauschchromatographie mit einem starken Kationenaustauscher und Reversed-Phase (RP)-Chromatographie kombiniert werden (Celis 1999, Fey 2001). Eine Verknüpfung elektrophoretischer und chromatographischer Techniken wird ebenfalls erfolgreich angewendet (Hille 2001, Jenkins 2001). Die Ausnahmestellung als essentielle Trenntechnik in der Proteinchemie, die die 2D-Gelelektrophorese in den letzten Jahren innehatte, wird sie in den nächsten Jahren wahrscheinlich verlieren, sie wird aber weiterhin eine wichtige Labortechnik bleiben.

2.3 Posttranslationale Modifikationen und ihre Analytik

Heutzutage sind mehr als 200 verschiedene posttranslationale Modifikationen bekannt (Hamdan 2001). So gibt es die bezüglich eines Massenunterschieds kleinen Veränderungen, wie Acetylierungen, Hydroxylierungen, Phosphorylierungen oder Methylierungen. Auch komplexere Verbindungen wie z.B. Glykosylierungen, die sich an einzelne Aminosäuren anlagern (Meri 2001) sind häufig zu finden. Zudem können die Aminosäuren auch selbst verändert werden, wie z.B. bei einer Deamidierung von Asparaginen oder Glutaminen. Die Mechanismen der Reaktionen sind höchst unterschiedlich und reichen von enzymatischen Reaktionen bis zu komplizierten mehrstufigen „chemischen“ Reaktionen. Die posttranslationalen Modifikationen sind zwar nicht auf DNA-Ebene determiniert, haben aber einen erheblichen Einfluss auf die Funktionen und Eigenschaften eines Proteins. Auch die biologischen Funktionen dieser Veränderungen sind sehr unterschiedlich, seien es notwendige Voraussetzungen für spätere biologische Abläufe, eine Art „molekulare Uhr“ (Robinson 2001) oder eine Alterung der Proteine und damit einhergehend ein Verlust der biologischen Funktion (Lindner 2000, Colvis 2001). Als eine Schweizer Gruppe 1999 eine Proteindatenbank zur Analyse massenspektrometrischer Daten um eine effektivere Suche von posttranslationalen Modifikationen erweitern wollten, (FindMod) untersuchten sie die SWISS-PROT-Datenbank nach Abweichungen zwischen den theoretisch berechneten Massen aus genomischen Daten und den gemessenen Daten (Wilkins 1999). Bei damals knapp 80000 Proteinen und damit circa 30 Millionen Aminosäuren wurden 5150 posttranslationale Modifikationen analysiert.

2.3.1 Analytik der posttranslationalen Modifikationen

Die Analytik der posttranslationalen Modifikationen unterscheidet sich grundsätzlich nicht von den gängigen Techniken der Proteinchemie, sie stellt jedoch immer noch eine große Herausforderung dar. Dies liegt zum einen an der Heterogenität, zum anderen an der mangelhaften Auswertung durch die Datenbankrecherchen (Sickmann 2001). In den Programmen werden nur die häufigsten posttranslationalen

Modifikationen mitberücksichtigt, so dass modifizierte Peptide mit einer Routinesoftware oftmals nicht erfolgreich identifiziert werden können.

In der vorliegenden Arbeit sind es vor allem zwei posttranslationalen Modifikationen, die eingehender untersucht worden sind: Glykosylierungen und Deamidierungen. Daher sollen sie im Folgenden etwas detaillierter vorgestellt werden.

2.3.2 Glykosylierungen

Eine große Anzahl an Proteinen, wie z. B. die meisten Plasmaproteine oder Zytokine besitzt eine oder mehrere Zuckergruppen, die kovalent an ein Asparagin („N-linked“) oder an ein Serin oder Threonin („O-linked“) gebunden sind. Zucker besitzen mehrere reaktive Gruppen und lassen sich dabei vielfältig miteinander kombinieren. Eine Besonderheit der Zucker ist ihre Stereochemie und das Vorhandensein von anomeren Konfigurationen. Zudem ist die Größe und Form der Zuckergruppen äußerst heterogen. Zuckerhaltige Proteine bestehen aus den Zuckermonomeren: β -L-Fucose, β -D-Galaktose, β -D-Mannose, β -D-N-Acetylgalaktosamin, β -D-N-Acetylglukosamin und Sialinsäure. Diese werden in hochkomplexen Bäumchenstrukturen aneinandergereiht und können mehrere 1000 Dalton groß werden. Die Struktur der an den Asparagin-Stickstoff gebundenen Zuckergruppen kann grob in drei verschiedene Typen eingeteilt werden (siehe Abbildung 2.3.).

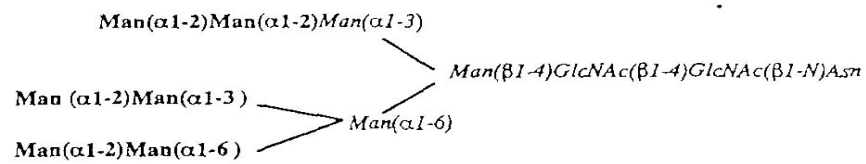
Häufig sind kleine Veränderungen in dieser Bäumchenstruktur Anzeichen für Krankheiten, so z.B. beim Haptoglobin im Falle von Lebererkrankungen (Chambers 1993) oder einigen Krebserkrankungen (Turner 1995). Die Struktur der Zuckergruppen variiert im Falle einer Krankheit signifikant (Goodarzi 1998). Dabei hat man festgestellt, dass sich innerhalb eines Krankheitsprofils die „fingerprints“ der Spektren stark ähneln.

Funktionen der an Proteinen gebundenen Zuckergruppen:

- Sie dienen zur Erkennung und Assoziation mit Proteinen, Enzymen, Viren oder anderen Lektingruppen.
- Sie schützen das Protein vor Proteolyse.
- Sie erhöhen die Löslichkeit der Proteine.

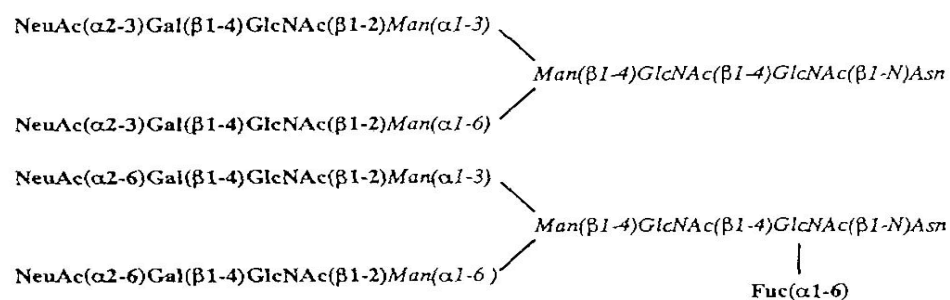
- Sie können eine spezielle Konformation des damit biologisch aktiven Proteins induzieren und diese auch aufrechterhalten.

HIGH MANNOSE :

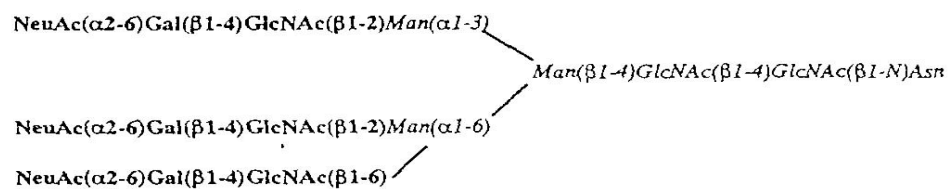


COMPLEX :

Biantennary:



Triantennary



HYBRID :

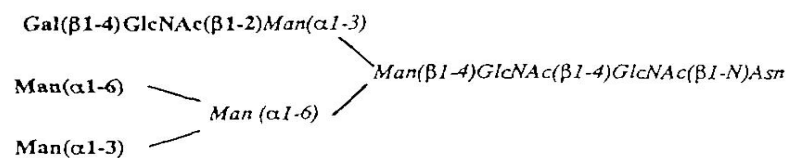


Abbildung 2.7: Strukturen der an Asparagin gebundenen Zuckergruppen (Robinson 1990)

2.3.3 Analytik der an Proteinen gebundenen Oligosaccharide

Die Analytik der Glykane eines Glykoproteins unterscheidet sich grundlegend von der Charakterisierung der übrigen posttranslationalen Modifikationen. Dies liegt an der Struktur der Zucker: Sie sind extrem polar, teilweise ionisch, besitzen häufig ähnliche Strukturen und sind nicht chromophor. Zur Trennung der zuckerhaltigen Proteine oder Peptide nutzt man diese Eigenschaften durch Anwendung chromatographischer Methoden aus, so z.B. Gelfiltration, Affinitätschromatographie (Lectinsäulen), Ionenchromatographie oder elektrochemischen Methoden, wie der gepulsten Amperometrie. Falls keine detaillierte Charakterisierung der Zucker, sondern nur eine Identifikation des Proteins gewünscht ist, können die Zucker vor der Analyse entfernt werden. Ein einfacher Weg hierfür, ist die enzymatische Abtrennung der Zuckergruppen vor der eigentlichen Analytik z. B mit Enzymen wie PNGaseF, das die N-glykosidischen Zuckergruppen entfernt. In den letzten Jahren wird für die Zuckeranalytik zunehmend die Massenspektrometrie eingesetzt (Harvey 2001, Küster 2001, Charlwood 2000).

2.3.4 Deamidierungen

Die Deamidierung von Asparaginen und Glutaminen zur Asparagin- und Glutaminsäure ist eine posttranslationale Modifikation, die analytisch schwierig zu detektieren ist. Dies liegt an der geringen Massendifferenz zwischen Asparagin und Asparaginsäure (dasselbe gilt für Glutamin und Glutaminsäure) von nur einem Dalton (Wright 1991).

Für die Deamidierungsreaktion sind zwei Reaktionswege möglich: Die erste Möglichkeit ist eine chemische Deamidierung, auf die später im Detail eingegangen wird. Der zweite Reaktionsweg ist eine enzymatische Deamidierung. Unter der großen Anzahl an Deamidasen, sind einige sehr spezifisch, wie z.B. die Nicotinamidase (Yan 1987) oder die NH₂-terminale Asparagin-Deamidase (Stewart 1994). Es gibt aber auch äußerst unspezifische Deamidasen, wie die *Pseudomonas* 7A Glutaminase-Asparaginase (Lubkowski 1994). Dieses Enzym deamidiert sowohl das Asparagin als auch das Glutamin.

In der nachfolgenden Tabelle sind einige häufig vorkommende Deamidasen aufgelistet.

Name	Organismus/ isoliert aus	Ort der Deamidierung	"biologische Funktion" (Anwendungen)
Protein-NH ₂ - Asparagin- Deamidase (PNAD)	Schweineleber	N-Terminus (Asparagin)	Proteinabbau (Ubiquitin- Proteolyse)
Maus-Nt(N)- Amidase	cDNA(Maus)/Hefe	N-Terminus (Asparagin/Glutamin)	Proteinabbau (Ubiquitin- Proteolyse)
Pseudomonas 7A Glutamin- Asparaginase	Pseudomonas	Asparagin/Glutamin	Leukämietherapie
Asparaginase 2 (L-Asparaginase- Klasse)	E. coli	L-Asparagin	Leukämietherapie
Protein Deamidasen	Samen von Kidneybohnen	Asparagin/Glutamin	Lebensmittel- Chemie
Deamidase Enzym (Anti-Krebs-Peptid- Antagonist G)	Mensch	N-Terminus (Asparagin)	Leukämietherapie
"Peptidase, die Substance P deamidiert"	Mensch	C-Terminus (Asparagin)	Proteinabbau
Peptidoglutaminase	Bacillus Circulans (Mikroorganismus im Boden)	Asparagin/Glutamin	Lebensmittel- Chemie
Thyrotropin- Releasing Hormone (TRH)-Deamidase	Rattengehirn	TRH	Proteinabbau

Tabelle 2.1: Übersicht einiger ausgewählter Deamidasen

Der zweite mögliche Reaktionsweg ist die chemische (nicht-enzymatische) Deamidierung der Asparagine und Glutamine. Die Reaktion kann unter physiologischen Bedingungen im Organismus (Hochstrasser 1998) stattfinden oder während der Probenvorbereitung, bei der das Protein extremen Bedingungen bezüglich des pH oder der Temperatur ausgesetzt wird (Wright 1991). Die Untersuchungen mehrerer hundert Modellpeptide ergaben eine zehnmal höhere Deamidierungsrate für Asparagine als für Glutamine unter physiologischen

Bedingungen, mit Halbwertszeiten, die von wenigen Stunden bis hin zu Jahren reichten (Robinson 1991, Robinson 2001). Dies lässt sich durch den Reaktionsmechanismus erklären (siehe Abbildung):

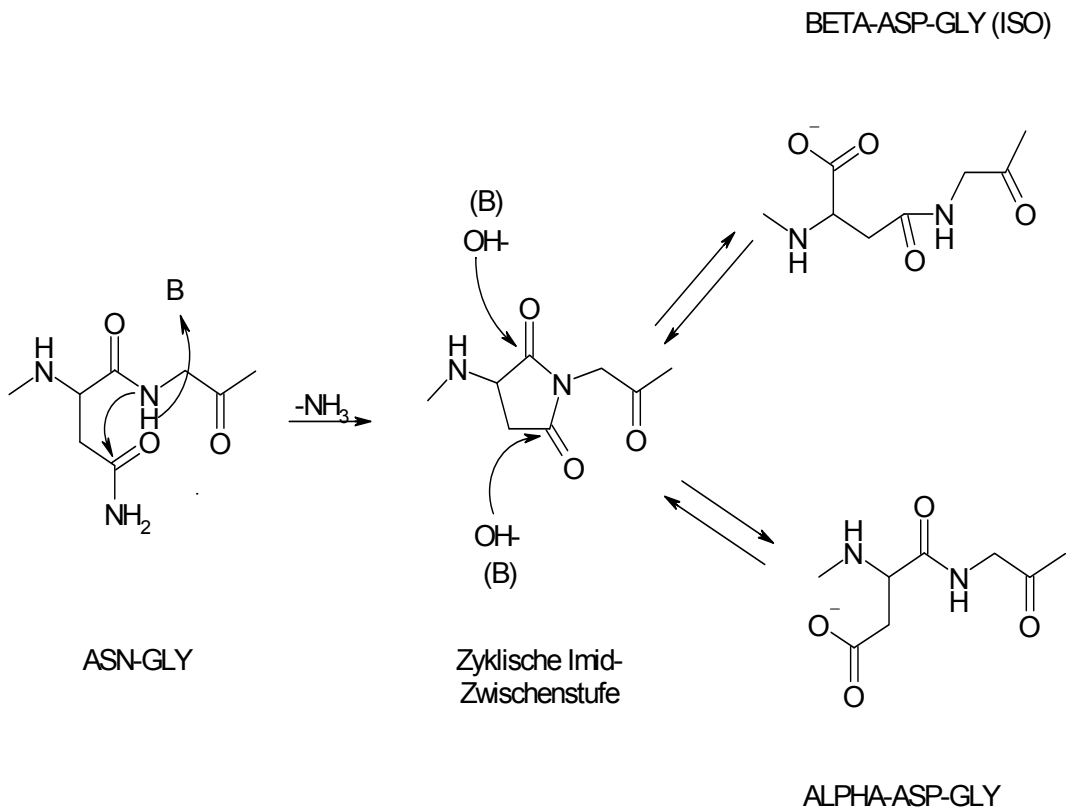


Abbildung 2.8: Reaktionsmechanismus der chemischen Deamidierung

Da es gelang, isomerische Aspartatprodukte zu isolieren, ist ein β -aspartyl-“Shift“-Mechanismus mit einer Succinimid-Zwischenstufe der einzig mögliche Reaktionsweg (Volkin 1997). Dabei wird die Geschwindigkeit der Reaktion von mehreren Parametern beeinflusst:

- Chemische Reaktionsbedingungen wie pH, Temperatur, Ionenstärke sowie Polarität der Lösungsmittel (Li 2000)
- Primärstruktur und damit die Aminosäuresequenz (Radkiewicz 2001)
- Tertiär- und Quartärstruktur (Wright 1991, Xie 1999).

Deamidierungen müssen jedoch keine biologische „Sackgasse“ sein. Es sind Enzyme bekannt, die eine Deamidierung reparieren können (DeVry 1999), so z.B. das Enzym L-isoaspartat (D-Aspartat) O-Methyltransferase (Hipkiss 2001).

2.4 Massenspektrometrie

2.4.1 Grundlagen und Übersicht über die verwendeten Techniken

Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik mit der die Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum bestimmt werden kann. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle zur Ionenerzeugung, einem Massenanalysator, in dem die Ionen beschleunigt und anschließend nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt und einer Detektionseinheit, welche die Ionen mit ihren relativen Intensitäten nachweist. Eine Übersicht über die Komponenten eines Massenspektrometers ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

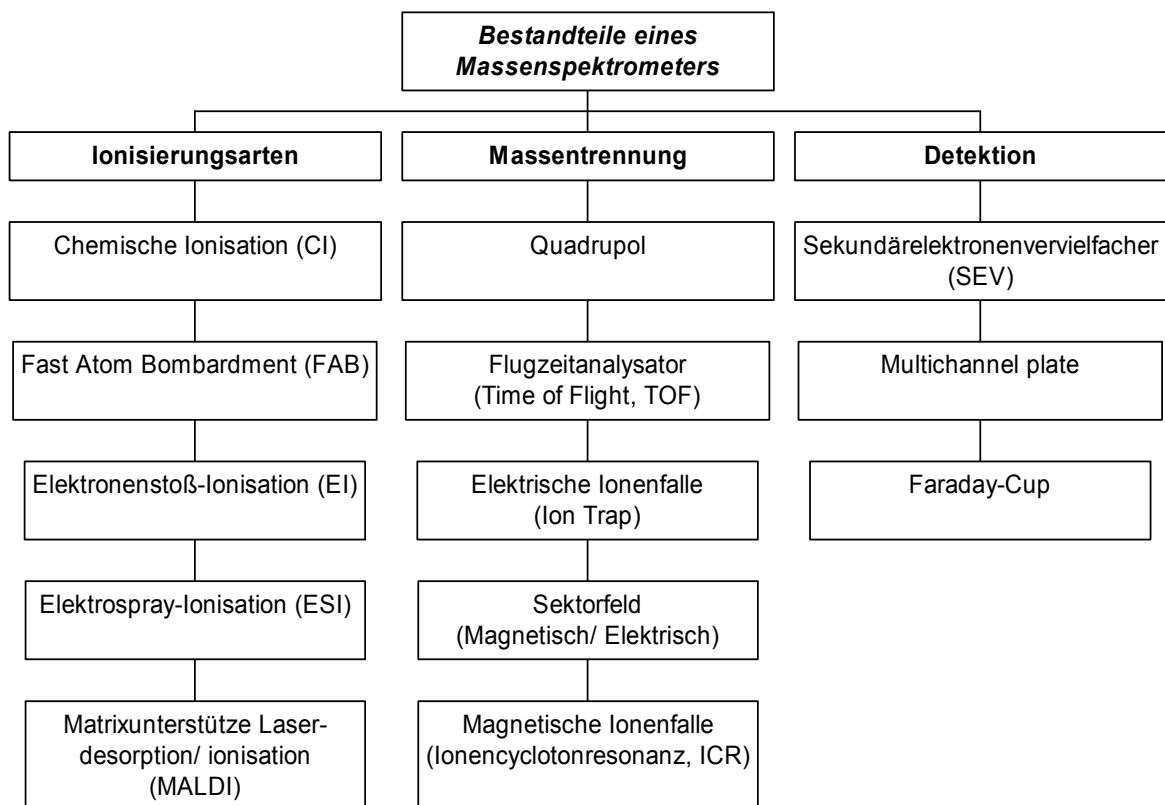


Abbildung 2.9: Prinzipielle Bestandteile eines Massenspektrometers

Die Massenspektrometrie (MS) als Analysetechnik im Hochvakuum gibt es schon sehr lange, ein regelrechter Boom in der Biochemie für diese analytische Methode ist aber erst in den letzten zehn Jahren entstanden. Dies liegt an der Entwicklung der sanften Ionisierungsarten Elektrospray-Ionisierung (ESI) und der Matrix unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI). Die beiden Techniken ermöglichten eine massenspektrometrische Analytik auch für Biomoleküle.

Im Folgenden sollen für die zwei heute wichtigsten MS-Techniken die Prinzipien der Ionisierung und der Massentrennung genauer veranschaulicht werden.

2.4.1.1 Ionisierungsprinzip

2.4.1.1.1 Ionisierung von Biomolekülen mittels ESI-Technik

Der Begriff „Elektrospray“ stammt aus der Physik und beschreibt die Dispersion geladener Teilchen aus einer Flüssigkeit in einem elektrostatischen Feld. Zu diesem Thema gibt es eine große Anzahl an Review-Artikeln, die sich sowohl mit der Theorie als auch mit Anwendungsbeispielen beschäftigen (Smith 1991, Yates 1996, Gaskell 1997).

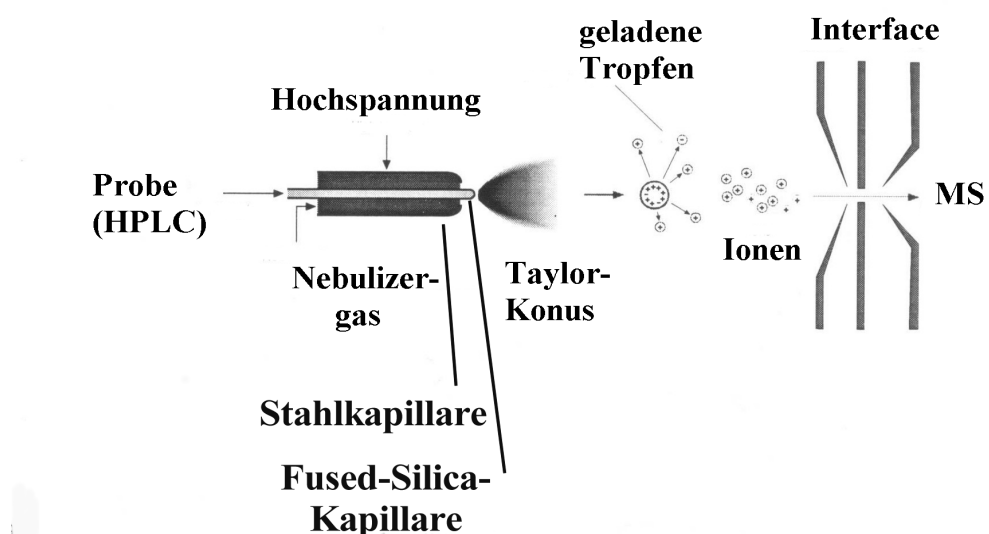


Abbildung 2.10: Prinzip des Elektrosprayverfahrens

Die Ionisierung der Probenmoleküle mittels Elektrospray, sowie der Aufbau eines ESI-Quadrupol-Massenspektrometers ist in Abbildung 2.10 schematisch dargestellt.

Die Proben werden in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, das üblicherweise aus einer Mischung aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol sowie einem geringen Anteil einer Säure wie Ameisensäure oder Trifluoressigsäure (TFA) besteht. Diese Lösung wird aus einer Fused-Silica-Kapillare mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit hinausgesprüht. Da eine Potentialdifferenz (ca. 4.5-5 kV) zwischen der Spitze der Stahlkapillare und einer Stahlplatte am Eingang des Massenspektrometers (Orifice Plate) besteht, kommt es durch eine Neuverteilung der geladenen Teilchen im Inneren der Flüssigkeit zu einem fortwährenden Zerplatzen der Tröpfchen (Coulomb-Abstoßung), die dadurch immer kleiner werden. Dieser Prozess wird durch eine Kollision mit Inertgasteilchen unterstützt, so dass „nackte“, fast vollständig desolvatisierte Ionen in das Massenspektrometer eintreten. Da im Inneren des Massenspektrometers eine negative Ladung angelegt wird, werden die Kationen förmlich in das Innere hineingezogen. Übliche Flussraten bei dieser Technik liegen zwischen 5 und 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Da Untersuchungen zeigten, dass eine Reduktion der Flussrate zu einer Steigerung der Empfindlichkeit führt, wurde die sogenannte Nanospraytechnologie entwickelt (Wilm 1994, Wilm 1996). Dabei wird die Probe in eine goldüberzogene Glaskapillare gegeben, und durch das Anlegen eines pneumatischen Drucks und einer geringen Potentialdifferenz (0.6-1.0 kV) kommt der Elektrosprayprozess in Gang. Im Gegensatz zu der Normalspraymethode wird die Probe nicht kontinuierlich zugeführt und es wird eine weitaus geringere Flussrate von ca. 5-20 nl/min erzielt, da die Glaskapillare eine Öffnung von nur wenigen μm im Gegensatz zu 50-100 μm bei der gängigen Methode besitzt. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Normalspraymethode ist neben einer höheren Empfindlichkeit die längere Spraydauer einer Probe, die eine Durchführung zeitaufwendigerer Experimente ermöglicht. Als Zwischenlösung hat sich mittlerweile die Mikrospraytechnik etabliert, die kleinere Flussraten deutlich unter $1\mu\text{l}/\text{min}$ zulässt, dennoch eine Online-Methode ist, die mit einer HPLC gekoppelt werden kann.

Der Elektrospray-Ionisierungsprozess zeigt eine Besonderheit, die man z.B. in einem MALDI-Spektrum nicht sieht, und die zu einem auf den ersten Blick schwer interpretierbaren Spektrum führt: Es kommt zu einer Bildung von mehrfach geladenen

Ionen. Wie die folgende Abbildung zeigt, entsteht eine Serie von Signalen, die sich jeweils um eine Ladung unterscheiden. Die Ladungen entstehen im einfachsten Fall durch Protonierung der zugänglichen basischen Aminosäuren in den Proteinen oder Peptiden. Die Ladungsverteilung ähnelt einer Gaußschen Glockenkurve, deren Form von vielen Faktoren, wie z.B. der Wahl der Lösungsmittelzusammensetzung und des pH-Wertes abhängt. Das erwartete Proteinspektrum mit der Molekülmasse wird mit Hilfe eines Computerprogramms erzeugt.

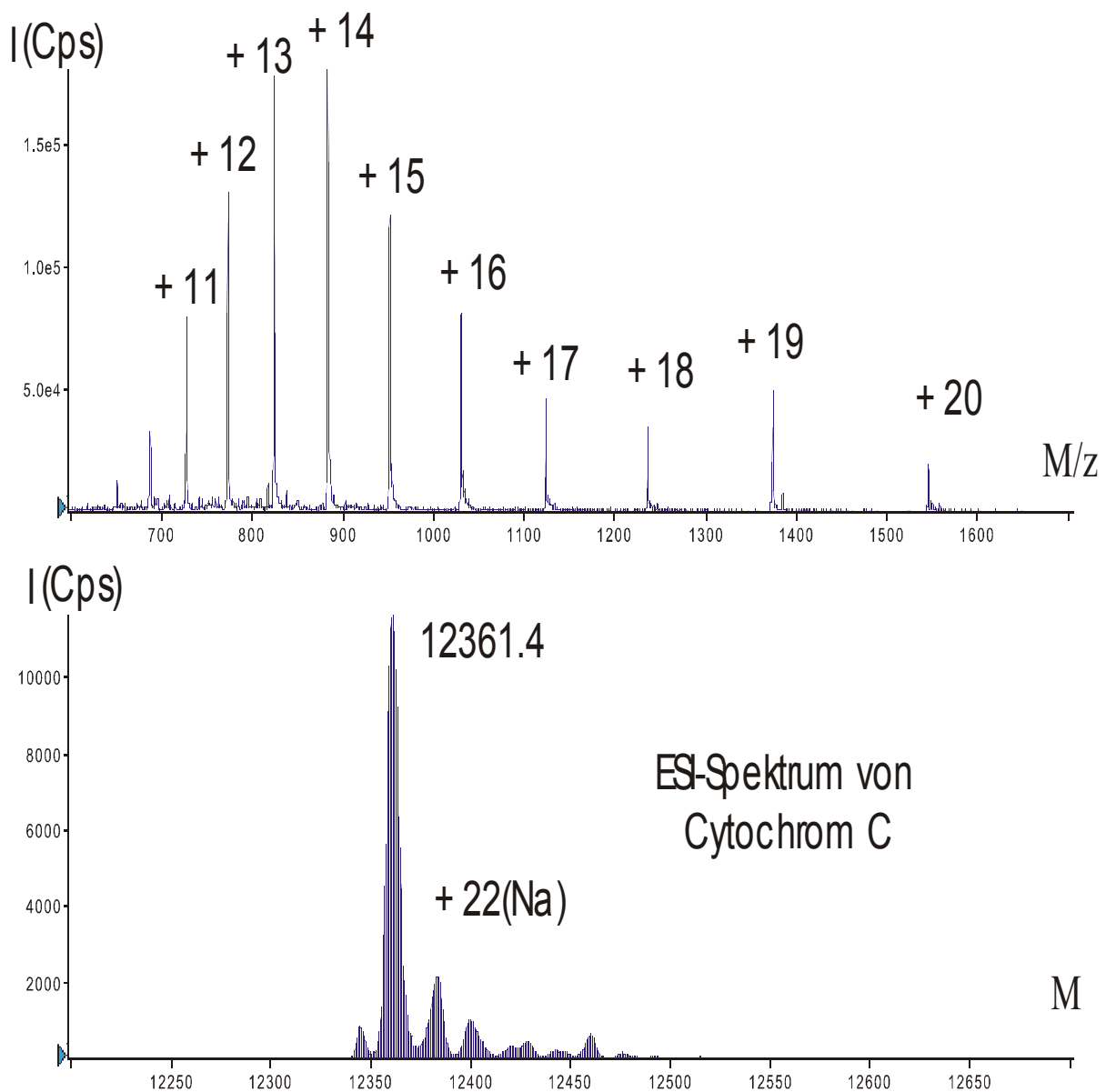


Abbildung 2.11: ESI-Spektrum von Cytochrom C mit dekonvuliertem Molekülpeak

Wie in der Abbildung 2.11 ersichtlich, ergibt sich eine statistische Verteilung über die verschiedenen Ladungszustände, die zeigt, dass eine bestimmte Anzahl von Ladungszuständen mit höherer Wahrscheinlichkeit auftreten als andere. Da benachbarte Ladungszustände sich um eine Ladung voneinander unterscheiden, kann die Software daraus das Molekulargewicht des Moleküls berechnen.

Die Berechnung beruht dabei auf folgenden Überlegungen:

Man hat zwei benachbarte Ladungszustände m_2 und m_1 mit $m_2 > m_1$. Gesucht ist die Molekulargewicht M , bekannt ist zusätzlich, dass die Ladung n der benachbarten Ladungszustände sich um eins unterscheiden. Damit kann folgendes Gleichungssystem aufgestellt werden:

$$m_1 = \frac{M + n}{n} \quad \text{und} \quad m_2 = \frac{M + (n - 1)}{(n - 1)}$$

Aus diesen beiden Gleichungen lässt sich einfach zuerst n und anschließend M berechnen:

$$n = \frac{m_2}{m_2 - m_1} \quad \text{und damit auch} \quad M = nm_1$$

2.4.1.1.2 Ionisierung mittels der MALDI-Technik

Ende der 80er Jahre gelang es Karas und Hillenkamp, die Probleme geringer Intensitäten und störender Fragmentierungen beim Ionisieren schwerflüchtiger organischer Substanzen zu umgehen (Hillenkamp 1990, Karas 1989). Der große Durchbruch wurde durch die Verwendung kleiner organischer Verbindungen erreicht, die bei der eingestrahlten Laserwellenlänge im UV-Bereich eine hohe Absorption zeigten.

Typische Matrixsubstanzen sind:

- Bernsteinsäure
- 2,5-Dihydrobenzoesäure (DHB)
- 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure (Sinapinsäure)
- α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure

In der Praxis sieht eine Analyse wie folgt aus:

Auf einem metallischen Probenhalter wird eine Probe mit der Matrix in einem Verhältnis von circa 1: 1000-10000 gemischt. Bei der Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zu einer Kokristallisation von Analyt und Matrix, wobei das Analytmolekül in den Kristallverband der Matrix eingebettet wird. Der Einbau der Probe in das Kristallgitter der Matrix ist dabei essentiell für das Funktionieren des nachfolgenden Prozesses.

Daher ist ein Entsalzen der Probe vor der Analyse notwendig. Die Entsalzung der Proben kann dabei z. B. mittels einer HPLC-Auftrennung erfolgen, es wird heutzutage aber auch häufig mit kommerziell erhältlichen „ZipTips“ (Kussmann 1997) durchgeführt. Dies sind kleine Spitzen, die mit Reversed-Phase (RP) C18-Material gefüllt sind. Die Probe wird an das RP-Material gebunden, während das Salz nicht auf der Säule bindet, und anschließend werden die Peptide mit einem Anteil von circa 50 % an anorganischem Lösungsmittel von der Säule eluiert. Mit Hilfe der ZipTip-Säulen dauert das Entsalzen der Probe nur wenige Minuten.

Nun schießt man mit einem Laser einen kurzwelligen Impuls von wenigen Nanosekunden Dauer auf die sich im Vakuum des MS befindliche Probe. Die Matrix absorbiert nun den Großteil der Laserenergie und es kommt zu einer Desorption einiger Schichten der Präparation aus Matrix und Analyt in die Gasphase. Weil die Matrix dabei den Großteil der Energie absorbiert, bleiben die labilen Biomoleküle intakt. Auch bei der Ionisation scheinen die Matrixmoleküle eine Rolle zu spielen, indem radikalische Matrixmoleküle Protonen an die Analytmoleküle übertragen. Das Prinzip der Ionisierung mit MALDI ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

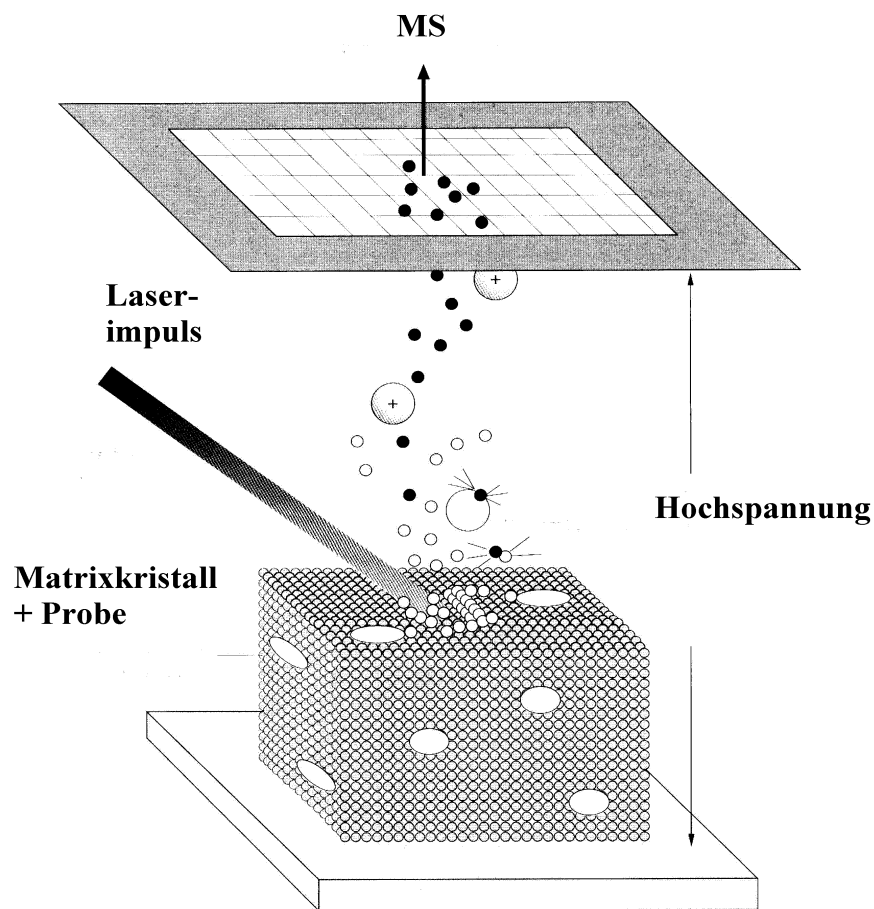


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der MALDI-Technik (aus Lottspeich 1998)

2.4.1.2 Prinzip der Massentrennung

2.4.1.2.1 Massentrennung mit einem Quadrupolinstrument

Der Quadrupol-Massenfilter ist ein scannender Massenanalysator, d.h. zu einem bestimmten Zeitpunkt ist er nur für Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis

durchlässig. Dies bedeutet in der Praxis gegenüber anderen Massenanalysatoren einen erhöhten Zeitaufwand, da der zu messende Massenbereich komplett abzuscannen ist. Der Aufbau besteht aus vier stabförmigen Metallstäben, den Quadrupolen. Durch das Anlegen von kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldern ergeben sich stabile Kreisbahnen für Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis. Sämtliche andere Ionen, die sich gleichzeitig in dem Quadrupolfeld befinden, gehen der Analyse verloren, da sie den Quadrupol nicht durchqueren können. Da man in der Praxis in einem Zeitfenster von einigen Sekunden den kompletten Massenbereich abscannen kann, erhält man trotzdem ein vollständiges Spektrum.

2.4.1.2 Massentrennung mit einem Time-of-Flight-Instrument

Die durch den Laserimpuls gebildeten Ionen werden im Vakuum auf eine kinetische Energie von mehreren KeV beschleunigt, um anschließend in einer feldfreien Driftstrecke nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis aufgetrennt zu werden. Dabei durchlaufen schwerere Ionen die Strecke langsamer als leichtere. Der mathematische Zusammenhang leitet sich über die kinetische Energie (E_{kin}) und die Geschwindigkeit v des Ions während des Fluges ab:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = zeU \quad \text{und} \quad v = \frac{L}{t}$$

und daraus ergibt sich:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eUt^2}{L^2}$$

mit:

- m: Masse des Ions
- z: Ladungszahl
- e: Elementarladung
- L: Weg
- t: Flugzeit

Wie man erkennen kann, besteht eine quadratische Abhängigkeit der Flugzeit von dem Verhältnis aus Masse und Ladung. Auf den genauen Aufbau eines MALDI-Massenspektrometers, z. B. die Unterschiede zwischen linear und reflector mode wird nicht näher eingegangen, da die meisten Proben mit ESI-MS aufgenommen wurden. In der Praxis gibt es in der MALDI-Technik im Vergleich zur ESI-Technik Limitierungen bei der Vermessung kleinerer Massen, da in diesem Bereich die Signale der Matrix sehr intensiv sind und andere Massen unterdrücken können.

Abschließend soll noch eine wichtige Kenngröße eines Massenanalysators eingeführt werden, die Auflösung (R). Sie wird definiert als:

$$R = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

Sie beschreibt wann zwei Massen m_1 und m_2 als getrennt voneinander bezeichnet werden in Abhängigkeit von dieser massenanalysatorspezifischen Größe. Je nach Massenspektrometriegerät ist diese Definition anders festgelegt worden: Bei einem Quadrupolinstrument geht man z. B. nicht von Basislinien getrennten Peaks aus, sondern von der sogenannten 50%-Taldefinition. Besitzt das Gerät eine Auflösung von 1000 so werden zwei Moleküle der Massen 1000 und 1001 als aufgetrennt betrachtet, wenn das Tal zwischen den beiden Peaks weniger als 50% der Signalintensität des Peaks mit der geringeren Signalintensität ausmacht. Die Auflösung liegt bei einem modernen MALDI-MS -Gerät bei 10000 bis 20000 je nach Gerät und Massenbereich.

2.4.2 Anwendungen in der Biotechnologie heute

Ein wichtiger Schritt in der Analyse der Funktion eines Proteins ist die Kenntnis der Primärsequenz eines Proteins und seiner posttranslationalen Modifikationen. Die klassische Edman-Chemie und eine Massenbestimmung des Gesamtproteins mittels MS reichen hierfür normalerweise nicht aus. Daher ging man dazu über, mittels enzymatischem Verdau die Proteine in Peptide zu spalten (Eckerskorn 1990, Eckerskorn 1996). Als Enzyme kommen dabei hauptsächlich Endopeptidasen in

Frage, die das Proteingerüst nach spezifischen Aminosäuren C- oder N-terminal spalten. Dies hat zwei Vorteile: Zum einen erhält man Peptide, die mittels Edman-Abbau oder Massenspektrometrie analysiert werden können. Zum anderen können die mittels Massenspektrometrie erstellten „peptide maps“ mit in der Datenbank enthaltenen Proteinen verglichen werden. Durch eine bekannte Enzymspezifität können die Proteine in der Datenbank theoretisch gespalten und die Peptidmassen mit den experimentell erhaltenen Massen verglichen werden. Die gängigsten Endopeptidasen mit ihren jeweiligen Spaltstellen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet (experimentelle Parameter für die in der Arbeit verwendeten Enzyme sind im experimentellen Teil erfasst):

Proteasen	Lys-C	Asp-N	Glu-C (Protease V8)	Trypsin
Spaltstelle	Lysin (C-terminal)	Asparagin, Cystein (N-terminal)	Glutamin (C-terminal)	Arginin, Lysin (C-terminal)

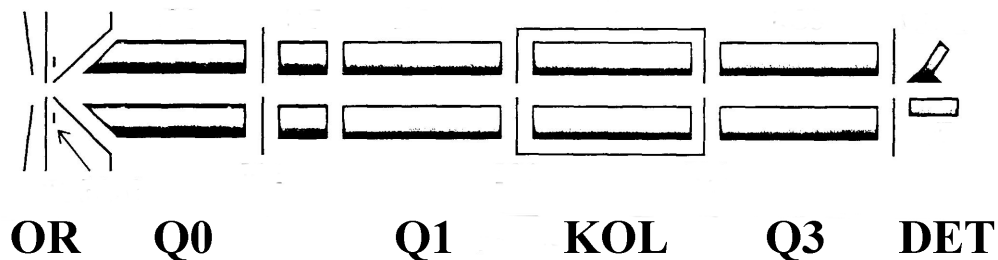
Tabelle 2.2: Die in der Proteinchemie am häufigsten verwendeten Endopeptidasen

Diese Peptidgemische, sogenannte „peptide maps“ werden im einfachsten Fall direkt online mit LC-ESI-MS oder offline als Gemisch mit MALDI-MS vermessen. Im letzteren Fall kann es zu Suppressionseffekten kommen (Kratzer 1998), da sich die Peptide bei der gleichzeitigen Ionisierung „stören“ können. Ist das Protein mit den Daten seines vollständig sequenzierten Genoms in einer Protein- oder Genom-Datenbank, kann durch den oben erwähnten Vergleich der Peptidmassen gegen die Datenbank das Protein identifiziert werden. Ist das Protein unbekannt oder nur mit einem teilweise sequenzierten Genom in der Datenbank muss zumeist eine „DeNovo-Sequenzierung“ durchgeführt werden. Diese liefert Sequenzinformation in Form eines kleinen Abschnittes der Aminosäuresequenz („sequence-tag“). Hierzu wird eine Fragmentierung der Peptide bis hin zu ihren Einzelbausteinen, den Aminosäuren benötigt. Wie nachfolgend erläutert, werden hierbei Fragmentierungen genutzt, die zumeist an den Peptidbindungen entlang der Peptidkette auftreten.

Der Ansatz der Strukturanalyse sieht je nach Massenspektrometrietyt unterschiedlich aus. Für die beiden gängigsten Typen, ESI und MALDI sollen die speziellen Techniken kurz erläutert werden.

2.4.2.1 Strukturanalyse mit ESI-Quadrupol-MS

Um die einzelnen Techniken erklären zu können, sollte man den Aufbau eines Triple-Quadrupol-MS vor Augen haben.



mit:

OR: Orifice (Eingang in das MS)

Q0: „Vor“-Quadrupol

Q1: 1. Quadrupol

Kol: Kollisionszelle

Q3: 2. Quadrupol

Det: Detektor

Abbildung 2.13: Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers

Im einfachsten Fall soll ein MS/MS-Spektrum von einem interessanten Peak erzeugt werden. Zu diesem Zweck wird aus dem normalen Spektrum ein Massenpeak ausgesucht (das Mutterion), der dann im ersten Quadrupol (Q1) selektiert und in der Kollisionszelle durch den Zusammenprall mit Inertgas (Collision induced dissociation, CID) fragmentiert wird. Das daraus resultierende Fragmentspektrum wird im dritten Quadrupol (Q3) aufgenommen. Bei den heutigen „High-throughput-

Methoden“ mit einem hohen Automatisierungsgrad erfolgt die Aufnahme der Spektren automatisiert. Der Computer fragmentiert selbstständig den jeweils höchsten, zweithöchsten, usw. Peak aus dem normalen Spektrum und man erhält eine Vielzahl von MS/MS-Spektren, die wiederum für die Datenbanksuche verwendet werden können.

Das Ergebnis dieser Fragmentierungen sind Ionen, die sukzessive entweder C- oder N-terminal abgespalten wurden. Nach dieser grundlegenden Unterscheidung werden sie in sogenannte x, y, z- bzw. a, b, c-Serien eingeordnet. Man erhält ein Spektrum mit unterschiedlichsten Fragmentmassen, die den entsprechenden Serien zuzuordnen sind, bevor die Sequenzinformation vorliegt. Von Hand ist eine solche Analyse sehr zeitaufwendig und umständlich. Daher bieten die meisten Massenspektrometer Software zur automatisierten Auswertung durch eine Datenbankrecherche. Dabei werden die Peptide theoretisch fragmentiert, die entsprechenden Massen für die jeweiligen Serien berechnet, mit dem gemessenen Spektrum verglichen und dem Benutzer Vorschläge für ein Protein mit einer bestimmten Trefferwahrscheinlichkeit angeboten.

Sobald posttranslationale Modifikationen auftreten, stößt diese Auswertemethode auf Probleme, da die Massen der modifizierten Peptide nicht mehr mit den theoretischen Massen übereinstimmen. Für posttranslationale Modifikationen benötigt man speziell auf sie zugeschnittene Analysetechniken. Beispiele für solche Techniken sind der Precursor-scan oder der Neutralverlust-scan (Huddleston 1993, Carr 1993, Neubauer 1999).

Eine schematische Übersicht über diese Techniken ist in der nachfolgenden Abbildung zu sehen. Allen drei gezeigten Techniken ist eine Fragmentierung in der Kollisionszelle eines Massenspektrometers gemeinsam. Im einfachsten Fall, einem MS/MS-Experiment (1) wird ein Peptid selektiert und fragmentiert. Man erhält die charakteristischen Fragmentierungsserien des gewünschten Peptides. Der zweite Fall, der „Precursor-scan“ (2) ist eine Art umgekehrtes MS/MS-Experiment. Man spaltet durch die Kollision mit Inertgas eine spezielle chemische Gruppe ab, und lässt sich rückwirkend die Peptide anzeigen, an denen diese Gruppe befand. Anhand eines Beispiels lässt sich der Ablauf besser verstehen. Beim Precursor-Scan auf eine Phosphat- oder Glykogruppe nutzt man die Tatsache, dass die Phosphat- oder Zuckerbindung sehr labil ist und leicht fragmentiert wird. In der Kollisionszelle findet

eine Fragmentierung statt, bei der das Phosphat oder der Zucker abgespalten wird. Nun kann mit Hilfe des Computers analysiert werden, an welchen Peptiden das Phosphat gebunden war bevor es abgespalten wurde.

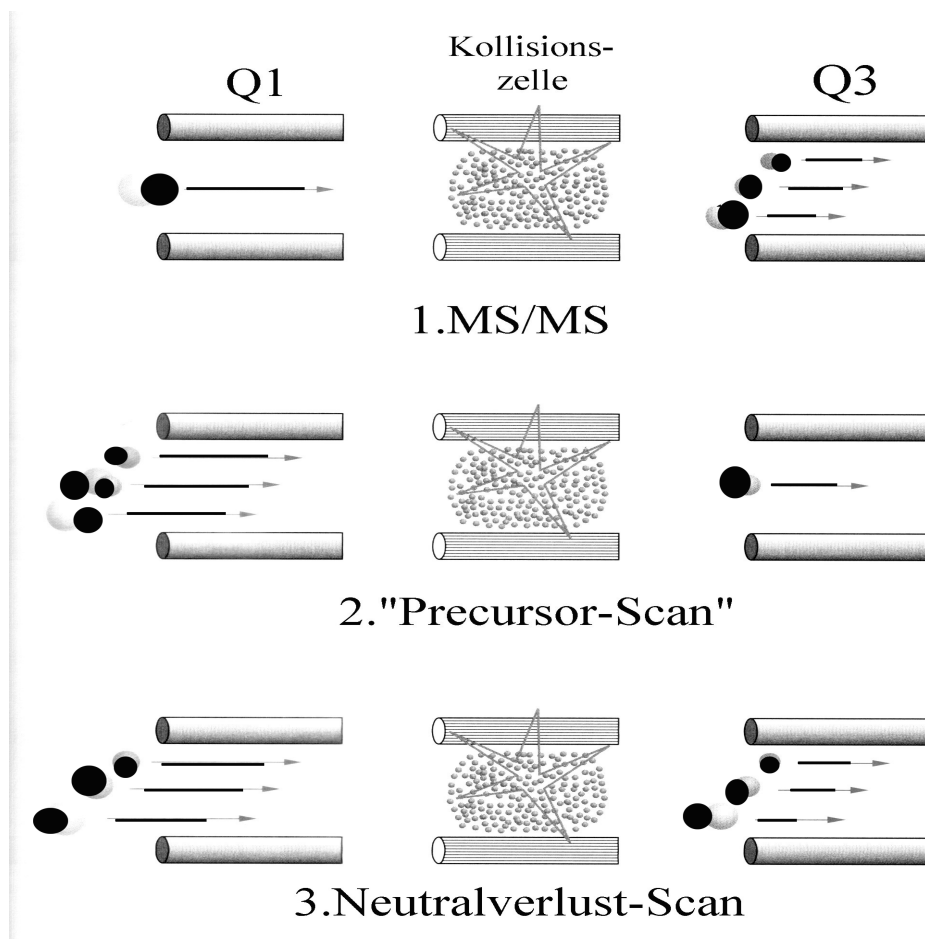


Abbildung 2.14: Ablauf einiger wichtiger Analysetechniken an einem ESI-Q-MS

Beim Neutralverlust-Scan (3) wird ein Neutralteilchen wie die Phosphorsäure bei der Fragmentierung abgespalten und sämtliche Peptidmassen vor und nach der Fragmentierung auf genau diesen Massenunterschied hin untersucht. Ein Unterschied von 80 Dalton zeigt an, dass bei der Fragmentierung ein Molekül Phosphorsäure vom Peptid abgespalten wurde.

Die beiden letztgenannten Methoden sind charakteristischer für spezielle Modifikationen, wie z. B. eine Phosphorylierung als ein reines MS/MS-Spektrum und werden daher bevorzugt bei Verdacht auf diese Modifikationen angewendet.

2.4.2.2 Strukturanalyse mit MALDI-MS

Die Strukturanalyse mit MALDI-MS entspricht was das Auftreten von Fragmentierungsserien angeht, der zuvor beschriebenen MS/MS-Fragmentierung, wird aber als Post-Source-Decay (PSD) bezeichnet. Sie beruht jedoch auf einem anderen Prinzip als die Kollision mit Inertgas bei den ESI-Triple Quadrupolen. Beim Durchlaufen der feldfreien Driftstrecke kommt es zu spontanen Zerfallsprozessen der Peptide, da die aufgenommene Energie beim Beschuss durch den Laser und durch Stoßaktivierung innerhalb der Matrixwolke zu hoch für die Anionen ist. Die metastabilen Ionen fragmentieren nach den gleichen vorher genannten Gesetzmäßigkeiten in die einzelnen Serien. Um ein vollständiges Fragmentspektrum zu erhalten, ist der technische Aufwand bei MALDI-MS sehr viel höher als bei der CID-Technik, die erhaltenen Spektren sind jedoch vergleichbar. Heutzutage wird das komplette PSD-Spektrum automatisch vom Computer generiert und ist innerhalb weniger Sekunden erstellt. Der Vorteil der MALDI gegenüber der ESI-Q-Strukturanalyse ist eine höhere Auflösung und damit eine höhere Massengenauigkeit. Bei einer Datenbankrecherche ist dies von Vorteil, da Peptide mit einer ähnlichen Masse so leichter ausgeschlossen werden können. Bei der Datenbanksuche führt dies zu einem höherem „Score“, wodurch die Trefferwahrscheinlichkeit für das richtige Protein erhöht wird.

2.4.2.3 Gebräuchliche Massenspektrometer und ihre Charakteristika

Zum Schluß sollen die Massenspektrometrie-Techniken, die in der Praxis heute angewendet werden oder früher angewendet worden sind noch kurz vorgestellt werden:

- ESI-(Quadrupol)-MS: Eine der am häufigsten angewendeten Techniken, vor allem in der online Kopplung mit einer HPLC. Es gibt verschiedene Analyse-Techniken, die vor allem für die Analyse posttranslationaler Modifikationen sehr gut geeignet sind.
- MALDI-TOF: Eine robuste Routinemethode, die nach wie vor sehr erfolgreich für die Analyse von „Peptid-Massen-Fingerprints“ eingesetzt wird.
- Ionenfalle (Ion-Trap, Pauli-Trap): Sie ist zumeist mit einer ESI-Quelle ausgestattet, daher ist die Kopplung mit einer HPLC möglich. Das Besondere an der Ionenfalle ist die Möglichkeit einer (MS)ⁿ-Analyse.
- Fouriertransform (FT)-Ionencyclotronresonanz (ICR)-MS: Zur Ionenerzeugung kann eine ESI- oder eine MALDI-Quelle verwendet werden. Durch physikalische Gesetzmäßigkeiten bedingt, ist bei dieser Technik die Massengenauigkeit (mass accuracy) am höchsten. So war es möglich bei einem 16 kD Protein eine Standardabweichung von ± 0.05 Dalton zu erzielen (Sarioglu, 1999).
- ESI-(Quadrupol)-TOF-MS: Eine neuere Entwicklung, die es ermöglicht, Fragmentspektren mit einer höheren Massengenauigkeit als der Quadrupoltechnik aufzunehmen und damit eine höhere Trefferwahrscheinlichkeit bei einer Datenbanksuche zu erzielen.
- MALDI-TOF-TOF: Die neueste Hybridtechnik, die mit einer MALDI-Quelle arbeitet, aber zusätzlich eine Kollisionskammer besitzt und dabei eine sehr große Anzahl an Spektren (und auch Fragmentspektren) mit einer äußerst hohen Massengenauigkeit und -intensität in kürzester Zeit liefert.

2.5 Bedeutung und Vorkommen der untersuchten Proteine

2.5.1 Haptoglobin

2.5.1.1 Geschichtliches

Das Haptoglobin wurde 1937 durch Jayle entdeckt. Er stellte eine Steigerung der Peroxidase-Aktivität des Hämoglobins nach Zugabe von Blutplasma fest und es gelang ihm, diese Eigenschaft einem neuen Protein zuzuschreiben. Der Name Haptoglobin wurde dabei vom Bindungsverhalten des Haptoglobins an das Hämoglobin abgeleitet ("haptein"-binden). Die Haptoglobin-Gehalte wurden später stets in Einheiten der Hb-Bindungskapazität ausgedrückt. 1946 gelang die Isolierung und Charakterisierung von Haptoglobin und 1956 wurden drei Phänotypen durch O'Smithies mittels Stärke-Gel-Elektrophorese entdeckt.

2.5.1.2 Struktur (Putnam 1975, Dobryszczycka 1997)

Das Haptoglobin besteht aus zwei Polypeptidketten: einer leichteren α -Kette (84 AS) und einer schwereren β -Kette (245 AS).

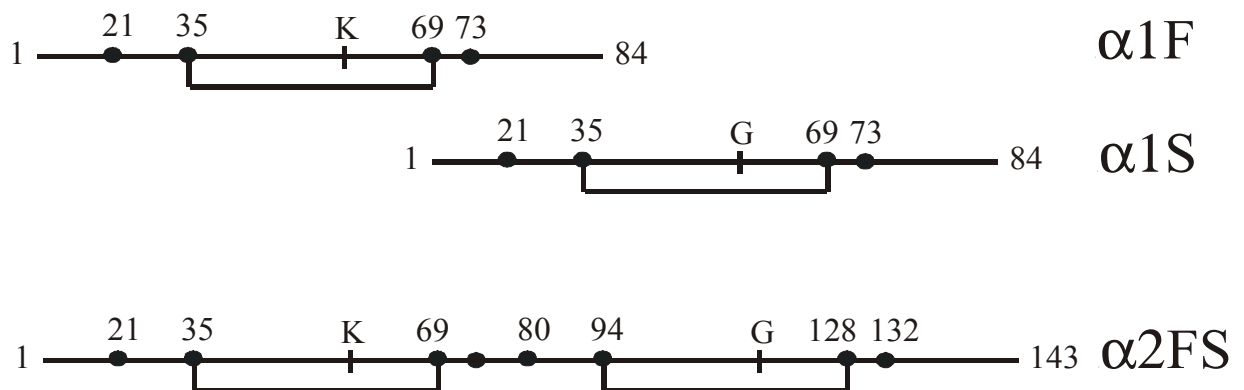


Abbildung 2.15: Die Struktur der unterschiedlichen α -Ketten des Haptoglobins

Die beiden α -Ketten werden, wie in der obigen Abbildung dargestellt, unterschieden in:

- α_1 -Typ: α_{1S} und α_{1F}
Sie haben die gleiche Anzahl an Aminosäuren, jedoch ist eine Glutaminsäure durch eine Punktmutation in Position 54 gegen ein Lysin ausgetauscht.
- α_2 -Typ: $\alpha_{2(FS)}$
Die beinahe doppelt so lange Kette, ist 143 Aminosäuren lang und, wie aus der Abbildung zu entnehmen, ein Produkt eines nicht identischen "crossing-over"-Ereignisses (Bowman 1982).

Die Grundstruktur des Haptoglobins besteht aus einer $2\alpha 2\beta$ -Anordnung mit jeweils einer Disulfidbrücke zwischen den beiden unterschiedlichen Ketten und einer (α -Kette) bzw. zwei (β -Kette) intramolekularer Disulfidbrücken.

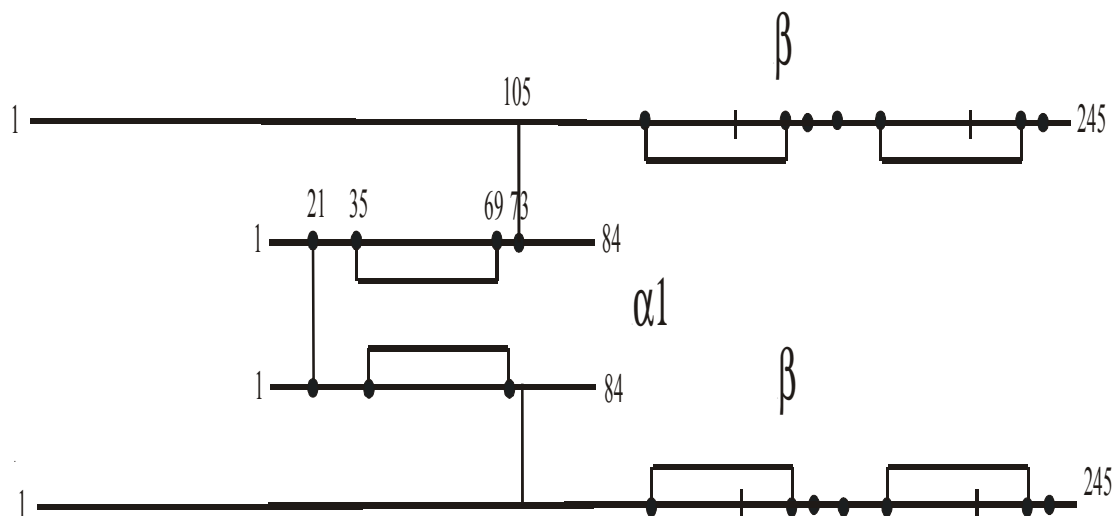


Abbildung 2.16: Räumliche Struktur der einfachsten Haptoglobinkette ($\alpha_1\beta$)² (Kurosky 1980)

2.5.1.3 Phänotypen (Javid 1978, Langlois 1996)

Es gibt verschiedene Phänotypen mit derselben β -Kette aber unterschiedlichen α -Ketten, für deren Kodierung drei verschiedene Allele am $HP\alpha$ -Gen zuständig sind.

Drei verschiedene Phänotypen (Rademacher 1987) treten vornehmlich auf:

- Hp 1-1: $(\alpha_1\beta)^2$ (keine Polymerbildung)
- Hp 1-2: $(\alpha_1\beta)^n$ oder $(\alpha_2\beta)^n$ (gemischte Polymerbildung)
- Hp 2-2: $(\alpha_2\beta)^n$ (Polymerbildung der α_2 - mit der β -Kette)

Der Aufbau der drei Phänotypen ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt:

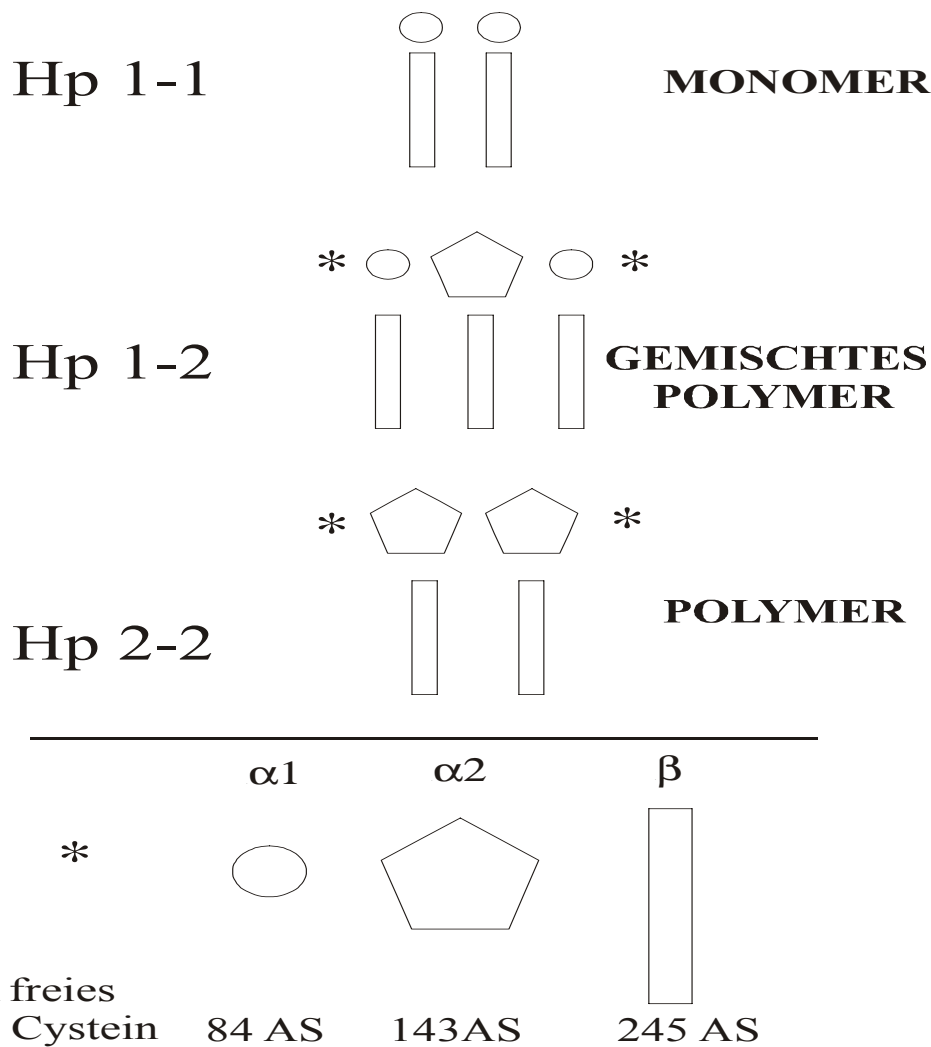


Abbildung 2.17: Die Struktur der drei häufigsten Haptoglobin-Phänotypen

Die einzelnen Ketten werden durch intermolekulare Cysteinbrücken (Abbildung 2.16) zusammengehalten: Bsp.: Hp 1-1: 3 intermolekulare Cysteinbrücken: β - α - α - β)

Neben diesen dreien gibt es weitere, sehr selten auftretende Phänotypen, sowohl mit Modifikationen in der β -Kette (Beispiele: Hp-Bellevue, Hp-Marburg, Hp-Porto Allegre) als auch mit Modifikationen der beiden α -Ketten.

Die Häufigkeit des Auftretens der drei wichtigsten Phänotypen ist geographisch stark unterschiedlich. Dieser Polymorphismus des Haptoglobin hat auch klinische Konsequenzen, so sind bestimmte Phänotypen deutlich häufiger in Krankheitsfällen, wie bestimmten Allergierarten, psychischen Störungen aber auch Krebsarten wie Brustkrebs oder Lungenkrebs zu finden (Langlois 1996).

2.5.1.4 Biochemische Eigenschaften

Die Haptoglobin-Gehalte im menschlichen Plasma schwanken zwischen 30-190 mg/ml. Das Molekulargewicht schwankt je nach Polymerisierungsgrad zwischen 80 und 800 KiloDalton. Zudem sind an die β -Kette Zuckergruppen gebunden, dabei beträgt das Molekulargewicht der zuckerfreien Kette 27800 Dalton, mit Glykoanteil 35700 Dalton. Der Glykoanteil setzt sich zusammen aus: 5% Sialinsäure, 5% Galactose, 2,5% Mannose, 5% Glucosamin und 0,2% Fucose (Gerbeck 1967, Nilsson 1981, Turner 1995, Goodarzi 1998, Gagneux 2001).

Es besteht eine Homologie mit der chymotrypsinogene Familie der Serin-Proteasen, dabei beträgt die Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz: 29-33%. Das Haptoglobin weist jedoch kein aktives Proteasezentrum auf: die zur Proteasefähigkeit notwendigen Aminosäuren His-57 und Ser-195 sind durch Lys und Ala ersetzt.

2.5.1.5 Funktion

Die wichtigste bekannte physiologische Eigenschaft ist die Bindung mit Hämoglobin (Hb). Dadurch wird die Metabolisierung des Komplexes durch einen Rezeptor in der Plasmamembran der Leber ($t_{1/2}$: 10 Minuten) gewährleistet. So kann ein Verlust des wichtigen Spurenelementes Eisen verhindert werden.

Haptoglobin ist ein "acute phase protein": Bei Entzündungsreaktionen kommt es zu einem Anstieg des Haptoglobin-Gehaltes auf das zwei- bis vierfache Level (Bowman 1988). Das Haptoglobin wird oft als "Reporter"- bzw. „Marker“-molekül für eine Vielzahl von Krankheiten, wie bestimmter Krebsarten, psychischer Störungen oder Autoimmunerkrankungen bezeichnet (Mann 1994, Turner 1995, Andersson 1998, Doherty 1998, Goodarzi 1998).

2.5.1.6 Haptoglobin-Hämoglobin-Bindung

Der Komplex aus Haptoglobin und Hämoglobin ist einer der stärksten nichtkovalenten Protein-Protein-Komplexe, die man kennt. Dieser Komplex hat eine Komplexbildungskonstante (K) von circa 10^{15} im pH-Bereich von 3,5-11. Es liegt jedoch keine kovalente Bindung vor, vielmehr wurden sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch Wasserstoffbrückenbindungen nachgewiesen (Tsapis 1979, Vallette 1981, Mucchielli 1981, Lustbader 1983, Okazaki 1996).

Es kommt zur Ausbildung eines stöchiometrischen 1:1-Komplexes. Ein Dimer des Hämoglobins reagiert mit dem Haptoglobin, dabei ist der reaktionsbestimmende Schritt die Ausbildung des Hämoglobin-Dimer ($Hb\alpha_1\beta_1$) aus dem Tetramer ($Hb\alpha_2\beta_2$), da die Hämoglobin-Bindungsstellen für das Haptoglobin zwischen den Dimeren liegt. Die nachfolgenden Reaktionsgleichungen soll die Komplexbildung veranschaulichen:

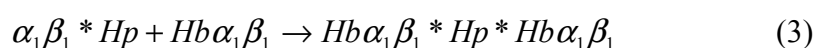
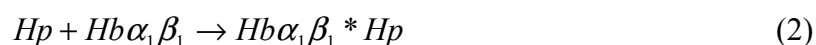
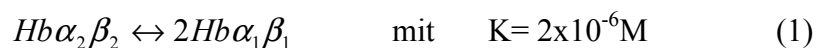


Abbildung 2.17: Der Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex

Dabei stellt Reaktionsschritt (2) eine Zwischenstufe dar. Die β -Kette des Haptoglobins und nur diese weist zwei unabhängige Bindungsstellen für das Hämoglobin auf. Ein Beleg hierfür ist, dass eine isolierte β -Kette mit dem Hämoglobin reagiert, nicht jedoch eine isolierte α_1 - oder α_2 -Kette. Auch Met-, Oxy-,

Cyanmet-, CO-Hämoglobin bilden Komplexe mit Haptoglobin aus, wobei sich die unterschiedlichen Phänotypen des Haptoglobin durch unterschiedlich starke Bindungen zum Hämoglobin unterscheiden.

Analytisch von Interesse war in der vorliegenden Arbeit die Ausbildung sogenannter „trains“ of spots in der 2D-Gelelektrophorese. So bilden alle drei Ketten eine ganze Reihe von Spots im 2D-Gel aus, von denen angenommen wird, dass sie auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sind (Anderson 1977, Anderson 1979). Das typische Muster der drei Haptoglobinketten ist in Abbildung 2.18 zu sehen. Für die spätere Diskussion ist noch erwähnenswert, dass käuflich erworbenes Protein eingesetzt wurde. Man kann das Haptoglobin für einen bestimmten Phänotyp als gepooltes Plasma kaufen, und die in dieser Arbeit verwendeten 2D-Gele hatten für dieselben Phänotypen immer dasselbe Spotmuster. Wie sich ein 2D-Gel eines Blutplasmas einer Einzelperson und gepooltes Material vieler Einzelpersonen unterscheidet, wird im Ergebnisteil im Detail beschrieben.

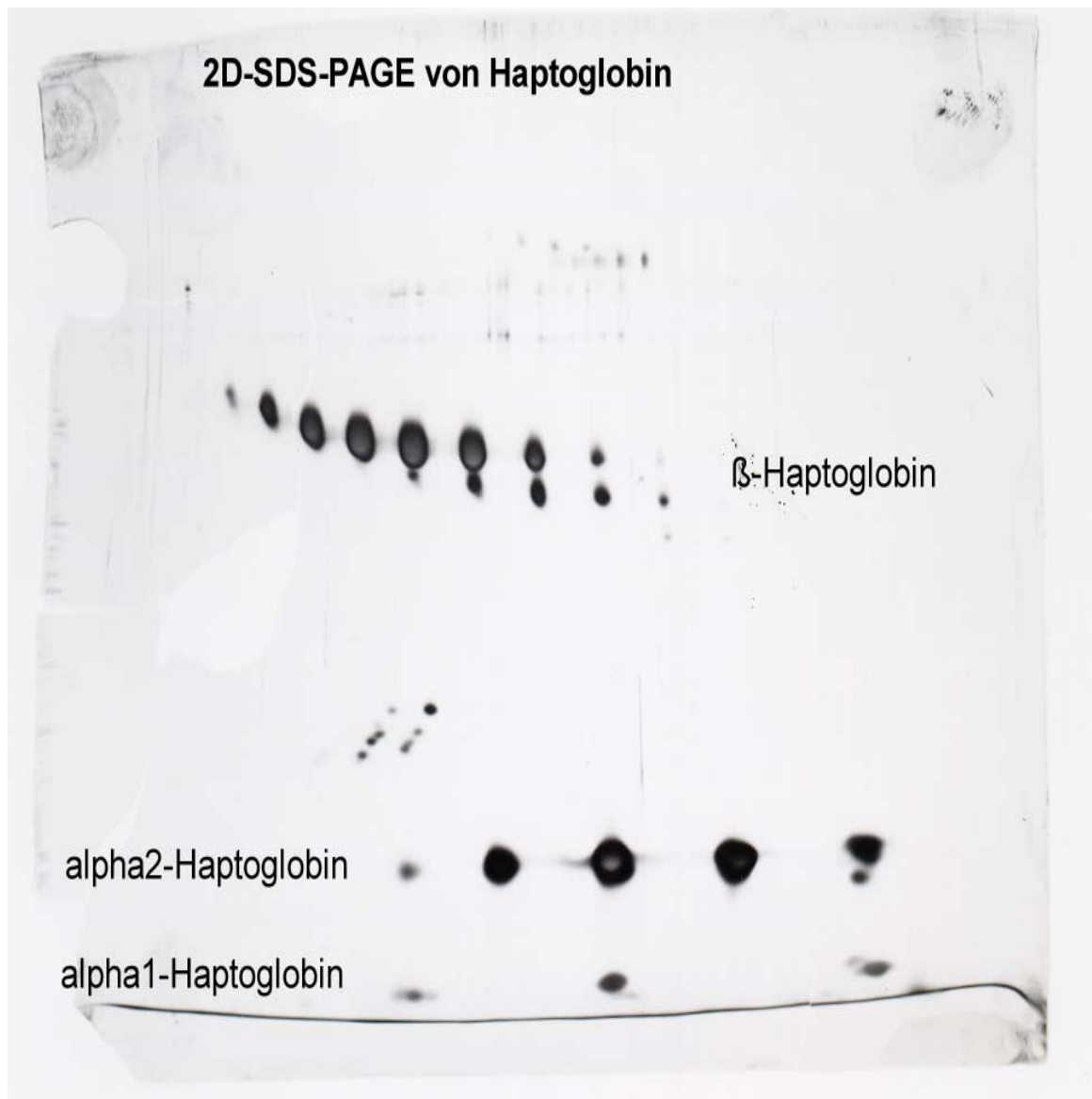


Abbildung 2.18: 2D-SDS-PAGE von Haptoglobin

2.5.2 β_2 -Microglobulin

Wie schon beim Haptoglobin wurde das β_2 -Microglobulin aufgrund seiner Leiterbildung in der 2D-Gelelektrophorese und wegen seiner übersichtlichen Struktur ausgesucht.

Das β_2 -Microglobulin wurde in den 60er Jahren von Berggard im menschlichen Urin entdeckt und charakterisiert (Berggard 1976). Es ist ein kleines Protein mit 99 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 11941 Dalton mit nur einer intramolekularen Cysteinbrücke und ohne Zuckeranteile (Berggard 1980), das man auch im Serum finden kann.

Große Bedeutung hat das β_2 -Microglobulin als ein Bestandteil des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse 1 (major histocompatibility complex-MHC). Dort findet man das β_2 -Microglobulin in einer nichtkovalenten Bindung zu der 44-kD- α -schweren Kette auf der Oberfläche fast aller Zellkerne (Ploegh 1981, Shields 1998). Wie man der Abbildung entnehmen kann besitzt die α -Kette drei extrazelluläre Domänen- α_1 , α_2 und α_3 -, ein Transmembransegment und einen cytosolischen Schwanz. Die α_3 -Kette des MHC I steht dabei in Wechselwirkung zum β_2 -Microglobulin. Das β_2 -Microglobulin wird daher als die leichte Kette des MHC Klasse 1-Komplexes bezeichnet. Diese Bindung zwischen β_2 -Microglobulin und dem MHC stabilisiert das Heterodimer in seiner biologisch aktiven Form.

MHC-Proteine der Klassen I und II wurden durch ihre Funktion bei der Transplantatabstoßung entdeckt. Transplantiert man Gewebe von einer Person an eine andere, wird das fremde Gewebe zumeist abgestoßen. Dagegen wird Gewebe, das z.B. von einem Zwilling an einen anderen transplantiert wird akzeptiert. Genetische Untersuchungen ergaben, dass eine Abstoßung auftritt, wenn die Individuen unterschiedliche Gene im MHC-Komplex, einem Genkomplex aus ungefähr 75 Genen aufweisen. Die Klasse 1 MHC Proteine präsentieren im Rahmen einer Immunreaktion gebundene „fremde“ cytosolische Peptide den T-Zellen, die permanent die Oberfläche der Zellen nach Fremdkörpern durchsuchen. Anschließend werden die „Eindringlinge“ durch Killer T Zellen erkannt und entfernt.

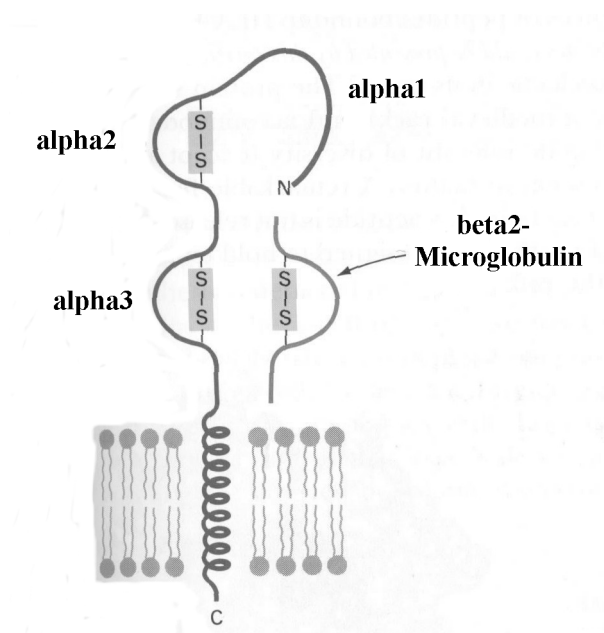


Abbildung 2.19: Schematischer Aufbau der Domänen des Klasse 1 MHC Protein (aus Stryer 1995)

Eine weitere Besonderheit ist die signifikante Homologie zu den Immunglobulinen (konstante Domäne der IgG). Das β_2 -Microglobulin wird deshalb der Immunglobulin-Gensuperfamilie zugeordnet (Peterson 1972).

Die klinische Bedeutung von β_2 -Microglobulin (Hoekman 1985) liegt in dem engen Zusammenhang von verändertem Serum bzw. Plasmagehalten bei Immunerkrankungen wie z. B. AIDS (Lifson 1992, Strathdee 1996, Yong 1997), Leukämie (Sadamori 1995), oder rheumatischer Arthritis (Walters 1989).

2.6 Herstellung rekombinanter Proteine

2.6.1 Grundlagen und Stand der Technik

Ein weiterer Themenschwerpunkt, der in der vorliegenden Arbeit behandelt wurde, beschäftigt sich mit der Herstellung rekombinanter Proteine und schließt damit den Kreis, der immer engeren Verflechtung von Genom- und Proteomanalyse.

Es gibt heutzutage eine große Anzahl von Büchern, die sich sowohl theoretisch als auch praktisch mit der DNA-Klonierung beschäftigen (Brown 1992; Brown 1999; Drlica 1997).

Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen und eine kurze historische Abhandlung des Gebietes der Molekularbiologie näher erläutert, wobei der Schwerpunkt auf den praktischen Grundlagen der Klonierungstechniken liegen soll.

Nachdem Watson und Crick die Doppelhelix-Struktur der DNA im Jahre 1953 entdeckt hatten, kam es zu einem rasanten Anstieg der Anzahl wissenschaftlicher Arbeiten auf dem Gebiet der Molekularbiologie. In den 50er und 60er Jahren wurde dabei die Struktur der DNA aufgeklärt, der genetische Code entschlüsselt, und die Vorgänge der Transkription und der Translation beschrieben. Man stellte in den folgenden Jahren jedoch fest, dass die experimentellen Methoden nicht weit genug entwickelt waren, um die Gene eingehender untersuchen zu können. Dies änderte sich in den frühen siebziger Jahren durch die DNA-Rekombinationstechnik. Als rekombinante DNA wird ein DNA-Molekül bezeichnet, das künstlich („im Reagenzglas“) hergestellt worden ist. Dadurch können z. B. einzelne Gene isoliert, aufgereinigt und analytisch untersucht werden.

2.6.2 Prinzip der DNA-Klonierung

In der folgenden Abbildung ist schematisch der Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten Klonierung skizziert. Anschließend werden einzelne Abschnitte der Arbeitsschritte im Detail beschrieben.

Zuerst wird das zu analysierende DNA-Fragment mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem Genom herausgeschnitten. Das DNA-Fragment wird anschließend in den sogenannten Klonierungsvektor, ein Stück einer Bakterien-DNA eingebaut (ligiert). Das resultierende DNA-Molekül wird nun mittels Transformation in eine Wirtszelle (im vorliegenden Fall E.coli) eingeschleust. Dort kommt es zur Vervielfältigung des rekombinanten DNA-Moleküls, so dass eine beliebige Anzahl an identischen Kopien erhalten werden kann. In der Praxis wird durch den Klonierungsvektor an das Protein zusätzlich ein 6xHis-Tag an den C- oder N-Terminus gehängt. Dieser Tag hat für die spätere Isolierung und Reinigung des Proteins große Vorteile. Das Protein wird dabei

durch die sogenannte „Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC) von dem restlichen Zell-lysat getrennt. Es gibt für diese Auftrennungen kommerziell erhältliche Säulen, die z. B. aus einer Trägermatrix und einem Nickel-Nitriloessigsäureadsorbens (Ni-NTA) bestehen. Die Isolierung des Proteins erfolgt durch eine Komplexierung (Chelatkomplex) mit der Ni-NTA-Matrix.

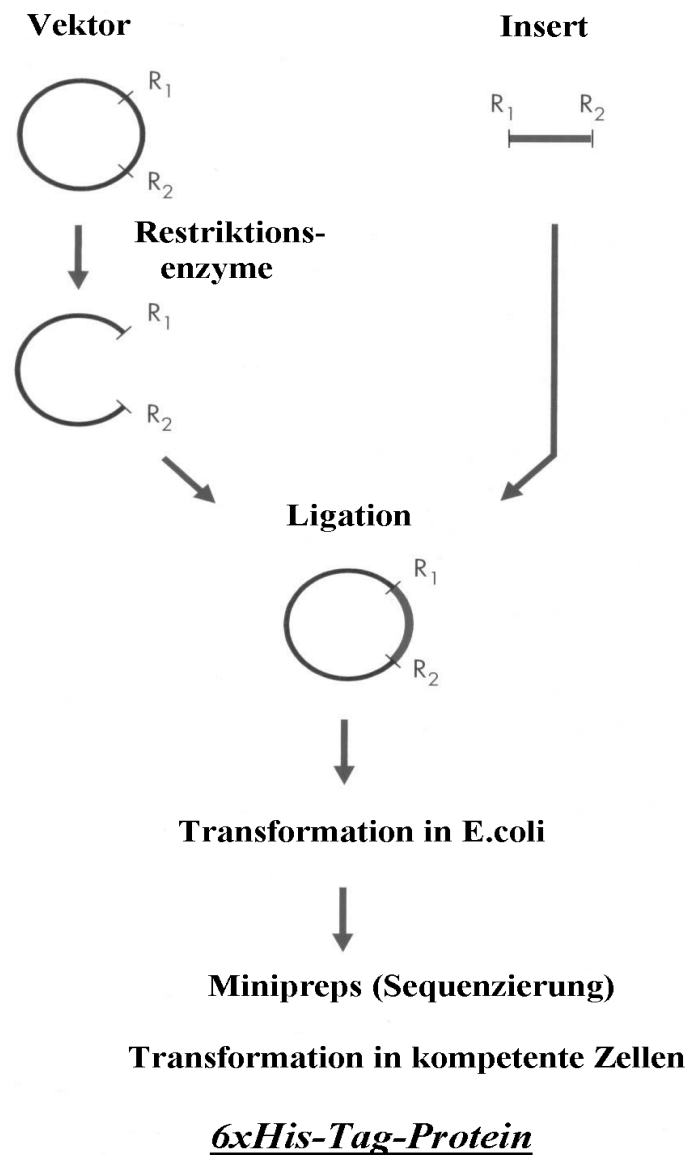


Abbildung 2.20: Abbildung: Prinzip der DNA-Klonierung aus E.coli

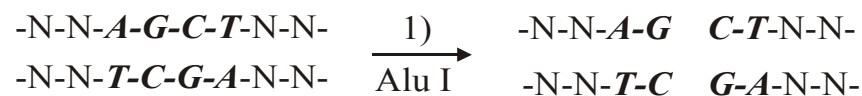
Im Folgenden sollen die Einzelschritte der Technik etwas ausführlicher erläutert werden.

2.6.3 Restriktionsenzyme

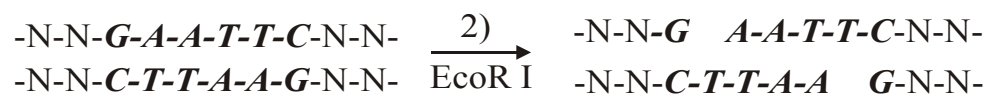
Zur Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls muss der ringförmige Vektor genau an der Stelle geschnitten werden, an der das DNA-Fragment eingebaut werden soll. Damit der Vektor nur einmal geschnitten wird, und zwar immer an der gleichen Stelle, benötigt man eine Typ II-Restriktionsendonuklease. Man kennt davon heute einige hundert Enzyme, die eine bestimmte Nukleotidsequenz erkennen und ein DNA-Molekül auch nur dort schneiden. Während die meisten dieser Enzyme eine bestimmte Hexanukleotidsequenz erkennen, sprechen andere auf Gruppen von vier, fünf oder auch acht Nukleotiden an.

Man unterscheidet die Enzyme nicht nur anhand der Erkennungssequenzen sondern auch an der Art des Schnittes, den das Enzym bewirkt. Einige Restriktionsenzyme schneiden die doppelsträngige DNA gerade in der Mitte durch, dies ergibt glatte Enden.

Andere Restriktionsenzyme schneiden die DNA-Stränge jedoch nicht in der Mitte durch, sondern erzeugen eine um zwei bis vier Nukleotide versetzte Spaltung. Diese DNA-Fragmente besitzen sogenannte überhängende oder klebrige Enden (Abbildung 2.21):



Glatte Enden



Klebrige Enden

Abbildung 2.21: Die Herstellung glatter bzw. klebriger Enden durch die Verwendung von Restriktionsendonukleasen

Der Vorteil dieser Enzyme liegt darin, dass verschiedene Restriktionsenzyme die gleichen klebrigen Enden erzeugen können, wie z.B. BamH I und Bgl II.

2.6.4 Ligation der DNA-Moleküle

Das gewünschte Gen oder eine gewünschte Nukleotidsequenz, sowie der geschnittene Vektor liegen vor. Mit Hilfe einer DNA-Ligase müssen die beiden Moleküle miteinander verbunden werden.

Zwar stellen alle lebenden Zellen DNA-Ligasen her, am häufigsten wird jedoch das Enzym verwendet, das an der Replikation des Phagen T4 beteiligt ist. Es wird einfach aus *E. coli*-Bakterien gereinigt, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert worden sind.

Die DNA-Ligase kann auf zwei verschiedene Arten die Ligation durchführen:

- Beim Verbinden zweier klebriger Enden repariert die Ligase die Unterbrechung in der Nukleotidsequenz durch die Bildung der entsprechenden Basenpaare. Dies ist eine effektive Verknüpfung, da die Enden der DNA-Moleküle vorübergehend zusammengehalten werden.
- Beim Verbinden zweier glatter Enden ist es für das Enzym schwieriger die Enden zu fassen zu bekommen. Hier kommt es nur zu einer Verknüpfung, wenn die beiden Enden zufällig zusammenkommen.

2.6.5 Klonierungsvektoren und ihre wichtigsten Merkmale

Der Klonierungsvektor ist der entscheidende Faktor bei der Klonierungsreaktion. Er stellt die Replikationsfunktionen zur Verfügung, mit der sich das rekombinante DNA-Molekül in der Wirtszelle erst vermehren kann.

Inzwischen ist eine Vielzahl von Klonierungsvektoren für verschiedenste Wirtszellen in Verwendung, seien es Prokaryonten wie *E. coli* oder Eukaryonten wie Hefe, Pilze, Pflanzen oder Tiere. Die meisten Klonierungsvektoren sind Abkömmlinge von Viren oder Plasmide.

Bakterien enthalten neben der chromosomalen DNA häufig zusätzlich kleine, zirkuläre DNA-Moleküle, Plasmide genannt, die unabhängig vom Chromosom

vermehrt und durch eine Wirtszelle schnell repliziert und transkribiert werden. Plasmide besitzen einige Eigenschaften, die für ein Klonierungsexperiment besonders wichtig sind:

- Für die Initiierung der Replikation werden bestimmte Elemente benötigt: Die sogenannten Cis-Elemente: Ori (Origin) und Ter (Terminus). Sie sind Start- und Endpunkt der Replikation.
- Restriktionsenzymstellen: Sie sind wichtig für das Einfügen fremder DNA-Moleküle. Vorzugsweise sollte diese Schnittstelle im Plasmid auch nur einmal vorkommen.
- Viele Plasmide besitzen ein oder mehr Antibiotikaresistenzgene (z.B. für Ampicilline oder Tetracycline).
- Größe: Plasmidgrößen liegen zwischen 5 und 100 Kilobasenpaare. Je kleiner das Plasmid ist, umso leichter ist die Isolierung und Aufreinigung aus E.coli.

Nach dieser kurzen Zusammenfassung einiger relevanter Grundlagen sollen noch kurz ein paar Anwendungen aufgezählt werden.

2.6.6 Anwendungen

Eine der wichtigsten Anwendungen ist die Herstellung therapeutisch bedeutender Proteine wie z. B. Insulin (Goeddel 1979). Dabei werden klonierte DNA-Fragmente in das Bakterium eingeschleust, und das entsprechend kodierte Protein in großer Menge, sozusagen in industriellem Maßstab, vom Bakterium synthetisiert. Auch Antibiotika, wie z.B. Peniciline, Gramicidine oder Streptomycine (Primrose 1991) können mittlerweile gentechnisch hergestellt werden.

Ebenfalls große Bedeutung hat die Technik in der medizinischen Grundlagenforschung. Dabei wird das Zusammenspiel von Genen untersucht, um Auswirkungen bei Änderungen in der Nukleotidsequenz auf die Funktionsweise der Proteine zu verstehen. Eine weitere Anwendung kann und wird die Gentherapie sein. Hierbei sollen genetisch bedingte Erkrankungen geheilt werden, indem man den Patienten mit einem normalen Exemplar des defekten Gens ausstattet, was im Tierexperiment bereits gelungen ist (Weatherall 1991).

Eine weitere der unzähligen Anwendungen sind transgene Organismen, also Tiere oder Pflanzen, in deren Genom entweder ein Gen eliminiert, inaktiviert, ersetzt oder ein zusätzliches Gen eingesetzt wurde. So werden bei Nutzpflanzen Resistenzen gegen Krankheitserreger sowie Verbesserungen im Ertrag oder der Qualität angestrebt (Steinbiß 1995).

Transgene Tiere werden vor allem in der biotechnologischen Forschung, sowie in der Landwirtschaft eingesetzt. Hier sind vor allem Mäuse zu nennen, die als Krankheitsmodelle dienen, um Therapieansätze testen zu können.

3 Experimenteller Teil

3.1 Proteinchemische Methoden

Die verwendeten Methoden werden in der Reihenfolge des analytischen Prozesses bei der Aufklärung posttranslationaler Modifikationen ausgewählter Blutplasmae Proteine dargestellt.

3.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel, Proteine und Enzyme

α -Casein	Sigma, Steinheim
α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure	Sigma, Steinheim
2,5 Dihydroxybenzoesäure	Sigma, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
2-Propanol	Merck, Darmstadt
4-Vinylpyridin	Sigma, Steinheim
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Albumin	Sigma, Steinheim
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumcarbonat	Merck, Darmstadt
Ampholine	Amersham Pharmacia, Freiburg
Asp-N	Roche, Penzberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Carbonanhydrase	Sigma, Steinheim
Citronensäure	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt

Fetuin	Sigma, Steinheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glu-C	Roche, Penzberg
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Wasser („Milli Q“-Qualität)	Millipore, Eschborn
Haptoglobin	Sigma, München; Bioscience Resource Project, USA
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Kaffein	Sigma, Steinheim
L-Methionyl-Arginyl-Phenylalanyl-Alanineacetat (MRFA)	Sigma, Steinheim
Lys-C	Roche, Penzberg
2-Morpholinoethansulfonsäure (Mes)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure(Mops)	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma, Steinheim
Natriumazid	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Sigma, Steinheim
Natriumcarbonat	Sigma, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Steinheim
Natriumthiosulfat	Sigma, Steinheim
Nonidet	Bio-Rad, München
NP40	Bio-Rad, München
Orange G	Merck, Darmstadt
Pharmalyte	Bio-Rad, München
PNGase F	Sigma, Steinheim
Polypropylenglykol (PPG)	Applied Biosystems, Weiterstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim
Silbernitrat	Sigma, Steinheim
Sinnapinsäure	Sigma, Steinheim
β_2 -Microglobulin	Sigma, Steinheim
β -Casein	Sigma, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trypsin	Roche, Penzberg
Ubiquitin	Sigma, München
Ultramark 1621	Lancaster Synthesis, Mühlheim a.M

Tabelle 3.1.: Verwendete Chemikalien, Lösungsmittel, Proteine und Enzyme

Sämtliche Chemikalien sind mindestens in p. A. Qualität bezogen worden.

Als Ausgangsmaterial wurden gekaufte Proteine, die aus Blutserum (Haptoglobin) bzw. Urin (β_2 -Microglobulin) isoliert und aufgereinigt wurden, verwendet. Wie im Theorieteil beschrieben, besteht das Haptoglobin aus drei Isoformen, die eine andere Zusammensetzung der drei Untereinheiten, der α_1 -, α_2 - und β -Kette besitzen. Die einzelnen Ketten werden als unterschiedliche Phänotypen isoliert kommerziell angeboten und wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet und analysiert.

3.1.2 Geräte

3.1.2.1 Allgemeiner Laborbedarf

Autoklav SAR 450	Biologische Analysensysteme, Lich
Diverse Waagen	Mettler-Toledo, Gießen, Sartorius, Göttingen etc.
Diverse Zentrifugen	Beckmann Instruments, München, Sigma, Osterode, etc.
Kühlschränke, Gefrierschränke	Heraeus Instruments, Hanau, Liebherr, etc.
Lyophile	Finn-Aqua, Hürth
Magnetrührer	Bachofer
pH-Meter wtw 521	Wissenschaftlich Technische Werkstätten
Pipetten (2 µl-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Abimed, Langenfeld
Speed-Vac	Bachofer
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallgerät	Branson
Wasseraufbereitung Milli-Q	Millipore, Eschborn

Tabelle 3.2.: Verwendete Laborgeräte

3.1.2.2 Gelelektrophorese

Gießkassetten, Spacer, Käbme	Bio-Rad, München, Amersham Pharmacia, Freiburg, Institutswerkstatt
Glasplatten	Institutswerkstatt
IEF-Kammern (z.B. Multiphor II electrophoresis unit 2117)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Immobiline Dry Strip Kit Components	Amersham Pharmacia, Freiburg
Spannungsquellen für SDS-PAGE	Bio-Rad, München
Thermostatisierung (Wasserbad)	Haake, Karlsruhe

Tabelle 3.3.: Gelelektrophoreseapparaturen

3.1.3 Reduktion und Alkylierung der untersuchten Proteine

Wie im Theorieteil beschrieben, weisen die untersuchten Proteine inter- und intramolekulare Cysteinbrücken auf, die eine vollständige Zugänglichkeit bestimmter Sequenzabschnitte aufgrund der Ausbildung einer räumlichen Struktur behindern können. Um dies zu verhindern, werden die Cysteine reduziert und anschließend alkyliert, um die Rückbildung der Cysteinbrücken zu verhindern (Raftery 1966).

Verwendete Chemikalien:

Denaturierungspuffer: 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 6 M Guanidinhydrochlorid,
4-Vinylpyridin, 2-Mercaptoethanol

Das Protein wurde in 200 µl Guanidinhydrochlorid gelöst. Die Dauer der Reduktion betrug 2 h bei 50°C und wurde mit 5 µl 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Die Alkylierung wurde mit 5 µl 4-Vinylpyridin bei Zimmertemperatur und einer Reaktionsdauer von 1h vorgenommen. Zur Aufreinigung und Trennung der einzelnen Untereinheiten wurde RP-Chromatographie auf einer kurzen C18-Säule (Aquapore) angewendet. Für die weitere Verwendung wurden die Proben anschließend lyophilisiert und bei -20°C eingefroren.

3.1.4 Gelelektrophorese

3.1.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gele

3.1.4.1.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Um eine gute Reproduzierbarkeit sowohl bei der ein- als auch der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu erzielen, ist es wichtig, bei der Herstellung sehr sorgfältig zu arbeiten. Insbesondere das frische Ansetzen der Lösungen, sowie die Kontrolle sämtlicher Parameter, wie Haltbarkeit der Chemikalien, pH-Wert und Temperatur sind dabei von entscheidender Bedeutung. Dasselbe gilt für das reproduzierbare Gießen der Gele, was Länge der Sammelgel- und Trenngelstrecke angeht, da erst dies das Vergleichen zweier oder mehrerer Gele aus einem oder mehreren Ansätze ermöglicht.

Verwendete Lösungen:

- Lösung 1 (Sol 1): Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0.8% Bis (N, N-Methylenbisacrylamid))
- Lösung 2 (Sol 2): 8 mM EDTA, 0.4% SDS, 1.5% Tris/HCl (pH: 8.8)
- Lösung 3 (Sol 3): 8 mM EDTA, 0.4% SDS, 0.5% Tris/HCl (pH: 6.8)
- Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung: 10%ig (w/v) in H₂O Millipore
- Lösung zum Überschichten der Gellösungen: 0.5% (w/v) SDS in H₂O Millipore

Die Gele bestehen aus einem Trenngelanteil, der circa 90% des Gesamtgels ausmacht und einem Sammelgelanteil, dem Ort, an dem die Proben aufgetragen werden (siehe Abbildung 3.1).

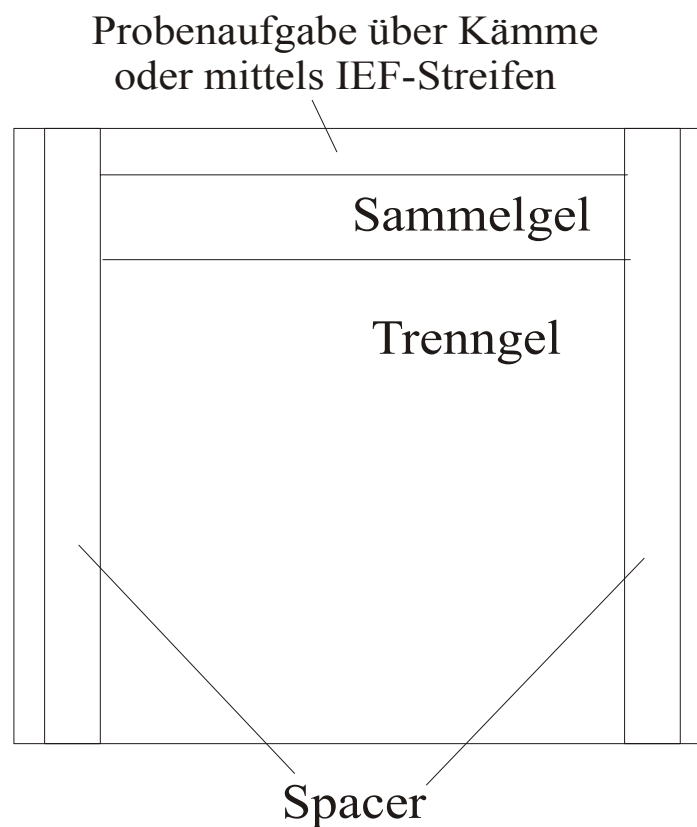


Abbildung 3.1: Aufbau eines horizontalen SDS-Polyacrylamid-Gels

Die Porengröße des Gels wird durch den Parameter T (Totalacrylamidkonzentration) und C (Vernetzungsgrad) bestimmt.

Totalacrylamid-Konzentration	10 %	12 %	15 %
Sol 1	10 ml	12 ml	15 ml
Sol 2	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
H ₂ O	12.5 ml	10.5 ml	7.5 ml
TEMED	15-20 µl	15-20 µl	15-20 µl
10 %ige (w/v) APS	200 µl	200 µl	200 µl

Tabelle 3.4.: Zusammensetzung des Trenngels

Totalacrylamid-Konzentration	3 %
Sol 1	2.4 ml
Sol 3	4.0 ml
H ₂ O	6.8 ml
TEMED	10 µl
10 %ige (w/v) APS	100 µl

Tabelle 3.5.: Zusammensetzung des Sammelgels

Die Zugabe der Katalysatoren fand erst kurz vor dem Gießen statt. Um eine gerade Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel bzw. eine gerade Oberfläche des Sammelgels zu erreichen, wurde das Trenngel sofort nach dem Gießen mit einer 0.5 %igen SDS-Lösung überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde die SDS-Lösung wieder entfernt und die Sammelgellösung zugegeben. Falls anschließend mehrere Fraktionen aufgetragen werden sollten, wurde ein „Kamm“ mit der gewünschten Anzahl an Ladetaschen in die Gelkassette gesteckt und erst nach dem Auspolymerisieren wieder entfernt. Die Ladetaschen haben eine definierte Größe und damit ein definiertes Volumen zur Probenaufgabe. Bei Verwendung eines IPG-Streifen, wurde der Streifen direkt auf die gerade Auflagefläche des Sammelgels gelegt.

Die SDS-PAGE Versuche erfolgten nach der Vorschrift von Laemmli in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur. Für etwaige Vorversuche sowie für die Überprüfungen der Ausschlußchromatographiefraktionen kamen Minigele in den Dimensionen 10.5 cm x 10 cm x 1mm zum Einsatz. Für die zweite Dimension der 2D-SDS-PAGE und den verwendeten IEF-Streifen mit 11 cm Länge wurden Gele in den Dimensionen 16 cm x 18 cm x 0.5 cm gegossen.

3.1.4.2 Native Gele

Verwendete Lösungen:

- Lösung 1: Rotiphorese ®
- Lösung 2: 1.5 M Tris/HCl (pH: 8.8)
- Lösung 3: 0.5 M Tris/HCl (pH: 6.8)
- APS-Lösung: 10%ig (w/v) in H₂O Millipore
- Isopropanol zum Überschichten der Gellösungen

Die Durchführung erfolgt analog zur nachfolgend beschriebenen Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele. Auf die Unterschiede, wie z.B. die Verwendung eines SDS-freien Elektrophoresepuffers wird in Kapitel 3.1.4.2.2 im Detail eingegangen.

3.1.4.2.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-SDS-PAGE)

Verwendete Lösungen:

Auftragspuffer (3-fach konzentriert):

- 15% SDS, 150 mM Tris-HCl pH 6,8, 45% Glycerin, 6% β -Mercaptoethanol und 0.01% Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer (1-fach konzentriert):

- 0,1% SDS, 24 mM Tris, 192 mM Glycin

Je nach Größe des Geles und der Art der anschließenden Färbung betrug die Menge an aufgegebenem Protein zwischen 20 und 100 μ g. Die Proben wurden mit dem Probenpuffer 1:1 versetzt und 5 min bei 100°C denaturiert. Das Volumen variierte je nach Größe der verwendeten Zinkengröße der Kämme zwischen 5 und 50 μ l. Da das Auftragsvolumen durch die Größe der Kämme limitiert ist, wurde der Auftragspuffer in einer höheren Konzentration (3-5x) eingesetzt, und anschließend durch Zugabe der Probe auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Proben wanderten bei 80 V (20 V bei Minigelen) in das Sammelgel ein, die anschließende Trennung im 12%igen

Trennung erfolgte bei 200 V. Die Laufzeit betrug dabei circa 2-4 Stunden (davon 30 min bis 1 h für das Wandern im Sammelgel). Als Marker wurden der Low und High Molecular SDS-Standard der Firma BioRad verwendet.

Protein	Molekulargewicht [Dalton]
Myosin	200000
β -Galactosidase	116250
Phosphorylase B	97400
BSA	66200
Ovalbumin	45000
Carbonanhydrase	31000
Trypsin Inhibitor	21500
Lysozym	14400

Tabelle 3.6: Übersicht der verwendeten SDS-Marker mit ihren zugehörigen Molekulargewichten

Das Ende der elektrophoretischen Trennung wurde durch die Wanderung der blauen Laufmittelfront des Bromphenolblaus bestimmt.

3.1.4.2.2 Native Eindimensionale-Polyacrylamidgelelektrophorese (Native 1D-PAGE)

Verwendete Lösungen:

Auftragspuffer (5-fach konzentriert):

- 312.5 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% Glycerin, 6% und 0.05% Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer (1-fach konzentriert):

- 25 mM Tris, 192 mM Glycin (SDS-frei!!)

Die Durchführung erfolgte analog zur Durchführung der 1D-SDS-PAGE.

3.1.4.3 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-SDS-PAGE)

Eine 2D-SDS-PAGE besteht aus den Teilschritten:

- Probenvorbereitung
- 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)
- Äquilibration der fokussierten IEF-Streifen
- 2. Dimension: SDS-PAGE

3.1.4.3.1 Probenvorbereitung

Ziel einer jeden Probenvorbereitung ist es, das Protein komplett zu lösen und es damit der analytischen Technik zugänglich zu machen. Bei der Komplexität biologischer Proben ist es offensichtlich, dass es hierfür keine allgemein gültige Vorschrift geben kann. Im Falle der Membranproteine ist es oft unmöglich, die äußerst hydrophoben Proteine vollständig in Lösung zu bringen.

Als äußerst erfolgreich beim Lösen von Proteinen erwies sich die Zugabe von 6M Guanidiniumhydrochlorid, 8M Harnstoff oder im Falle eines 1D-SDS-Geles SDS. Hierbei wurde, nach Spaltung der Cysteinbrücken durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, die Tertiär- und Quartärstruktur durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen und einer Streckung des Proteins aufgeweitet. Der Komplex aus SDS-Anionen und den gestreckten Aminosäureketten wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Weitere Vorteile der Verwendung von SDS sind eine einheitliche (hohe) negative Ladung der Komplexe, und dadurch eine hohe elektrophoretische Mobilität in dieselbe Richtung zur Anode hin.

3.1.4.3.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Als Trennprinzip in der ersten Dimension wurde die IEF verwendet und damit eine Trennung nach Ladung erzielt. Dabei wandern die Proteine aufgrund ihrer jeweiligen Zusammensetzung aus basischen und sauren Restgruppen bis zu einem pH-Wert, an dem ihre Nettoladung Null beträgt. Wie im Theorieteil bereits beschrieben, ist dies der für jedes Protein charakteristische isoelektrische Punkt (pI).

Für die IEF pH-Gradienten kamen Gele der Firma Pharmacia im pH-Bereich 4-7 mit einer Länge von 11 cm zum Einsatz. Um die trockenen IPG-Streifen zu rehydratisieren, sind zwei Möglichkeiten denkbar: zum einen die Trog-Methode, zum anderen die „in gel reswelling“-Methode (Sanchez 1997). Letztere ermöglicht die Rehydratisierung der IEF-Streifen und die Probenaufgabe in einem Schritt. In der vorliegenden Arbeit wurde vorwiegend die Trog-Methode verwendet, daher wird diese im Folgenden beschrieben.

Durchführung:

Die 3 mm breiten Streifen wurden über Nacht in einem Puffergemisch aus

8 M Harnstoff
0,5% Nonidet (10%ige Lösung)
10 mM DTT
50 mg/ml Orange G (rehydriert)

Die IEF erfolgte in einer Fokussierungseinheit der Firma LKB Bromma (2117 Multiphor Electrophoresis II). Hierin konnte die „strip-tray“ Technik nach Görg angewendet werden. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Gele wurde die Elektrophoreseeinheit auf eine Temperatur von 15°C gekühlt. Zur Probenvorbereitung zugeschnittenes Elektrodenpapier wurde in H₂O getränkt. Die rehydratisierten IEF-Streifen wurden in die dafür vorgesehenen Zwischenräume gelegt und mit Silikonöl überschichtet, um ein Auskristallisieren des Harnstoffes zu verhindern.

Die Proben wurden in einem Lysis-Puffer gelöst. Dieser bestand aus

8 M Harnstoff (2 M Thioharnstoff)
2% Nonidet (10%ige Lösung)
5% β-Mercaptoethanol
0,4% Ampholine und 0,4% Pharmalyte

Harnstoff soll die vollständige Solubilisierung der Proteine ermöglichen, wobei der Zusatz von Thioharnstoff zu der gesättigten 8 M Harnstofflösung die Löslichkeit der Proteine noch erhöht (Rabilloud 1998). Für die nur schwer lösliche Gruppe der Membranproteine konnte dies erfolgreich gezeigt werden (Pasquali 1997).

Mit Hilfe von Probenrögen der Firma Pharmacia wurden die Proben auf der sauren Seite der IEF-Streifen aufgegeben. Das Auftragsvolumen der Proben betrug maximal 100 µl. Die Proben wurden jeweils mit 40 kVh fokussiert, wobei sie bei 300 V (0,1-0,2 mA, 0,1-0,2 W) für etwa 120 Minuten in die Gelmatrix einwandern konnten. Anschließend wurde die Spannung alle 30 Minuten um 300 V erhöht, bis die Proben bei einer konstanten Spannung über Nacht fokussierten. Die höchste verwendete Spannung betrug 3000 V. Die fertig fokussierten Streifen wurden dann entweder direkt für die zweite Dimension weiterverwendet oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.4.3.3 Äquibrierung der fokussierten IEF-Streifen

Um den Transfer aus dem IPG-Gel in das SDS-Gel zu ermöglichen, wurden die Proben 2 x 10 min bei Raumtemperatur in der Äquibrierlösung geschwenkt und dabei umgepuffert.

Die Äquibrierlösung bestand dabei aus

6 M Harnstoff
30% Glycerin
1% DTT
2% SDS
50 mM Tris/HCl pH 6.8
0.8 mM EDTA

und zur Laufmittelfrontkontrolle in der nachfolgenden SDS-PAGE 0,01% w/v Bromphenolblau.

3.1.4.3.4 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Als Trennprinzip in der zweiten Dimension wurde eine SDS-PAGE verwendet und damit die Probenmoleküle nach Größe getrennt. Die Durchführung erfolgte stets in einer vertikalen Elektrophoresapparatur (Görg , Werner 1990).

3.1.4.3.4.1 Vorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE

Der verwendete Elektrophoresepuffer bestand aus:

3 g Tris

1 g SDS

14,4 g Glycin pro Liter.

Die Herstellung der verwendeten Polyacrylamidgele wurde in Kapitel 3.1.4.1.1 bereits beschrieben. Die Gele wurden in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingespannt und sowohl in den anodischen als auch in den kathodischen Elektrodenbereich ausreichend Puffer eingefüllt. Nach dem Äquilibrieren wurden die IPG-Streifen auf die vertikal eingespannten Gele gelegt.

Die Proben wanderten bei einer niedrigeren Spannung von 80 V ein, was circa 30-45 Minuten in Anspruch nahm. Anschließend wurde eine Endspannung von 200 V eingestellt, um die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe zu erreichen. Dieser Vorgang dauerte circa 3 Stunden und seine Beendigung konnte an der Laufmittelfront des Bromphenolblaus abgelesen werden.

3.1.4.4 Gelfärbungen

3.1.4.4.1 Coomassie Blue

Die Gele wurden mindestens 30 min in einer Lösung aus 10% Essigsäure und 50% Methanol fixiert, 1 h lang mit 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250 in einer 10%igen Essigsäurelösung gefärbt und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit einer

10%igen Essigsäurelösung entfärbt, bis der Hintergrund nahezu ungefärbt und die Spots deutlich zu sehen waren.

Für die Elution intakter Proteine aus IEF-Gelen war es notwendig, diese ebenfalls mit Coomassie zu färben, um die genaue Position der Banden zu erkennen. Hierfür wurden die IEF-Streifen für 30 min in einer 20%igen Trifluoressigsäure (TFA)-Lösung fixiert. Die Streifen wurden für 15 min mit 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250 in einer Lösung aus 10% Essigsäure und 30% Methanol gefärbt und durch mehrmaliges Waschen einer Lösung aus 30% Methanol und 10% Essigsäure entfärbt.

3.1.4.4.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung der SDS-Gele und der 2D-Gele erfolgte nach Heukeshoven (Heukeshoven 1985). Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

Fixierlösung: mind. 30 min	
Essigsäure	10%
Ethanol	40%
Inkubationslösung: mehrere Stunden (ü. Nacht)	
Natriumthiosulfat	0,2%
Natriumacetat	0,5 M
Glutaraldehyd	0,5%
Ethanol	30%
3x 5 min waschen	
Silberlösung: 45 min	
Silbernitrat	0,1%
Formaldehyd	0,02%
30 sek waschen	
Entwickler: 15 min	
Natriumcarbonat	2,5%

Formaldehyd	0,01%
Stopplösung: mindestens 10 min	
EDTA	1,5%
Waschen	
Millipore Wasser	

Tabelle 3.7.: Abfolge der Arbeitsschritte bei der Silberfärbung nach Heukeshoven

Sämtliche Lösungen müssen frisch angesetzt werden. Die Entwicklungsdauer wird nach eigener Einschätzung gewählt und ist abhängig von gewünschter Spot- aber auch Hintergrundfärbung.

3.1.4.5 Elution aus IEF-Streifen

Ein erster Ansatz der Arbeit ging von der massenspektrometrischen Analyse intakter Proteine aus, um wie im Theorieteil beschrieben signifikante Massenunterschiede zwischen einzelnen Spots zu detektieren und anschließend posttranslationalen Modifikationen zuordnen zu können. Hierfür wurden die Proteine direkt aus der Polyacrylamidmatrix eluiert:

Ein IEF-Streifen wurde mit Coomassie Blue gefärbt, um die genaue Position der Banden zu markieren. Der gefärbte Streifen wurde neben einen nicht gefärbten Streifen gelegt, und durch den Vergleich an der genau markierten Position die Banden aus den ungefärbten Streifen mit dem Skalpell herausgeschnitten. Die Elution der Proteine erfolgte in zwei Stufen: Im ersten Schritt wurden die Proteine in einer Mischung aus 10% 2-Propanol und 5% Ameisensäure für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit 70% Acetonitril für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Beide Lösungen wurden vereinigt und lyophilisiert.

3.1.5 Enzymatische Spaltung von Proteinen in der Gelmatrix

Nach mehrmaligem Waschen der Coomassie gefärbten Gele mit H₂O wurden die Proteinspots möglichst knapp mit einem Skalpell ausgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt. Die entstandenen Gelstückchen wurden mehrmals abwechselnd mit Acetonitril und doppeltkonzentriertem Spaltpuffer gewaschen. Die Spaltbedingungen für die verwendeten Endopeptidasen waren:

	Lys-C	Asp-N	Glu-C	Trypsin
Spaltpuffer	25mM Tris-HCl, 1mM EDTA	50mM Natriumhydrogen- phosphat	25mM Ammonium- carbonat	100mM Tris-HCl
pH	8.5	8.0	7.8	8.5
Verhältnis Enzym/ Protein	1:10 bis zu 1:3	1:10 bis zu 1:3	1:10 bis zu 1:3	
Temperatur	37°C	37°C	25°C	37°C
Dauer	über Nacht	über Nacht	über Nacht	4 h

Tabelle 3.8.: Proteolysebedingungen für die in der Proteinchemie am häufigsten verwendeten Endopeptidasen

Die Elution der Spaltpeptide aus der Gelmatrix erfolgte durch mehrmalige Inkubation mit Acetonitril und 10%iger Ameisensäure. Die Eluate wurden gesammelt und in der Speed Vac eingetrocknet oder lyophilisiert.

3.1.6 Abtrennung der N-glykosidisch gebundenen Zuckereinheiten: Deglykosylierung mit PNGase F

Da die β -Kette von Haptoglobin N-glykosidische gebundene Zuckerketten besitzt, wurde eine enzymatische Deglykosylierung mit PNGase F durchgeführt, um das deglykosylierte Protein der weiteren Analytik zu unterziehen.

Deglykosylierungspuffer:

10 mM Na₂HPO₄, 5 mM Titriplex III, 0,01% NaN₃, pH 7.5

Inkubationspuffer:

20 mM NaH₂PO₄, 25 mM EDTA, pH 8.0

Sowohl die komplette β -Kette als auch die enzymatisch gespaltenen Peptidgemische wurden der Prozedur unterzogen. Die lyophilisierten Proben wurden in Inkubationspuffer gelöst und mit 1 Unit PNGase F pro 1 nmol Protein die Zuckereinheiten abgetrennt. Die Reaktion findet bei 37°C für 24 h statt. Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte anschließend durch die unterschiedlichen massenspektrometrischen Techniken.

3.1.7 Proteinsequenzanalyse:

3.1.7.1 N-Terminale Sequenzanalyse nach Edman:

Die Aminosäuresequenzanalyse, die auf dem Prinzip des Edman-Abbaus beruht, wurde an einem Gasphasen-Sequencer (Procise 492 A bzw. 492clc, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Trennung der PTH-Aminosäuren erfolgte mittels Kapillar LC-Säulen (150 x 1 mm, 5 μ m, 300 Å, RP C18) auf einer Mikro-HPLC-Anlage (Applied Biosystems).

3.1.8 Massenspektrometrie:

3.1.8.1 MALDI-MS

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem Bruker-Reflex III-Massenspektrometer der Firma Bruker-Franzen GmbH (Bremen) aufgenommen. Das Gerät ist mit einem nm Stickstoff-UV-Laser (337 nm) ausgerüstet. Die Spektren wurden im „delayed extraction“-Modus aufgenommen. Für jedes Spektrum wurden

mehr als 10 Einzel-„Laserschüsse“ aufsummiert. Zur Massenkalisierung wurde für die externe Kalibrierung ein Peptidgemisch im Massenbereich 1046.54-2465.2 m/z für Spaltungen im Gel und Standardproteine wie Ubiquitin oder Trypsinogen für die Massenbestimmung von Gesamtproteinen verwendet.

Probenpräparation:

Sowohl die Proben als auch die Matrix wurden in einer Mischung aus Wasser/Acetonitril 50/50 (v/v) mit 0,1 % TFA gelöst. Als Matrix wurde α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure für Peptide, 2,5 Dihydroxybenzoesäure für Peptide und Proteine sowie 3,5 Dimethoxy-4-hydroxymizinsäure (Sinapinsäure) für Proteine verwendet. Die Präparation erfolgte nach der „dried-drop“-Methode. Matrix und Probe wurden vorab im Verhältnis 1:1 vermischt und 1 μ l des Gemisches direkt auf das MALDI-Target aufgegeben. Die Datenauswertung erfolgte mit der Bruker XTOF Software im manuellen Modus.

3.1.8.2 LC-ESI-MS

Folgende HPLC-Puffermischungen wurden eingesetzt:

- 0.1 % TFA in H₂O als Puffer A und 0.1 % TFA in 80 % Acetonitril als Puffer B für Standardbedingungen (pH 2-3)
- 0.1 % Ameisensäure in H₂O als Puffer A und 0.1 % Ameisensäure in 80 % Methanol als Puffer B als Alternative zu dem vorherigen Puffersystem (pH 2-3)
- 20 mM Ammoniumacetat in H₂O als Puffer A und 20 mM Ammoniumacetat in 80 % Acetonitril als Puffer B für Neutralpufferversuche (pH 6.8)

Verwendete HPLC-Säulen:

C18 Reversed-Phase Säulen mit den Durchmessern 2,4 mm, 1 mm und 0.5 mm und Längen zwischen 10 und 15 cm, die von verschiedenen Firmen bezogen wurden (PE Sciex, Maisch).

Die gezeigten Ergebnisse wurden mit Säulen erzielt, deren Länge 125 x 0.5 mm betrug und die Korngrößen von 3 bzw. 5 μm und Porengrößen von 300 \AA aufwiesen. Die Detektion erfolgte bei 210 bzw. 214 nm.

Die Spaltpeptidmischungen aus den Gelelutionen wurden in H_2O mit 3% Ameisensäure aufgenommen. Eine 140D HPLC-Pumpe (ABI) wurde direkt mit einer Normalsprayquelle eines API 365-Massenspektrometers (Sciex, Thornhill, Ontario, Canada) verbunden. Als weiteres Massenspektrometer mit einer Elektrosprayquelle kam eine LCQ Ionenfalle (Thermoquest, San Jose, USA) in Verbindung mit einer HP1100-HPLC zum Einsatz. HPLC-Gradienten wurden für die jeweiligen Proteine optimiert, und sind bei den jeweiligen Chromatogrammen vermerkt. Übliche Gradienten dauerten zwischen 70 und 120 min. Die Flußraten waren 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit der 140D-Pumpe und auf circa 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ gesplittet an der HP1100-Pumpe. HPLC und MS wurden direkt mit einer Fused Silica-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 μm verbunden. Im Falle des API 365 wurden die Spektren durch das Scannen des ersten Quadrupoles mit einer Scangeschwindigkeit von circa 6 Sekunden für den Massenbereich 300-2000 erstellt. Das Instrument wurde mit Polypropylenglykol (PPG) für den Massenbereich m/z 60 bis 2250 kalibriert. Für die LCQ stehen Kaffein, L-Methionyl-Arginyl-Phenylalanyl-Alaninacetat (MRFA) und Ultramark 1621 als Eichsubstanzen für den Massenbereich m/z 195-1822 zur Verfügung.

3.1.8.3 Nano-ESI-MS

Nanospraymessungen wurden mit einem selbstgebauten Spraykopf an dem API 365-Massenspektrometer durchgeführt. Spraynadeln mit einer Öffnung von 1-2 μm wurden an einem Laserpuller P 2000 der Firma Sutter Instrument in einem „Zwei-Schritt“-Programm unter Einsatz von Kapillaren des Types GC 120 F-10 der Firma

Clark Capillaries selber gezogen. Anschließend wurden die Nadeln mit einer wenige μm dicken Goldschicht besputtert. Zudem wurden Nadeln der Firma Protana in der Spezifikation „short“, „medium“ und „long“ eingesetzt. Im Vergleich zu den Normalspraybedingungen wurde von den Meßparametern am API 365 nur die Ionensprayspannung deutlich geändert und auf 1 kV herabgesetzt. Die Entsalzung von Proben mit zu hohen Salzkonzentrationen erfolgte auf kleinen mit Poros-RP-Material selbstgefüllten Säulchen. Die Nadeln wurden anschließend mit 2-5 μl Probe gefüllt, bei erzielten Spraydauern zwischen 5 und 90 min erreichten sie dabei Flußraten zwischen 20-100 nl/min.

3.1.8.4 FT-ICR-MS

Die Proteinproben wurden in einer Mischung aus Wasser/ Methanol 50/50 (v/v) mit 1% Essigsäure gelöst. Anschließend wurden zwischen 1 und 5 μl einer Ubiquitin-Stammlösung (1,1 mg/ml) als interner Standard zugefügt. Die Vermessung der Lösungen erfolgte mit einer Spritzenpumpeninjektion und einer Flußrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Der eingesetzte Spraykopf war eine Analytica Quelle der Firma Branford Inc. Die Spektren wurden im Massenbereich von 600 bis 1800 m/z analysiert und als 256 k-Datenpunkte aufgenommen. Die Eichung des Gerätes erfolgte über die verschiedenen Ladungszustände von Cytochrom C. Für die Massenbestimmung mittels FT-ICR-MS gibt es zwei Ansätze: Die erste Methode berechnet die theoretische Isotopenverteilung, um dann die einzelnen Isotopenpeaks einer gesuchten Anzahl an ^{13}C -Atomen zuordnen zu können. Dies ist schon deshalb sehr schwierig, da der erste Isotopenpeak, welcher der monoisotopischen Masse entspricht, häufig nicht eindeutig bestimmt werden kann. Daher wurde die zweite Möglichkeit der Auswertung gewählt, für die der höchste Peak in der Isotopenverteilung herangezogen und mit einem entsprechenden Peak eines theoretisch berechneten Isotopenmuster korreliert wird. Die Auswertung der Isotopenmuster wurden unter Zuhilfenahme der Bruker Xmass 4.0 Software durchgeführt.

3.1.9 Ausschlußchromatographie

Eine Gelfiltrationssäule besteht aus Gel „Beads“, in die kleine Moleküle hineindiffundieren können, während die größeren Moleküle an diesen Gelkugeln vorbeiwandern und zusammen mit der Laufmittelfront die Trennstrecke als Erste durchlaufen. Für die Durchführung der „Size Exclusion Chromatography“ (SEC) wurde als HPLC die SMART-Anlage der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) mit den Säulen Superdex 75 HR (Molekulargewichtsbereich 3000-75000) und Superdex 200 HR (Molekulargewichtsbereich: 10000-600000) mit einem Durchmesser 3,2 mm und einer Länge von 30 cm verwendet. Die Detektion erfolgte bei 208, 254 und 280 nm. Die HPLC wurde isokratisch betrieben und alle 1 Minute wurden Fraktionen geschnitten. Die gesammelten Proteinfractionen wurden mittels 1D-Polyacrylamid-Gelen sowie MALDI-Messungen auf ihre Größe überprüft. Sämtliche Auftrennungen wurden bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, die durch das Verwenden gängiger biochemischer Puffersysteme eingestellt wurden.

Als Laufmittel dienten folgende Puffer:

Puffer	pH
0.15 M NaCl, 0.05 M Na ₃ PO ₄	7.0
6 M Harnstoff	8.6
6 M Harnstoff, 0.05 M Tris	8.0
6 M Harnstoff, 0.05 M MOPS	6.95
6 M Harnstoff, 0.05 MES	5.98
6 M Harnstoff, 0.05 M Citronensäure	5.0
6 M Harnstoff, 0.05 M Ameisensäure	4.0
6 M Harnstoff, 2% NP40, 5% β-Mercaptoethanol, 0.4% Ampholin, 0.4% Pharmalyte	-
6 M Harnstoff, 1% NP40	-

Tabelle 3.9.: Verwendete Puffersysteme für die Ausschlußchromatographie

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Chemikalien, Enzyme, Medien und kommerziell erhältliche Kits (falls nicht bereits im proteinchemischen Kapitel aufgelistet)

CHEMIKALIEN	HERKUNFT
Agarose	Sigma, Steinheim
Ampicilin	Roche, Penzberg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Peptide	Difco Laboratories, Detroit, USA
DNA-Größenstandard	Roche, Penzberg
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
IPTG	Roche, Penzberg
Kanamycin	Roche, Penzberg
MgCl ₂	Roche, Penzberg
Ni-NTA Spin Kit	Qiagen, Hilden
Nukleotide	Roche, Penzberg
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, USA
Taq DNA Polymerase	Roche, Penzberg
Vent _R DNA Polymerase	Roche, Penzberg
X-Gal	Roche, Penzberg
XL1-Blue Supercompetent Cells	Stratagene, Heidelberg

Tabelle 3.10.: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Medien sowie kommerziell erhältliche Kits

STÄMME	GENOTYP	HERKUNFT
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac (F'proAB, lacI ^q ZDM15, Tn10 tet ^r)	Stratagene, Heidelberg
M15		Qiagen, Hilden

Tabelle 3.11.: Verwendete Stämme (E.Coli)

Als Plasmid wurde ein pQE30-Vektor verwendet, der speziell für N-terminale 6xHis Tags-Konstrukte hergestellt wird (Qiagen, Hilden BRD). Sein genauer Aufbau ist in Abbildung 4.14 auf Seite 127 gezeigt.

Verwendete Medien:

Als Nährmedium diente LB (Luria-Bertani Medium) Medium. Das LB Medium wurde aus 1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeastextrakt und 1% NaCl hergestellt. Zur Herstellung von Kulturplatten wurden zu dem flüssigen LB Medium 2% Bacto-Agar hinzugefügt. Für die Selektion wurden 50 bzw. 100 µg/ml Ampicilin verwendet. Für die Transformation mit M15-Zellen wurde zusätzlich 25 µg/ml Kanamycin zugegeben. Kultivierung der E. coli erfolgte für Platten bei 37°C im Brutschrank und für Flüssigkulturen bei 37°C und 250 rpm in Inkubatoren.

3.2.2 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktionsspaltung

Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte in einem Volumen von 10-50 µl unter den von New England Biolabs bzw. La Roche angegebenen Bedingungen bezüglich Verhältnis von Enzym zu DNA, der Salzkonzentration, Zusatz von BSA (100 µg/ml) sowie Dauer der Reaktion. Um 1 µg DNA zu spalten, wurden 1-20 U Restriktionsendonuklease eingesetzt und die Reaktion dauerte 1 h bei plasmidischer DNA und bis zu 16 h bei genomischer DNA (je nach Enzym).

Ligation

Für einen Ligationsansatz von 10 µl waren etwa 200 µg DNA erforderlich. Bei der Ligation eines DNA-Fragmentes mit einem Vektor wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Fragment von 1:1 bis 1:3 eingesetzt. Die Ligation wurde bei 16°C für 16 h durchgeführt und erfolgte nach einer Methode von Blakesly (1986).

Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung der Phosphatgruppen am 5'-Ende von linearer Vektor-DNA verhindert die Religation der offenen Enden. Die Phosphatase aus Kälberdarm wurde gemäß Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die Entfernung des Enzyms nach der Reaktion erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese mit nachfolgender Elution des Vektorfragments aus der Agarose.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook 1989)

Verwendete Lösungen

- Elektrophoresepuffer (1fach TAE) besteht aus 40 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl und 1mM EDTA. Der pH wurde mit Essigsäure auf 8 eingestellt.
- Auftragspuffer (6fach TAE) besteht aus 25% (w/v) Ficoll, 50 mM EDTA und 0,5% Bromphenolblau. Der pH wurde ebenfalls mit Essigsäure auf 8 eingestellt.
- Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg Ethidiumbromid pro 1 ml H₂O

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Die dafür verwendeten Gele enthielten je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8-1,2 %iger Agarose [w/v] in Trisacetat (TAE)-Puffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit DNA-Probenpuffer gemischt. Die Elektrophorese fand in TAE-Puffer bei 70-200 mA statt. Die DNA-Fragmente wurden durch Inkubieren des Geles für 30 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt und mit einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von

365 nm sichtbar gemacht. Die Größenbestimmung der Fragmente erfolgte über den Vergleich mit einem DNA-Längenstandard.

3.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, wurden die Gelblöcke, die die mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemachten Banden enthielten, mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.5 Polymerasekettenreaktion

Diese Methode wurde benutzt, um DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Die Durchführung der Reaktion erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers mit Vent_R® DNA-Polymerase (New England Biolabs) oder Taq Polymerase in einem GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT).

Die Zyklusprogrammierung war wie folgt:

	30 Zyklen			1 Zyklus
	Denaturierung	Anlagerung	Amplifikation	Elongation
Temperatur:	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C
Dauer:	60 sec	60 sec	60 sec/kBp	10 min

Für ein vorgegebenes Volumen von 50 µl wurden 2 µl linearisiertes Template (40 ng/µl), jeweils 0,5 µl Primer für das 3' bzw. 5'-Ende (20pmol), 1µl MgCl₂ (1mM), 1 µl dNTPs (0.2mM), 5 µl Puffer (10 fach konzentriert) und 0,5 µl Polymerase (0.5U) eingesetzt.

3.2.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden bei einer externen Firma in Auftrag gegeben, und dort mit einem ABI 377-Prism-Sequencer mit Hilfe von automatisierter Fluoreszenzsequenzierungstechnologie vermessen. Die Konzentration der DNA-Produkte wurde bei einem OD von 260 nm vermessen und nach der Formel:

$$A_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ DNA}$$

berechnet. Pro Reaktion wurden 1-2 μg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit Hilfe des Programmes Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

3.2.7 Herstellung eines rekombinanten β_2 -Microglobulin

Eine cDNA-Bibliothek der Spezies Mensch (Gehirn) diente als Ausgangspunkt für die Isolierung und Amplifizierung des β_2 -Microglobulins mittels PCR. Das Gen wurde als ein BamH I-, Hind III-Fragment in einen pQE30-Vektor kloniert, der einen N-terminalen 6xHis Tag trägt. Dieser 6xHis Tag ist für die spätere Isolierung und Aufreinigung des Proteins von Bedeutung. Das Produkt wurde anschließend in kompetente XL1-Blue-Zellen (Klebe 1983) transformiert. Zur Kontrolle wurden Kolonien gepickt und Minipräps des Genproduktes hergestellt, die anschließend wieder mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten und sequenziert wurden. Nachdem das Produkt als β_2 -Microglobulin identifiziert werden konnte, wurde das Genprodukt in kompetente M15-Zellen transformiert (nach Villarejo, Zabin). Für die Expression wurden Kolonien gepickt und Übernachtskulturen angesetzt, die am nächsten Tag verdünnt und mit frischem Medium wieder angesetzt wurden. Nachdem die Kulturen einen O.D.₆₀₀ von 0.7 erreicht hatten (Dauer: circa 2-3 Stunden), wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben und die Kulturen konnten weitere 5 Stunden wachsen. Sie erreichten dabei einen O.D.₆₀₀ von circa 2.8-3.0. Für

die Weiterverarbeitung wurden die Zellen bei 4000 x g für 20 min zentrifugiert und das Pellet bei -80 °C eingefroren.

3.2.8 Proteinchemische Methoden II

3.2.8.1 Gewinnung von Lysaten aus *E. coli* und Aufreinigung des 6xHis-Tag Proteins

Die eingefrorenen Zellpellets wurden in einem Zehntel des Volumens der vorherigen Zellkultur unter denaturierenden Bedingungen in einer Mischung aus 8 M Harnstoff, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl resuspendiert. Um Probleme bei der Ausbeute zu verhindern, wurde die Lösung für 30 min geschüttelt, anschließend Lysozym in einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben und die Lösung auf Eis gestellt. Bei sämtlichen Aufreinigungsschritten wurden Proben genommen, um diese mittels SDS-PAGE zu kontrollieren. Einige der Proben wurden anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (6 x mit Intervallen von 10 sec und Pausen von 5 sec). Zur Abtrennung des Proteins von den restlichen Zellinhaltsstoffen wurden Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA)-Spinsäulen verwendet. Es kommt auf einer Ni-NTA-Affinitätssäule zu einer Komplexbildung mit dem 6xHis Tag des Proteins. Die Vorgehensweise folgte den Anweisungen des Herstellers.

3.2.8.2 SDS-PAGE von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE erfolgte modifiziert nach Laemmli (1970) und wurde bereits im Kapitel 3.1 „Proteinchemische Methoden“ beschrieben. An dieser Stelle sollen daher lediglich die Unterschiede bzw. die Probenvorbereitung beschrieben werden. Die Proben wurden in 3-fach konzentriertem Lysispuffer aufgenommen und für 5 min bei 100 °C denaturiert. Das Gießen der Gele sowie die Laufbedingungen entsprechen den Angaben in Kapitel 3.1.4.1 mit einem Kamm für 11-15 Proben und einem Low Molecular Proteinstandard. Die Gele wurden anschließend entweder mit Coomassie Blue gefärbt oder einer Silberfärbung unterzogen.

4 Ergebnisse

Wie in Kapitel 1.2 erläutert, wurden die Proteine Haptoglobin und das β_2 -Microglobulin ausgewählt, um anhand dieser Proteine die Leiterbildung im 2D-Gel aufzuklären. Der klassische Ansatz, um posttranslationale Modifikationen zu untersuchen, sind enzymatische Spaltungen der Coomassie-Spots im Gel mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse.

4.1 Vergleich von enzymatischen Spaltungen der untersuchten Proteine

4.1.1 Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine und deren einzelner Untereinheiten

α_1 -Haptoglobin

1	11	21	31	41
VDSGNDVTDI	ADDGCPKPPE	IAHGYVEHSV	RYQCKNYYKL	RTEGDGVYTL
51	61	71	81	
NNEKQWINKA	VGDKLPECEA	VCGKPKNPAN	PVQ	

α_2 -Haptoglobin

1	11	21	31	41
VDSGNDVTDI	ADDGCPKPPE	IAHGYVEHSV	RYQCKNYYKL	RTEGDGVYTL
51	61	71	81	91
NDKKQWINKA	VGDKLPECEA	DDGCPKPPEI	AHGYVEHSVR	YQCKNYYKLR
101	111	121	131	141
TEGDGVYTLN	NEKQWINKAV	GDKLPECEAV	CGKPKNPANP	VQ

β -Haptoglobin

1	11	21	31	41
ILGGHLDKAG	SFPWQAKMVS	HHNLTTGATL	INEQWLLTTA	KNLFLNHSEN
51	61	71	81	91
ATAKDIAPTL	TLYVGKKQLV	EIEKVVLHPN	YSQVDIGLIK	LKQKVSVNER
101	111	121	131	141
VMPICLPSKD	YAEVGRVGYV	SGWGRNANFK	FTDHLKYVML	PVADQDQCIR
151	161	171	181	191
HYEGSTVPEK	KTPKSPVGVQ	PILNEHTFCA	GMSKYQEDTC	YGDAGSAFAV
201	211	221	231	241
HDLEEDTWYA	TGILSFDKSC	AVAEYGVYVK	VTSIQDWWQK	TIAEN

 β_2 -Microglobulin

1	11	21	31	41
IQRTPKIQVY	SRHPAENGKS	NFLNCYVSGF	HPSDIEVDLL	KNGERIEKVE
51	61	71	81	91
HSDLFSKDW	SFYLLYYTEF	TPTEKDEYAC	RVNHVTLSQP	KIVKWDRDM

4.1.2 Sequenzen aus Spaltungen mit Endoproteinasen (Lys-C, Asp-N, Trypsin) und deren Abdeckung mittels massenspektrometrischer Techniken

Bei allen Versuchen wurden die Cysteine reduziert und anschließend mit Vinylpyridin alkyliert (bzw. mit Jodacetamid, dies ist dort aber speziell gekennzeichnet). Die angegebenen Massen sind stets die monoisotopischen Massen der einfach geladenen Spaltfragmente. Die Peptidmassen, die mit den verschiedenen MS-Geräten festgestellt wurden, sind unterstrichen (auch nach Behandlung mit PNGaseF und der Abspaltung der Zuckereinheiten; dort ist jedoch experimentell bedingt die Masse um 1 Dalton höher, da aus dem an die Zucker gebundenen Asparagin bei der Abspaltung der Zucker eine Asparaginsäure wird. Auf die Unterschiede in den Isoformen wird im Einzelnen

im Kapiteln 4.5 eingegangen. Da beinahe ausschließlich der Phänotyp 2-2 kommerziell bezogen und verwendet wurde, und dieser Phänotyp nur aus der α_2 - und β -Kette des Haptoglobin besteht, erfolgte keine umfassende Untersuchung der α_1 -Kette.

Die Spaltungen mit Lys-C ergaben eine ideale Größe der Spaltfragmentmassen für die anschließende Untersuchung mit ESI- bzw. MALDI-Massenspektrometrie. Dies gilt mit kleineren Einschränkungen auch für Asp-N. Bei den Spaltungen mit Trypsin ist die Sequenzabdeckung weniger groß als bei den anderen Ansätzen, daher wurde dieses Enzym deutlich seltener verwendet. Durch den Einsatz mehrerer Spaltenzyme konnte die komplette Sequenz der Proteine abgedeckt werden. In den Tabellen nicht besonders hervorgehoben sind Peptide mit unspezifisch gespaltenen Spaltstellen (missed cleavage), bei denen eine oder mehrere theoretische Spaltstellen ausgelassen werden. Solche Spaltfragmente wurden ebenfalls in die Tabelle aufgenommen und für die Berechnung der Sequenzabdeckung mit berücksichtigt. In den Tabellen sind die Massen der Peptide, ihre Sequenz sowie die Position der Sequenz in dem Protein aufgelistet.

4.1.2.1 β_2 -Microglobulin

4.1.2.1.1 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Lys-C

Massen	Start	Ende	Sequenzen
359.26	92	94	<u>(K) IVK</u>
722.29	95	99	<u>(K) WDRDM</u>
742.45	1	6	<u>(-) IQRTPK</u>
845.44	42	48	<u>(K) NGERIEK</u>
1148.56	49	58	<u>(K) VEHSDLFSK</u>
1498.78	7	19	<u>(K) IQVYSRHPAENGK</u>
1964.97	76	91	<u>(K) DEYACRVNHVTLSPK</u>
2203.03	59	75	<u>(K) DWSFYLLYYTEFTPTEK</u>
2602.27	20	41	<u>(K) SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK</u>

4.1.2.1.2 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Asp-N

Massen	Start	Ende	Sequenzen
475.24	34	37	<u>(S) DIEV</u>
696.36	53	58	<u>(S) DLSFSK</u>
1766.94	38	52	<u>(V) DLLKNGERIEKVEHS</u>
2203.03	59	75	<u>(K) DWSFYLLYYTEFTPTEK</u>
2491.29	76	95	<u>(K) DEYACRVNHVTLSPKIVKW</u>
3879.95	1	33	<u>(-) IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPS</u>

4.1.2.1.3 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Trypsin

Massen	Start	Ende	Sequenzen
345.21	4	6	<u>(R) TPK</u>
359.26	92	94	<u>(K) IVK</u>
389.24	46	48	<u>(R) IEK</u>
416.26	1	3	<u>(-) IQR</u>
471.22	49	52	<u>(K) VEHS</u>
475.22	42	45	<u>(K) NGER</u>
475.24	34	37	<u>(S) DIEV</u>
488.31	38	41	<u>(V) DLLK</u>
696.36	53	58	<u>(S) DLSFSK</u>
752.37	13	19	<u>(R) HPAENGK</u>
765.43	7	12	<u>(K) IQVYSR</u>
861.36	76	81	<u>(K) DEYACR</u>
1122.63	82	91	<u>(R) VNHVTLSPK</u>
1676.75	20	33	<u>(K) SNFLNCYVSGFHPS</u>
2203.03	59	75	<u>(K) DWSFYLLYYTEFTPTEK</u>

4.1.2.2 α_2 -Haptoglobin4.1.2.2.1 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Lys-C

Massen	Start	Ende	Sequenzen
489.27	60	64	<u>(K) AVGDK</u>
489.27	119	123	<u>(K) AVGDK</u>
587.28	36	39	<u>(K) NYVK</u>
587.28	95	98	<u>(K) NYVK</u>
688.38	55	59	<u>(K) QWINK</u>
688.38	114	118	<u>(K) QWINK</u>
739.37	136	142	<u>(K) NPANPVQ</u>
1483.74	124	135	<u>(K) LPECEAVCGKPK</u>
1580.79	40	53	<u>(K) LRTEGDGVYTLNDK</u>
1708.85	99	113	<u>(K) LRTEGDGVYTLNNEK</u>
3685.70	65	94	<u>(K) LPECEADDGCPKPPEIAHGYVEHSVRYQCK</u>
4024.86	1	35	<u>VDSGNDVTDIADDGCPKPPEIAHGYVEHSVRYQCK</u>

4.1.2.2.2 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Asp-N

Massen	Start	Ende	Sequenzen
318.17	9	11	(T) DIA
334.16	6	8	(N) DVT
392.14	2	5	(V) DSGN
781.37	45	51	(G) DGVYTLN
1009.47	63	70	<u>(G) DKLPECEA</u>
1286.72	52	62	<u>(N) DKKQWINKAVG</u>
2049.04	104	121	<u>(G) DGVYTLNNEKQWINKAVG</u>
2447.22	122	142	<u>(G) DKLPECEAVCGKPKNPANPVQ</u>
3947.91	13	44	<u>(D) DGCPKPPPEIAHGYVEHSVRYQCKNYYKLRTEG</u>
3947.91	72	103	<u>(D) DGCPKPPPEIAHGYVEHSVRYQCKNYYKLRTEG</u>

4.1.2.2.3 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Trypsin

Massen	Start	Ende	Sequenzen
246.15	119	121	(K) AVG
246.15	60	62	(K) AVG
306.13	101	103	(R) TEG
306.13	42	44	(R) TEG
318.17	9	11	<u>(T) DIA</u>
334.16	6	8	<u>(N) DVT</u>

392.14	2	5	<u>(V) DSGN</u>
587.28	95	98	<u>(K) NYVK</u>
587.28	36	39	<u>(K) NYVK</u>
646.30	91	94	<u>(R) YQCK</u>
646.30	32	35	<u>(R) YQCK</u>
688.38	55	59	<u>(K) QWINK</u>
688.38	114	118	<u>(K) QWINK</u>
739.37	136	142	<u>(K) NPANPVO</u>
766.34	65	70	<u>(K) LPECEA</u>
781.37	45	51	<u>(G) DGVYTLN</u>
1152.55	104	113	<u>(G) DGVYTLNNEK</u>
1483.74	124	135	<u>(K) LPECEAVCGKPK</u>
2196.07	72	90	<u>(D) DGCPKPPEIAHGYVEHSVR</u>
2196.07	13	31	<u>(D) DGCPKPPEIAHGYVEHSVR</u>

4.1.2.3 β -Haptoglobin

Da die Sequenzabdeckung mittels Lys-C und Asp-N-Verdauansätzen bereits 100% beträgt und Spaltungen mit Trypsin deutlich seltener untersucht wurden, wird darauf verzichtet die dort analysierten Spaltpeptide zu zeigen.

4.1.2.3.1 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Lys-C

Massen	Start	Ende	Sequenzen
345.21	162	164	<u>(K) TPK</u>
547.27	241	245	<u>(K) TIAEN</u>
760.40	131	136	<u>(K) FTDHLK</u>
858.49	68	74	<u>(K) QLVEIEK</u>

920.46	10	17	<u>(K) GSFPWQAK</u>
923.53	1	9	<u>(-)ILGGHLDAK</u>
1203.64	231	240	<u>(K) VTSIQDWVQK</u>
1290.73	55	66	<u>(K) DIAPTLTLYVGK</u>
1393.68	219	230	<u>(K) SCAVAEYGVYVK</u>
1458.73	42	54	<u>(K) NLFLNHSENATAK</u>
1776.95	95	109	<u>(K) VSVNERVMPICLPSK</u>
1795.01	75	90	<u>(K) VVLHPNYSQVDIGLIK</u>
2220.095	165	184	<u>(K) SPVGVQPILNEHTFCAGMSK</u>
2345.14	110	130	<u>(K) DYAEVGRVGYVSGWGRNANFK</u>
2679.39	18	41	<u>(K) MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK</u>
2883.38	137	160	<u>(K) YVMLPVADQDQCIRHYEGSTVPEK</u>
3922.70	185	218	<u>(K)</u> <u>YOEDTCYGDAGSAFAVHDLEEDTWYATGILSFDK</u>

4.1.2.3.2 Sequenzen und zugehörige Peptidmassen aus Spaltungen mit Asp-N

Massen	Start	Ende	Sequenzen
505.21	202	205	(H) DLEE
609.37	1	6	(-)ILGGHL
663.24	188	192	(E) DTCYG
874.40	193	201	(G) DAGSAFAVH
1203.60	236	245	<u>(Q) DWVQKTIAEN</u>
1273.61	206	216	<u>(E) DTWYATGILSF</u>
1285.70	133	143	<u>(T) DHLKYVMLPVA</u>
2165.10	217	235	<u>(F) DKSCAVAEYGVYVKVTSIQ</u>
2593.26	110	132	<u>(K) DYAEVGRVGYVSGWGRNANFKFT</u>

2913.68	85	109	<u>(V) DIGLIKQKQKVSNERVMPICLPSK</u>
3394.90	55	84	<u>(K) DIAPTLTLYVGKKQLVEIEKVVLPNYSQV</u>
4942.41	146	187	<u>(Q)DQCIRHYEGSTVPEKKTTPKSPVGVQPILNEHTF</u> <u>CAGMSKYQE</u>

Als Beispiel für einen Peptidmix, der mittels LC-MS nach einem enzymatischen Verdau mit Lys-C analysiert wurde, sollen zwei Spots aus den Leitern für β_2 -Microglobulin und α_2 -Haptoglobin dienen. In der folgenden Abbildung sind die zugehörigen Totalionenstromchromatogramme (TIC) zu sehen. Diese Totalionenstromchromatogramme sind eine Besonderheit der LC-ESI-MS-Geräte und können direkt mit der UV-Spur der HPLC verglichen werden. Sie zeigen den Gesamtstrom an, der am Detektor des Massenspektrometers ankommt. Während einer Analyse erhält man einen „Grundstrom“, der z.B. vom Lösungsmittel kommen kann, und die Basislinie des TIC darstellt. Erreicht eine ionisierbare Spezies den Detektor, steigt das Signal abrupt in Form eines scharfen Peaks an. Damit zeigt es exakt dasselbe Verhalten wie die UV-Absorption im UV-Detektor, wenn eine UV-absorbierende Spezies den Detektor erreicht. Die zugehörigen Massen sind in der Tabelle 4.1 aufgelistet:

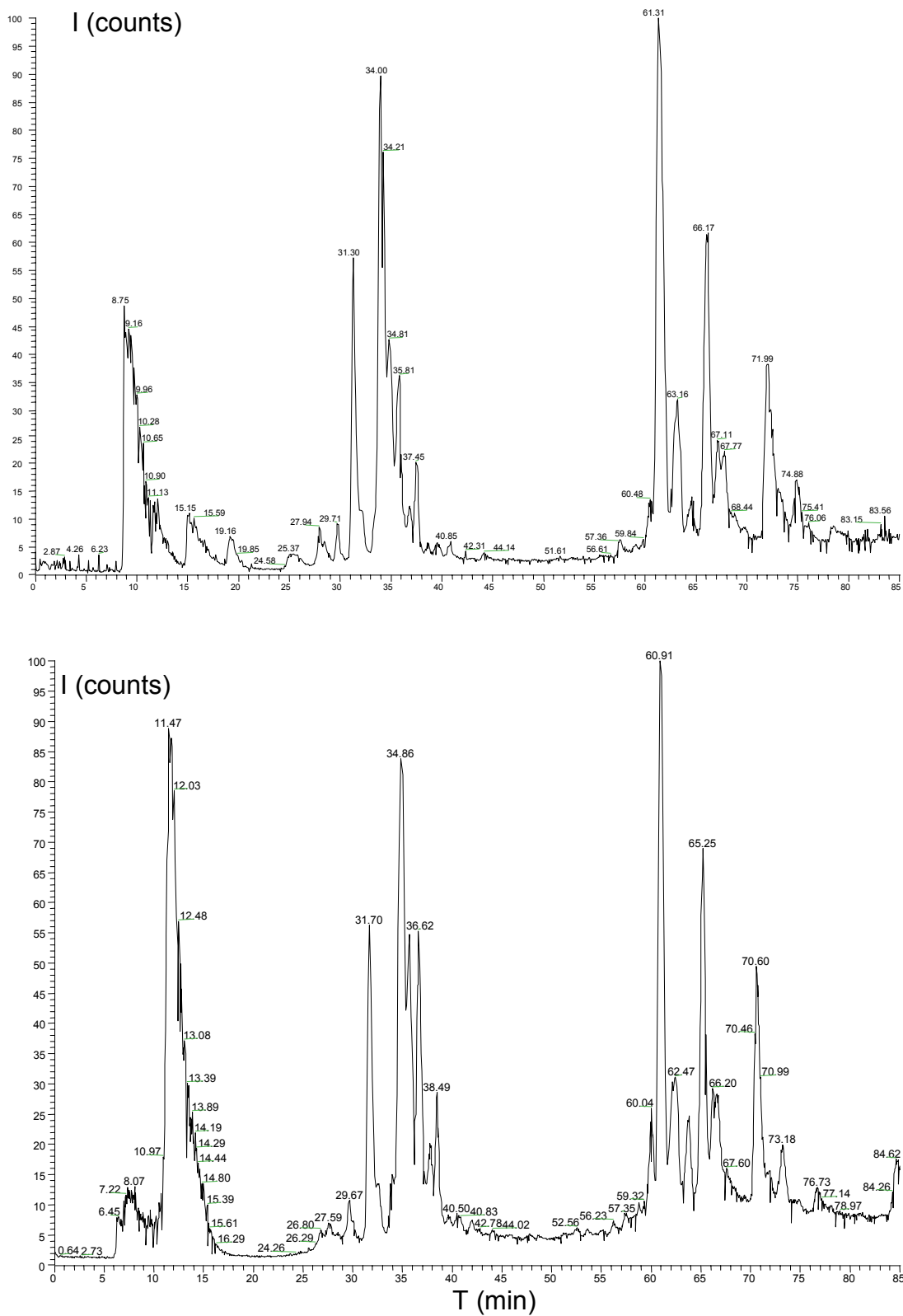


Abbildung 4.1.: Vergleich der Totalionenstromchromatogramme für Spot B und C von β_2 -Microglobulin

Theor. (M+H) ⁺	Exp. (M+H) ⁺ für SpotB	Exp. (M+H) ⁺ für SpotC	Sequenzen für β₂-Microglobulin
359.27	359.31	359.38	IVK
722.29	722.32	722.30	WDRDM
742.46	742.58	742.58	IQRTPK
845.45	845.50	845.52	NGERIEK
1148.56	1148.52	1148.51	VEHSDLSFSK
1498.78	1498.74	1498.74	IQVYSRHPAENGK
1964.97	1964.85	1964.83	DEYACRVNHVTLSPK
2203.03	2203.04	2203.01	DWSFYLLYYTEFTPTEK
2602.27	2602.82	2602.78	SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK
Theor. (M+H) ⁺	Exp. (M+H) ⁺ für Spot B	Exp. (M+H) ⁺ für Spot C	Sequenzen für α₂-Haptoglobin
147.11	-	-	K
489.27	489.24	489.24	AVGDK
489.27	489.24	489.24	AVGDK
587.28	587.23	587.23	NYYK
587.28	587.23	587.23	NYYK
688.38	688.43	688.40	QWINK
688.38	688.43	688.40	QWINK
739.37	739.41	739.44	NPANPVQ
1483.74	1483.96	1484.03	LPEC EAVC GKPK
1580.79	1580.78	1581.02	LRTEGDGVYTLNDK
1708.85	1709.02	1709.02	LRTEGDGVYTLNNEK
3685.70	3687.04	3687.00	LPEC EADDGC PKPPEIAHGYVEHSVRYQCK
4024.86	4026.84	4026.64	VDSGNDVTDIADDGC PKPPEIAHGYVEHSVRYQCK

Tabelle 4.1.: Vergleich der theoretischen und experimentell ermittelten Peptidmassen benachbarter Spots in einer Leiter für β₂-Microglobulin und α₂-Haptoglobin

Eine deutliche Übereinstimmung des Peptidpatterns der beiden Totalionenströme der beiden benachbarten Spots kann man Abbildung 4.1 entnehmen. So sind sämtliche relevanten Peaks ab circa 25 min in beiden Läufen vorhanden und zeigen dabei eine identische Abfolge der Peaks. Der einzige sichtbare Unterschied liegt in kleineren Unterschieden in den Retentionszeiten in einer Größenordnung von bis zu einer Minute, die jedoch für chromatographische Trennungen durchaus üblich sind.

Wie man Tabelle 4.1 entnehmen kann (sie gilt exemplarisch auch für die übrigen Verdauansätze einschließlich der zuckerhaltigen β -Kette des Haptoglobins) ist kein Unterschied in den Massen vorhanden, der eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes in der isoelektrischen Fokussierung erklären könnte. Dabei war die Massenabweichung von der theoretischen Masse stets besser als 100 ppm (parts per million). Als Fazit lässt sich sagen: Mit diesem Ansatz konnte neben der bekannten Glykosylierung der β -Kette keine weitere posttranslationale Modifikation mit einer signifikanten Veränderung der Peptidmassen gefunden werden.

4.2 Glykosylierung als mögliche Ursache der Leiterbildung im Falle der Haptoglobin- β -Kette

4.2.1 Oligosaccharidanalytik

Ein erster Schritt in der Analyse der Zuckergruppen wurde schon in Kapitel 4.1.2.3 beschrieben. Die zuckerhaltige β -Kette wurde ebenso behandelt wie die übrigen Proteine. Durch die enzymatische Spaltung der β -Kette kommt es zur Bildung von zuckerhaltigen Peptiden, die massenspektrometrisch untersucht werden können. Eine Untersuchung der Glykopeptide gelingt jedoch nur, wenn der Zuckeranteil nicht zu hoch wird. Die Zuckerketten können die Analyse in zweierlei Hinsicht stören: Zum einen kann durch die ausladende Bäumchenstruktur der Zuckergruppen eine Protonierung der basischen Aminosäuren erschwert und so die Ionisierung der Peptide gestört werden. Zum anderen können die Peptide durch Anlagerung der Zuckergruppen zu hydrophil werden und so der Analyse verloren gehen.

Wie im Folgenden näher erläutert wird, konnten in den unterschiedlichen Ansätzen den zuckerhaltigen Peptiden mittels spezieller auf Zucker optimierter massenspektrometrischer Techniken stets Peptidmassen zugeordnet werden. Diese

waren jedoch für die verschiedenen Spots der zuckerhaltigen β -Kette ohne Ausnahme identisch. Auf eine klassische Zuckeranalytik mit speziellen chromatographischen Methoden, so z.B. Gelfiltration, Affinitätschromatographie (Lectinsäulen) oder Ionenchromatographie sowie elektrochemischen Methoden wurde daher verzichtet. Eine mögliche Heterogenität innerhalb Zuckergruppen identischer Molekülmasse, die als Ursache für eine Auftrennung in der IEF nicht sehr wahrscheinlich ist, bleibt dabei unaufgeklärt.

Als qualitativen Beweis für das Vorhandensein der Zuckerketten kann man die Labilität der Peptid-Zuckerbindung nutzen. Während eines normalen LC-MS-Laufes an einem Elektrospraygerät wurde die sogenannte „Orifice“ (OR)-Spannung am Eingang zum Massenspektrometer in jedem zweiten Scan von 30-40 Volt auf 80-120 Volt erhöht. Es kommt dadurch zu einer Fragmentierung, der sogenannten „front-end-fragmentation“, die im Gegensatz zum MS/MS-Modus keine Peptidbindungen, aber die labile Bindung zwischen Asparagin und dem Zucker spaltet. Man erhält ein signifikantes Zuckerpattern im niedermolekularen Bereich, das in der Abbildung 4.2 zu sehen ist. In der obersten Zeile ist das Totalionenstromchromatogramm der Messung zu sehen. Darunter liegt die Massenspur der zuckerspezifischen Masse von 204 Dalton. In der untersten Zeile sind die zuckerspezifischen Massen von verschiedenen Hexosenstrukturen und von Sialinsäure erkennbar. Die Abkürzung SA steht für Sialinsäure, HexNAc für N-Acetylhexosamin und HexNAcHex für den um eine Hexose größeren Zucker. In den Scans mit niedrigerer OR-Spannung sind diese Zuckermassen nicht zu sehen. Durch abwechselnde Änderung der OR-Spannung kann nun die Masse der zuckerhaltigen Peptide bestimmt bzw. der jeweiligen Peptidmasse aus dem Scan mit der niedrigeren OR-Spannung und dem intakten Glykopeptid zugeordnet werden. Die zuckerhaltigen Peptide der β -Kette des Haptoglobins konnten so herausgefiltert und ihre Massen miteinander verglichen werden.

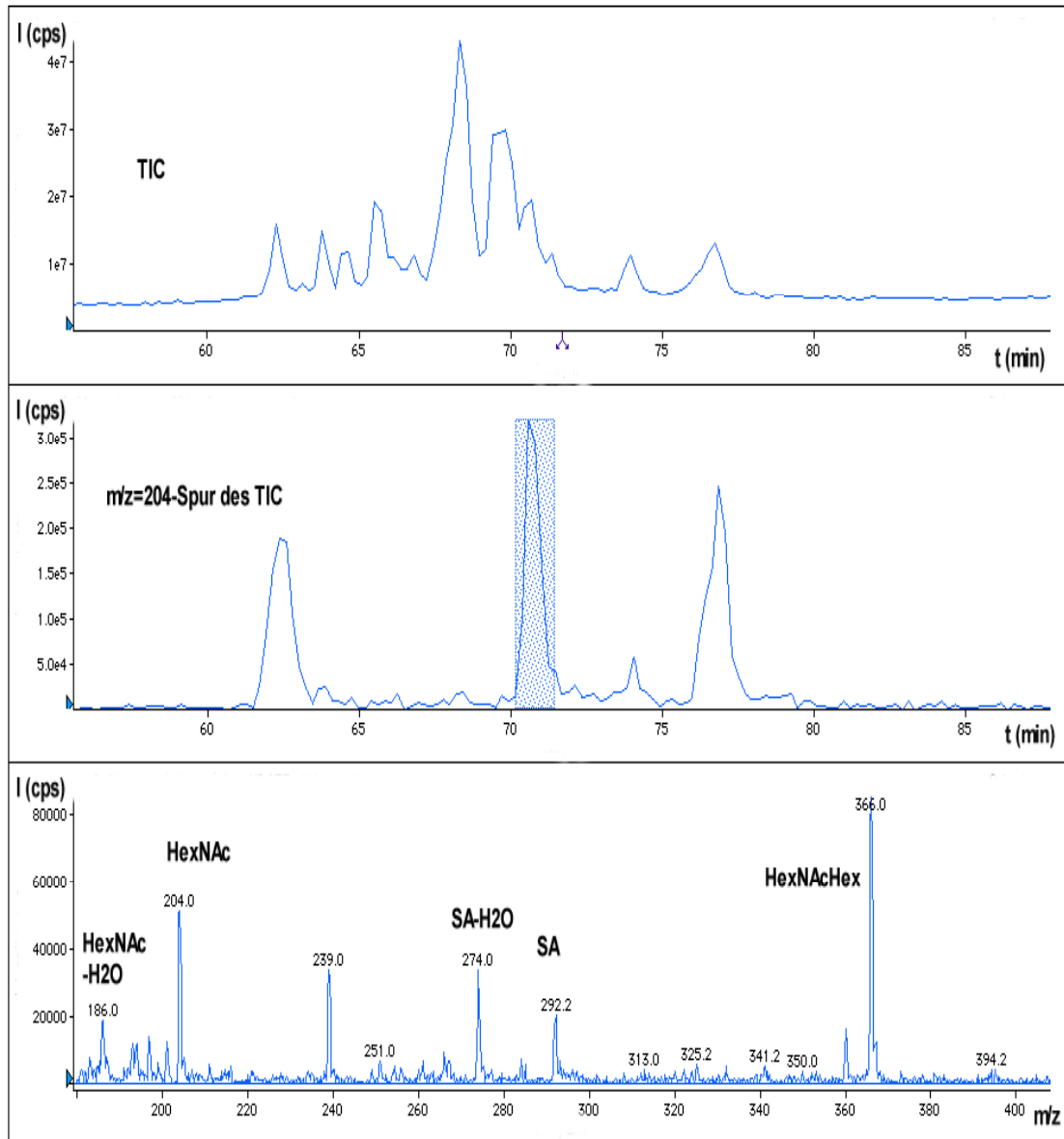


Abbildung 4.2.: „High-Orifice“-Experiment an einem Triple-Quadrupolinstrument zur Detektion zuckerhaltiger Peptide

4.2.2 Deglykosylierung des Proteins und anschließende Analytik

Ein anderer oft angewandter Ansatz für Untersuchungen von Glykoproteinen beinhaltet die enzymatische Abspaltung der Zuckergruppen und die anschließende Analytik der abgetrennten Zuckerketten und/oder des Proteins. Die Zuckergruppen schirmen bei der Ionisierung in einem Massenspektrometer sehr effektiv die zu protonierenden basischen Aminosäuren ab, so dass diese Proteine entweder sehr

schlecht oder gar nicht mehr ionisiert werden können. Dies kann man an der β -Kette des Haptoglobins nachweisen. Aufgrund des hohen Anteils an Zuckerketten ist es nicht möglich ein gut aufgelöstes ESI-Spektrum des intakten Proteins zu erhalten. Wie dem MALDI-Spektrum der β -Kette in Abbildung 4.3 zu entnehmen ist, ergibt sich eine Proteinmasse von ungefähr 35kD. Die theoretische Masse dagegen beträgt circa 27kD, was auf einen Zuckeranteil von circa 8kD schließen lässt.

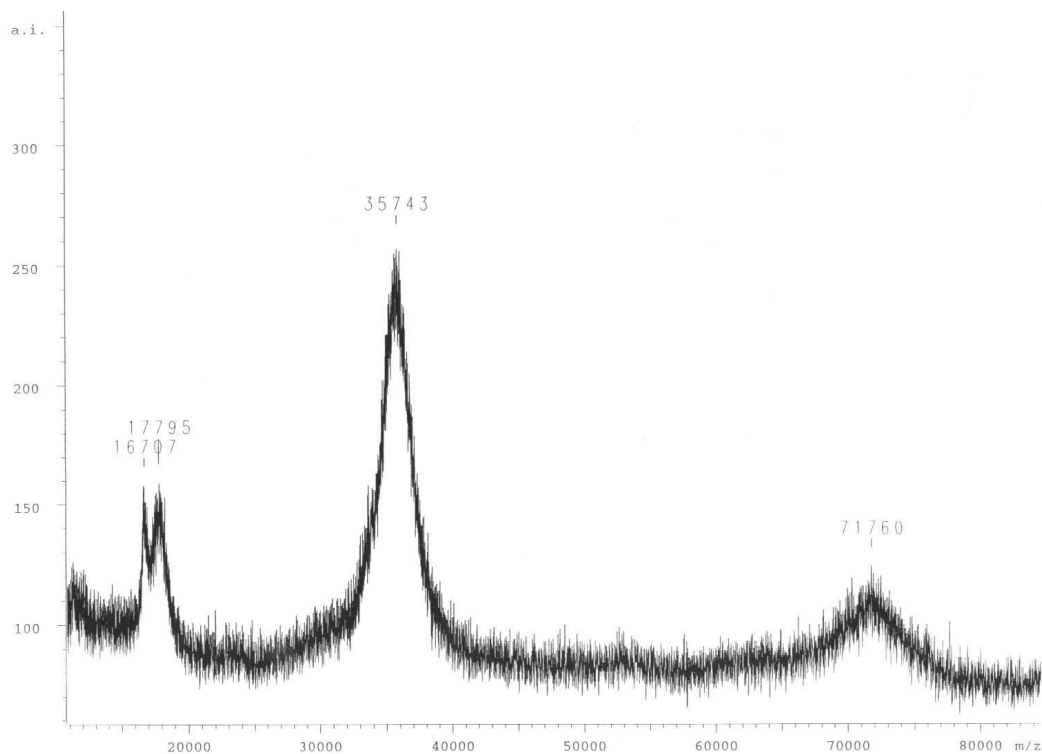


Abbildung 4.3.: MALDI-Spektrum von β -Haptoglobin (Vp behandelt)

Um die Analyse des „Peptid-Massenfingerprint“ zu erleichtern, wurde die β -Kette mit PNGase F behandelt, die Zucker enzymatisch entfernt, mit Lys-C im Gel gespalten und anschließend die Spaltfragmente analysiert. Wie Tabelle 4.2 zu entnehmen ist, wurden durch Kombination verschiedener Analysetechniken sämtliche theoretisch zu erwartenden Massen gefunden, womit die Sequenzabdeckung nahezu 100% beträgt. Die restlichen Peptide bestehen aus ein oder zwei Aminosäuren und sind der Analyse nicht zugänglich:

Sequenz	Fragment	Theor. Masse	ESI
TIAEN	241-245	547.27	547.2
FTDHLK	131-136	760.40	760.4
QLVEIEK	68-74	858.49	858.4
GSPWQAK	10-17	920.46	920.6
ILGGHLDAK	1-9	923.53	923.6
VTSIQDWVQK	231-240	1203.64	1203.6
SCAVAEYGVYVK	219-230	1288.62	1393.8
DIAPTLTLYVGK	55-66	1290.73	1290.8
DIAPTLTLYVGKK	55-67	1418.83	1418.8
NLFLNHSENATAK	42-54	1458.73	-
VSVNERVMPICLPSK	95-109	1671.89	1778.0
VVLHPNYSQVDIGLIK	75-90	1795.01	1793.2
ILGGHLDAKGSFPWQAK	1-17	1824.98	-
VVLHPNYSQVDIGLIK	75-92	2036.19	-
SPVGVQPILNEHTFCAGMSK	165-184	2115.04	2219.8
DYAEVGRVGYVSGWGRNANFK	110-130	2345.14	2345.0
MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK	18-41	2679.39	-
NLFLNHSENATAKDIAPTLTLYVGK	42-66	2730.45	-
YVMLPVADQDQCIRHYEGSTVPEK	137-160	2778.32	2883.6
YVMLPVADQDQCIRHYEGSTVPEKK	137-161	2906.42	3011.4
YQEDTCYGDAGSAFAVHDLEEDTWYATGILSFDK	185-218	3817.65	3923.3
Sequenz	ESI-Degly	MALDI	MALDI-Degly
TIAEN	-	-	-
FTDHLK	760.4	760.12	760.26
QLVEIEK	858.6	858.54	858.70
GSPWQAK	920.4	920.6	920.52
ILGGHLDAK	923.6	923.75	923.90
VTSIQDWVQK	1203.6	1203.64	1203.69
SCAVAEYGVYVK	1393.8	1393.73	1393.63
DIAPTLTLYVGK	1290.6	1290.82	1290.84
DIAPTLTLYVGKK	1418.4	1418.71	1418.96
NLFLNHSENATAK	1459.8	-	1460.41
VSVNERVMPICLPSK	1776.8	1777.07	1776.93
VVLHPNYSQVDIGLIK	1795.5	1793.43	1795.39
ILGGHLDAKGSFPWQAK	-	1824.4	1824.37
VVLHPNYSQVDIGLIK	-	-	2037.33
SPVGVQPILNEHTFCAGMSK	2220.4	2219.45	2220.08
DYAEVGRVGYVSGWGRNANFK	2345.6	2345.30	2345.36
MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK	?	-	2679.59
NLFLNHSENATAKDIAPTLTLYVGK	-	-	2730.44
YVMLPVADQDQCIRHYEGSTVPEK	2883.8	2883.44	2883.37
YVMLPVADQDQCIRHYEGSTVPEKK	?	3011.4	3011.28
YQEDTCYGDAGSAFAVHDLEEDTWYATGILSFDK	?	?	3922.92

Tabelle 4.2.: Erhaltene Peptidmassen vor und nach Deglykosylierung der β -Kette-Haptoglobin mit PNGase F

Wie Tabelle 4.2 zeigt, war eine vollständige Sequenzabdeckung erst nach der Deglykosylierung möglich. Die beiden fett gedruckten Sequenzen sind zuckerhaltige Peptide, die zur Absicherung der Peptidsequenz zusätzlich N-terminal ansequenziert wurden. Erst danach erfolgte über die vorher angesprochenen „High-Orifice“-Experimente eine exakte Zuordnung der zuckerhaltigen Peptide. Auf eine Untersuchung der Bäumchenstruktur im Detail der abgetrennten Zuckeruntereinheiten wurde verzichtet. Diese ist bereits bekannt und kann in der Literatur nachgelesen werden (Anderson 1998, Goodarzi 1998).

4.3 Ausschlußchromatographie zur Untersuchung möglicher Oligomerisierungsreaktionen der Haptoglobine

Eine weitere Hypothese, die das Auftreten unterschiedlicher pI-Werte in der IEF erklären könnte, ist ein Modell, bei dem kovalent gebundene Oligomere die Unterschiede in der Gesamtladung verursachen würden.

Dabei liegt die Annahme einer unterschiedlichen Anzahl von Monomeren zugrunde, die auch in der IEF kovalent verbunden bleiben und dadurch zu unterschiedlichen pI-Werten beitragen. Da der pI-Wert sich aus der Gesamtzahl an anionischen und kationischen Aminosäuren berechnen lässt, würden sich das Monomer, Dimer, Trimer usw. in verschiedene Banden aufspalten. Als geeignete analytische Untersuchungsmethode wurde die Ausschlußchromatographie bzw. die Gelfiltration ausgewählt. Zur Nachahmung der Bedingungen der isoelektrischen Fokussierung, wurde 6 M Harnstoff verwendet, um die Proteine denaturiert und damit möglichst gestreckt und ohne Ausbildung einer Sekundär- oder Tertiärstruktur auftrennen zu können. Zusätzlich wurden verschiedene pH-Bereiche getestet (unter der Verwendung verschiedener Puffersysteme), um Unterschiede in der Ausbildung möglicher Oligomere festzustellen. Als Molekularbereiche für die aufgetrennten Proteine wurden Säulen mit einem Bereich von 3000-70000 Dalton und 10000 bis 600000

Dalton ausgewählt. Da der Harnstoff bei der üblichen Peptid-/Proteinwellenlänge von 210 nm absorbiert, erfolgte die Detektion bei den etwas unempfindlicheren Wellenlängen 254/ 280nm. Die Kalibrierung des Massenbereichs der verwendeten Säulen wurde mittels eines Proteinstandards (Low- und High Molecular Standard) aus der 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Kalibrierung wurde dabei durch Läufe mit einzelnen Standardproteinen zusätzlich abgesichert und daraus Kalibrierkurven berechnet. Dabei ergaben sich Korrelationskoeffizienten von 94 % für eine lineare Regression und > 99 % für eine Regression zweiter Ordnung.

Eine Auftrennung des Low Molecular Standard ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

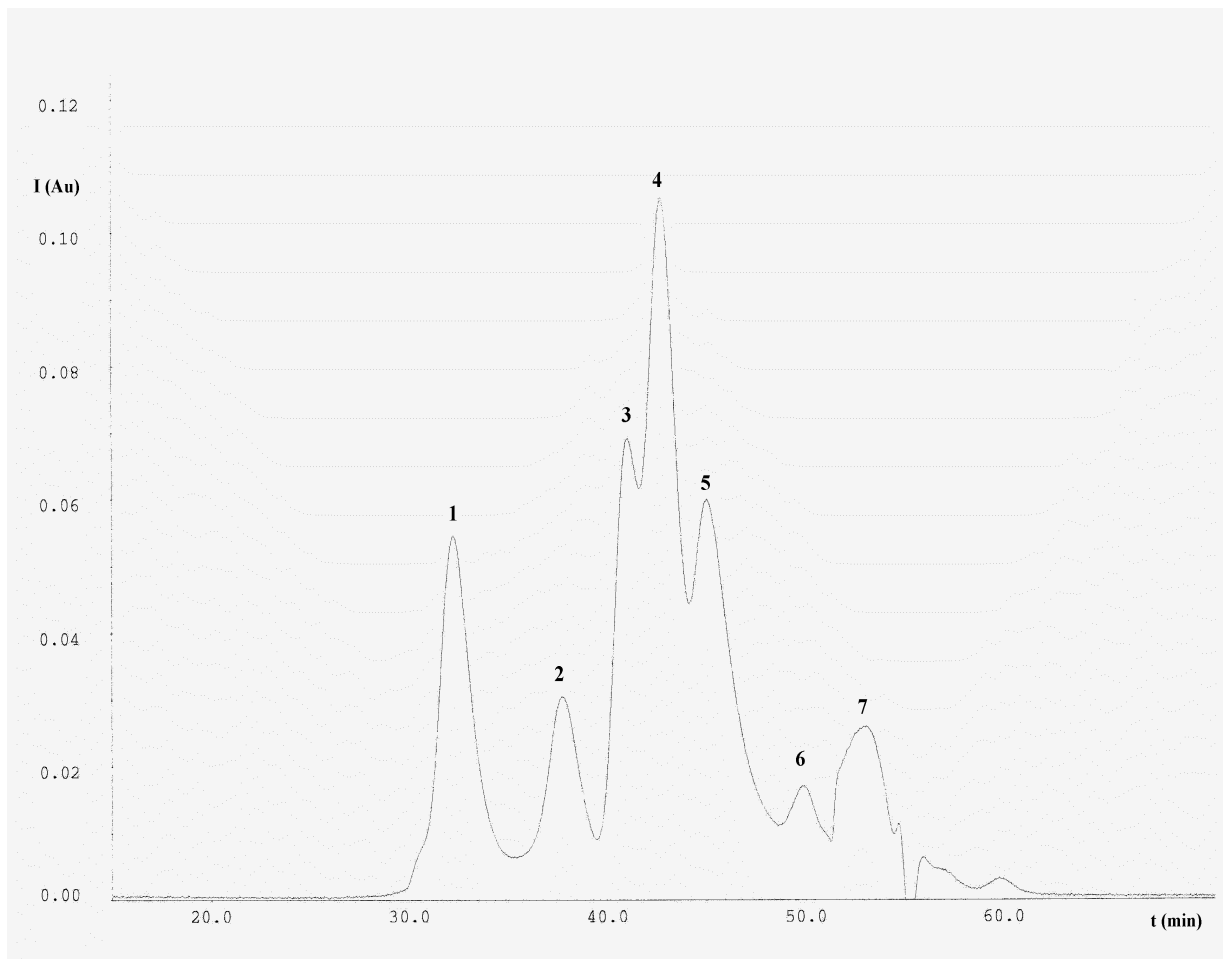


Abbildung 4.4.: Kalibrierung einer Superdex 75 HR-Säule mit dem Low Molecular Standard der Firma Pharmacia für die Ausschlußchromatographie

Zur Absicherung der mittels externer Kalibrierung ermittelten Massen wurden die aufgetrennten Peaks minutenweise fraktioniert und deren Größe sowohl mit MALDI als auch mittels nativer 1D-PAGE überprüft.

Ein Beispiel für einen gelchromatographischen Lauf des β_2 -Microglobulin ist in Abbildung 4.5. zu sehen.

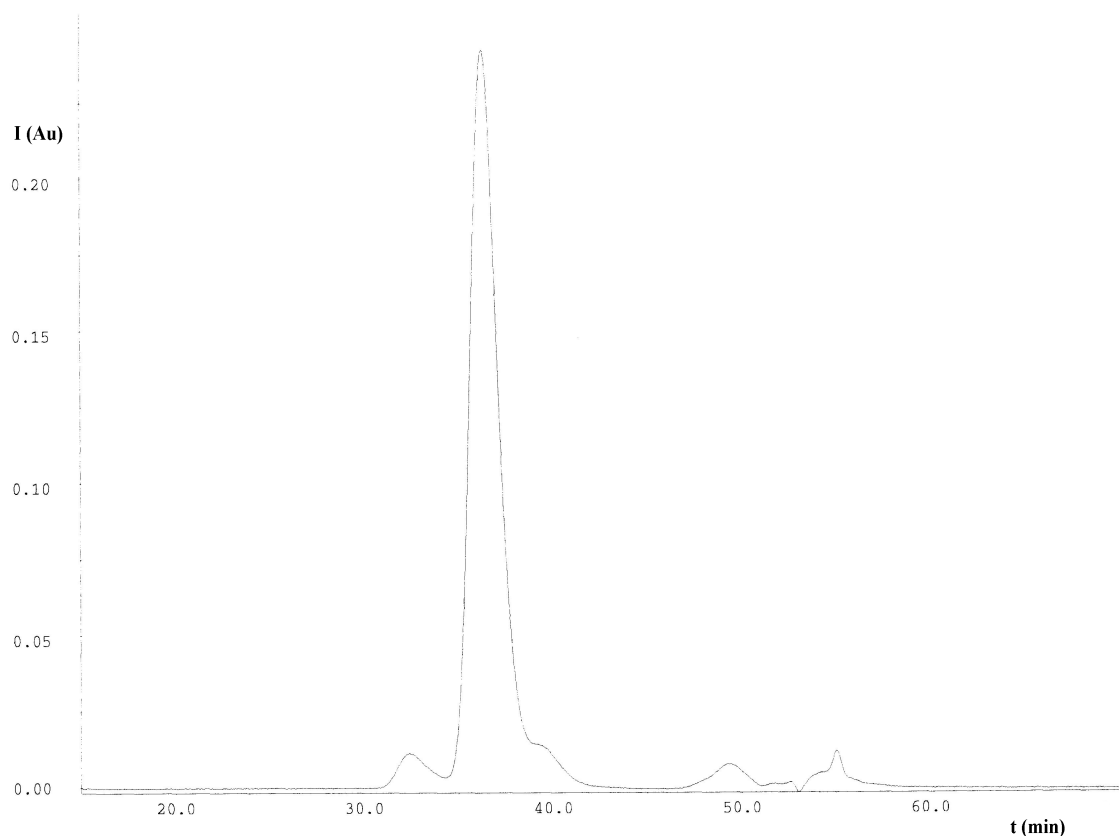


Abbildung 4.5.: β_2 -Microglobulin auf einer Superdex 75 HR-Säule

Die Übereinstimmung der Proteinmassen aus der Gelfiltration sowie MALDI-MS-Messungen und den nativen 1D-Gelen war ausreichend. Aufspaltungen der Proteinproben in mehrere Banden konnten jedoch nicht beobachtet werden. Zwar wurden auch kleine Peaks in den Chromatogrammen gesammelt, weitere Proteinmassen waren dort aber nicht bestimmbar. Als Fazit lässt sich festhalten, dass es nicht zu Aufspaltungen in mehrere Proteinfractionen kam und die Hypothese nicht bestätigt werden konnte. Unter den Bedingungen einer isoelektrischen Fokussierung

kommt nicht zu einer Oligomerisierung der Proteine, da sich unter diesen Bedingungen offenbar keine kovalente Bindung ausbilden kann, die während der gesamten IEF Bestand haben könnte.

4.4 Bestimmung der Gesamtproteinmasse

Wie in Kapitel 2.4 erläutert, besteht eine weitere Möglichkeit der massenspektrometrischen Untersuchung von Proteinen in der Bestimmung des Molekulargewichtes der gesamten Proteine ohne enzymatische Aufspaltung in Peptide. Diese Vorgehensweise wurde in dieser Arbeit ebenfalls angewendet und durch den Einsatz verschiedenster MS-Techniken unterschiedlich genaue Ergebnisse erzielt.

Der Ansatz, die unterschiedlichen Spots der Proteine getrennt voneinander auf das Molekulargewicht zu analysieren, ging von einer Elution der Proteine aus der Gelmatrix der isoelektrischen Fokussierung aus. Abbildung 4.6. zeigt als Beispiel das Bandenmuster von β -Haptoglobin mit den unterschiedlichen pI-Werten.

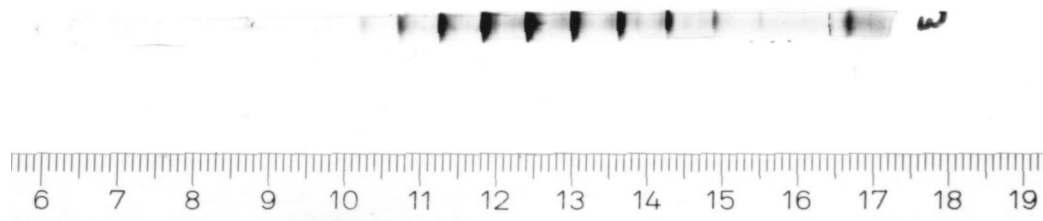
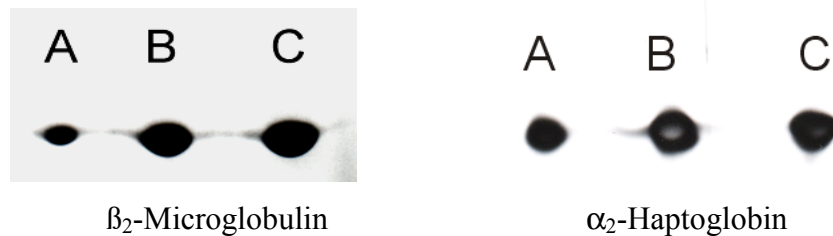


Abbildung 4.6.: IEF-Streifen der β -Kette von Haptoglobin

Die exakte Prozedur dieser Elution kann in Kapitel 3.1.4.5. nachgelesen werden. Es bietet sich an, die Proteine aus der ersten Dimension zu eluieren, da in der zweiten Dimension die Gelmatrix eine Elution deutlich erschwert. Aus der zweiten Dimension können ganze Proteine mittels Elektroelution eluiert werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, in der Literatur gibt es jedoch erfolgreiche Beispiele für diesen Ansatz (Schuhmacher 1996, Nousiainen 1998).

Eine Übersicht der Ergebnisse der Gesamtmassenbestimmung mit verschiedenen Massenspektrometern ist in Tabelle 4.3. zu sehen (zur besseren Veranschaulichung sind noch einmal die Spots der beiden Proteine im 2D-Gel dargestellt).



Protein	Theoretische Masse	Gefundene Masse	Massen-Abweichung
IR-MALDI (Eckerskorn 1997)			
α_2 -Haptoglobin	16681.80		
Spot A		16695±20	13.2±20
Spot B		16684±15	2.2±15
Spot C*	16837.90	16832±20	5.9±20
ESI-MS			
α_2 -Haptoglobin	16681.80		
Spot A		16682.62±2.0	0.8±2.0
Spot B		16680.20±1.8	1.6±1.8
Spot C*	16837.90	16839.03±2.2	2.1±2.2
FT-ICR-MS			
α_2 -Haptoglobin	16681.80		
Spot A		-	-
Spot B		16681.05±0.05	0.75±0.05
Spot C*	16837.90	16837.24±0.05	0.66±0.05
β_2 -Microglobulin	11941.47		
Spot A		-	-
Spot B		11941.94±0.05	0.47±0.05
Spot C		11940.94±0.05	0.53±0.05

*) Spot C (α_2 -Haptoglobin) besitzt noch ein zusätzliches Arginin am C-Terminus, und hat damit eine um 156.1 Dalton höhere Masse als Spot A und B

Tabelle 4.3.: Bestimmung der Proteingesamtmassen eluierter Spots mittels verschiedener MS-Techniken

Zum Vergleich mit den anderen Techniken ist zu Beginn die “scanning”-IR-MALDI Massenspektrometrie aufgeführt. Die MALDI-Technik hat ihre Hauptanwendungen im Peptidmassenbereich, da dort die Genauigkeit im unteren ppm-Bereich liegt. Wie in der Tabelle angegeben, liegt die Massengenauigkeit im Proteinbereich bei ± 20 -25 Dalton. Dass größere Massenabweichungen auch mit dieser Technik durchaus zu analysieren sind, zeigt der Nachweis einer Modifikation am C-Terminus von Spot C. An diesem Spot hängt am C-Terminus ein zusätzliches Arginin, das von der Straten 1984 durch eine nicht vollständige Prozessierung eines Precursors bereits erklärt hat.

Als weitere MS-Technik wurde ein ESI-Quadrupolinstrument verwendet. Im Gegensatz zur IR-MALDI, das die Proteine auch von einem Blot direkt analysiert, muss das Protein für die Elektrosprayionisierung in einem Lösungsmittel in ausreichender Konzentration gelöst vorliegen. Zudem reagiert das System wesentlich empfindlicher auf Salze oder Detergenzien als die MALDI-Technik.

Der Ansatz für die Analyse der Proteingesamtmasse ging von einer Elution der intakten Proteine aus dem IEF-Gel aus. Hierzu ist anzumerken, dass diese Methode ihre Vor- und Nachteile hat: Während die vollständige Trennung der in der Arbeit verwendeten Proteinbanden vorteilhaft ist, stellt der erhebliche Verlust an Protein, der bei der Elution der kompletten Proteine aus der Gelmatrix heraus unvermeidbar ist, einen Nachteil dar. Die zuckerhaltige β -Kette des Haptoglobins konnte mit diesen Techniken nicht mit einer ausreichenden Massengenauigkeit analysiert werden, da die Zuckerketten die Ionisierung des Proteins deutlich behinderten.

Wie aus Tabelle 4.3 zu entnehmen ist, zeigten auch diese Messungen keine Abweichungen im Rahmen der Messgenauigkeit. Daraufhin wurden die Proben zusätzlich mit einem ESI-FT-ICR-MS vermessen werden. Dieses Massenspektrometer mit einer elektromagnetischen Ionenfalle hat eine außergewöhnlich hohe Auflösung von circa 20000 über einen breiten Massenbereich. In der Literatur finden sich einige Beispiele für ähnliche Ansätze, kleinste Massendifferenzen von einigen wenigen Dalton an Proteinen zu analysieren, die mit älteren Geräten jedoch oft nicht

erfolgreich durchgeführt werden konnten (Groenen 1993, Wood 1995, Green 1998, Jedrzejewski 1998). Das FT-ICR-MS kann sowohl mit einer MALDI- als auch mit einer Elektrosprayquelle betrieben werden. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde jedoch ausschließlich eine ESI-Quelle benutzt. Um die hohe Auflösung dieses Gerätes zu veranschaulichen, wurden in der Abbildung 4.6 das theoretisch berechnete Isotopenmuster für einen Ladungszustand mit dem experimentell erhaltenen verglichen.

Mit Hilfe eines internen Standards berechnet die Software eine Gesamtmasse für das Protein unter Berücksichtigung der intensivsten Ladungszustände. Die verschiedenen Ladungszustände des Ubiquitin, das als interner Standard verwendet werden konnte sind ebenfalls in Abbildung 4.6. eingezeichnet. Wie man der Tabelle 4.3 entnehmen kann, wurden mittels FT-ICR-MS β_2 -Microglobulin und α_2 -Haptoglobin untersucht. Für das β_2 -Microglobulin ergab sich eine signifikante Massendifferenz von 1 Dalton für das Spotpaar B and C (siehe Abbildung 4.6.). Die Massen betragen für Spot B 11941,938 Dalton und für Spot C 11940,944 Dalton (Das Gerät war zuvor mit Ubiquitin geeicht worden, bei dem eine Standardabweichung von ± 0.05 Dalton erreicht wurde).

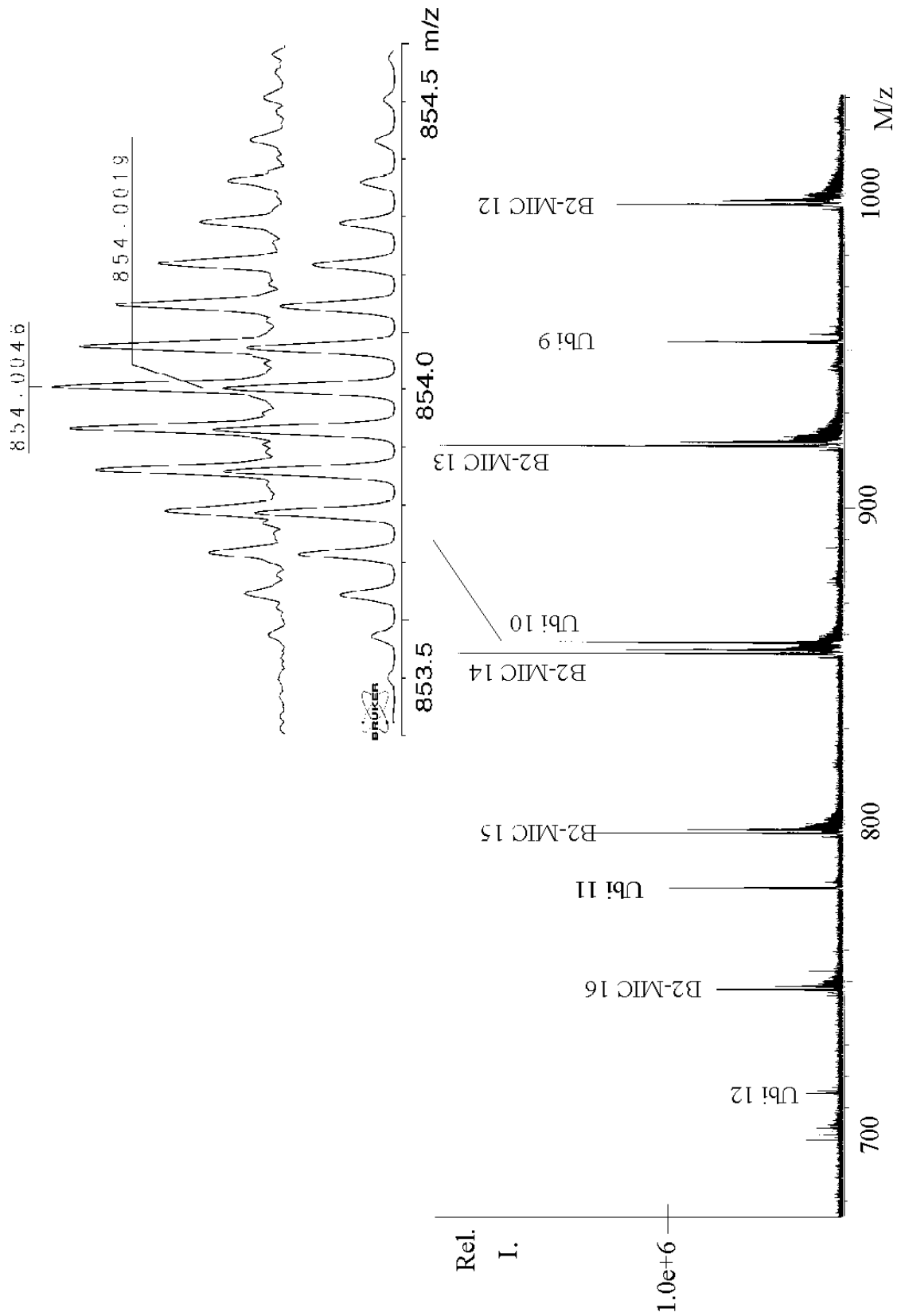


Abbildung 4.7: FT-ICR-MS Spektrum von β_2 -Microglobulin mit Ubiquitin als internem Standard



Abbildung 4.8.: 2D-SDS-PAGE-Spotpattern von β_2 -Microglobulin

Wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, kann dem experimentellen Befund einer Massendifferenz von nur einem Dalton nur eine Deamidierungsreaktion der Asparagine bzw. Glutamine zu ihren zugehörigen Säuren als Ursache zugrunde liegen.

Im nächsten Schritt war zu klären, an welchen Asparaginen oder Glutaminen die Deamidierung stattfindet. Um die Position der Deamidierungsstellen zu finden, mussten anschließend die Peptide auf Deamidierungen untersucht werden. Eine Deamidierung ist mit einem herkömmlichen LC-ESI-MS-Experiment allerdings nur schwer detektierbar. Dies liegt an der Reversed-Phase-Chromatographie im TFA-sauren Milieu. Sollte es sich um eine unvollständige Modifikation der Asparagine handeln, so würde es im stark sauren pH (2-3) zu einer Koelution der asparagin- und asparaginsäurehaltigen Peptide kommen. Dies liegt an der pH-abhängigen Gleichgewichtsreaktion der Säuregruppe sowie der Säureamidgruppe bei Protonierung im stark sauren Milieu. Beide Spezies sind hier ungeladen und unterscheiden sich nicht mehr.

Im Folgenden wird die Auswirkung der Koelution auf die Analyse mit einem ESI-Massenspektrometer und die erhaltenen Spektren beschrieben.

Die Isotopenverteilung der beiden sich um ein Dalton unterscheidenden Spezies überlagert sich und man erhält als Ergebnis ein Peptid mit einer je nach Grad der Deamidierung nur geringfügig veränderten Isotopenverteilung bis hin zu einer

kompletten Verschiebung zu einer um einen Dalton höher liegenden Isotopenverteilung.

Dies ist in Abbildung 4.9 einer Auftrennung in einem ESI-IonTrap-Gerät dargestellt: Sie zeigt zwei asparaginsäurehaltige Peptide der beiden Spots B und C des β -Microglobulins, von denen das Peptid mit der Masse 1148.5 (linker Teil der Abbildung) nicht deamidiert ist und das eine völlig normale Isotopenverteilung zeigt. Das zweite Peptid besitzt ein labiles Asparagin und wird, wie sich im Folgenden herausstellt, deamidiert. Wie im rechten Teil der Abbildung zu erkennen ist, verschiebt sich die Isotopenverteilung für ein Peptid dieser Größe völlig untypisch zu dem zweiten Isotopenpeak hin. Dies entspricht nicht dem regulären Isotopenmuster für ein Peptid dieser Masse, wie es im linken Teil der Abbildung zu sehen ist und damit der natürlichen Verteilung von C^{12} und C^{13} -Atomen. Das neue verschobene Isotopenmuster kommt durch eine Überlagerung der beiden regulären Isotopenmuster zustande, die sich jedoch um einen Dalton unterscheiden und deshalb versetzt voneinander aufaddiert werden.

Nur an dieser leichten Verschiebung des Isotopenmusters lässt sich eine mögliche Deamidierungsreaktion ablesen. Da dies für eine quantitative Abschätzung des Anteils an deamidierter Spezies zu ungenau ist - aber dennoch von einigen Gruppen praktiziert wird (Zhang 1999), musste eine Änderung der experimentellen Parameter erfolgen. Diese sollte es ermöglichen, das Auftreten einer Deamidierung zweifelsfrei zu bestimmen und wenn möglich, eine quantitative Abschätzung der Verhältnisse zu geben.

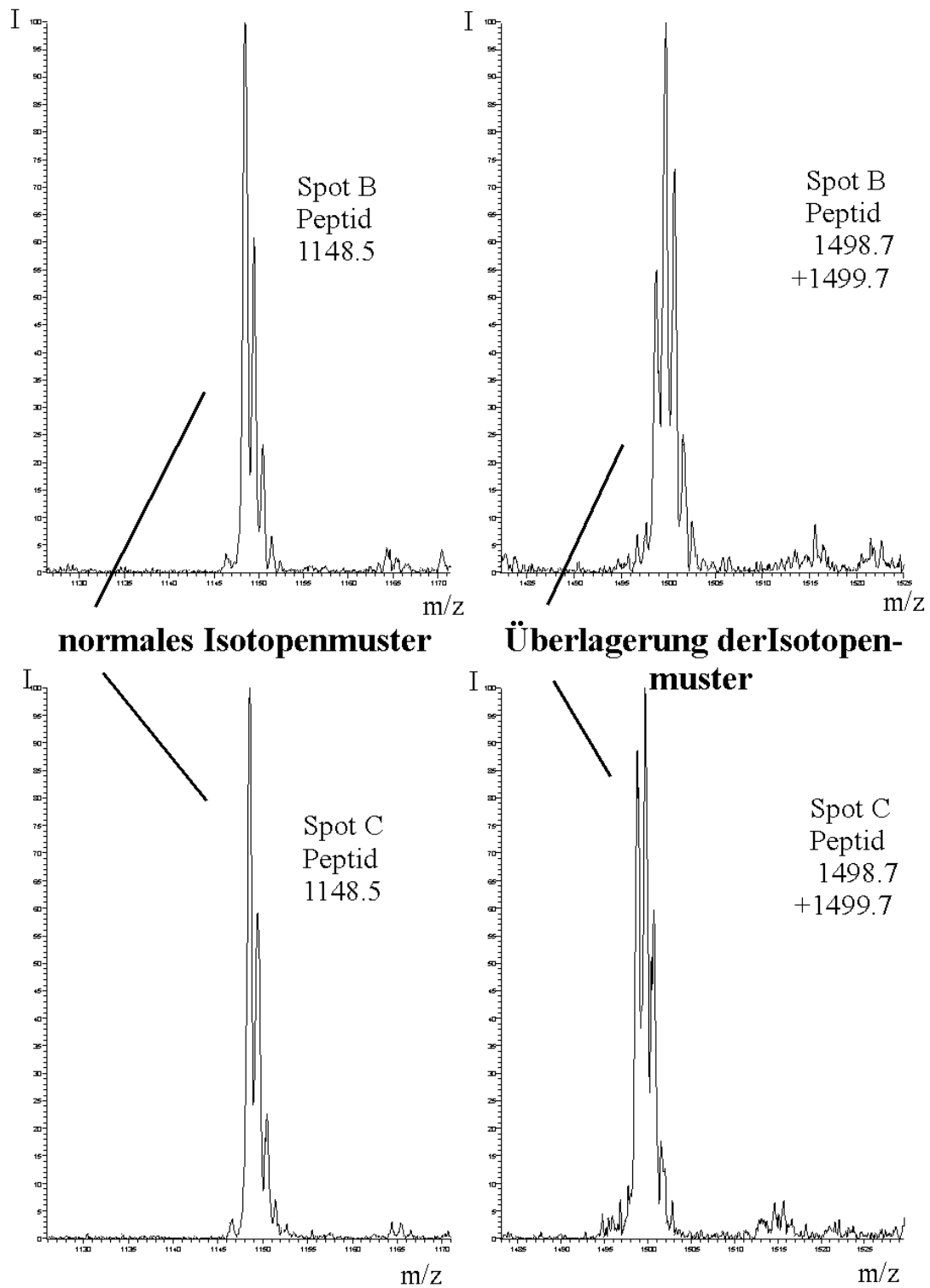


Abbildung 4.9.: Verschiebung des Isotopenmusters bei Koelution unmodifizierter und deamidierter Spezies im TFA-Puffersystem am Beispiel β_2 -Microglobulin

4.5 Deamidierungen als chemischer Alterungsprozess

Beispiele für Deamidierungen sind in der Literatur häufig belegt. Deamidierungsstellen sind z. B. für Varianten der G Proteine in Säugetierzellen berichtet worden (McIntire 1998, Exner 1999). Dabei diskutiert McIntire die Möglichkeit, dass die Deamidierung ein biologisch relevanter Teil eines neuartigen Prozesses sei mit dem die G Proteine auf zelluläre Antworten reagieren können. Auf die biologische Funktion der Deamidierung wird in Kapitel 5 in der abschließenden Diskussion auch anhand von Beispielen aus der Literatur eingegangen.

4.5.1 LC-ESI-MS im Neutralpuffersystem

Um eine komplette Trennung der beiden Spezies zu erhalten, und damit auch geringfügig deamidierte Peptide neben dominanten unmodifizierten asparaginhaltigen Peptiden analysieren zu können, wurden die Pufferbedingungen der RP-Chromatographie verändert. Im Neutralbereich sollten sich laut Theorie beide Spezies aufgrund der unterschiedlichen Ladung trennen, statt wie bei einer Trennung in einem TFA-System mit einem pH von circa 2-3 zu koeluiieren.

Die modifizierte HPLC-Trennung wurde mit 20 mM Ammoniumacetat bei neutralen Bedingungen durchgeführt. Abbildung 4.10. zeigt eine erfolgreiche Trennung der beiden Spezies am Beispiel des Spotpaares B and C von β_2 -Microglobulin:

Neben der erfolgreichen Trennung der fast basisliniengetrennten Peaks ist erkennbar, dass im Spot C das asparaginsäurehaltigen Peptid mit der Masse 1499.6 Dalton überwiegt, während in Spot B das asparaginhaltige und damit unveränderte Peptid einen deutlich höheren Anteil hat.

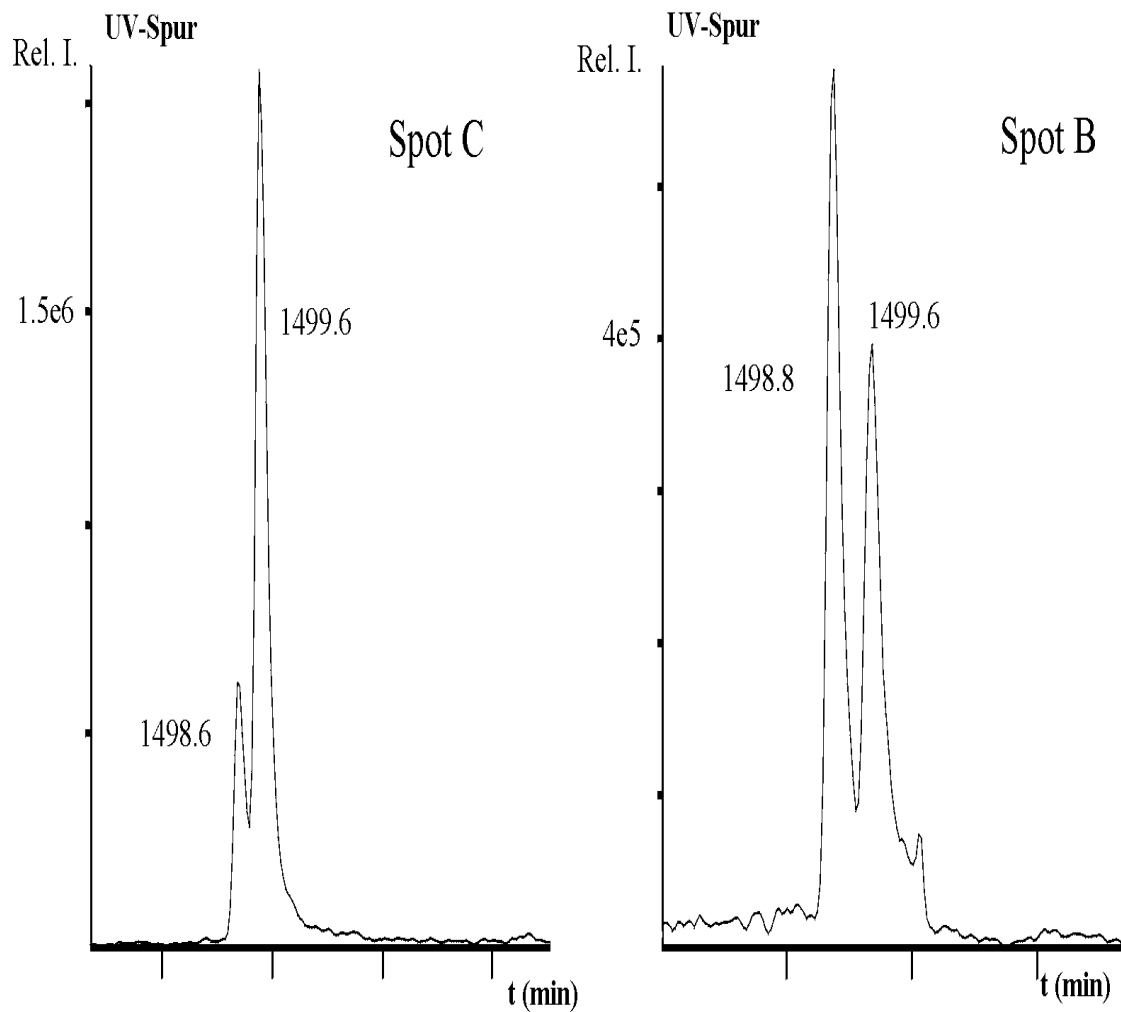


Abbildung 4.10: Auftrennung von asparagin -und asparaginsäurehaltigen Peptide der Spots B und C von β_2 -Microglobulin

Tabelle 4.3. zeigt einen Vergleich der Lys-C-Spaltfragmentmassen (M) für diese beiden Spots. Das Auftreten einer partiellen Deamidierung und damit beider Spezies sind jeweils fett hervorgehoben. Auf die Sequenzen wurde in der Tabelle verzichtet, da sie bereits in Tabelle 4.1. genannt wurden.

Insgesamt sind drei Deamidierungsstellen sichtbar, die in dem Protein entdeckt werden konnten, wobei das Peptid mit der Masse 845.45 Dalton nur in Spot B deamidiert gefunden wurde. Dies würde genau den Ladungsunterschied für den saureren Spot B ergeben, den man von den Banden in der IEF erwartet hatte. Zudem tritt ein Unterschied in den Anteilen an deamidierten Spezies auf (Abbildung 4.10).

M (theoretisch)	M (gemessen) Spot C	M (gemessen) Spot B
359.27	-	-
722.29	722.34	722.32
742.46	742.58	742.58
845.45	845.58	845.44/ 846.58
1148.56	1148.56	1148.60
1498.78	1498.69/ 1499.63	1498.96/ 1499.64
1964.97	1966.00/ 1965.03	1966.18/ 1965.02
2203.03	2203.01	2203.04
2602.27	2602.83	2602.75

Tabelle 4.4.: Vergleich der theoretischen und gemessenen Peptidmassen im Neutralpuffersystem für Spot B und C von β_2 -Microglobulin

Um die Auftrennung der zuvor koeluierten asparagin- und asparaginsäurehaltigen Peptide zu veranschaulichen, ist in der Abbildungen 4.11. erneut die HPLC-Auftrennung im Neutralpuffersystem gezeigt. An dieser Abbildung lassen sich die Vorteile der eingeführten Auftrennungen im Neutralpuffersystem darlegen. Die Natur der posttranslationalen Modifikation ist deutlich erkennbar, zudem sind auch das Auftreten einer partiellen Deamidierung, sowie quantitative Unterschiede zwischen den Spots aus den Spektren ablesbar. Mit Hilfe der UV-Spur kann auch der quantitative Unterschied zwischen den Spots einer Leiter abgeschätzt werden.

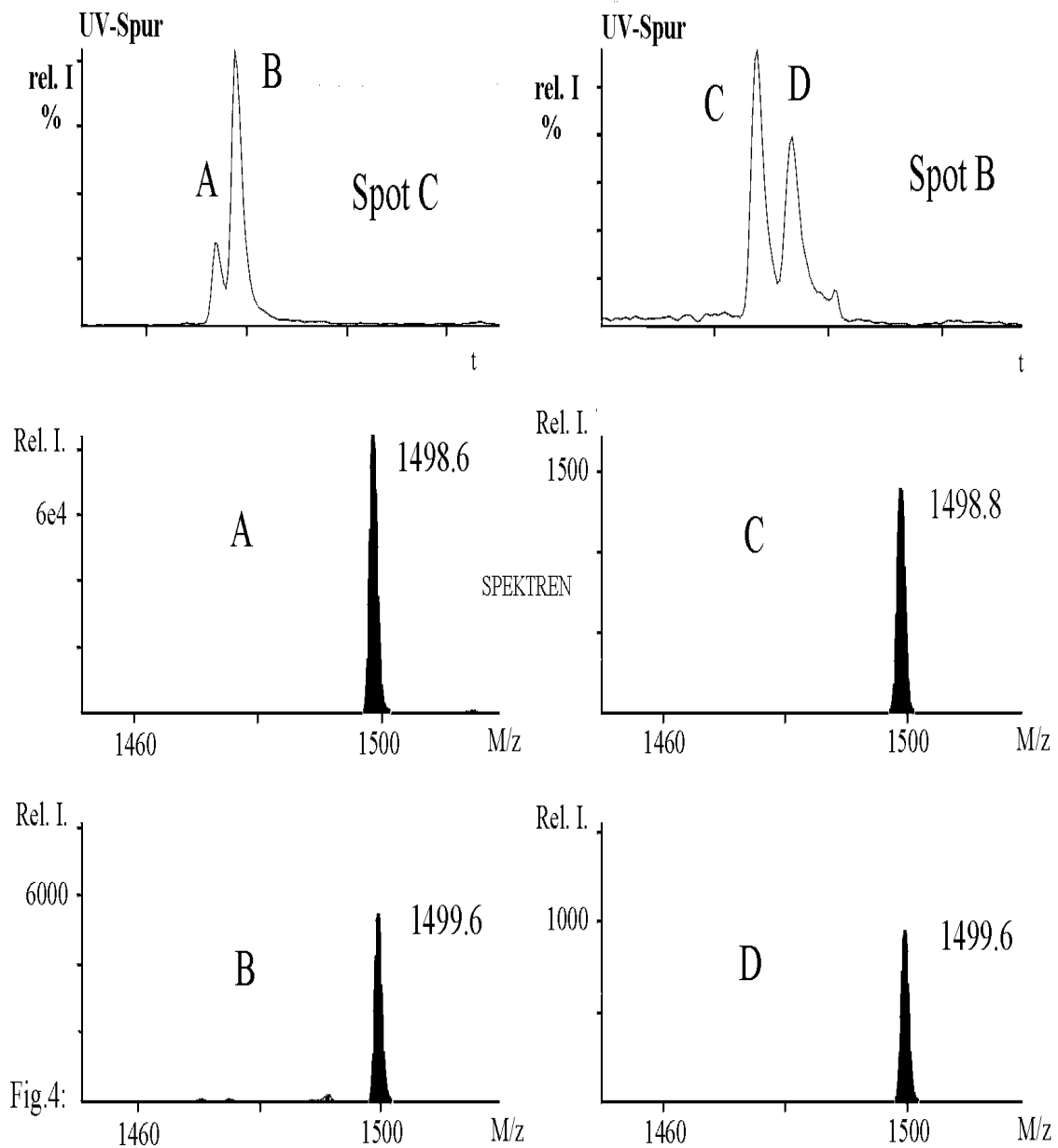


Abbildung 4.11.: Auftrennung asparagin - und asparaginsäurehaltiger Peptide im Neutralpuffersystem

Um ein klares Bild der Anteile von deamidierter Spezies zu erhalten, wurde anhand der UV-Spur das Verhältnis beider Spezies quantitativ abgeschätzt. Dies ist in Tabelle 4.3. zu sehen.

Massen	Intensitäten (Spot B)	Intensitäten (Spot C)
845.6/ 846.6	1:1	kein 846.6!
1498.6/1499.6	1:1	15:1
1965/1966	5:1	35:1

Tabelle 4.5.: Quantitative Abschätzung der Mengenverhältnisse beider Spezies für Spot B und C von β_2 -Microglobulin aus den jeweiligen UV-Spuren

Wie zu erwarten war, ist der Anteil an deamidierter Spezies und damit der Asparaginsäure in dem saureren Spot B deutlich höher. So ist bei dem basischeren Spot C für die Masse 845.6 gar keine deamidierte Form gefunden worden, ein Verhältnis kann daher nicht berechnet werden. Im Falle der α_2 -Haptoglobulin-Kette wurden ebenfalls deamidierte Peptide mit den Massen 1580.8 Dalton und 1708.9 gefunden. Wie später in Kapitel 5.1 aufgezeigt wird, stimmt dies mit der durch die Primärstruktur gewonnenen Einschätzung überein, dass es sich dabei um leicht zu deamidierende Peptide handelt.

4.5.2 Vergleich der Proteinpattern bei chemischen und enzymatischen Deamidierungsversuchen

Um mehr über die Natur der hier gefundenen Deamidierungen zu erfahren, sollte im Rahmen der Arbeit der Einfluß von künstlich herbeigeführten Deamidierungen getestet werden.

Proteinproben wurden sowohl chemisch als auch enzymatisch unter physiologischen Bedingungen bei 37°C deamidiert. Die Proben wurden anschließend mit den gängigen Endopeptidasen verdaut und mittels LC-MS im zuvor etablierten Neutralpuffersystem analysiert.

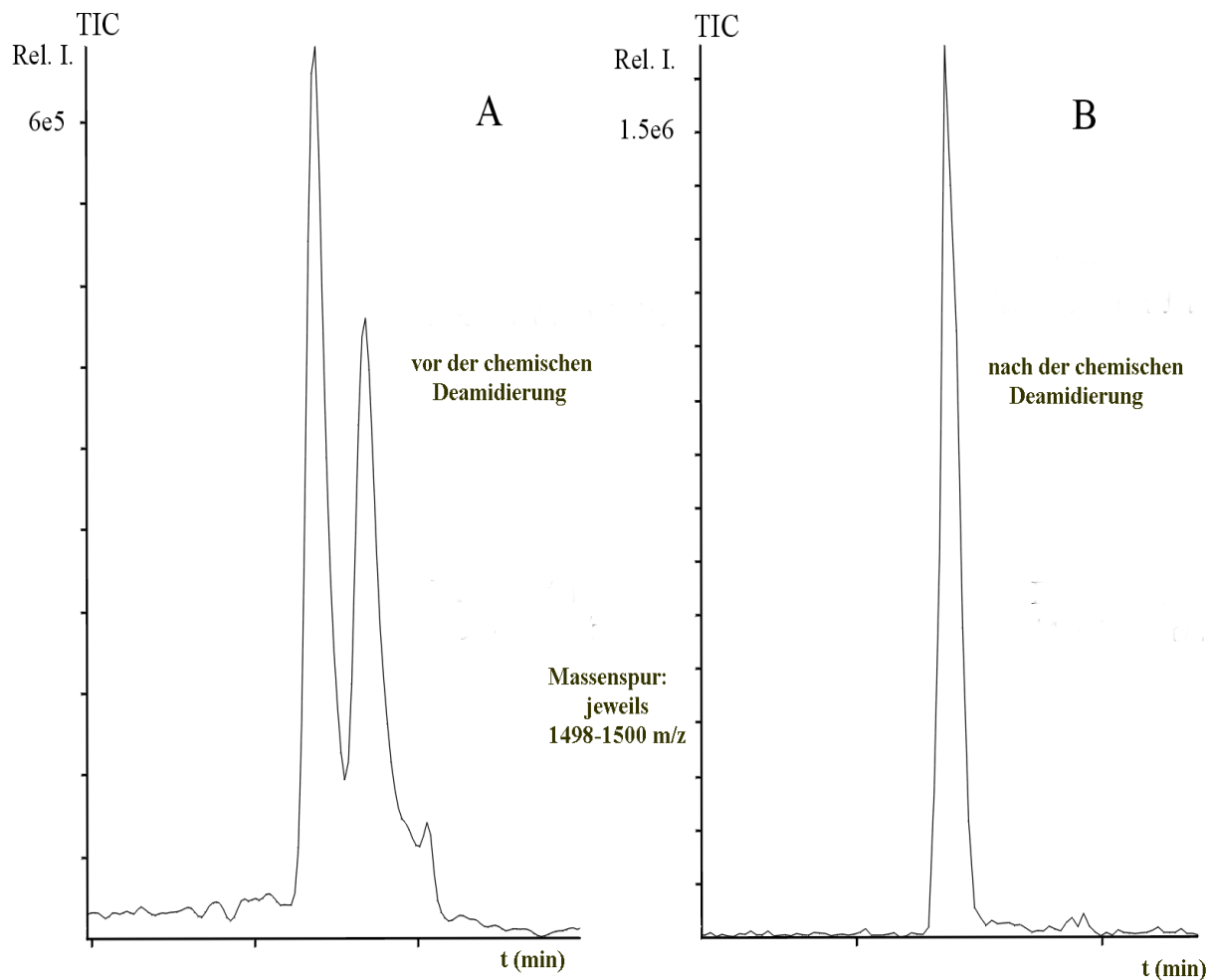


Abbildung 4.12.: Komplette Verschiebung des Anteils an Asparaginsäuren nach chemischer Deamidierung mit 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer für 48 h bei 37° C für Spot B von β_2 -Microglobulin

Die Ergebnisse der chemischen Deamidierung im Falle des β_2 -Microglobulin sind in der nachfolgenden Tabelle zu sehen:

Von den potentiellen vier Peptiden mit einem „labilen“ Asparagin sind drei vollständig zur Asparaginsäure deamidiert worden. Einzig im Fall des Peptids Nr. 7 mit der Masse 1964.97 liegen bei allen drei Spots beide Spezies nebeneinander vor. Dies kann durch die Primärstruktur „VNH“ erklärt werden, die einer Deamidierungsreaktion schwer zugänglich sein sollte.

Spot B				
Fragment #	(M+H) ⁺	(M+2H) ²⁺	(M+3H) ³⁺	Gefundene Massen
8	359.3			359.2
9	722.3			722.4
1	742.5			742.6
4	845.5			846.6
5	1148.6	574.8		1148.6
2	1498.8	749.9		1499.8
7	1965.0	983.0	655.7	1965.4/1966.0
6	2203.0	1102.0	735.0	2203.2(R)/1102.4
3	2602.3	1301.6	868.1	2602.8 (R)/868.8/1302.4
Spot C				
Fragment #	(M+H) ⁺	(M+2H) ²⁺	(M+3H) ³⁺	Gefundene Massen
8	359.3			359.2
9	722.3			722.4
1	742.5			742.6
4	845.5			846.6
5	1148.6	574.8		1148.6
2	1498.8	749.9		1499.8
7	1965.0	983.0	655.7	1965.2/1966.2
6	2203.0	1102.0	735.0	2203.2(R)/1102.6
3	2602.3	1301.6	868.1	2602.8 (R)/868.6/1302.4
Spot A				
Fragment #	(M+H) ⁺	(M+2H) ²⁺	(M+3H) ³⁺	Gefundene Massen
8	359.3			359.2
9	722.3			722.4
1	742.5			742.6
4	845.5			846.6
5	1148.6	574.8		1148.8
2	1498.8	749.9		1499.8
7	1965.0	983.0	655.7	1966.0/1965.4
6	2203.0	1102.0	735.0	2203.2(R)/1102.8
3	2602.3	1301.6	868.1	2602.8 (R)/868.6/1302.4

Tabelle 4.6.: Erhaltene Spaltpeptidmassen nach chemischer Deamidierung und anschließendem Verdau mit Lys-C für die Spots A, B, C von β_2 -Microglobulin

Einen quantitativen Unterschied im Deamidierungsgrad zwischen den drei Spezies kann es nicht mehr geben. Bei einer vollständigen Verschiebung zur komplett deamidierten Form tritt kein Unterschied mehr zwischen den drei Spots auf. Das nicht vollständig deamidierte Peptid mit der Masse von 1965 Dalton brachte ebenfalls keine deutlichen Unterschiede. Vergleichbare Ergebnisse für chemische Deamidierungs-

reaktionen erzielte Hsu 1998. Auch hier verschob sich das Pattern fast vollständig zu den sauren Spots hin.

Keine Unterschiede im Verhältnis unveränderter und deamidierter Peptide im Vergleich zu den Peptidpaaren bei der chemischen Deamidierung brachten die parallel durchgeführten Versuche mit enzymatischen Deamidierungen: Die Ergebnisse enzymatischer Deamidierungen mit der Deamidase Asparaginase der Firma Sigma stimmten mit denen der chemischen Deamidierung überein, es kam auch dort zu einer vollständigen Deamidierung der labilen Asparagine.

4.5.3 Vergleich der Proteinpattern von rekombinanten und gepoolten Proteinproben anhand des β_2 -Microglobulin

Nach den zuvor gewonnenen Erkenntnissen über das Auftreten chemischer Deamidierungen war dennoch die Frage nicht vollständig geklärt, warum die Leiterbildung und die erhaltenen Spotpattern reproduzierbar sind. Selbst beim Kauf gepoolter Proteinproben, so z.B. des β -Microglobulins, kommt es stets zu einem identischen Spotmuster in der 2D-Gelelektrophorese, was einem identischen Deamidierungsgrad entspricht. Zudem war auch durch eine umfangreiche Literaturrecherche nicht zu klären, wann die Modifikation auftritt.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde ein neuer Ansatz gewählt: Die rekombinante Herstellung eines der zuvor untersuchten Proteine. Um das erhaltene Spotmuster mit den vorher erhaltenen zu vergleichen wurde das β -Microglobulin ausgewählt. Zunächst war zu klären, ob bei einem rekombinant hergestellten Protein ein völlig unmodifizierter Spot auftritt.

Falls ja, könnte man diesen nicht deamidierten Spot unter physiologischen Bedingungen anschließend denselben Deamidierungsversuchen wie im vorherigen Kapitel unterwerfen, um den zunehmenden Deamidierungsgrad auch quantitativ zu beobachten.

Das konkrete Klonierungsprojekt ist schematisch in Abbildung 4.14 dargestellt und ging von einer cDNA-Bibliothek Mensch (Gehirn) aus. Anhand der bekannten

Nukletidsequenz des β -Microglobulins (Gussow 1987, Ono 1993) wurden Primer in Auftrag gegeben, um das β -Microglobulin-Gen in der cDNA-Bibliothek erkennen zu können.

Die verwendeten Primer sahen folgendermaßen aus:

Microglobulin FOR 32mer-Seq: GGG GGA TCC ATG TCT CGC TCC GTG GCC TTA GC und

Microglobulin REV 28 mer-Seq: GGG TCT AGA TTA CAT GTC TCG ATC CCA C

Die Klonierung inklusive der Aufreinigung des 6xHis Tag Proteins wurde nach dem Handbuch der Firma Qiagen „The QIAexpressionist“ durchgeführt und der verwendete Vektor pQE30 der Firma Qiagen ist in Abbildung 4.13 zu sehen.

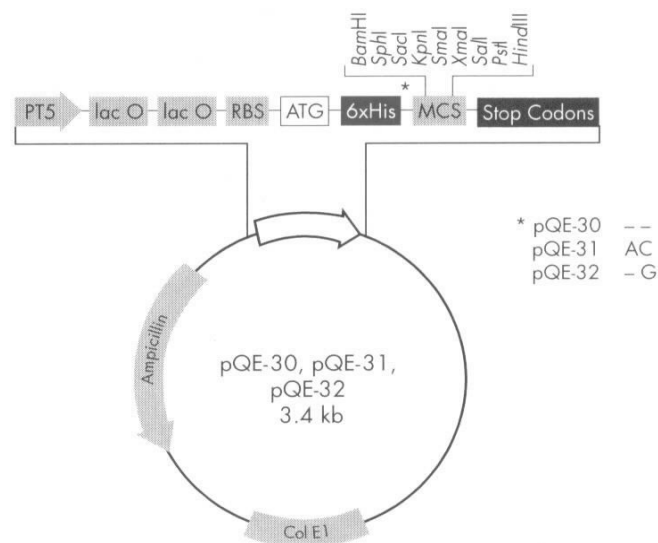
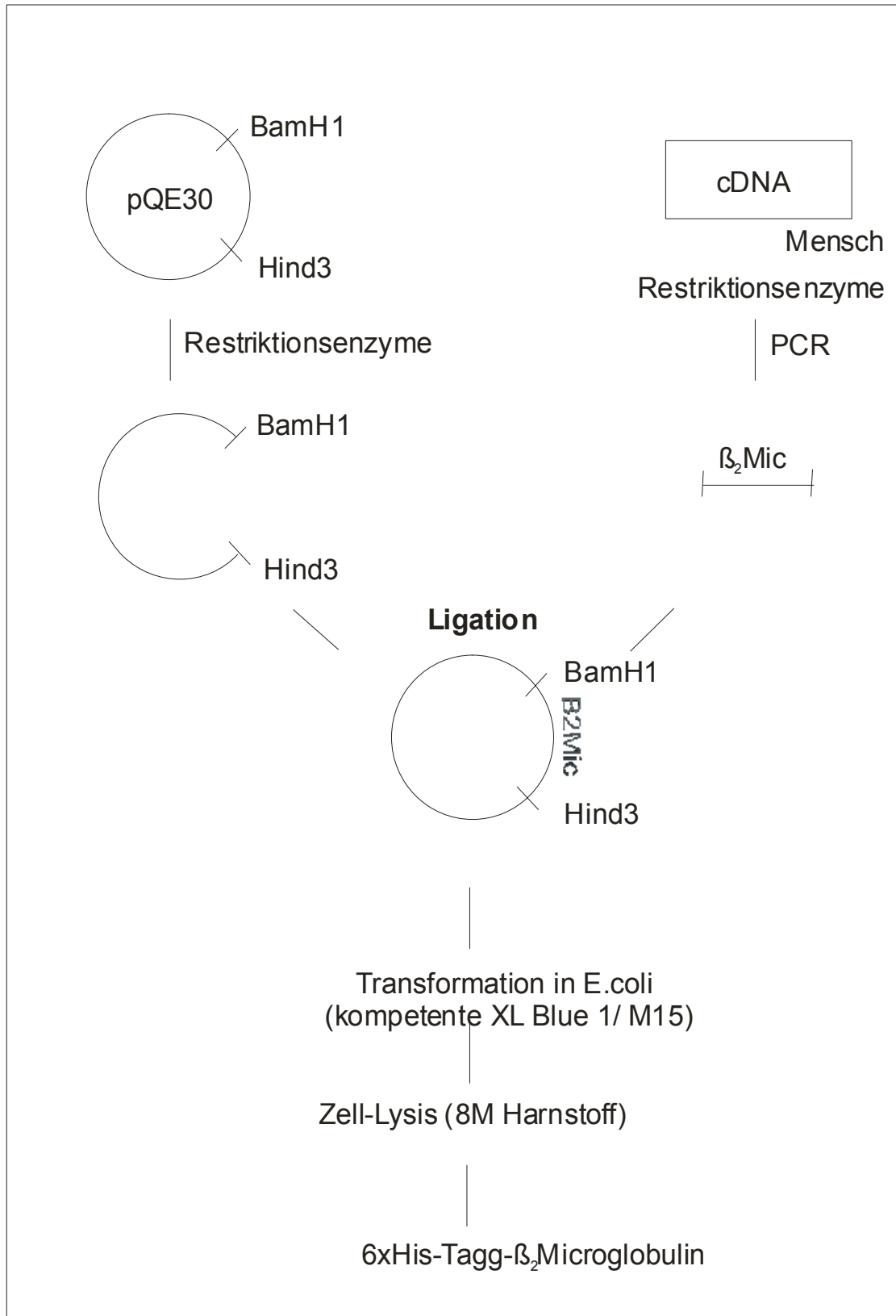


Abbildung 4.13.: Für die Klonierung verwendeter 6x His-Tag-Vektor pQE30

Abbildung 4.14: Strategie zur Klonierung des β_2 -Microglobulins aus *E. coli*

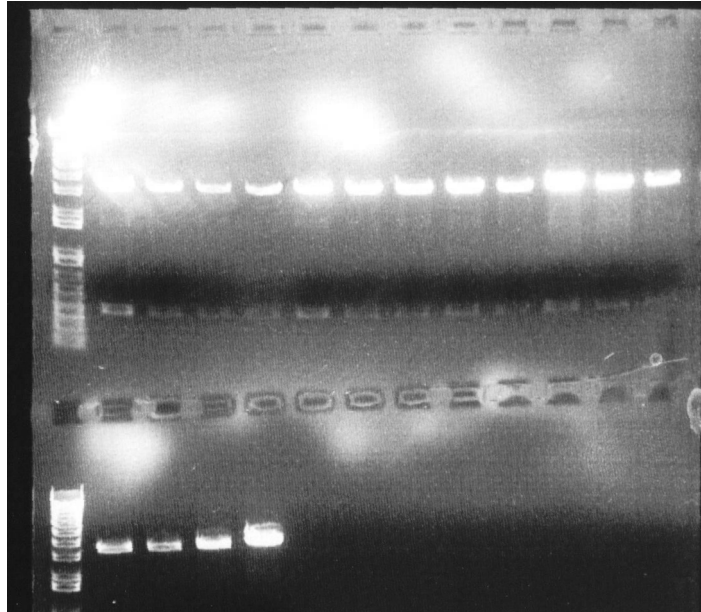


Abbildung 4.15.: Agarosegel eines Mini-„Präp“-Ansatzes, der mittels Sequenzierung auf eine erfolgreiche Klonierung überprüft wurde

Die Sequenzierung ergab eine mehr als 99%ige Übereinstimmung mit dem β_2 -Microglobulin-Gen, so dass anschließend das Protein exprimiert, 2D-Gele angefertigt und mit dem kommerziell erhältlichen Proteinspotmuster verglichen wurden. Um einen Vergleich der beiden Gele zu erleichtern, wurden die drei Spots des β_2 -Microglobulin in der nachfolgenden Abbildung leicht hervorgehoben. Man erhält ein identisches Spotmuster mit den Hauptspots A, B und C im Vergleich zu den natürlich gewonnenen Proben. Durch Übereinanderlegen der Gele und Identifizierung mittels Massenspektrometrie konnte eine völlige Übereinstimmung der drei Spots aus gepooltem Material und rekombinant hergestelltem Protein analysiert werden.

Die Modifikation wurde demnach entweder *in vitro* durch die Probenbehandlung eingeführt oder fand *in vivo* im Rahmen einer natürlichen Alterungsreaktion statt. Aufgrund der Labilität der vorliegenden Asparagine könnte dies sehr schnell ablaufen. In der Literatur sind Halbwertszeiten für Deamidierungen von wenigen Minuten bis hin zu Jahrzehnten bekannt (Robinson 1991).

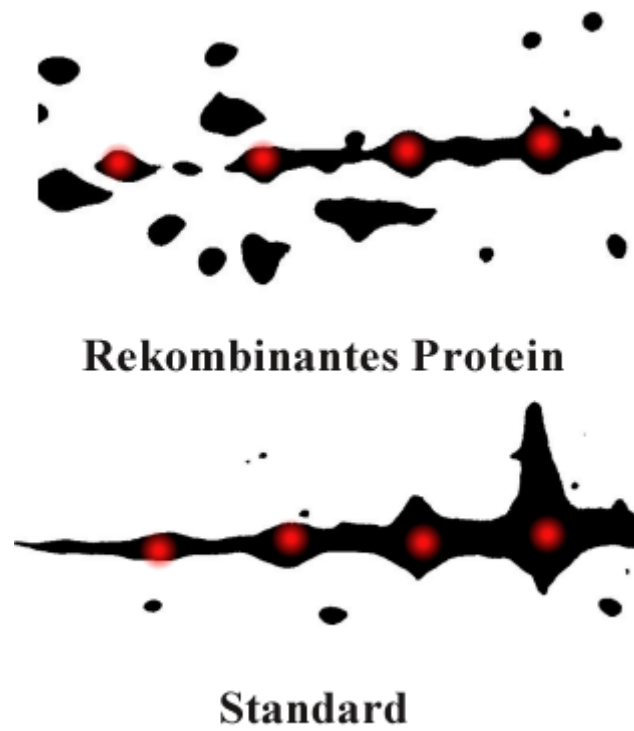


Abbildung 4.16: Vergleich des Spotpatterns aus dem 2D-Gel für rekombinantes und gepooltes β_2 -Microglobulin

5. Diskussion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Ausbildung von Isoformen in einer sogenannten Leiter („trains of spots“) in einem 2D-Gel. Dafür kamen nur posttranslationale Modifikationen in Frage, die sowohl zu einer Änderung der Ladung als auch der Größe der Proteine führen. Dies gilt für eine Vielzahl an bekannten Modifikationen mit einer zumeist deutlichen Änderung der Proteinmasse. Für die beiden Proteine α_2 -Haptoglobin und β_2 -Microglobulin wurden eindeutig Deamidierungen der Asparagine zu Asparaginsäuren als Ursache für die Änderung des isoelektrischen Punktes und damit einer Aufspaltung in Leitern zugeordnet. Nach einer ausführlichen Literaturrecherche und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann man Deamidierungen als ubiquitäres Phänomen in der biologischen Welt betrachten, das als eines der Hauptfaktoren für das Vorhandensein von Mikroheterogenitäten in Peptiden und Proteinen gelten muss. Da posttranslationale Modifikationen weitreichende biologische Konsequenzen haben können, sollen noch einmal wichtige Eigenschaften der ausführlich untersuchten Deamidierungen sowie biologische Beispiele aufgezeigt werden. Anschließend werden auf der Grundlage dieser Informationen die Ergebnisse diskutiert.

5.1 Strukturelle Aspekte der Deamidierungsreaktionen

Wie im Theorieteil bereits erläutert wird nicht automatisch jedes Asparagin und Glutamin zu seiner entsprechenden Säure deamidiert. Wann und zu welchem Anteil sie deamidiert werden, hängt von einer Reihe von Parametern ab: dem Einfluß der benachbarten Aminosäuren, sowie den Reaktionsparametern wie pH, Temperatur oder auch Ionenstärke. Dies ist mit einer Vielzahl von Studien belegt worden (Robinson 1991, Tyler-Cross 1991), auf die anschließend noch näher eingegangen wird.

Laut Literatur ist der Reaktionsmechanismus der in vivo gefundenen Deamidierungen fast ausschliesslich der einer chemischen Deamidierung. Wie im Theorieteil erläutert, gibt es zwar eine Vielzahl von mehr oder weniger spezifischen Enzymen, jedoch konnte mit dem Nachweis der für eine chemische Deamidierungsreaktion typischen

Reaktionszwischenprodukte der enzymatische Mechanismus ausgeschlossen werden. Zum leichteren Verständnis soll der chemische Reaktionsmechanismus noch einmal dargestellt werden.

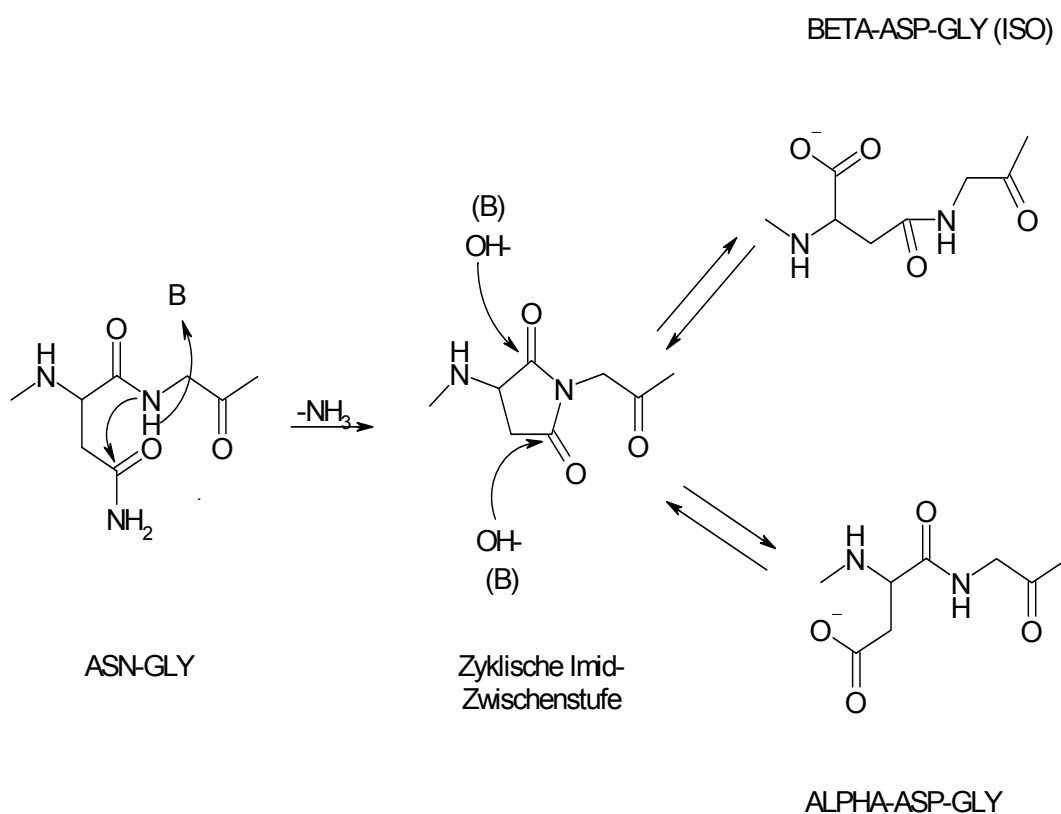


Abbildung 5.1: Reaktionsmechanismus der chemischen Deamidierung

Bei der chemischen Deamidierung handelt es sich wie in der obigen Abbildung gezeigt um einen β -aspartyl-“Shift“-Mechanismus. Zunächst findet ein nucleophiler Angriff auf das Asparagin statt, aus dem eine Succinimid-Zwischenstufe resultiert. Der Succinimidring zerfällt anschließend in zwei mögliche Isomere, einem α - und einem β -Peptid in einem Verhältnis von 1:3. Sowohl die Zwischenstufe als auch beide Isomere konnten isoliert und nachgewiesen werden (Thannhauser 1985, Meinwald 1986). Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt kann die Deamidierungsreaktion (inklusive der beiden Teilschritte) sowohl durch Basen als auch durch Säure katalysiert werden.

Interessanterweise ist dabei der Deamidierungsgrad für Glutamine um einen Faktor 10 geringer als der für Asparagine. Grundlage für diese Abschätzung sind statistische

Auswertungen von knapp 1500 Peptiden mit fast 500 000 Aminosäuren, die eine deutlich höhere Instabilität der Asparagine gegenüber den Glutaminen zeigten (Robinson 1991). Eine Erklärung für dieses Phänomen liegt in der sterischen Einschränkung des Glutaminringes mit sechs Atomen bei der zyklischen Succinimid-Zwischenstufe gegenüber einem Fünfering beim Asparagin. An den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen wurden keine Deamidierungen der Glutamine nachgewiesen, was mit der aufgestellten Theorie übereinstimmt.

Von wesentlicher Bedeutung für das Auftreten von Deamidierungen an Asparaginen sind sowohl die benachbarten Aminosäuren als auch die Konformation des Peptides oder des Proteins. Der Einfluß der Umgebung wurde anhand einer großen Anzahl von synthetischen Pentapeptiden untersucht (Robinson 1974). In der nachfolgenden Abbildung 5.2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Die Liste enthält die Aminosäuren vor (linke Hälfte) und nach (rechte Hälfte) einem Asparagin aufgelistet. Auf der Basis der Untersuchungen von Deamidierungsreaktionen an kleinen synthetischen Peptiden ist die natürliche Häufigkeit einzelner Aminosäuren (gestrichelte Balken) der Häufigkeit der Aminosäuren, die deamidiert wurden gegenübergestellt (schwarze Balken).

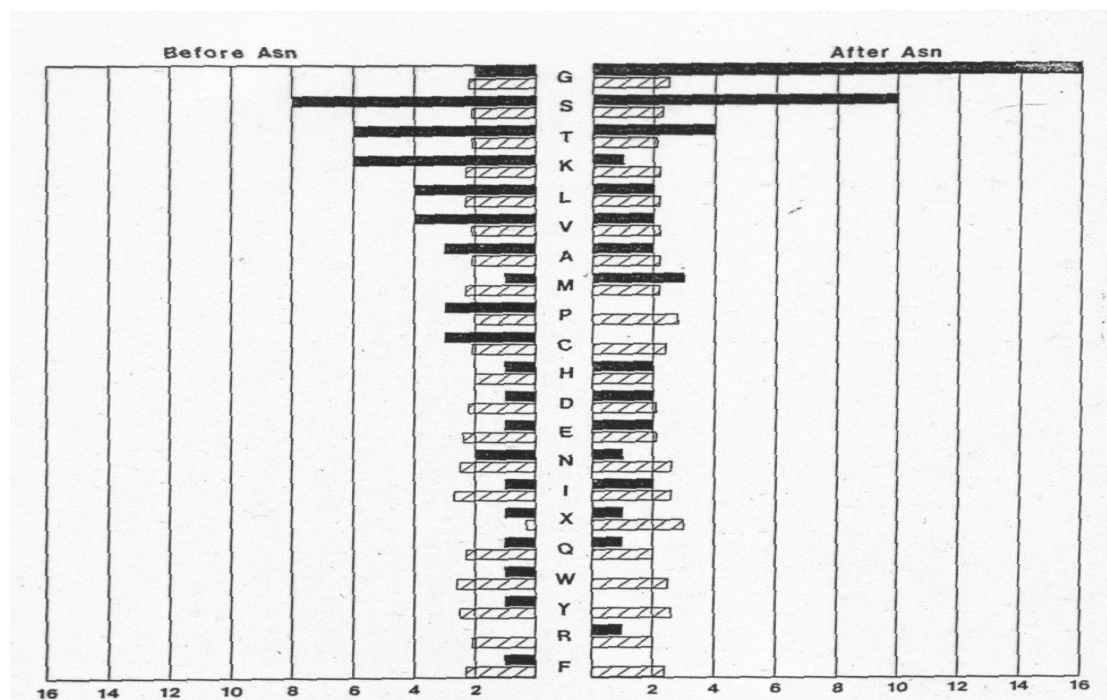


Abbildung 5.2: Häufigkeit von Deamidierungsreaktionen in Abhängigkeit der Primärstruktur (Wright 1991)

Wie aus der Abbildung erkennbar, ist vor allem die leichte Zugänglichkeit zu der Asparagingruppe das entscheidende Kriterium. Dabei haben kleine, polare Aminosäuren wie Glycin und Serin einen deutlich destabilisierenden Effekt. Ausladende, hydrophobe Aminosäuren wie z.B. ein Prolin oder ein Tryptophan haben dagegen eher eine Art Schutzfunktion. Wendet man diese Erkenntnisse auf die untersuchten Proteine an, so zeigt sich für das β_2 -Microglobulin eine deutliche Übereinstimmung mit den gefundenen Deamidierungsstellen. Tabelle 5.1 zeigt die benachbarten Sequenzen zu den Asparaginen im Falle des β_2 -Microglobulin und des α_2 -Haptoglobin:

Nummer	β_2 -Microglobulin	α_2 -Haptoglobin
1	E N G	G N D
2	S N F	K N Y
3	L N C	L N D
4	K N G	I N K
5	V N H	K N Y
6		L N N
7		N N E
8		I N K
9		K N P
10		A N P

Tabelle 5.1: Primärsequenz der untersuchten Proteine

Als labile Asparaginsequenzen wurden die Aminosäurenpaare **NG/ SN/ NS/ TN/ NT/ KN/ LN/ VN** aus den schon zuvor besprochenen Literaturstellen (Wright 1991, Robinson 1974) übernommen. Die zutreffenden labilen Asparagine sind fett hervorgehoben.

Das β_2 -Microglobulin besitzt insgesamt fünf potentielle Deamidierungsstellen, von denen die drei Peptide mit einem Glycin und Serin (Nummer 1, 2, 4) in direkter Nachbarschaft ("labile" Asparagine) zum Asparagin deamidiert wurden. Im Falle des α_2 -Haptoglobin wurden zwei Peptide und drei Asparaginsequenzen gefunden, die

deamidiert wurden. Von diesen drei Sequenzen (Nummer 3, 6, 7) sind zwei als labil einzustufen. Von sechs gefundenen Deamidierungsstellen in beiden Proteinen sind nach dieser aus experimentellen Befunden abgeleiteten Richtlinie fünf labile Asparagine. Zudem ist festzuhalten, dass acht Sequenzen als labil vorausgesagt wurden und fünf tatsächlich deamidiert worden sind. Diese Zahlen zeigen eine gute Übereinstimmung der Resultate mit der aufgestellten Faustregel. Somit scheint eine Vorhersage, ob eine Deamidierung stattfindet oder nicht mit dieser Regel gut möglich. Die Primärsequenz der Peptide oder Proteine ist demzufolge ein wichtiges Kriterium, ob eine Deamidierung an einem bestimmten Asparagin stattfindet.

Die Sekundär- und Tertiärstrukturen sind ebenfalls von entscheidender Bedeutung dafür, ob ein Asparagin für eine Deamidierungsreaktion räumlich zugänglich ist oder nicht.

Zu welchem Zeitpunkt die Deamidierungsreaktion auftritt und was die Ursachen sind, ist damit jedoch nicht geklärt. Aufgrund der Natur der chemischen Deamidierung muss man prinzipiell zwischen *in vitro* und *in vivo* Deamidierung unterscheiden. Ersterer wird sozusagen künstlich im Labor während der Isolierung, Reinigung sowie der Lagerung der Proteine unbeabsichtigt herbeigeführt. Die *in vivo* Deamidierung dagegen hat einen biologischen Hintergrund, und findet unabhängig von einer Behandlung der Proteine im Labor statt. Hierfür gibt es in der Literatur verschiedene Erklärungsansätze, die von der Funktion als biologische Uhr (Robinson 1991) bis hin zu einer Proteindegradation (Rogers 1988), das heißt einem Alterungsprozess reichen. Dies soll anschließend anhand einiger biologischer Beispiele aus der Literatur erläutert werden.

Bei sämtlichen Beispielen ist der Zeitpunkt des Reaktionsbeginns, die Dauer und die Vollständigkeit der Reaktion von großem Interesse. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit ein Ansatz gefunden werden, mit dem man den Zeitpunkt der Deamidierung bestimmen kann. Um eine Aussage über diesen Zeitpunkt treffen zu können, wurde eines der untersuchten Proteine rekombinant hergestellt. Dies stellte zudem einen methodisch neuen Themenkomplex in dieser Arbeit dar. Durch einen Vergleich zwischen „gealtertem“ gepoolten und aufgereinigtem Protein und exprimiertem rekombinanten Protein sollten mögliche Unterschiede im Deamidierungsgrad bestimmt werden. Die Interpretation des Ergebnisses scheint einfach klar: Es konnten

keine Unterschiede im Deamidierungsgrad der Proteine festgestellt werden. Wie im Ergebnissteil gezeigt, waren die hergestellten 2D-Gele in ihrem Pattern der Aufspaltung in die einzelnen Isoformen identisch. Eine Aussage zum Zeitpunkt des Auftretens der posttranslationalen Modifikation an dem rekombinanten Protein ist damit zunächst nicht möglich. Es stellt sich die Frage, ob das β_2 -Microglobulin aufgrund seiner Primärstruktur sehr schnell deamidiert und das bekannte Spotpattern kurz nach der Expressierung angelegt wird, oder ob das Pattern künstlich in vitro durch die Probenvorbereitung bzw. durch einen der vielen Behandlungsschritte verursacht wurde. Zur detaillierten Diskussion dieser Fragestellung sollen im folgenden Beispiele für die beiden Arten einer chemischen Deamidierung gezeigt werden. Auf die enzymatische Deamidierung wird aufgrund der zuvor dargelegten experimentellen Befunde nicht weiter eingegangen, da sie für die in der Arbeit aufgetretenen Deamidierungen als Ursache ausscheidet.

5.2 In vitro Deamidierung von Proteinen

Die chemische Deamidierungsreaktion, die mit einem nucleophilen Angriff auf das Asparagin beginnt, findet leicht unter milden Bedingungen, wie einem physiologischen pH und bei 37°C statt. Wie in der vorliegenden Arbeit anhand chemischer Deamidierungsversuche bei 37°C in einem 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer für 48 h gezeigt, steigt dabei der Deamidierungsgrad signifikant an. Es kommt zu einer deutlichen Verschiebung des Spotmusters und einige Peptide, die zu Beginn des Experimentes nur zum Teil deamidiert waren, wurden vollständig zur Asparaginsäure umgewandelt. Dieser Effekt nahm nach noch längeren Verweildauern (bis zu mehreren Wochen) in der oben genannten Lösung weiter zu.

Ähnliche Ergebnisse finden sich auch in der Literatur. Für das menschliche rt-PA (recombinant Tissue Plasminogen Activator) wurden von Paranandi (1994) ebenfalls Deamidierungsstellen nach Inkubation in gepufferten Lösungen gefunden. Er erhielt unter ähnlichen Bedingungen (pH= 7.3, 37°C, t= 14 Tage) 77% mehr an Deamidierungsprodukten als vor der Behandlung. Für die Proteine rhGH (recombinant human Growth Hormon) und Calmodulin konnten vergleichbare Ergebnisse und

Verschiebungen hin zu den Deamidierungsprodukten vom gleichen Labor bestätigt werden. Hsu (1998) untersuchte den menschlichen Stammzellenfaktor rhSCF (recombinant human stem cell factor) und fand nach längerer Lagerung eine Abnahme der biologischen Aktivität um den Faktor 50 gegenüber dem „frischen“ Protein.

5.3 In vivo Deamidierung von Proteinen

Wie zuvor bereits erläutert, ist eine Unterscheidung zwischen in vitro und in vivo Deamidierung schwierig. Daher ist es wichtig, geeignete Modellsysteme auszuwählen, an denen solche Veränderung gut zu untersuchen sind.

Ein solches Modellsystem sind die Proteine der Augenlinsen, die sehr gut untersucht sind, und im Vergleich zu anderen Proteinen nur sehr langsam altern. Eines der wichtigsten Proteine in diesem Proteinkomplex ist das α -Kristallin. Die beiden Untereinheiten des α -Kristallins, α A und α B-Ketten werden beide als Folge der Alterung des Proteins (Groenen 1994) deamidiert. Schey (2000) untersuchte Linsen unterschiedlichen Alters und fand heraus, dass zwei spezielle Asparaginstellen nach sieben Jahren komplett deamidiert vorlagen.

Deamidierungen und die Bildung eines Isoaspartatproduktes könnten auch eine Rolle bei der Alzheimer Krankheit spielen (Lindner 1999). Bei der Alzheimer Krankheit kommt es zu einem Verlust einer ausgewählten Population von Neuronen, während sogenannte „PHFs“ (paired helical Filament) gebildet werden, zu denen auch das Tau-Protein (microtubule associated) gezählt wird. Durch eine Deamidierung einer spezifischen Domäne des Tauproteins, das zwei Asparagine enthält kommt es zu einer deutlichen Änderung in der Konformation des Proteins. Erst dadurch, so glaubt man, kann sich das Tau-Protein durch eine Dimerisierung bzw. Trimerisierung in die PHFs umwandeln. Neuere Forschungsergebnisse scheinen auch eine enge Verbindung zwischen in vivo Deamidierungen und Prionerkrankungen (Sandheimer 1999, Qin 2000) zu zeigen. Es wird diskutiert, ob eine Deamidierungsreaktion für die Umwandlung des zellulären Prionproteins (PrP^c) in die infektiöse Scrapieform (PrP^{Sc}) verantwortlich ist. Für die Bildung der infektiösen Form ist eine Änderung der Konformation verantwortlich. Eine dafür wichtige Domäne liegt in der Nähe des N-Terminus des PrP^c . Untersuchungen an synthetischen Peptiden, die diese Region

nachbilden sollten, belegen, dass dort ein spezifisches Asparagin mit einer Halbwertszeit von wenigen Tagen sehr leicht deamidiert wird und damit die Änderung in der Konformation des PrP^c verursachen könnte. Auch an den Histonen H1^o, die eine Rolle bei der Organisation der DNA in Chromatinen spielen wurden Deamidierungen gefunden, die einen Verlust der Funktion bedeuten könnten (Helliger 1999).

All diesen Beispielen scheint die Bedeutung der Deamidierungsreaktion für eine Funktionalität der Proteine bzw. den Verlust einer Funktionalität gemein zu sein. Durch die Umwandlung des Asparagins in seine Säure wird nicht nur eine negative Ladung in das Protein eingeführt, es kommt darüber hinaus zu einer Änderung in der Primär-, oft auch in der Sekundär- und Tertiärstruktur. Dies hat Auswirkungen auf die biologische Aktivität und Funktionalität der Proteine. Der Begriff der molekularen Uhr (Robinson 2001) scheint demnach durchaus gerechtfertigt: die Deamidierungsreaktion stellt eine in vivo Kontrollinstanz dar, mit der die Lebensdauer eines Proteins kontrolliert werden kann. Ein Beispiel für eine solche molekulare Uhr wurde an dem Protein Cytochrom C gezeigt (Robinson 1974). Mit Hilfe von synthetischen Peptiden konnte eine sehr enge Verbindung der Proteinsequenz und der dreidimensionalen Struktur des Proteins mit der Deamidierung des Proteins und einem in vivo Abbau des Proteins aufgezeigt werden.

Dass eine Deamidierung auch umkehrbar sein kann und damit keine biologische Sackgasse sein muss, zeigt die Existenz eines Reparaturenzyms, der L-isoaspartyl-/D-Isoaspartyl Protein Methyltransferase (PIMT) (Clarke 1985, Lowenson 1988, Lowenson 1991, Devry 1999). Dabei handelt es sich um ein cytosolisches Enzym, das äußerst weit verbreitet ist und durch die Umwandlung einer Methylgruppe des S-Adenosyl-L-Methionin zur L-Isoasparaginsäure die Rückreaktion zu den ursprünglichen L-Asparaginen katalysiert. Ein Beispiel für eine solche Reparaturreaktion wurde für das HPr Phosphocarrier-Protein gezeigt (Brennan 1994). Durch eine Deamidierungsreaktion kam es zur Verringerung der Aktivität des Proteins. Inkubation mit dem Enzym führte zur vollständigen Wiederherstellung der Aktivität.

5.4 Modell einer partiellen Deamidierung zur Erklärung der erhaltenen Spotpattern im 2D-Gel

Deamidierungen gelten mittlerweile als ubiquitäres Phänomen, das deutlich häufiger auftritt, als bislang angenommen. Asparagin oder Glutamin werden dabei in Asparagin- und Glutaminsäure umgewandelt. Die Reaktion läuft jedoch bei einem Großteil der Deamidierungsstellen nur unvollständig ab und die beiden Aminosäuren werden demzufolge nur zu einem bestimmten Prozentsatz in Asparagin- und Glutaminsäure umgewandelt. Wie an unserem Modell gezeigt werden soll, kommt es zu einer partiellen Deamidierung:

Das gleichzeitige Vorhandensein deamidierter und unveränderter Spezies, wie es in der vorliegenden Arbeit anhand Untersuchungen in einem Neutralpuffersystem gezeigt wurde, kann nur durch ein Modell erklärt werden, das ein Gemisch von Proteinen unter einem Spot in einem 2D-Gel postuliert. Unter einem Spot liegen mehrere Proteinspezies mit der gleichen Anzahl an deamidierten Asparaginen und damit demselben pI-Wert. Sie unterscheiden sich dadurch, dass sich die deamidierten Asparagine an unterschiedlichen Positionen befinden. In der Abbildung 5.3 ist dies schematisch gezeigt. Unter den 2D-Gelspots liegen Proteinsequenzen, in denen die Positionen der Asparagine eingezeichnet wurden. Die Schattierungen um die Asparagine stellen eine Deamidierung zur Asparaginsäure dar.

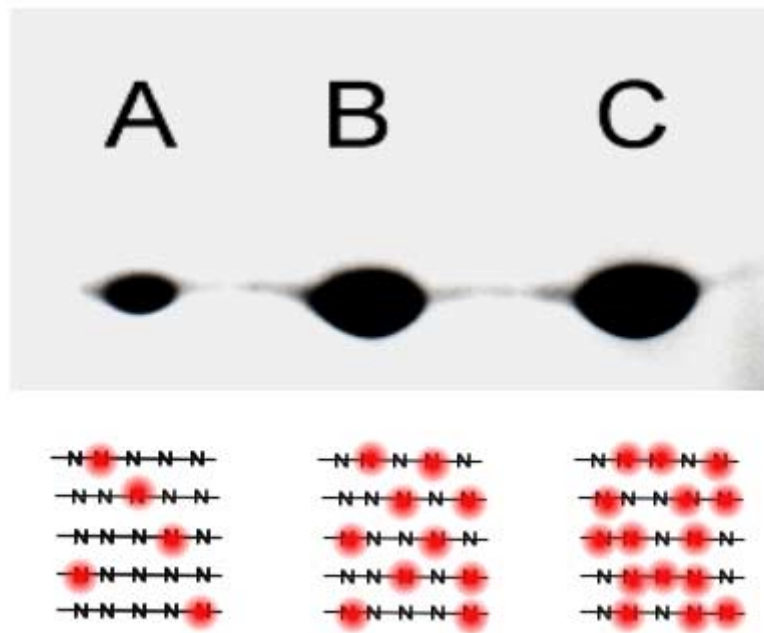


Abbildung 5.3: Modell zur Erklärung der Leiterbildung aufgrund von partieller Deamidierung

Wie aus Abbildung 5.3 zu entnehmen, liegen unter einem Spot verschiedene Proteinspezies, die dieselbe Anzahl an deamidierten Asparaginen in unterschiedlichen Positionen aufweisen. Die Proteine besitzen dieselbe Ladung und auch denselben pI-Wert. Wird nun ein solcher Spot enzymatisch verdaut, so erhält man Peptide, die in dem einen Fall deamidiert und im anderen Fall nicht deamidiert sind. Je nach Verhältnis der beiden Spezies ist dies im Spektrum zu sehen oder bleibt unter einem normalen Isotopenmuster verborgen. Die Leiterbildung kann nun durch einen Unterschied in der Anzahl an deamidierten Asparaginen benachbarter Spots erklärt werden. Dies ist an der Anzahl der Kreise unter einem Spot in der Abbildung abzulesen, sie reichen in dem gezeigten Beispiel von einer Deamidierungsstelle bis hin zu drei Deamidierungen. Benachbarte Spots unterscheiden sich nur um eine Deamidierungsstelle und damit differieren die Massen um genau eine Masseneinheit. Mittels FT-ICR-MS-Untersuchungen von β_2 -Microglobulin konnte das vorgestellte Modell bestätigt werden. Wie im Modell vorhergesagt, hatte beim Vergleich zweier benachbarter Spots der Spot mit dem höheren pKs-Wert auch eine um ein Dalton höhere Masse, da ein Asparagin mehr zur entsprechenden Säure deamidiert wurde.

5.5 Analytik der deamidierten Spezies

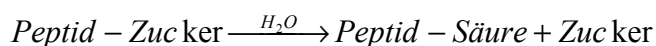
Wie in unserem Modell gezeigt, liegen asparagin- und asparaginsäurehaltige Peptide oder Proteine nebeneinander vor und müssen gleichzeitig analysiert werden, was sich als schwierig erweist.

Durch die Umwandlung in die Säure kommt es zwar zu einer Änderung der Ladung, jedoch nur zu einem Massenunterschied von 1 Dalton. Ein Grund für Schwierigkeiten in der Detektion liegt in der gängigen Analysestrategie in der Proteinchemie, bei der chromatographische Trennungen im stark sauren Milieu durchgeführt werden und es somit zu einer Koelution der unveränderten und deamidierten Peptide kommt. Geht man von einem MS-Spektrum aus, so sehen die koeluierten Peptide fast so aus wie ein unverändertes Peptid. Je nach Anteil der deamidierten Asparagine bleibt die Masse unverändert und es ändert sich lediglich das Isotopenmuster der koeluierten Peptide geringfügig. Wie in Kapitel 4 erläutert, tritt bei einem Peptid mit einer durchschnittlichen Größe von 1500 Dalton ein bekanntes Isotopenmuster auf, das sich aus dem natürlichen Verhältnis an ^{12}C - und ^{13}C -Atomen ergibt. Erst bei vollständiger Deamidierung kommt es zu einer Verschiebung der Peptidmasse um einen Dalton höher. Bei der partiellen Deamidierung verschiebt sich bei einer HPLC-Trennung im stark sauren Milieu dagegen das Isotopenmuster im Spektrum nur geringfügig. Daher war eine Optimierung der HPLC-Trennung erforderlich. Durch die Etablierung einer Trennung der asparagin- und asparaginsäurehaltigen Peptide in einem Neutralpuffersystem konnten die beinahe basisliniengetrennten Peptide erfolgreich analysiert werden.

Ein weiteres Problem stellen posttranslationale Modifikationen bei der Datenbankrecherche dar. Da der Trend zu größerem Probendurchsatz und zunehmender Automatisierung geht, werden die deamidierten Peptide bei der Analyse häufig übersehen. Bei hohem Deamidierungsgrad werden sie automatisch mit einer um 1 Dalton höheren Masse berücksichtigt und können nicht zur eigentlichen Proteinidentifizierung beitragen. Mittlerweile kann jedoch bei sämtlichen, gängigen Datenbanken eine Deamidierung als variable Modifikationsmöglichkeit eingegeben werden. Das Programm sucht automatisch nach den Massen der unveränderten und deamidierten Peptidmassen.

5.6 Deamidierung als ubiquitäres Phänomen

An dieser Stelle soll auf die untersuchten Proteine eingegangen werden, bei denen es nicht gelang, Deamidierungen nachzuweisen. Im Gegensatz zur α_2 -Kette des Haptoglobins konnten bei der β -Kette anhand der Isotopenmuster Deamidierungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auch bei den Neutralpufferansätzen gelangen keine Auftrennungen der beiden Spezies. Da aber auf der Zuckerkettenebene die in der Literatur genannten Unterschiede in der Zuckerstruktur (Anderson 1979) und damit der zuckerhaltigen Peptidmassen nicht gefunden wurden, war eine Bestimmung der Ursache der Leiterbildung nicht möglich. Wie im Ergebnisteil gezeigt, gab es drei zuckerhaltige Peptide, die bei sämtlichen untersuchten Spots dieselben Massen ergaben. Demzufolge ist festzuhalten, dass die einzelnen Proteinspots im 2D-Gel mit den vorhandenen analytischen Hilfsmitteln als identisch einzustufen sind und keine Ursachen für die Leiterbildung feststellbar waren. Dass es prinzipiell möglich ist, an der β -Kette des Haptoglobins Unterschiede in der Masse von einem Dalton zu detektieren, wurde an der deglykosylierten Kette gezeigt. Nach der Abspaltung der an den Asparaginen gebundenen Zucker wurde bei den Peptiden eine um 1 Dalton größere Masse als theoretisch erwartet gefunden. Dabei handelt es sich jedoch um keine chemische Deamidierung, vielmehr handelt es sich um eine Nebenreaktion der enzymatischen Deglykosylierungsreaktion bei der Reaktion des Proteins mit PNGaseF. Die Asparagine reagieren dabei zur Asparaginsäure, während die N-glykosidisch gebundenen Zucker abgespalten werden. Vereinfacht kann die chemische Reaktion wie folgt dargestellt werden:



Nicht bei allen untersuchten Proteinen konnten sämtliche Spots durch Deamidierungsreaktionen erklärt werden. Daher ist es interessant zu sehen, wieviele labile Asparagine als mögliche Ansatzpunkte für Deamidierungen in Proteinen in Frage kommen. Labile Asparagine sind vor allem solche Stellen im Protein, die durch benachbarte Aminosäuren schlecht abgeschirmt werden. In der Tabelle 5.2 wurden bekannte Blutplasmae Proteine, die eine große Anzahl an Spots im 2D-Gel zeigen auf

die bekannten Motive für labile Asparagine und mögliche Deamidierungen statistisch untersucht. Die Anzahl an Spots in den Leitern wurde aus 2D-Gelen menschlicher Plasmaproben bestimmt.

Als labile Asparaginsequenzen wurden die Aminosäurenpaare NG/ SN/ NS/ TN/ NT/ KN/ LN/ VN aus der Literatur (Wright 1991, Robinson 1974) übernommen.

Protein	MW (2D-SDS- PAGE)	Anzahl an labilen Asparaginen	Gesamt- anzahl an Asparaginen	Anzahl Spots im 2D- Gel	CHO
α 1-Anti- chymotrypsin	54-62kD	10	19	16	
α 1-Antitrypsin	49-53kD	11	19	9	+
α 1-Haptoglobin	11-12kD	2	7	3	
α 2-Haptoglobin	16kD	2	10	3-4	-
α 2-Macroglobulin	143-144kD	38	62	9	+
Apolipoprotein A1	20kD	4	5	4	+
Ceruloplasmin	103-123kD	27	53	10	+
α -Fibrinogen	62-66kD	21	45	11	
Hemopexin	63-69kD	8	14	10	
Plasminogen	96-97kD	20	40	9	+
β ₂ -Microglobulin	12kD	3	5	3-4	
β -Haptoglobin	35-39kD	2	11	12	+

Tabelle 5.2: Vergleich dominanter Blutplasmaproteine des Menschen anhand des Molekulargewichtes (MW), ihrer Anzahl an Spots im 2D-Gel und der Anzahl labiler Asparagine

Die Abkürzung CHO steht für Glykosylierungen, die in der Literatur häufig als Erklärung für das Auftreten einer Leiterbildung genannt werden. Der statistische

Anteil an Asparaginen unter den 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren liegt über verschiedene Spezies gemittelt im mittleren Bereich. Im Falle des Menschen gehören die Asparagine mit 3.58 % ebenfalls zu den durchschnittlich häufig vorkommenden Aminosäuren. In der obigen Tabelle variiert der Anteil an labilen Asparaginen stark, so beträgt er im Falle des Apolipoprotein A1 nur circa 6%, im Falle des α_2 -Macroglobulin knapp 31%. Um einen besseren Überblick zu schaffen, wurden die Werte für labile Asparagine und die Gesamtzahl an Asparaginen gegen die experimentell ermittelte Anzahl an Spots in einem 2D-Gel in Form eines Balkendiagramm dargestellt.

Wie man Abbildung 5.3 entnehmen kann ist der Verlauf der Anzahl an Asparaginen für die einzelnen Proteine sehr unterschiedlich. Es gibt Proteine, bei denen sich wie beim α_1 -Anti-Chymotrypsin die Anzahl der labilen Asparagine und der Spots in einer vergleichbaren Größenordnung befinden. Hier können, rein statistisch betrachtet, sowohl Deamidierungen ein Grund für das Spotpattern sein, als auch andere posttranslationale Modifikationen vorliegen, die zu einer Aufspaltung der Proteinspots führen. Eine weitere Gruppe sind Proteine, wie das α_2 -Macroglobulin, bei denen die Zahl an labilen Asparaginen deutlich größer ist als die Zahl der gefundenen Spots. Hier ist die Wahrscheinlichkeit für eine Deamidierungsreaktion sehr hoch. Interessant ist vor allem die β -Kette des Haptoglobin. Bei diesem Protein ist die Zahl an Spots im 2D-Gel weitaus höher als die Anzahl der labilen Asparagine. Eine andere posttranslationale Modifikation muss entweder alleine oder zusätzlich als Ursache für die Ausbildung der Leiter verantwortlich sein.

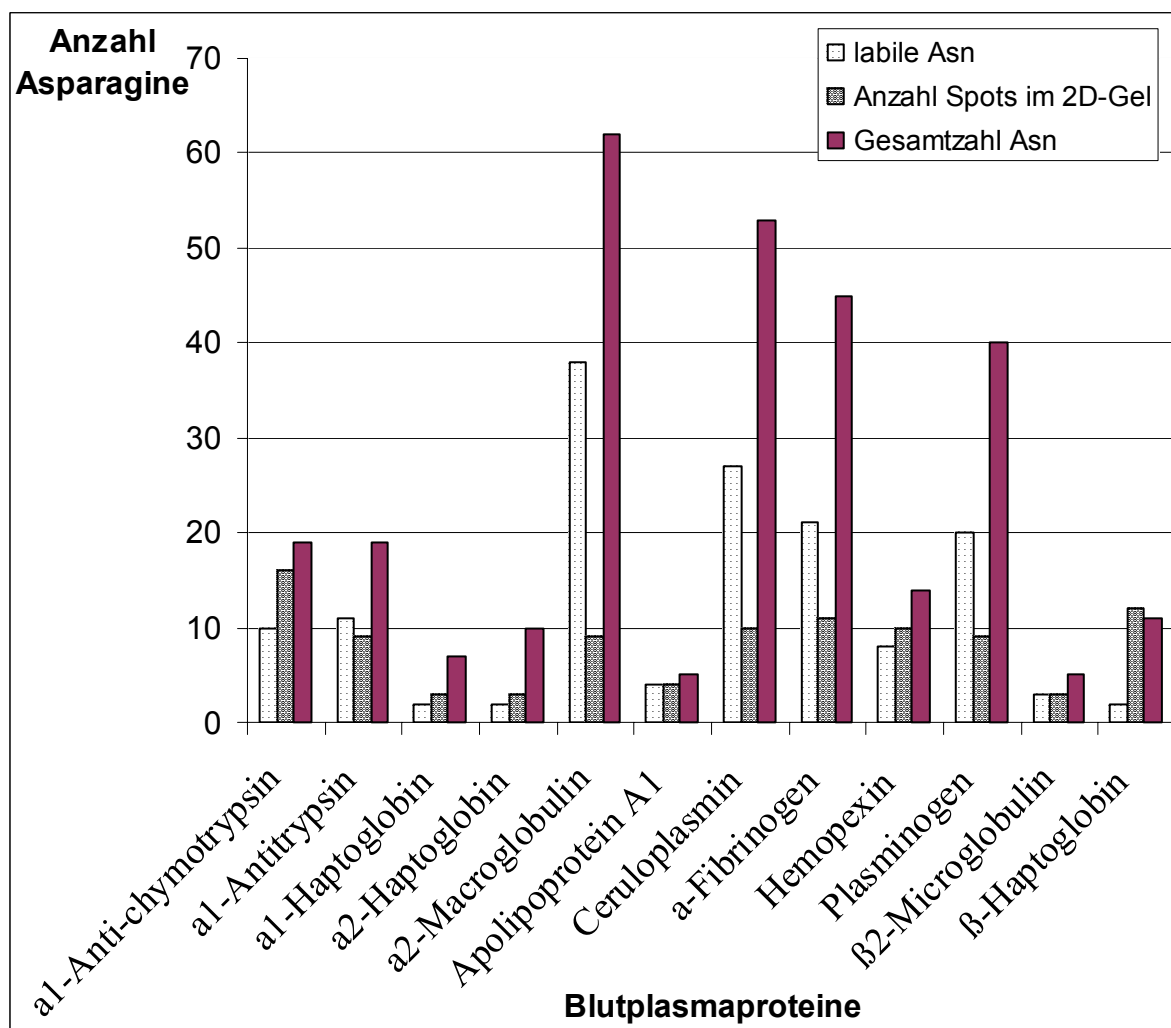


Abbildung 5.4: Vergleich der Anzahl an Spots in einem 2D-Gel von Blutplasma mit der Anzahl an labilen Asparaginen

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Anzahl an labilen Asparaginen nur eine Abschätzung dafür angibt, in wie viele Spots sich das Protein aufspaltet. Eine Reihe weiterer Faktoren wie die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, aber auch Parameter wie Temperatur oder pH der Lösung sind für das Auftreten einer Deamidierung von Bedeutung.

Abschließend lässt sich sagen, dass die chemische Deamidierung ein weitverbreitetes Phänomen ist, das zu Heterogenitäten in Proteinen führt. Wie in den letzten Jahren zunehmend gezeigt wurde hat sie weitreichende biologische Auswirkungen für die strukturelle Integrität und biologische Aktivität der Proteine.

5.7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte anhand einiger ausgewählter Proteine ein neuer analytischer Weg gezeigt werden, um die schwierige Fragestellung der Deamidierungen aufzuklären.

Eine nahezu basisliniengetrennte Auftrennung der asparagin- und asparaginsäurehaltigen Peptide konnte durch die Verwendung eines Neutralpuffersystems in der Reversed-Phase-Chromatographie erreicht werden. Dadurch wurde eine korrekte Abschätzung der Gehalte der beiden Spezies ermöglicht.

Durch die Definition labiler Proteinsequenzen wurde ein Hilfsmittel zur Vorhersage von Deamidierungsreaktionen eingeführt: Nach Abschätzung der Anzahl labiler Asparagine aus der Primärsequenz eines Proteins, kann das zahlenmäßige Auftreten von Deamidierungen vorhergesagt werden. Wie anhand einiger Beispiele gezeigt wurde, stimmen die Vorhersagen größenordnungsmäßig gut mit den experimentellen Daten überein.

Um die Ergebnisse der Untersuchungen sinnvoll zusammenfassen zu können, wurde ein Modell unter der Annahme partieller Deamidierungen entwickelt. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stimmen dabei vollständig mit dem Modell überein. Zu denselben Resultaten gelangte kürzlich eine Gruppe aus Rostock, die ebenfalls an den α -Ketten des Haptoglobins arbeitet (Mikkat 2003). Bei der α_2 -Kette des Haptoglobins wurden dort ebenfalls partielle Deamidierungen gefunden. Als Erklärung für die experimentellen Befunde wurde das von uns entwickelte Modell der partiellen Deamidierung übernommen. Dabei wird von einem Überlappen verschiedener Derivate in einem Spot gesprochen, womit unterschiedliche Proteinspezies mit derselben Anzahl an Asparaginen gemeint sind, die sich an unterschiedlichen Positionen im Protein befinden.

6 Literaturverzeichnis

Anderson, L. and N.G. Anderson. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74: 5421-5425.

Anderson, N.G., A. Matheson, and N.L. Anderson. 2001. Back to the future: The human protein index (HPI) and the agenda for post-proteomic biology [Review]. Proteomics 1: 3-12.

Anderson, N.L. and N.G. Anderson. 1979. Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin and alpha 2 HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional electrophoresis. Biochemical & Biophysical Research Communications 88: 258-265.

Anderson, N.L. and N.G. Anderson. 1991. A two-dimensional gel database of human plasma proteins. Electrophoresis 12: 883-906.

Anderson, N.L. and N.G. Anderson. 1998. Proteome and Proteomics - new technologies, new concepts, and new words [Review]. Electrophoresis 19: 1853-1861.

Anderson, N.L., A.D. Matheson, and S. Steiner. 2000. Proteomics: applications in basic and applied biology [Review]. Current Opinion in Biotechnology 11: 408-412.

Andrews, A., 1986, Second Edition, Electrophoresis, Oxford University Press, New York.

Baron, D., Proteine steuern das Leben in Pharmazeutische Zeitung 2001-01.

Berggard, B., L. Bjorck, R. Cigen, and L. Logdberg. 1980. Beta 2-Microglobulin. [Review] [100 refs]. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation Supplement 154: 13-25.

Berggard, I. 1976. Beta-2 micro globulins isolation properties and distribution. Federation Proceedings 35: 1167-1170.

Bischoff, R. and H.V. Kolbe. 1994. Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology. [Review] [58 refs]. Journal of Chromatography Biomedical Applications 662: 261-278.

Bowman, B.H. and A. Kurosky. 1982. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. [Review] [238 refs]. Advances in Human Genetics 12: 189-261.

Bowman, B.H., D.R. Barnett, J.B. Lum, and F. Yang. 1988. Haptoglobin. Methods in Enzymology 163: 452-474.

Brown, T.A., 1992 (Second edition). Genetics: A molecular approach, Chapman & Hall, New York

Brown, T.A., 2002 (Second Edition). Genomes. Wiley Liss, New York.

Buchanan, M.V. and R.L. Hettich. 1993. Fourier transform mass spectrometry of high-mass biomolecules. [Review] [63 refs]. Analytical Chemistry 65: 245A-259A.

Carr, S.A., M.J. Huddleston, and M.F. Bean. 1993. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. Protein Science 2: 183-196.

Celis J. E., M. Ostergaard, A. Jensen Niels, I. Gromova, H. Rasmussen Hanne, and P. Gromov. 1998. Human and mouse proteomic databases: Novel resources in the protein universe. FEBS Letters 430: 64-72.

Celis J. E., P. Gromov, M. Ostergaard, P. Madsen, B. Honore, K. Dejgaard, E. Olsen, H. Vorum, B. Kristensen Dan, I. Gromova, A. Haunso, J. Van Damme, M. Puype, J. Vandekerckhove, and H. Rasmussen. 1996. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biophase.dk/cgi-bin/celis>. FEBS Letters 398: 129-134.

Celis, J.E. and P. Gromov. 1999. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? [Review]. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 16-21.

Chambers, W., S. Thompson, A.W. Skillen, C.O. Record, and G.A. Turner. 1993. Abnormally fucosylated haptoglobin as a marker for alcoholic liver disease but not excessive alcohol consumption or non-alcoholic liver disease. *Clinica Chimica Acta* 219: 177-182.

Charlwood, J., D. Bryant, J.M. Skehel, and P. Camilleri. 2001. Analysis of N-linked oligosaccharides: progress towards the characterisation of glycoprotein-linked carbohydrates [Review]. *Biomolecular Engineering* 18: 229-240.

Charlwood, J., J.M. Skehel, and P. Camilleri. 2000. Analysis of N-linked oligosaccharides released from glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 284: 49-59.

Clarke, S. 1985. Protein carboxyl methyltransferases: two distinct classes of enzymes. *Annual Review Biochemistry* 54: 479-506.

Colvis, C. and D. Garland. 2002. Posttranslational modification of human alpha A-crystallin: Correlation with electrophoretic migration. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 397: 319-323.

Corthals, G.L., Wasinger, V.C., Hochstrasser, D.F and Sanchez, J.C. 2000. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research [Review]. *Electrophoresis* 21: 1104-1115.

DeVry, C.G. and S. Clarke. 1999. Polymorphic forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins. *Journal of Human Genetics* 44: 275-288.

Dobryszczycka, W. 1997. Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. [Review] [81 refs]. *European Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry* 35: 647-654.

Doherty, N.S., B.H. Littman, K. Reilly, A.C. Swindell, J.M. Buss, and N.L. Anderson. 1998. Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute

inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 355-363.

Drlica, K. (1997), Third edition. *Understanding DNA and gene cloning: A guide for the curious.*

Eckerskorn, C. and F. Lottspeich. 1990. Combination of two-dimensional gel electrophoresis with microsequencing and amino acid composition analysis: improvement of speed and sensitivity in protein characterization. *Electrophoresis* 11: 554-561.

Eckerskorn, C. and R. Grimm. 1996. Enhanced in situ gel digestion of electrophoretically separated proteins with automated peptide elution onto mini reversed-phase columns. *Electrophoresis* 17: 899-906.

Eckerskorn, C., K. Strupat, D. Schleuder, D. Hochstrasser, J.C. Sanchez, F. Lottspeich, and F. Hillenkamp. 1997. Analysis of proteins by direct-scanning infrared-MALDI mass spectrometry after 2D-PAGE separation and electroblotting. *Analytical Chemistry* 69: 2888-2892.

Eckerskorn, C., K. Strupat, J. Kellermann, F. Lottspeich, and F. Hillenkamp. 1997. High-sensitivity peptide mapping by micro-*lc* with on-line membrane blotting and subsequent detection by scanning-ir-maldi mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry* 16: 349-362.

Edman, P. 1950. *Acta Chem. Scan.* 4: 283-290.

Fey, S.J. and P.M. Larsen. 2001. 2D or not 2D [Review]. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 26-33.

Figeys, D. and D. Pinto. 2001. Proteomics on a chip: Promising developments [Review]. *Electrophoresis* 22: 208-216.

Figeys, D., S.P. Gygi, Y. Zhang, J. Watts, M. Gu, and R. Aebersold. 1998. Electrophoresis combined with novel mass spectrometry techniques - powerful tools for the analysis of proteins and proteomes. *Electrophoresis* 19: 1811-1818.

Gagneux, P., B. Amess, S. Diaz, S. Moore, T. Patel, W. Dillmann, R. Parekh, and A. Varki. 2001. Proteomic comparison of human and great ape blood plasma reveals conserved glycosylation and differences in thyroid hormone metabolism. *American Journal of Physical Anthropology* 115: 99-109.

Gaskell, S.J. 1997. Electrospray - Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry* 32: 677-688.

Gauss, C., M. Kalkum, M. Lowe, H. Lehrach, and J. Klose. 1999. Analysis of the mouse proteome. (I) - Brain proteins: Separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis* 20: 575-600.

Gerbeck, C.M., A. Bezkorovainy, and M.E. Rafelson, Jr. 1967. Glycopeptides obtained from human haptoglobin 2-1 and 2-2. *Biochemistry* 6:403-411.

Goeddel, D. et al.. 1979. Expression in E.coli of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 106-110.

Goodarzi, M.T. and G.A. Turner. 1998. Reproducible and sensitive determination of charged oligosaccharides from haptoglobin by PNGase F digestion and hpaec/pad analysis - glycan composition varies with disease. *Glycoconjugate Journal* 15: 469-475.

Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, and W. Weiss. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. [Review] [72 refs]. *Electrophoresis* 21: 1037-1053.

Gorg, A., W. Postel, and S. Gunther. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. [Review] [49 refs]. *Electrophoresis* 9: 531-546.

Graveley, B.R. 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world [Review]. *Trends in Genetics* 17: 100-107.

- Green, M.K., M.M. Vestling, M.V. Johnston, and B.S. Larsen. 1998. Distinguishing small molecular mass differences of proteins by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 260: 204-211.
- Groenen P., Merck K., De Jong, W., Bloemendal H. 1994. Structure and modifications of the junior chaperone α -crystallin. *Eur. J. Biochem.* 225; 1-19.
- Gygi, S.P. and R. Aebersold. 2000. Mass spectrometry and proteomics [Review]. *Current Opinion in Chemical Biology* 4: 489-494.
- Gygi, S.P., B. Rist, and R. Aebersold. 2000. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis [Review]. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 396-401.
- Hamdan, M., M. Galvani, and P.G. Righetti. 2001. Monitoring 2-D gel-induced modifications of proteins by MALDI-TOF mass spectrometry [Review]. *Mass Spectrometry Reviews* 20:121-141.
- Harvey, D.J. 2001. Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry [Review]. *Proteomics* 1: 311-328.
- Haynes, P., S. Gygi, D. Figeys, and R. Aebersold. 1998. Proteome analysis: Biological assay or data archive? *Electrophoresis* 19:1862-1871.
- Haynes, P.A. and J.R. Yates. 2000. Proteome profiling - pitfalls and progress [Review]. *Yeast* 17: 81-87.
- Heukeshoven, J. and R. Dernick. 1985. Simplified Method For Silver Staining Of Proteins In Polyacrylamide Gels and the Mechanism Of Silver Staining. *Electrophoresis* 6:103-112.
- Hille, J.M., A.L. Freed, and H. Watzig. 2001. Possibilities to improve automation, speed and precision of proteome analysis: A comparison of two-dimensional electrophoresis and alternatives [Review]. *Electrophoresis* 22: 4035-4052.

- Hillenkamp, F. and M. Karas. 1990. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology* 193: 280-295.
- Hillenkamp, F., M. Karas, R.C. Beavis, and B.T. Chait. 1991. Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry Of Biopolymers. *Analytical Chemistry* 63: 1193-1207.
- Hipkiss, A.R. 2001. On the "struggle between chemistry and biology during aging" - implications for DNA repair, apoptosis and proteolysis, and a novel route of intervention. *Biogerontology* 2: 173-178.
- Hochstrasser, D.F. 1998. Proteome in perspective [Review]. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine* 36: 825-836.
- Hoekman, K., J.A. Van Nieuwkoop, and R. Willemze. 1985. The significance of beta-2 microglobulin in clinical medicine. *Netherlands Journal of Medicine* 28: 551-557.
- Hsu Y., Chang W., Mendiaz E., Hara S., Chow D., Mann M., Langley K., Lu H. 1998. Selective deamidation of recombinant human stem cell factor during in vitro aging. *Biochemistry*. 37: 2251-2262.
- Huddleston, M.J., M.F. Bean, and S.A. Carr. 1993. Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests. *Analytical Chemistry* 65: 877-84.
- Issaq, H.J. 2001. The role of separation science in proteomics research [Review]. *Electrophoresis* 22: 3629-3638.
- Javid, J. 1978. Human haptoglobins. [Review] [221 refs]. *Current Topics in Hematology* 1: 151-192.
- Jenkins, R.E. and S.R. Pennington. 2001. Arrays for protein expression profiling: Towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? [Review]. *Proteomics* 1: 13-29.

- Karas, M., U. Bahr, A. Ingendoh, and F. Hillenkamp. 1989. Laserdesorptions-Massenspektrometrie von Proteinen mit Molmassen zwischen 100 000 und 250 000 Dalton. *Angewandte Chemie* 101/6: 805-806.
- Kettman, J.R., J.R. Frey, and I. Lefkovits. 2001. Proteome, transcriptome and genome: top down or bottom up analysis? [Review]. *Biomolecular Engineering* 18: 207-212.
- Klebe, R.J., Harriss, J.V., Douglas, M.G. 1983. A general method for polyethylene glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25: 333-341
- Klose, J. 1975. Protein Mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues *Humangenetik*. 26: 231-243
- Klose, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26: 231-243.
- Klose, J. 1999. Genotypes and phenotypes. *Electrophoresis* 20: 643-652.
- Kratzer, R., C. Eckerskorn, M. Karas, and F. Lottspeich. 1998. Suppression effects in enzymatic peptide ladder sequencing using ultraviolet-matrix assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 19: 1910-1919.
- Kurosky, A., D.R. Barnett, T.H. Lee, B. Touchstone, R.E. Hay, M.S. Arnott, B.H. Bowman, and W.M. Fitch. 1980. Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 3388-3892.
- Kussmann, M., E. Nordhoff, H. Rahbeknielsen, S. Haebel, M. Rossellarsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Krollkristensen, L. Palm, and P. Roepstorff. 1997. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *Journal of Mass Spectrometry* 32: 593-601.

- Kuster, B., T.N. Krogh, E. Mortz, and D.J. Harvey. 2001. Glycosylation analysis of gel-separated proteins [Review]. *Proteomics* 1: 350-361.
- Laemmli, U.K.. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Langlois, M.R. and J.R. Delanghe. 1996. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans [see comments]. [Review] [160 refs]. *Clinical Chemistry* 42: 1589-1600.
- Larsen, M.R. and P. Roepstorff. 2000. Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis [Review]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366: 677-690.
- Li, J.J., J.F. Kelly, I. Chemushevich, D.J. Harrison, and P. Thibault. 2000. Separation and identification of peptides from gel-isolated membrane proteins using a microfabricated device for combined capillary electrophoresis/nanoelectrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 72: 599-609.
- Li, R., D.S. AJ, B.B. Laird, R.L. Schowen, R.T. Borchardt, and E.M. Topp. 2000. Effects of solution polarity and viscosity on peptide deamidation. *Journal of Peptide Research* 56: 326-334.
- Lifson, A.R., N.A. Hessol, S.P. Buchbinder, P.M. Omalley, L. Barnhart, M. Segal, M.H. Katz, and S.D. Holmberg. 1992. Serum Beta-2 Microglobulin and Prediction Of Progression to Aids In Hiv Infection. *Lancet* 339: 1436-1440.
- Lilley, K.S., A. Razzaq, and P. Dupree. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation [Review]. *Current Opinion in Chemical Biology* 6: 46-50.
- Lindner H., Sarg B., Grunicke, H., Helliger W. 1999. Age-dependent deamidation of H1° histones in chromatin of mammalian tissues. *J. Cancer Res. Cli. Oncol* 125: 182-186.

- Lindner, H. and W. Helliger. 2001. Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins. *Experimental Gerontology* 36: 1551-1563.
- Lottspeich, F. (1998). In Lottspeich, F. & Zorbas, H. (Hrsg.) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Lottspeich, F. 1999. Proteome analysis: A pathway to the functional analysis of proteins [Review]. *Angewandte Chemie International Ed. in English*. 38: 2477-2492.
- Lowenson, J. and S. Clarke. 1988. Does the chemical instability of aspartyl and asparaginyl residues in proteins contribute to erythrocyte aging? The role of protein carboxyl methylation reactions. [Review] [54 refs]. *Blood Cells* 14: 103-118.
- Lowenson, J.D., Clarke, S. 1991. Spontaneous degradation and enzymatic repair of aspartyl and asparaginyl residues in aging red cell proteins analyzed by computer simulation. *Gerontology* 37: 128-151.
- Lubkowski, J., A. Wlodawer, H.L. Ammon, T.D. Copeland, and A.L. Swain. 1994. Structural characterization of *Pseudomonas* 7A glutaminase-asparaginase. *Biochemistry* 33: 10257-10265.
- Lustbader, J.W., J.P. Arcoleo, S. Birken, and J. Greer. 1983. Hemoglobin-binding site on haptoglobin probed by selective proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 258: 1227-1234.
- Manabe, T. 1999. Capillary electrophoresis of proteins for proteomic studies [Review]. *Electrophoresis* 20: 3116-3121.
- Manabe, T. 2000. Combination of electrophoretic techniques for comprehensive analysis of complex protein systems [Review]. *Electrophoresis* 21: 1116-1122.
- Mann, M. and A. Pandey. 2001. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases [Review]. *Trends in Biochemical Sciences* 26: 54-61.

- Mann, M. and M. Wilm. 1994. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Analytical Chemistry* 66: 4390-4399.
- Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry [Review]. *Annual Review of Biochemistry* 70: 437-473.
- Meinwald, Y., Stimson, E., Scheraga, H., 1986. Deamidation of the asparaginyl-glycyl sequence. *International Journal of peptide and Protein Research*, 28, 79ff.
- Meri, S. and M. Baumann. 2001. Proteomics: posttranslational modifications, immune responses and current analytical tools [Review]. *Biomolecular Engineering* 18: 213-220.
- Mikkat, S., Koy, C., Ringel, B., Hoffrogge, R., O. Glocker, M. 2003. Mass spectrometric analysis of post-translational modifications of Haptoglobin α chains from human proteomes. Posterpräsentation auf der Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie.
- Molloy, M.P. 2000. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients [Review]. *Analytical Biochemistry* 280: 1-10.
- Mucchielli, A. and R. Masseyeff. 1981. Purification and characterization of a haptoglobin-hemoglobin complex isolated from human fetuses. *Oncodevelopmental Biology & Medicine* 2: 371-80.
- Neubauer, G. and M. Mann. 1999. Mapping of phosphorylation sites of gel-isolated proteins by nanoelectrospray tandem mass spectrometry: Potentials and limitations. *Analytical Chemistry* 71: 235-242.
- O'Farrell, P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250: 4007-4021.
- Okazaki, T., Y. Yanagisawa, and T. Nagai. 1996. Determination of intermediates of hemoglobin-haptoglobin complex of haptoglobin polymers by "Crossed hemoglobin electrophoresis". *Analytical Biochemistry* 239: 123-129.

- Ono, H., F. Figueroa, O.h. C, and J. Klein. 1993. Cloning of the beta 2-microglobulin gene in the zebrafish. *Immunogenetics* 38: 1-10.
- Paranandi M., Guzetta A., Hancock W., Aswad D. 1994. Deamidation and isoaspartate formation during in vitro ageing of recombinant tissue plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 269: 243-253.
- Parker, K.C. and D.C. Wiley. 1989. Overexpression of native human beta 2-microglobulin in *Escherichia coli* and its purification. *Gene* 83: 117-124.
- Pasquali, C., Fialka, I., Huber, L.. 1997. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins *Electrophoresis* 18: 2573-2581
- Patton, W.F. 2000. A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics [Review]. *Electrophoresis* 21: 1123-1144.
- Patton, W.F. 2000. Making blind robots see: The synergy between fluorescent dyes and imaging devices in automated proteomics [Review]. *Biotechniques* 28: 944ff.
- Patton, W.F., J.M. Beechem. 2002. Rainbow's end: the quest for multiplexed fluorescence quantitative analysis in proteomics [Review]. *Current Opinion in Chemical Biology* 6: 63-69.
- Peterson, P., Cunningham, I., Berggard, I., Edelman, G. 1972. β_2 -Microglobulin-a free immunoglobulin domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69: 1697ff.
- Ploegh, H., Orr, H., Strominger, J. 1981. Major Histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, -H-2D9 class I molecules. *Cell* 24: 287ff.
- Primrose, S. 1991 (Second Edition). *Molecular Biotechnology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Putnam, F.,(Ed.) Haptoglobin in The Plasma Proteins, 1975. Second Edition (Volume II), Academic Press, New York, San Francisco, London.

Qin K., Yang D., Yang Y., Chisti M., Meng L., Kretschmar H., Yip C., Fraser P., Westaway D.2000 Copper (II) induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular prP. *J. Biol. Chem.* 275: 19121-19131.

Rabilloud, T..1998. Use of thiourea to increase the solubility of mebrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 758-760.

Rademacher, B.E. and W.J. Steele. 1987. A general method for the isolation of haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 from human plasma. *Analytical Biochemistry* 160: 119-126.

Radkiewicz, J.L., H. Zipse, S. Clarke, and K.N. Houk. 2001. Neighboring side chain effects on asparaginyl and aspartyl degradation: An ab initio study of the relationship between peptide conformation and backbone NH acidity. *Journal of the American Chemical Society* 123: 3499-3506.

Raftery, M.J., C.A. Harrison, P. Alewood, A. Jones, and C.L. Geczy. 1996. Isolation of the murine s100 protein mrp14 (14 kda migration-inhibitory-factor-related protein) from activated spleen cells - characterization of post-translational modifications and zinc binding. *Biochemical Journal* 316: 285-293.

Righetti, P.G. and A. Bossi. 1997. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: an update. [Review] [66 refs]. *Journal of Chromatography.B, Biomedical Sciences & Applications* 699: 77-89.

Robinson, N.E. and A.B. Robinson. 2001. Deamidation of human proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 12409-12413.

Robinson, N.E. and A.B. Robinson. 2001. Molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 944-949.

Robinson, N.E. and A.B. Robinson. 2001. Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4367-4372.

Robinson, N.E., A.B. Robinson, and R.B. Merrifield. 2001. Mass spectrometric evaluation of synthetic peptides as primary structure models for peptide and protein deamidation. *Journal of Peptide Research* 57: 483-493.

Roepstorff, P. 1997. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Current Opinion in Biotechnology* 8:6-13.

Rogers S., Rechsteiner M. 1998. Degradation of structurally characterized proteins infected in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 263: 19843-19849.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. In: (Hg.) 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sanchez, J.C., R.D. Appel, O. Golaz, C. Pasquali, F. Ravier, A. Bairoch, and D.F. Hochstrasser. 1995. Inside SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis* 16: 1131-1151.

Sandheimer E., Hunziker P., Kunz B., Sack R., Christen P. 1999. Spontaneous deamidation and isomerisation of Asn 108 in prion peptide 106-126 and in full length prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 578-583.

Santoni, V., M. Molloy, and T. Rabilloud. 2000. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? [Review]. *Electrophoresis* 21: 1054-1070.

Sarioglu, H., F. Lottspeich, T. Walk, G. Jung, and C. Eckerskorn. 2000. Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins. *Electrophoresis* 21: 2209-2218.

Schey K., Little M. Fowler J., Crouch J. 2000. Characterization of human lens major intrinsic protein structure. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 41: 175-182.

Schreiner, M., K. Strupat, F. Lottspeich, and C. Eckerskorn. 1996. Ultraviolet matrix assisted laser desorption ionization-mass spectrometry of electroblotted proteins. *Electrophoresis* 17: 954-961.

Shevchenko, A., I. Chernushevich, W. Ens, K.G. Standing, B. Thomson, M. Wilm, and M. Mann. 1997. Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11: 1015-1024.

Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68: 850-858.

Sickmann, A., K. Marcus, H. Schafer, E. Butt-Dorje, S. Lehr, A. Herkner, S. Suer, I. Bahr, and H.E. Meyer. 2001. Identification of post-translationally modified proteins in proteome studies. *Electrophoresis* 22: 1669-1676.

Simpson, C., Whitaker, M. (Hrsg.) 1983, *Electrophoretic Techniques*, Academic Press Inc., London.

Smith, R.D. 2000. Evolution of ESI-mass spectrometry and Fourier transform ion cyclotron resonance for proteomics and other biological applications [Review]. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 509-544.

Smith, R.D., L. Pasa-Tolic, M.S. Lipton, P.K. Jensen, G.A. Anderson, Y.F. Shen, T.P. Conrads, H.R. Udseth, R. Harkewicz, M.E. Belov, C. Masselon, and T.D. Veenstra. 2001. Rapid quantitative measurements of proteomes by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Electrophoresis* 22: 1652-1668.

Smithies, O, 1955, *Journal of Biochemistry* 61: 629.

Steinbiß, H. 1995. *Transgene Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Stewart, A.E., S.M. Arfin, and R.A. Bradshaw. 1994. Protein NH₂-terminal asparagine deamidase. Isolation and characterization of a new enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 269: 23509-23517.

Strathdee SA, O'Shaughnessy MV, Montaner JS, Schechter MT, 1996, A decade of research on the natural history of HIV infection: Part 1. Markers. *Clin Invest Med.* 2: 111-120.

Stratton, L.P., R.M. Kelly, J. Rowe, J.E. Shively, D.D. Smith, J.F. Carpenter, and M.C. Manning. 2001. Controlling deamidation rates in a model peptide: Effects of temperature, peptide concentration, and additives. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90: 2141-2148.

Stryer, L. 1995 (Fourth Edition). *Biochemistry*. Freeman and Company, New York.

Thannhauser, T., Scheraga, H., 1985. Reversible blocking of half-cysteine residues of proteins and an irreversible specific deamidation of asparagine 67 of s-sulfuribonuclease under mild conditions. *Biochemistry*, 24, 7681ff.

Tsapis, A., Y. Blouquit, Y. Beuzard, C. Mihaesco, and J. Rosa. 1979. [Localization of binding sites in the hemoglobin-haptoglobin complex]. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales* 173: 314-320.

Turner, G.A. 1995. Haptoglobin. A potential reporter molecule for glycosylation changes in disease. [Review] [26 refs]. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 376: 231-238.

Tyler-Cross R., Schirch V. 1991. Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of asparagine residues in small peptides. *J. Biol. Chem.* 274: 7368-7378.

Valaskovic, G.A., N.L. Kelleher, and F.W. McLafferty. 1996. Attomole protein characterization by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Science* 273: 1199-1202.

Valette, I., M. Waks, J.C. Wejman, J.P. Arcoleo, and J. Greer. 1981. Haptoglobin heavy and light chains. Structural properties, reassembly, and formation of minicomplex with hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 256: 672-679.

Villarejo, M.R., Zabin, I. 1974. β -Galactosidase from Termination and deletion mutant strains *J. Bacteriol.* 120: 466-474

Volkin, D.B., A.M. Verticelli, M.W. Bruner, K.E. Marfia, P.K. Tsai, M.K. Sardana, and C.R. Middaugh. 1995. Deamidation of polyanion-stabilized acidic fibroblast growth factor. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84: 7-11.

Volkin, D.B., H. Mach, and C.R. Middaugh. 1995. Degradative covalent reactions important to protein stability. [Review] [118 refs]. *Methods in Molecular Biology* 40: 35-63.

Weatherall, D. 1991 (Third Edition). *The new genetics and clinical practice.* Oxford University Press, Oxford.

Westermeier, R. (Hrsg.) 2001 Third Edition, *Electrophoresis in Practice*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Wilkins, M.R., E. Gasteiger, A.A. Gooley, B.R. Herbert, M.P. Molloy, P.A. Binz, K.L. Ou, J.C. Sanchez, A. Bairoch, K.L. Williams, and D.F. Hochstrasser. 1999. High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. *Journal of Molecular Biology* 289: 645-657.

Wilkins, M.R., I. Lindskog, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, D.F. Hochstrasser, and R.D. Appel. 1997. Detailed peptide characterization using peptidemass - a world-wide-web-accessible tool. *Electrophoresis* 18: 403-408.

Wilm, M. and M. M. 1994. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 136: 167-180.

Wilm, M. and M. Mann. 1996. Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Analytical Chemistry* 68: 1-8.

Wilm, M., A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, and M. Mann. 1996. Femtomole Sequencing Of Proteins From Polyacrylamide Gels By Nano-Electrospray Mass Spectrometry. *Nature* 379: 466-469.

Wright, H.T. 1991. Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. [Review] [285 refs]. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology* 26: 1-52.

Wright, H.T. 1991. Sequence and structure determinants of the nonenzymatic deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins. *Protein Engineering* 4: 283-294.

Xie, M.L. and R.L. Schowen. 1999. Secondary structure and protein deamidation [Review]. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88: 8-13.

Yan, C. and D.L. Sloan. 1987. Purification and characterization of nicotinamide deamidase from yeast. *Journal of Biological Chemistry* 262: 9082-9087.

Yates, J. R., I. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry* 33: 1-19.

Yates, J.R., A.L. McCormack, A.J. Link, D. Schieltz, J. Eng, and L. Hays. 1996. Future prospects for the analysis of complex biological systems using microcolumn liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [Review]. *Analyst* 121: 76ff.

Yong, FH, Taylor, JM, Bryant, JL, Chmiel, JS, Gange, SJ, Hoover, D. 1997. Dependence of the hazard of AIDS on markers. *AIDS*. 11(2): 217-228.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für seine Bereitschaft, die Arbeit vor der chemischen Fakultät der LMU München zu vertreten. Bei ihm als Stellvertreter der Max-Planck-Gesellschaft möchte ich mich zudem für die Bereitstellung der verwendeten Geräte und Arbeitsmaterialien bedanken.

Meinem Betreuer Herrn Dr. habil. Friedrich Lottspeich danke ich für die Bereitschaft, die Betreuung der Arbeit nachträglich zu übernehmen. Seine zahlreichen, wertvollen Anregungen und Diskussionen, die für diese Arbeit richtungsweisend waren, seine uneingeschränkte Unterstützung, sowie sein Interesse und sein Engagement bei der Verwirklichung vieler Ideen waren mir eine unersetzliche Hilfe.

Herrn Dr. habil. Christoph Eckerskorn möchte ich für die interessante, vielseitige und aktuelle Aufgabenstellung danken, sowie für die Erstellung des Zweitgutachtens. Die zahlreichen Diskussionen und die Einführung in die Proteinanalytik waren für den Erfolg der Arbeit sehr wichtig.

Monica Zobawa danke ich für die Durchführung der MALDI-MS-Spektren, sowie die unermüdliche Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Heidemarie Groß danke ich für die Einführung in die 2D-Gelelektrophorese und unersetzliche Hilfestellung bei der Durchführung zahlreicher Versuche.

Craig Young und Anne von Zychlinski danke ich für die Einführung in die für einen Chemiker ungewohnte Welt der Molekularbiologie.

Jocelyn Ng danke ich für ihre Hilfestellung bei den ersten Gehversuchen auf dem Gebiet der Elektrospray-Massenspektrometrie.

Allen Mitgliedern der Abteilung Proteinchemie danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Eltern und meinen Schwiegereltern danke ich für ihre Unterstützung und Hilfe während meines gesamten Studiums.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Frau Sabine für ihre seelische Unterstützung und grenzenlose Geduld und unserem Sohn Jonathan für die Freude, die er uns täglich schenkt.

Lebenslauf

Name Hakan Sarioglu

Anschrift Weißenburger Straße 27
81667 München

Geboren am 14.02.1970 in Geislingen/Steige

Familienstand verheiratet, 1 Sohn

Schulbildung 1976-1980 Grundschule in Süßen
1980-1989 Rechberg-Gymnasium Donzdorf
1989 Abitur

Studium ab WS 1989 Studium der Chemie an der Universität Ulm
Vordiplom im Januar 1992
Diplom im August 1995

Oktober 1995 - Mai 1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung
"Analytische Chemie und Umweltchemie" der Universität Ulm

Promotion Juni 1996 - Dezember 1996 Doktorand bei der Daimler Benz Forschung und
Technik in Ottobrunn

seit Januar 1997 Promotion bei Prof. Dr. D. Oesterhelt am Max-Planck-Institut
für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Dr. phil. Dr. med. habil.
F. Lottspeich

Berufstätigkeit 2002-2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried