

**Identifizierung und Charakterisierung von Brustdrüsengewebeproteinen
der Maus und Etablierung einer neuen Kalibrierungsmethode für
zweidimensionale Gele**

vorgelegt von
Master of Science
Sevil Aksu
aus Antalya/Türkei

Von der Fakultät II - Mathematik- und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Salnikow
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Theuring
3. Gutachter: Prof. Dr. J. Starnick

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17.01.2003

Berlin 2003

D 83

Abstract

Aksu, Sevil:

Identifizierung und Charakterisierung von Brustdrüsengewebeproteinen der Maus und Etablierung einer neuen Kalibrierungsmethode für zweidimensionale Gele

Durch die Analyse ganzer Proteome werden mit den sensitiven Methoden der Proteomanalyse Einblicke in die aktuelle Zusammensetzung der Proteine, also das aktuelle Geschehen in der Zelle, gewährt. Die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese ist noch immer die Methode, die komplexe Proteinproben am besten auftrennt und eine sensitive Detektion derer erlaubt. Durch fortwährende Entwicklungen sind heutzutage Identifizierungen von Proteinen mit Konzentrationen im femtomol Bereich möglich.

In dieser Arbeit wurden die gängigsten Identifizierungsmethoden, wie N-terminale Sequenzierung und MALDI-TOF-MS verwendet. Anhand der MALDI-MS können Proteine über ihren 'peptide mass fingerprint' (PMF), dem Massenspektrum der Peptide eines tryptisch gespaltenen Proteins aus dem Peptidgemisch, identifiziert werden. Durch einige Veränderungen an dem in unserem Labor bisher angewendeten Verdauprotokoll und an den Messparametern konnte für die PMF-Spektren von schwach angefärbten CBB-Spots eine Empfindlichkeitssteigerung erzielt werden.

Im weiteren wurden aus dem Brustdrüsengewebe von Wildtyp-Mäusen insgesamt 72 Proteinspezies identifiziert. 66 der identifizierten Proteinspezies wurden in einer Proteindatenbank zusammengestellt und über das Internet zugänglich gemacht. Die restlichen sechs Proteinspezies wurden erst später identifiziert. Deshalb sind sie in der Datenbank nicht enthalten. Mit den 66 Proteinspezies wurde eine neue Gelkalibrierungsmethode entwickelt. Durch die Kenntnis der N-terminalen Aminosäure einiger Proteinspezies konnten in einer ersten Iteration die genaueren M_r - und pI -Werte berechnet werden. In der zweiten Iteration wurden nur die Spots, die mit ihren M_r - und pI -Werten innerhalb eines bestimmten Intervalls lagen, für die weiteren Berechnungen verwendet. Mit dieser Methode wird die Kalibrierung eines 2-DE Gels nicht nur genauer, es wird auch die Erkennung von posttranslational modifizierten Proteinspezies ermöglicht.

Bei der subtraktiven Proteomanalyse wurden die Proteinmuster von Tumorgewebeproben mit histologisch normalen Gewebeproben aus der Brustdrüse von doppeltransgenen Mäusen verglichen. Die doppeltransgenen Mäuse besaßen die Transgene des humanen EGFR und des $TGF\alpha$ Gens. Einige der unterschiedlichen Proteinspots wurden identifiziert. Folgende Proteine wurden im Tumorgewebe mit niedrigerer Intensität detektiert: Carbonic anhydrase III, Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Fruktose-biphosphat Aldolase I, Kreatinkinase und Enolase 3. Tropomyosin 5, 'eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2' und mehrere Serumalbumin Fragmente wiesen jedoch im Tumorgewebe höhere Intensitäten auf. Weitergehende *in-vitro* und *in-vivo* Validierungen müssen zeigen, ob diesen Proteinen eine Relevanz im Tumorgeschehen zukommt.

Meiner Mutter, meinem Vater und meinem Ehemann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Proteomics	1
1.2 Proteomanalyse und Subtraktive Proteomforschung.....	2
1.3 Methoden der Proteomanalyse	4
1.3.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese	4
1.3.2 Proteindetektion auf Polyacrylamidgelen und Membranen	7
1.3.3 Auswertung von zweidimensionalen Gelen	9
1.3.4 Identifizierung von Proteinen	10
1.3.4.1 N-terminale Sequenzierung	10
1.3.4.2 Massenspektrometrie	11
1.3.4.3 Weitere Identifizierungsmethoden.....	15
1.3.5 Proteindatenbanken.....	17
1.3.5.1 Proteinsequenzdatenbanken.....	17
1.3.5.2 2-DE Datenbanken.....	19
1.4 Mausmodelle	19
1.5 Krebs.....	22
1.6 Brustkrebs.....	24
2 Aufgabenstellung.....	28
3 Materialien	29
3.1 Chemikalien.....	29
3.2 Geräte	31
3.3 Probenmaterial.....	32
4 Methoden.....	33
4.1 Probenaufarbeitung für die zweidimensionale Gelelektrophorese.....	33
4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	33
4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese	34
4.3.1 Isoelektrische Fokussierung.....	34
4.3.1.1 Vorbereiten der Röhrengelge	35

4.3.1.2	Auftragen der Probe	35
4.3.1.3	Fokussierung	36
4.3.1.4	Equilibrierung und Lagerung der Röhrengelge	37
4.3.1.5	Reinigung der IEF-Glasröhrchen	37
4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
4.4	Gelfärbemethoden	40
4.4.1	Silberfärbung	40
4.4.2	Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbung	40
4.4.3	Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbung	41
4.5	Geltrocknung	41
4.6	Semidry-Gelblotting	42
4.7	Blotfärbemethoden	42
4.7.1	Färbung der Blotmembran mit CBB R-250	42
4.7.2	Färbung der Blotmembran mit Ponceau S	43
4.8	Auswertung von 2-DE Gelen	43
4.9	Enzymatische Spaltung von Proteinen	43
4.9.1	Tryptischer Verdau mit ZipTip-Aufarbeitung	43
4.9.2	Tryptischer Verdau ohne ZipTip-Aufarbeitung	44
4.10	Automatische N-terminale Mikrosequenzierung von Proteinen	45
4.11	Massenspektrometrie	45
4.12	Computergestützte Identifizierung	46
5	Ergebnisse	47
5.1	Vorarbeiten zur Empfindlichkeitssteigerung bei PMF-Spektren	47
5.1.1	Modifizierung des 'in-gel' Verdauprotokolls	48
5.1.2	Benutzung von unterschiedlichen Matrices	49
5.1.3	Optimierung der Geräteeinstellungen	50
5.1.3.1	Vergleich dreier Meßmethoden nach Auflösung und Intensität	51
5.1.3.2	Intensitätsvergleich der Spektren einer Probe bei unterschiedlichen Geräteeinstellungen	53
5.1.4	Identifizierung von <i>H. pylori</i> Sekretionsproteinen unter Verwendung von unterschiedlichen Verdauprotokollen und Meßmethoden	56
5.2	Proteomanalyse der Brustdrüsenproteine der Maus	61

5.2.1 Identifizierung und Charakterisierung von Wildtyp-Mausbrustdrüsenproteinen und Zusammenstellung in einer Proteindatenbank	62
5.2.2 Etablierung einer neuen 2-DE Gelkalibrierungsmethode.....	69
5.2.3 Nutzung der neuen Kalibrierungsmethode zur Vorhersage von posttranslationalen Modifikationen	74
5.2.4 Subtraktive Proteomanalyse von Brustdrüsenproteinen doppeltransgener Mäuse	78
5.2.4.1 Carbonic Anhydrase III.....	79
5.2.4.2 Intensitätsabfall bei GAPDH, Fruktose-biphosphat Aldolase I, Kreatinkinase und Enolase 3	80
5.2.4.3 Tropomyosin 5 und ‘eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2‘	81
5.2.4.4 Fragmente des Serumalbumins	82
6 Diskussion.....	83
6.1 Empfindlichkeitssteigerung bei PMF-Spektren	83
6.1.1 Veränderungen an der bestehenden Verdaumethode	84
6.1.2 Veränderungen der Messparameter	85
6.1.3 Anwendung der veränderten Methoden.....	85
6.2 Proteomanalyse der Brustdrüsenproteine der Maus	86
6.2.1 Identifizierung von Wildtyp-Mausbrustdrüsenproteinen und Zusammenstellung in einer 2-DE Datenbank.....	86
6.2.2 Vorteile einer neuen Kalibrierungsmethode von 2-DE Gelen.....	86
6.2.3 Vergleich der Proteinmuster von Gewebelysaten aus Tumorgewebe und histologisch normalem Gewebe doppeltransgener Mäuse	88
7 Ausblick.....	91
8 Literaturverzeichnis.....	92

9 Anhang	99
9.1 Abkürzungen	99
9.2 Danksagungen	101
9.3 Lebenslauf	102
9.4 Eigene Veröffentlichungen.....	103

1 Einleitung

1.1 Proteomics

Der Begriff Proteomics ist von der Fachwelt aus dem Englischen direkt ins Deutsche übernommen worden und wird seit einigen Jahren auch in deutschen Lexika aufgeführt (Brockhaus-Die Enzyklopädie, 1999, Lexikon der Biochemie, 2000). Im Brockhaus-Lexikon wird es mit "Proteomics; Proteombiologie; Wissenschaftszweig, der sich mit der globalen Analyse zellulärer Proteine (Proteom), deren Struktur, Funktion und Wechselwirkungen befaßt, um die Rolle normaler Proteine und die Schlüsselrolle veränderter Proteine bei der Entstehung von Krankheiten und Fehlbildungen zu erkennen." (verkürzt) beschrieben. Das erste Mal wurde der Begriff Proteomics im Jahr 1994 bei der internationalen Elektrophorese-Tagung in Siena/Italien erwähnt (Kahn, 1995). Es ist analog zum Genom, welches die Gesamtheit der codierenden Gene darstellt, aufgestellt worden. Von Proteomics-Fachleuten wird die Gesamtheit/ Zusammensetzung der Proteine einer Zelle, eines Organs oder eines Organismus unter definierten Bedingungen als das Proteom bezeichnet (Wilkins *et al.*, 1997). Und Proteomics ist der Wissenschaftszweig, der sich systematisch mit der Analyse des Proteoms befaßt.

Die Entwicklungen, die auf dem Gebiet von Proteomics entstanden, haben dazu beigetragen, daß die Proteinchemie immer mehr an Bedeutung gewonnen hat. Spätestens seit dem Ende der Sequenzierung der menschlichen Gene hat man erkannt, daß mit der Gensequenzierung nicht alle Fragen, z. B. zur Funktion einzelner Gene und ihrer möglichen Relevanz bei Krankheitsgeschehen, beantwortet werden können. Somit erlangte Proteomics in der Postgenom-Ära eine neue Bedeutung (Pandey und Mann, 2000, Eisenberg *et al.*, 2000). Die Molekularbiologie und die Proteinchemie werden jetzt nicht nur als gleichwertig sondern, was viel wichtiger ist, als komplementäre Einheiten, die sich ergänzen, angesehen. Die Bedeutung, die Proteomics gewonnen hat, spiegelt sich auch in der Fülle an Publikationen wieder.

Die Grundsteine der klassischen Proteomanalyse wurden schon 1975 mit der Veröffentlichung einer Methode gelegt, die aus der Kombination von isoelektrischer Fokussierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese besteht (Klose, 1975, O'Farrell, 1975). Somit entstand die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE). In den folgenden Jahren wurde die Methode weiterentwickelt und verbessert. Es wurden an der Geldicke, Gelgröße, dem Ampholytengemisch sowie den Färbemethoden Veränderungen

vorgenommen. Diese führten zu besserer Auflösung, sensitiverer Detektion und besserer Reproduzierbarkeit. Heute kann man mit dieser Methode sehr hohe Auflösungen von komplexen Proteingemischen erzielen. Mit den großen Gelen (30 x 23 cm oder 30 x 40 cm) können mehrere tausend Proteinspezies voneinander getrennt werden, was für die Identifizierung und Charakterisierung der einzelnen Proteinspezies sehr wichtig ist.

Die Idee ganze Proteome systematisch zu analysieren ist nicht neu. Schon Anfang der 80er Jahre diskutierte man über die Notwendigkeit der Analyse auf Proteinebene, vor allem der menschlichen Proteine (Anderson und Anderson, 1981, 1982, Clark, 1981, Wade, 1981). Mit der 2-DE war es endlich möglich komplexe Proteingemische ohne große Verluste aufzutrennen und die Proteine zu analysieren und zu charakterisieren.

In den späten 80er Jahren gab es für Proteomics einen zusätzlichen Aufschwung. Mit der Entwicklung der 'matrix-assisted laser desorption/ionisation'- (MALDI) (Karas und Hillenkamp, 1988, Tanaka *et al.*, 1988) und der 'electrospray-ionisation'- (ESI) (Fenn, *et al.* 1989) Massenspektrometrie konnten Biomoleküle zum ersten Mal massenspektrometrisch analysiert werden ohne zerstört zu werden. Die MALDI- und ESI-Techniken sind die einzigen für Biomoleküle verträglichen Ionisierungsformen. Die Aufarbeitung der biologischen Proben erfolgt hierbei unter relativ milden Bedingungen, so daß deren Struktur nicht verändert oder zerstört wird. Im Laufe der Zeit wurden auch diese Methoden weiterentwickelt und die Geräte sensitiver. Die meisten Proteomanalysen werden als Kombination der 2-DE mit Massenspektrometrie durchgeführt.

1.2 Proteomanalyse und Subtraktive Proteomforschung

Die Erbinformation der Lebewesen in Form von Genen stellt einen statischen Zustand für die Zelle oder den Organismus dar. Sie bleibt das ganze Leben über gleich, es sei denn, die DNS wird durch äußere Einflüsse, wie z.B. Strahlung, Chemikalien, usw., mutiert. Die translatierten Genprodukte, also die Proteine, bilden die dynamische Zusammensetzung der Zellen. Wenn man jedoch bedenkt, daß, wie in Abbildung 1.1 Bild A dargestellt, nicht immer ein einzelnes Gen ein Protein kodiert, sondern ein Gen auch mehrere Proteine kodieren kann (Abb. 1.1 Bild B) oder mehrere Gene die selben unterschiedlichen Proteine codieren (Abb. 1.1 Bild C) und noch viel komplexere Konstellationen möglich sind (Abb. 1.1 Bild D), ist es sehr schwer nur aus der Geninformation eine Aussage über den Zustand der Proteine zu treffen. Berücksichtigt man all die möglichen Veränderungen an Proteinen nach der Translation, kann man sich die Komplexität auf Proteinebene in einer Zelle vorstellen. Auch

der Einfluß der Umwelt, der auf jeden einzelnen Organismus unterschiedlich einwirken kann, ist immens. Daher ist die Notwendigkeit der Analyse der Proteine nach der Translation mehr als offensichtlich.

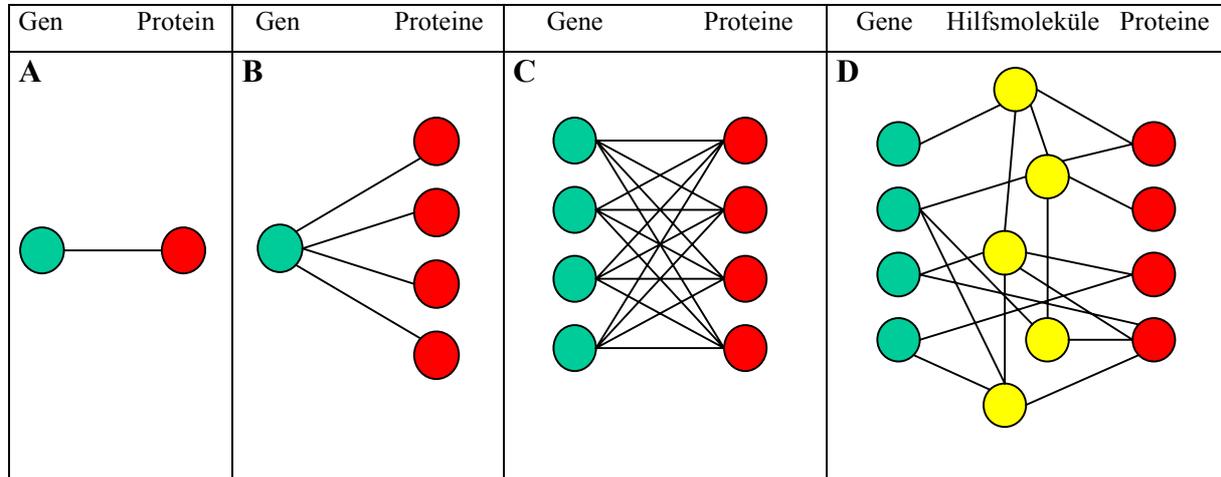


Abbildung 1-1: Komplexität des Gen-Protein Verhältnisses. Bild A: ein Gen codiert ein Protein. Bild B: ein Gen codiert unterschiedliche Proteine. Bild C: unterschiedliche Gene codieren die selben unterschiedlichen Proteine. Bild D: Codierung mehrerer Gene resultiert über Hilfsmoleküle in mehrere Proteine

Die physiologischen Vorgänge und die phänotypischen Veränderungen, die Lebewesen während ihres Daseins erfahren, sind, obwohl durch die Umwelt beeinflussbar, in den Genen codiert. Sie werden aber von Proteinen organisiert und durchgeführt. Es ist logisch, daß zu verschiedenen Stadien des Zellzyklusses unterschiedliche Proteine zum Einsatz kommen. Zusätzliche Variabilität und Vielfalt bringen die co- bzw. posttranslationalen Modifikationen der Proteine mit sich. Mögliche Modifikationen sind unter anderem Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen oder Verknüpfung mit Kohlenhydraten oder Lipiden. Darüber hinaus kann sich ein Proteom mit Einflüssen von außen verändern. Solche Einflüsse können z.B. Temperatur, Streß, Kulturbedingungen (bei Zellkulturen) oder auch Medikamente sein. Das typischste Beispiel zur Veränderlichkeit des Proteoms ist die Verwandlung einer Raupe in einen Schmetterling. In Abbildung 1.2 ist rechts ein Schmetterling, ein Exemplar der Spezies Schwalbenschwanz, abgebildet. Das Bild links zeigt eine Raupe der selben Art. Diese zwei Erscheinungsformen sind phänotypisch sehr unterschiedlich, obwohl sie das gleiche Genom besitzen. Was das Aussehen und die Form bestimmt, ist das Proteom. Die Analyse verschiedener Proteome kann Aufschlüsse über wichtige Mechanismen geben. Neben der kompletten Analyse von bestimmten Proteomen, ist

die subtraktive Proteomanalyse ein wichtiger Bestandteil von Proteomics.



Abbildung 1-2: Gleiches Genom - unterschiedliches Proteom. (Raupe und Schmetterling der Spezies Schwalbenschwanz)

Bei der subtraktiven Proteomanalyse werden mindestens zwei verschiedene Proteomzustände auf Unterschiede analysiert. Man kann zum Beispiel gesunde Zellen mit kranken Zellen oder verschiedene Stämme eines Organismus oder Zellen zu unterschiedlichen Stadien des Zellzyklusses miteinander vergleichen. Die Unterschiede zwischen den Proteinmustern auf den 2-DE Gelen stellen sich in Form von Intensitäts- oder Positionsveränderungen von Spots dar. Proteinspots können auch in einem Zustand vorhanden sein wobei sie im anderen Zustand gar nicht zu detektieren sind. Die unterschiedlichen Proteine haben meist wichtige Aufgaben. Sie sind entweder an den Veränderungen beteiligt oder als Ergebnis der Veränderungen entstanden oder abgebaut worden. Die gezielte Suche nach solchen Proteinen, die mit dem speziellen Zustand assoziieren, kann bei Krankheiten für die Prognose, Diagnose oder für die Therapie von großer Bedeutung sein. Solche Proteine werden auch Target-Proteine genannt.

1.3 Methoden der Proteomanalyse

1.3.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Proteine können aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften voneinander getrennt werden. Schon in den 60er Jahren versuchten Wissenschaftler unterschiedliche Trennmethode miteinander zu koppeln um bessere Trennungen zu erzielen (Smithies und Poulik, 1956, Raymond und Ann, 1964, Hedrick und Smith, 1968, Margolis und Kenrick,

1967, 1969). Nach verschiedenen Entwicklungen stellte sich jedoch für Proteine die zweidimensionale Gelelektrophorese, eine Kombination aus isoelektrischer Fokussierung (IEF) und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, als die beste und effektivste heraus. Die IEF wurde erstmals von G. Dale (Dale und Latner, 1969) und V. Macko (Macko und Stegemann, 1969) eingeführt. Die SDS-PAGE wurde von U. K. Laemmli entwickelt (Laemmli, 1970). Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) wird in der ersten Dimension die IEF und in der zweiten Dimension die SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteine werden bei der 2-DE in einer Gelmatrix aufgetrennt. Die Trennung erfolgt in zwei Richtungen mit einem 90° Winkel zueinander.

Die IEF ist eine Auftrennungsmethode nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine. Abhängig von der Aminosäurezusammensetzung und dem pH der Umgebung können Proteine eine Nettoladung besitzen und sich somit in einem elektrischen Feld, angezogen von der entgegengesetzt geladenen Elektrode, bewegen. Wenn Proteine durch einen pH-Gradienten bewegt werden, dann ändert sich die Ladung je nach pH der Umgebung. Das Protein wandert, bis zu einem pH-Bereich, an dem es keine Nettoladung mehr hat. Diesen pH-Wert nennt man den isoelektrischen Punkt des Proteins. Der pH-Gradient in IEF-Gelen kann auf zwei Weisen aufgebaut werden. Bei der einen Art werden dem Gel Ampholyte zugesetzt. Ampholyte sind kleine Moleküle, die die Eigenschaft besitzen sowohl als Säure als auch als Base zu wirken. Sie besitzen eine positive und eine negative Ladung. Je nach pH-Wert der Umgebung bekommen sie eine Nettoladung und wandern im elektrischen Feld bis zu ihren isoelektrischen Punkten. Die Herstellung von Ampholyt-Gelen erfolgt nach den verbesserten Methoden von Klose und Kobalz aus dem Jahr 1995 (Klose und Kobalz, 1995). Die IEF-Gele werden in Glasröhrchen gegossen, die unterschiedliche Innendurchmesser besitzen können. Die Probe wird auf die Anodenseite des IEF-Gels aufgetragen. Die Fokussierung wird in vertikaler Position durchgeführt. Wegen des Gradientendriffs, einer Verschiebung des Gradienten in Richtung der Kathode mit zunehmender Fokussierungszeit, ist es ratsam die Fokussierung abubrechen, bevor alle Proteine ihren pI erreichen. Vor allem dauert die Fokussierung der großen Moleküle länger. Bis diese fokussiert werden, sammeln sich kleinere basische Moleküle am kathodischen Ende des Gels und die Trennung dieser Proteine wird somit verhindert. Aus diesem Grund wurde für Ampholytgele die 'non-equilibrium-pH-gel-electrophoresis' (NEPHGE) eingeführt (O'Farrell, 1977). Bei diesem System wird die IEF schon abgebrochen, bevor die Proteine ihren pI erreichen. Für eine optimale Reproduzierbarkeit wird nach einem konstanten Volt-Stunden-Produkt fokussiert. Bei der anderen Form des pH-Gradienten werden bestimmte Ampholyte in die

Gelmatrix mit einpolymerisiert. Da sie dann nicht mehr frei beweglich sind, nennt man sie Immobiline (Bjellqvist *et al.*, 1982, Görg *et al.*, 1988, 1995). Mit ihnen entsteht ein immobilisierter pH Gradient (IPG). Die IEF-Gele dieses Systems sind auf Folien eingetrocknet und käuflich erwerbbar. Diese Gele müssen vor dem IEF-Lauf rehydratisiert werden. Der Lauf wird in horizontaler Position durchgeführt.

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach dem Molekulargewicht der Proteine (Laemmli, 1970). Dieses Gel ist eine vernetzte, porige Matrix, durch die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes gesteuert werden. Größere Proteine können, limitiert durch die Porengröße, nicht so schnell vordringen. Kleinere Proteine hingegen kommen schneller voran.

Die Gelgröße wird durch die Größe der SDS-PAGE-Gelkammern vorgegeben. Als Standard werden Gele mit den Maßen von 7 x 8 cm (Kleingele) und 30 x 23 cm (Großgele) produziert. Die Geldicke kann je nach Anwendungsziel unterschiedlich gewählt werden. Die gängigen Dicken sind 0,75, 0,9 und 1,5 mm.

Bei der 2-DE werden die Proteine auf Proteinspezies-Basis voneinander getrennt (Jungblut *et al.*, 1996). Das bedeutet, daß je ein Spot, das auf 2-DE Gelen zu sehen ist, je eine Proteinspezies darstellt. Mit einer einzigen Modifizierung können sich die Eigenschaften der Proteine drastisch verändern. Wenn zum Beispiel ein Proteinmolekül, das nur aus einer Polypeptidkette besteht, zusätzlich kleine Gruppen wie eine Acetat-, Phosphat- oder Methylgruppe bindet, ändert sich, je nach *pI*-Wert und nachdem an welche Aminosäure die Gruppe bindet, der isoelektrische Punkt des Proteins. Viele Proteine besitzen mehrere kleine Gruppen und zu unterschiedlichen Zeiten können sie sich in unterschiedlichen Formen befinden. Andere Proteine können fragmentiert vorliegen. Jedes Fragment mit unterschiedlicher Länge würde an einer anderen Stelle im Gel liegen, somit würde das selbe Protein detektiert werden aber als unterschiedliche Spezies des Proteins. In der Praxis können auch zwei oder mehrere Proteinspezies unterschiedlicher Proteine in ein und dem selben Proteinspot vorkommen. Diese besitzen beinahe den gleichen *pI* und das gleiche Molekulargewicht oder werden durch bestimmte Umstände an den gleichen Ort fokussiert. Dieses Phänomen kommt öfters vor. Wenn zum Beispiel eine Proteinspezies in einer Probe in hoher Menge vorkommt, bedeckt es im 2-DE Gel eine etwas größere Fläche. Auf diese Weise kann diese eine Spezies viele andere nicht so häufig vorkommende Proteinspezies mit sehr ähnlichen Eigenschaften überdecken.

1.3.2 Proteindetektion auf Polyacrylamidgelen und Membranen

Proteine können auf Polyacrylamidgelen oder auf Blotmembranen mit verschiedenen Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Seit den 60er Jahren wird Coomassie-Brilliant Blau (CBB), ein Triphenylmethanfarbstoff, zur Färbung von Proteinspots verwendet. Es gibt zwei Arten dieses Farbstoffes, die CBB R-250 und die CBB G-250 Variante. Die Farbmoleküle unterscheiden sich darin, daß die G-Variante zwei zusätzliche Methylgruppen besitzt. Die Färbeprotokolle dieser Farbstoffe sind sehr unterschiedlich. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei CBB R-250 um 100 ng und bei CBB G-250 um 50-100 ng (Eckerskorn *et al.*, 1988, Neuhoff *et al.*, 1988). Die Färbung mit den Coomassie Farbstoffen erfolgt neben hydrophoben Wechselwirkungen hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen der Sulfonat-Gruppen, welche beide Varianten besitzen, mit den positiv geladenen Aminosäuren und dem eventuell positiv geladenen freien Aminoende der Proteine.

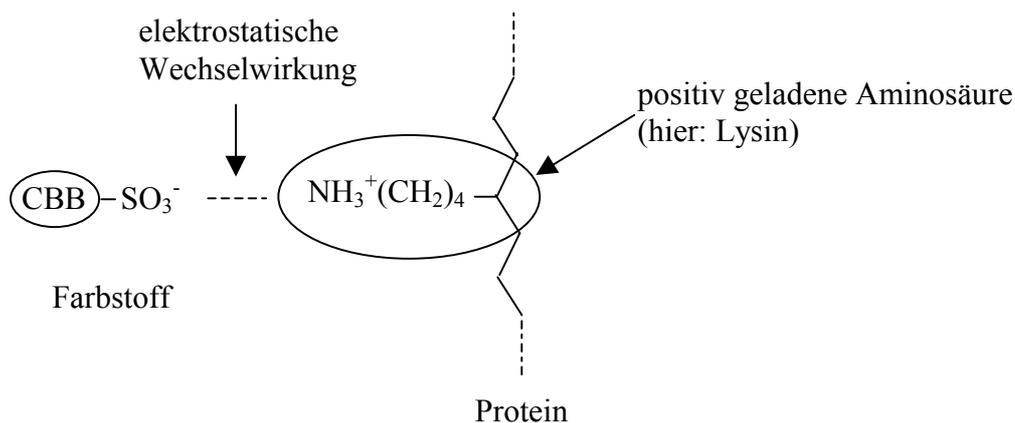


Abbildung 1-3: Elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Sulfonat-Gruppe des CBB Farbstoffs und der Ammonium-Gruppe von positiv geladenen Aminosäuren im Protein

Tal *et al.* fanden die Anzahl der gebundenen Farbstoffmoleküle pro positiver Ladung zwischen 1,5 und 3 variierend. Dies kam nach verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Proteinen heraus, die sie in Polyacrylamidgelen getrennt hatten (Tal *et al.*, 1985), wobei die Zahl abhängig von der Entfernung zweier positiver Ladungen zu sein scheint. Als einfachste Erklärung geben sie an, daß eine Sulfonat-Gruppe an eine positiv geladene Aminosäure elektrostatisch gebunden ist und zwei weitere hydrophobisch gebunden werden können. Es gibt jedoch auch Anzeichen auf sekundäre Bindungsstellen, wie die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin (Compton und Jones, 1985). Die Möglichkeit der Bindung von Farbmolekülen an andere Farbmoleküle, die an

Proteine gebunden sind, besteht auch (Wilson, 1979).

Eine weitere Färbemethode ist die Silberfärbung. Bei dieser Methode bilden sich keine spezifischen Bindungen zwischen Silber und den Proteinen. Die Silberionen binden an die Proteine unspezifisch und werden reduziert. Somit entsteht in geringen Mengen metallisches Silber. Dazu tragen die funktionellen Gruppen und die Peptidbindungen der Proteine bei. Mit einem zusätzlichen Reduktionsmittel werden alle Silberionen im Gel umgewandelt. Die Prozedur ist ähnlich wie die Entwicklung einer Fotografie. Die Umwandlung geht bei Silberionen, die an Proteinen gebunden sind, schneller voran als bei den freien Silberionen. Die Entwicklung muß nach einer gewissen Zeit gestoppt werden, damit nicht alle Silberionen umgewandelt werden. Die Proteinspots bekommen somit eine braune bis schwarze Färbung. Es gibt verschiedene Färbeprotokolle. Benutzt man Glutardialdehyd als Verstärker wird die Methode empfindlicher (Rabilloud, 1990, Jungblut und Seifert, 1990). Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei 1-10 ng Protein. Die Methode ohne Glutardialdehyd ist mit mindestens 5-10 ng Protein etwas weniger sensitiv (Shevchenko *et al.*, 1996).

Neben diesen beiden hauptsächlich eingesetzten Färbemethoden gibt es viele weitere Methoden, die hier nur kurz erwähnt werden sollen. Zum Beispiel gibt es die Zn-Imidazol Färbung mit einer Nachweisgrenze von ca. 100 ng Protein (Fernandez-Patron *et al.*, 1995). Bei der Fluoreszenzfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYPRO Orange oder SYPRO Red können zum Teil Proteine detektiert werden, die mit der Silberfärbung nicht detektiert werden. Die Sensitivität dieser Färbung ist mit der Silberfärbung mit Glutardialdehyd zu vergleichen (Steinberg *et al.*, 1996). Die sensitivste Detektion ist mit 1-100 pg die Detektion radioaktiv markierter Proteine (Jungblut *et al.*, 1987).

Für die Detektion der Proteine auf Blotmembranen gibt es ebenfalls unterschiedliche Färbemethoden. Hydrophobe Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranen können unter anderem mit den Farbstoffen wie Ponceau S (Salinovich und Montelaro, 1986), Amidoschwarz (Sanchez *et al.*, 1992) und CBB R-250 (Matsudaira, 1987) gefärbt werden. Nitrocellulose Membranen können mit CBB nicht gefärbt werden, da sich die gesamte Oberfläche blau färbt. Nitrocellulose ist hydrophil und die gesamte Oberfläche der Membran würde mit dem hydrophilen CBB-Farbstoff reagieren. Die anderen Blotfärbemethoden hingegen können ohne Bedenken eingesetzt werden.

Die Wahl der Proteinfärbung ist für die Identifizierungsmethoden sehr wichtig. Sie sollte mit der gewählten Identifizierungsmethode kompatibel sein.

1.3.3 Auswertung von zweidimensionalen Gelen

Die Auswertung von 2-DE Gelen kann sowohl visuell als auch digital mit Hilfe einer Auswertesoftware für 2-DE Gele durchgeführt werden. Dabei werden Intensitäts- und Positionsunterschiede sowie plus/minus Unterschiede detektiert. Unter einem plus/minus Unterschied ist folgendes gemeint. Wenn zwei Zustände verglichen werden, können in den Gelen des einen Zustands Proteinspots zu sehen sein, die entsprechenden Spots in den Gelen des anderen Zustands aber fehlen. Die visuelle Auswertung wird mit bloßem Auge erarbeitet. Hierfür braucht man Erfahrung und ein sehr gutes Einschätzungsvermögen. Viele Parameter, wie z.B. die Färbintensität der Spots, eingenommene Fläche, aber auch unterschiedlich starke Färbung der Gele, müssen berücksichtigt werden. Für eine computergestützte Auswertung müssen bestimmte Parameter von vornherein gleichbleibend eingestellt werden. Dies beginnt schon beim Einscannen der zu vergleichenden Gele. Scanparameter wie Auflösung, Helligkeit und Kontrast sollten bei allen Gelen gleich sein. Ein Auswerteprogramm rechnet die Informationen aus den bildlichen Darstellungen der Gele mit Hilfe bestimmter Algorithmen um und vergleicht diese Daten miteinander. Die Algorithmen der verschiedenen Auswerteprogramme sind unterschiedlich und kompliziert. Eine Möglichkeit der Auswertung ist, die Spotintensität in eine zweidimensionale Gaußkurve umzurechnen und diese zu vergleichen.

Es gibt zahlreiche Anbieter solcher Auswerteprogramme. Die Programme detektieren die Spots vollautomatisch und können die korrespondierenden Spots in verschiedenen Gelen wiedererkennen. Der Anwender muß die durchgeführten Schritte überprüfen und zum Teil manuell nacheditieren. Als erstes werden die Spots auf den Gelen detektiert. Nach der Editierung werden die Gele zueinander gematcht. Das heißt, auf den zu vergleichenden Gelen werden die Spots eines Gels mit den korrespondierenden Spots des anderen Gels als der gleiche Spot bestimmt. Auch das Matchen muß auf alle Fälle nachkontrolliert werden. Die Programme versuchen Spots, auch wenn sie in Form und Größe unterschiedlich aussehen, in verschiedenen Gelen einander zuzuordnen. Ein Vorteil der computergestützten Auswertung ist, daß man für jeden Spot einen Intensitätswert erhält. Diese Werte können direkt miteinander verglichen werden. Bei der visuellen Auswertung muß der Vergleich nach anderen Kriterien, wie z. B. Färbintensität des Gesamtgels, Intensität und Größe des zu vergleichenden Spots, Intensität und Größe von nicht-unterschiedlichen Spots, beurteilt werden. Einige der zur Zeit auf dem Markt erhältlichen Auswerteprogramme sind PDQuest (Garrels, 1989, PDI, Huntington Station, New York), Melanie II (Appel *et al.*, 1991, BioRad,

München), DELTA 2D (Decodon, Greifswald), PROTEOMWEAVER (Definiens, München) und TopSpot (Algorithmus, Berlin). Alle diese Auswerteprogramme haben unterschiedliche Vor- und Nachteile. Der erste Schritt, die Detektion von "interessanten" oder von mutmaßlich krankheitsassoziierten Proteinspots ist somit getan. Der folgende Schritt ist die Identifizierung dieser Proteine.

1.3.4 Identifizierung von Proteinen

Die gängigen Identifizierungsverfahren haben sich im Laufe der Zeit geändert. Bei der Identifizierung von Proteinen aus 2-DE Gelen wird man zuerst mit der Aufgabe konfrontiert, die Proteine aus dem Gelmaterial zu extrahieren. Hierzu wird entweder ein enzymatischer in-gel Verdau oder ein Transfer der Proteine auf eine Blotmembran durchgeführt. Die auf Membranen transferierten Proteine können entweder on-blot verdaut oder direkt verwendet werden. Nach dem Verdau eines Proteins erhält man Peptide, die sich leichter aus dem Gel oder Blot extrahieren lassen. Diese Methoden werden im folgenden einzeln erläutert.

1.3.4.1 N-terminale Sequenzierung

Heutzutage kann man mit der N-terminalen Sequenzierung Proteine oder Peptide bis zu einer Nachweisgrenze von 1-5 pmol identifizieren. Früher brauchte man sehr viel mehr Probenmaterial. Diese Technologie wurde durch die Verbesserung einzelner instrumenteller Komponenten verfeinert. Mit der Zeit wurden unterschiedliche Reagenzien zur Detektion der N-terminalen Aminosäure verwendet. War es am Anfang noch die Dinitrophenyl (DNP)-Methode mit dem sog. Sanger-Reagenz 2,4-Dinitrofluorbenzol, wurde diese später wegen erhöhter Empfindlichkeit durch die Dansyl-Methode mit Dansylchlorid (1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid) ersetzt (Gray und Hartley, 1963). Weitere gute Methoden hierfür sind die Dansylchlorid- und die FMOC-Methoden. Alle dieser Methoden haben einen großen Nachteil. Wenn sich das Reagenz an die N-terminale Aminosäure gebunden hat, müssen alle Peptidbindungen hydrolysiert werden. Auf diese Weise kann jeweils nur eine Aminosäure identifiziert werden. Eine starke Verbesserung brachte der schrittweise Abbau von Pehr Edman (Edman, 1950). Die N-terminale Aminosäure wurde mit Phenylisothiocyanat (PITC) umgesetzt. Das entstehende Derivat cyclisiert und gleichzeitig wird die nächste Peptidbindung gespalten. Das Derivat isomerisiert sich zweimal und es entsteht eine Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäure. Diese wird dann über eine

HPLC-Säule geleitet und über einen UV-Spektrometer identifiziert. Das Restpeptid bleibt intakt und hat jetzt eine freie Aminogruppe erhalten. Es kann nun einer neuen Abbaureaktion unterzogen werden. Mit den automatischen Geräten, die heute benutzt werden, kann man sowohl flüssige Proben als auch Proben auf PVDF-Membranen analysieren (Vandekerckhove *et al.*, 1985, Aebersold, 1986, Matsudaira, 1987). Indem die Aminosäuren schrittweise nacheinander detektiert werden, wird die Sequenz des Peptids ermittelt. Der einzige Nachteil der N-terminalen Sequenzierung ist die, daß bei N-terminal blockierten Peptiden keine Sequenzierung erfolgen kann. Die Aminogruppe des N-Terminus muß für die Reagenzien zugänglich sein.

1.3.4.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde als analytische Methode schon Anfang des letzten Jahrhunderts entwickelt und eingesetzt. Jedoch erst in den 80er Jahren entdeckte man sie für die Biowissenschaften. Ende der 80er Jahre wurden zwei "milde" Ionisierungstechniken entwickelt, mit denen der Einsatz von massenspektrometrischen Verfahren für Biomoleküle ermöglicht wurde. 1988 wurde die "matrix-assisted laser desorption/ionisation" (MALDI) Methode bekannt (Karas und Hillenkamp, 1988). Im selben Jahr wurde von Fenn *et al.* die "electrospray-ionisation" (ESI) Methode entwickelt (Fenn *et al.*, 1989). Obwohl diese Ionisierungstechniken eine bedeutende Voraussetzung für den Einsatz der Massenspektrometrie auf Biomoleküle darstellten, trugen auch Entwicklungen wie z.B. die Modifizierung der Probenpräparation und spezielle Software dazu bei (Mann *et al.*, 2001).

Massenspektrometer detektieren Ionen im gasförmigen Zustand. Biomoleküle, wie Proteine oder Peptide, in den gasförmigen Zustand zu bringen, ohne sie zu beschädigen, ist nicht einfach. Bei der MALDI-Methode wird eine kleine Menge an Probe oder Analyten mit einer verhältnismäßig großen Menge an Matrixmolekülen in saurer Lösung vermischt. Es wird ein 10^3 - 10^4 facher Überschuß an Matrix empfohlen. Dieser Überschuß wird für den Schutz der Analytmoleküle benötigt. Sonst würde der Laser direkt auf die Analyten wirken und sie zerstören. Als Matrix werden Verbindungen verwendet, die die Eigenschaft haben Lichtenergie zu absorbieren. Für die Messung wird ein Teil der Lösung auf einen Metallträger pipettiert. Nach Verflüchtigung des Lösungsmittels kristallisiert die Matrix mit den Analytmolekülen aus. Wird solch ein Kristall mit einem gepulsten Laser bestrahlt, nehmen die Matrixmoleküle die Energie des Lasers auf. Diese Energie oder ein Teil davon wird an die Analyten weitergegeben. Dieser Energietransfer bewirkt die Desorption und gleichzeitig die

Ionisation der Analytmoleküle. Es entstehen einfach protonierte Ionen. Der genaue Vorgang der Ionisation ist noch unbekannt (Karas und Hillenkamp, 1988, Mann *et al.*, 2001). Als Laserquelle wird meistens ein Stickstoff Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm benutzt. Diese Wellenlänge ist im ultravioletten Strahlungsbereich. In Abbildung 1.4 ist die MALDI Ionisation vereinfacht dargestellt.

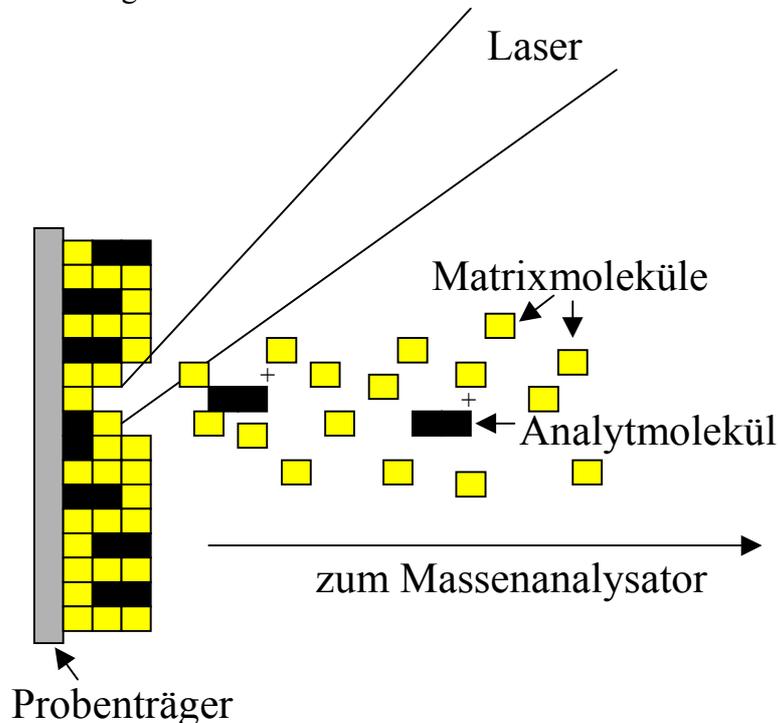


Abbildung 1-4: Matrix gestützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

Die ESI-Ionisation beruht auf dem Prinzip, daß eine flüchtige Probe in einen kleinen Hohlraum gesprüht wird. Dazu werden die Analytmoleküle direkt aus der Lösung mit Hilfe einer Nadel oder einer Kapillare, an der eine Spannung angeschlossen ist, in den gasförmigen Zustand gebracht. Hierbei entstehen zuerst positiv geladene Tröpfchen. Durch die Verflüchtigung des Lösungsmittels werden die Tröpfchen immer kleiner und kleiner. Am Ende bleiben nur noch die geladenen Analytmoleküle übrig. Diese stoßen sich wegen der Ladung voneinander ab. Diese elektrostatische Zerstreung wird Elektrospray genannt. Es gibt verschiedene Theorien zur ESI-Ionisation, die aber noch immer nicht im Detail verstanden wird. Die Ionisation bei der ESI-Methode passiert unter atmosphärischen Bedingungen und ist deshalb sehr mild. Die Analyten müssen nur polar genug sein damit sie sich protonieren lassen. Bei der ESI-Ionisation entstehen neben einfach protonierten Ionen auch mehrfach protonierte Ionen (Fenn *et al.*, 1989).

Neben der Ionisation der Analyten ist die Massenanalyse ein weiterer wichtiger Bestandteil in der Massenspektrometrie. Im Laufe der Zeit wurden drei unterschiedliche Techniken entwickelt. Eine der Methoden beruht auf dem Prinzip der Massentrennung nach der Flugzeit (time-of-flight, TOF-MS). Bei den anderen Methoden erfolgt die Trennung durch ein mit Metallstäben erzeugtes elektrisches Quadrupolfeld ('quadrupole MS') oder durch selektive Ausstoßung von Ionen aus einem Feld, das eine dreidimensionale Falle darstellt ('ion trap MS'). Mit der Messung einer Probe, die aus z. B. einem Peptidgemisch besteht, können mit einem dieser Massenanalysatoren die Massen der Peptide aus der Probe ermittelt werden. Durch eine Hintereinanderschaltung von zwei Massenanalysatoren kann eine gezielte Sequenzierung der Peptide erzielt werden. Dieses Verfahren wird als Tandem MS bezeichnet und kann sowohl mit zwei gleichen Analysatoren als auch mit zwei unterschiedlichen Analysatoren hintereinandergeschaltet durchgeführt werden. Alle drei Analysatortypen können mit MALDI und mit ESI, als Ionenerzeugungsmethode, gekoppelt werden. Es werden aber die Verknüpfungen MALDI mit einem TOF-Analysator und ESI mit dem Quadrupol oder dem Ion Trap Analysator bevorzugt.

Ein TOF-Analysator trennt die Ionen in einem Flugrohr. Alle Prozesse geschehen im Hochvakuum. Die desorbierten positiv geladenen Ionen werden zunächst durch eine Gegenelektrode angezogen. Diese Gegenelektrode, auch Grid (Gitter) genannt, bewirkt eine Beschleunigung der Ionen bevor sie in das Flugrohr eintreten. Alle Ionen nehmen die gleiche kinetische Energie auf, bewegen sich aber wegen ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. So treffen auf dem Detektor zuerst kleine Ionen und zum Schluß erst die großen Ionen. Es gibt Geräte mit einfachem linearem Flugweg oder mit am Ende dieses Weges befindlichen Reflektoren, die die Ionen in eine andere Richtung lenken. Somit wird der Flugweg verlängert und die Genauigkeit der Detektion verbessert (Mamyrin, 1994). In Abbildung 1.5 ist ein Reflektron-TOF-Massenanalysator vereinfacht dargestellt.

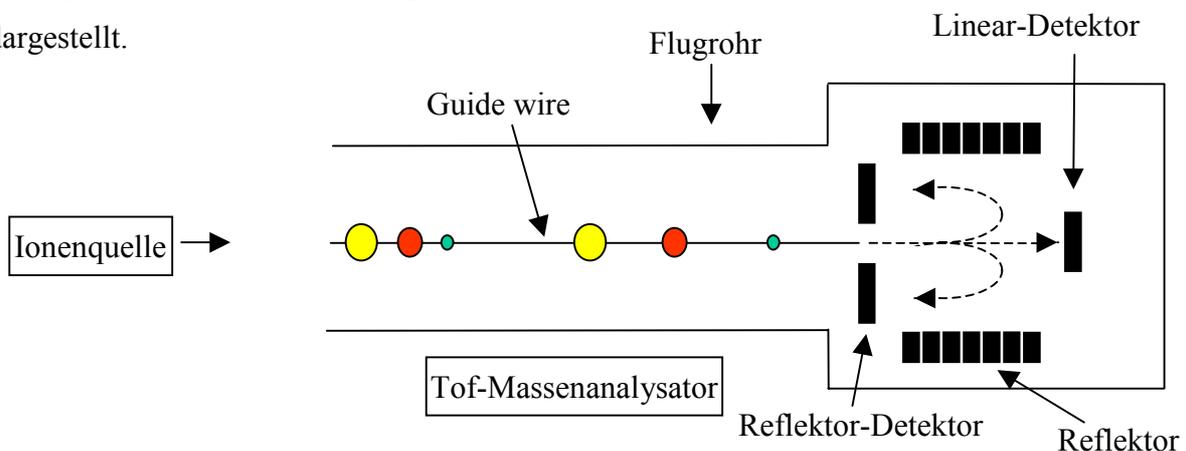


Abbildung 1.5: Ein Reflektron-TOF-Massenanalysator

In einem Quadrupol-MS besteht das Quadrupol aus vier Metallstäben. Es wird ein oszillierendes elektrisches Feld an das Quadrupol angeschlossen und so wirkt es als ein Massenfilter. Es kann Ionen mit einer bestimmten Masse erfassen. Diese wandern auf ihrer Flugbahn ungestört weiter, alle anderen Ionen werden aus ihrer Bahn geworfen und erreichen somit den Detektor nicht. Die meisten Geräte besitzen drei Quadrupole hintereinander (triple quadrupole). Das Erste hat die Aufgabe die Analytione nach ihren Massen aufzutrennen. Interessiert man sich für ein bestimmtes Peptid, kann dieses im zweiten Quadrupol weiter fragmentiert werden. Die entstandenen Fragmente fliegen in das dritte Quadrupol und werden dort nach ihren Massen aufgetrennt (Fenn *et al.*, 1989). Diese Vorgehensweise ermöglicht die Sequenzierung von Peptiden. Da unterschiedliche Massenanalysatoren unterschiedliche Vorteile haben, wurde auch eine Kombination von verschiedenen Analysatoren konstruiert. So wurde z.B. in einem Q-TOF Massenspektrometer das dritte Quadrupol durch ein Flugrohr ersetzt (Shevchenko *et al.*, 1997).

Die dritte Art der Massenanalyse erfolgt mit einer Ionenfalle. Der kontinuierliche Ionenstrahl füllt zuerst ein dreidimensionales elektrisches Feld (Louris *et al.*, 1987, 1989, Jonscher und Yates, 1997). Durch gezielte Änderung des elektrischen Feldes können Ionen unterschiedlicher Massen nacheinander aus der Falle gelassen werden. Auf diese Weise erhält man das Massenspektrum. Für eine MS/MS Messung werden alle Ionenspezies, außer der, für die man sich interessiert, aus der Trap herausgeschleust und nur die übrig gebliebene Ionenspezies in der Falle weiter fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden dann auch in der Falle analysiert und am Detektor die Massen ermittelt. Das Massenspektrum einer MS/MS Messung ist sehr viel komplexer und gibt Informationen über die Sequenz des fragmentierten Ions. Die Sensitivitäten und Genauigkeiten der einzelnen Massenspektrometer können unterschiedlich sein. Je nach Aufgabenstellung muß das geeignete Gerät eingesetzt werden.

Zur Identifizierung eines Proteins wird in der Regel zuerst ein 'peptide mass fingerprint' (PMF) des Proteins aufgenommen. So wird ein Massenspektrum des Peptidgemisches eines fragmentierten Proteins genannt. Aus 2-DE Gelen zu analysierende Proteine werden zuerst enzymatisch oder chemisch in Peptide gespalten. So können die Peptide aus dem Gelmaterial extrahiert werden. Es entsteht ein Gemisch aus unterschiedlich langen Peptiden. Wenn ein Protein mit einem bestimmten Enzym fragmentiert wird, erhält man mit dem Einsatz desselben Enzyms auch immer wieder die gleichen Fragmente. Daher ist ein solches Fragmentgemisch mit einem charakteristischen Fingerabdruck vergleichbar.

Für die Spaltung eines Proteins in Peptide werden gewöhnlich Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Lys-C oder Asp-N benutzt. Diese Enzyme haben die Eigenschaft nur nach oder vor bestimmten Aminosäuren zu spalten. Zum Beispiel spaltet Trypsin nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Das Enzym Asp-N spaltet die Peptidbindung vor Aspartaten. Eine chemische Fragmentierung kann durch den Einsatz von Cyanbromid (CNBr) erzielt werden. CNBr spaltet Proteine nach der Aminosäure Methionin. Durch diese Eigenschaft der Enzyme oder des Cyanbromids kann man ein Polypeptid immer wieder in die selben Fragmente teilen. Nach der Fragmentierung können die Peptide in Lösung gebracht werden. Dieses Peptidgemisch wird in eine für die Massenspektrometrie kompatible Lösung gebracht und als Ganzes ohne weitere Fraktionierung vermessen. Es resultiert ein Massenspektrum, welches für dieses Protein einen charakteristischen Peptidmassen-Fingerabdruck liefert. Diese Spektren werden zuerst kalibriert. Dann werden alle Peaks markiert. Die so erhaltene Peptidmassentabelle kann in unterschiedliche Suchprogramme eingegeben und über Proteindatenbanken identifiziert werden.

1.3.4.3 Weitere Identifizierungsmethoden

Neben der 2-DE Methode als Trennverfahren für Proteine haben sich auch andere Methoden etabliert bzw. unterliegen gerade weiteren Entwicklungsschritten. Neben den Vorteilen, wie z. B. Trennung von einer sehr großen Anzahl an Proteinspezies mit einem Mal, gute Trennresolution, Visualisierung von Proteinspezies auf dem Gel, Trennung von Proteinen über einen großen Massen- und *pI*-Bereich, gibt es auch einige Nachteile. Proteine, die in geringerer Konzentration als der Detektionslimit der Färbung vorliegen, können nicht detektiert werden. Die Proteine, die erfaßt werden, sind wahrscheinlich nur der kleine Teil, die in großen Konzentrationen vorhanden sind. Ein weiterer Nachteil der 2-DE ist die Schwierigkeit Membranproteine zu detektieren. Membranproteine sind hydrophobe Proteine, die sehr schwer in Lösung zu bringen sind. Man versucht dieses Problem mit dem Einsatz von Detergentien zu lösen. Ein anderer Punkt ist, daß bei der 2-DE Proteine im Massenbereich von etwa 10 bis etwa 150 kDa erfaßt werden. Alle anderen, die kleiner als 10 kDa oder größer als 150 kDa sind, bleiben nicht im Gel oder gehen gar nicht erst hinein.

Viele Forschungsgruppen bevorzugen daher andere Techniken, wie z.B. die Flüssigkeitschromatographie und kombinieren sie mit der Massenspektrometrie. Nach der Entwicklung der ESI-MS wurde die Kombination von Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie optimiert. Somit entstand die "liquid-chromatography-mass

spectrometry" (LC-MS). Im Laufe der Zeit hat sich daraus die Multidimensionale-LC (MDLC) entwickelt. Bei dieser Methode können Proteine je nach Interesse nach unterschiedlichen Eigenschaften, wie Hydrophobizität, Hydrophilität, Größe, usw. fraktioniert werden und die einzelnen Fraktionen werden dann massenspektrometrisch vermessen. Nachteile dieser Methode sind die Notwendigkeit von großen Probenmengen, Probenverluste während der Chromatographie und Erhalt von einer großen Anzahl von Chromatogrammen und Massenspektren. Es kann auch kein quantitativer Vergleich der Proteine zwischen zwei Zuständen gemacht werden. Ein Vorteil gegenüber der 2-DE ist die Erfassung einiger Proteine, die außerhalb der Bereiche der 2-DE Gele liegen. Bei der LC-MS werden die Fraktionen direkt in ein MS/MS-Gerät geschleust, so daß gleich eine Sequenzierung vorgenommen werden kann.

Eine andere Methode ist die Isotopen-markierte Affinitätschromatographie (engl. isotope-coded-affinity-chromatography), die auch mit einem Massenspektrometer gekoppelt ist (Gygi *et al.*, 1999). Hier werden an die Cysteine der Probenproteine zwei unterschiedliche Linker gebunden. Diese Linker werden 'isotope-coded-affinity-tag' (ICAT)-Reagentien genannt und unterscheiden sich nur in der Masse des Mittelteils. Der Mittelteil des ICAT-Reagens besteht aus einer Kohlenwasserstoffkette mit acht Wasserstoffatomen bzw. acht Deuteriumatomen, wobei dieses auch schweres Reagens genannt wird. An einem Ende tragen die ICAT-Reagentien Biotin, das zu ihrer Erkennung dient. Die zu vergleichenden Proben des einen Zustands werden mit dem leichten ICAT und die Proben des zweiten Zustands mit dem schweren ICAT inkubiert. Nach der Inkubation werden beide Proben vermischt. Dieses Gemisch wird dann enzymatisch fragmentiert. Das Peptidgemisch wird nun über eine Avidinsäule geführt und es sollten theoretisch nur die Peptide, die mit dem ICAT-Reagens gekoppelt sind, säulenchromatographisch getrennt werden. Nach der Trennung enthält das Eluat nur die cysteinhaltigen Peptide gekoppelt an die ICAT-Reagentien beider Proben. Dieses Eluat wird dann massenspektrometrisch vermessen. Für ein Peptid, das in beiden Proben enthalten ist, sieht man auf dem Spektrum je zwei Peaks, die nur 8 Da Massenunterschied voneinander haben. Dieser 8 Da Unterschied kommt nur von den acht Deuteriumatomen. Der Peak mit dem kleineren m/z (Masse/Ladung) Wert kommt aus der Probe, die mit dem leichten ICAT-Reagens und der Peak, der 8 Da größer ist, kommt aus der Probe, die mit dem schweren ICAT-Reagens gekoppelt wurde. Wenn man solche Peakpaare detektiert hat, muß man noch die Massen für die Kopplungsreagentien abziehen und erhält die Masse für das jeweilige Peptid. Die Intensität der Peaks kann sehr unterschiedlich sein. Theoretisch zeigen solche Spektren auf diese Weise eine quantitative Darstellung der Peptide

und damit indirekt der Proteine. Diese Spektren führen jedoch noch zu keiner Identifizierung. Über MS/MS Messungen können dann ausgesuchte Peptide fragmentiert werden, um Sequenzinformationen zu erhalten. Mit diesen Methoden kann man auch die Proteine erfassen, die kleiner als 10 kDa und größer als 150 kDa sind. Bei der ICAT-Methode können Aussagen über die Quantitäten der Proteine gemacht werden. Allerdings können nur Proteine, die die Aminosäure Cystein beinhalten auch ermittelt werden. In der Praxis funktioniert diese Methode noch nicht einwandfrei, weitere Verbesserungen müssen eingefügt werden.

1.3.5 Proteindatenbanken

1.3.5.1 Proteinsequenzdatenbanken

Es gibt unterschiedliche Arten von Datenbanken, die man als Proteindatenbanken bezeichnet. In Proteinsequenzdatenbanken werden alle Proteinsequenzen gesammelt, die vorher auf DNS (Deoxyribonukleinsäure) Ebene untersucht und von der DNS übersetzt wurden. Diese Datenbanken sind öffentlich und frei zugänglich. Zwei dieser Datenbanken sind die NCBI- (National Center for Biotechnology Information) und die SwissProt-Datenbanken. Sie beinhalten verschiedene Informationen über die eingetragenen Proteine, wie z.B. die Proteinsequenz, den Gennamen, den Genort und falls bekannt die Funktion. Bisher wurden Gene von unterschiedlichen Organismen analysiert. Die Sequenzierung von zahlreichen Genomen ist auch schon abgeschlossen.

Die Gensequenzierung erfolgt durch Sequenzierung von kurzen, sich überlappenden DNS Fragmenten. Dies geschieht auf diese Weise, daß die Fragmente durch Replikationsreaktionen gelesen und repliziert werden. Das heißt, ein DNS-Stück wird gelesen und die komplementären Nukleotide reihen sich gegenüber an. Für diese Reaktionen werden ein Primer, freie Nukleotide und eine DNS-Polymerase benötigt. Der Primer ist ein kleines Stück DNS, das etwa 20-30 Nukleotide lang ist und dem 5'-Ende komplementär ist, so das es damit hybridisieren kann. Ein kleiner Teil der freien Nukleotide sind Dideoxynukleotide, die an dem 3'-Kohlenstoff des Riboserings statt einer Hydroxylgruppe ein Wasserstoffatom besitzen. Dadurch kann an dieses Nukleotid kein anderes drangehängt werden. Somit wird die Replikation an dieser Stelle gestoppt. Solch ein stoppendes Nukleotid kann theoretisch an jeder Nukleotidstelle vorkommen. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange Replikanten. Alle Dideoxynukleotide sind chemisch modifiziert so das sie unter UV-Licht fluoreszieren. Jede der vier Nukleotiden fluoresziert anders, so daß sie in einer anderen Farbe

leuchten. Trennt man alle Replikanten nach ihrer Größe mit Hilfe der Gelelektrophorese auf, so erhält man ein Gelmuster auf dem jede Bande einem Replikanten entspricht, der um ein Nukleotid länger ist als der Replikant in der Bande darunter. Anschließend wird die Sequenz aufgrund der Farbe der Banden abgelesen. Da sich die DNS-Stücke überlappen, kann man aus den Sequenzen der kleineren Stücke die Sequenz des Ausgangsstücks ableiten. Dies ist meistens nicht so einfach, da das Zusammenstellen der Teile einem Puzzlespiel gleicht. Außerdem sind solche Sequenzierungen nicht fehlerfrei. Die Reinheit des Templates spielt eine große Rolle. Die Qualität des Elektrophoresesegels, die Sensitivität der Detektion und das Lesen des Gels sind weitere Faktoren für die Richtigkeit der Sequenz.

Sequenziert eine Wissenschaftlergruppe ein Gen, wird die Sequenz in Gensequenzdatenbanken und die Übersetzung zum Protein in Proteinsequenzdatenbanken eingetragen. Diese Datenbanken können durchsucht und abgefragt werden. Wenn ein Teil eines Proteins über die N-terminale Sequenzierung sequenziert oder das PMF eines Proteins ermittelt wird, wird auf solche Proteinsequenzdatenbanken zurückgegriffen. Über spezielle Softwareprogramme kann man eine Suche starten, in dem man die ermittelten Teilsequenzen oder Peptidmassen in das Programm eingibt.

Bei Sequenzergebnissen wird die eingegebene Sequenz mit allen Sequenzen der Datenbank verglichen. Alle Proteine, die das gleiche Sequenzstück beinhalten, werden als Resultate angegeben. Bei PMF-Ergebnissen erhält man eine Liste von Massen, die einigen Peptiden des Proteins nach Trypsinspaltung entsprechen. Die Programme, die mit solch einer Eingabe die Proteinsequenz finden, die diese Peptide besitzen, arbeiten nach dem Prinzip der höchsten Wahrscheinlichkeit, daß so viele Peptide wie möglich zusammen in einem Protein vorkommen und das mit einer möglichst hohen Massengenauigkeit. Bei den Suchen kann man Einschränkungen vornehmen. Es kann z. B. nur in den Einträgen von bestimmten Organismen gesucht werden. Oder es kann durch Limitierung der M_w - und/oder pI -Werte in bestimmten Bereichen gesucht werden. Die Resultate der Suchen müssen gut abgewägt werden. Nicht immer ist das Resultat, das an erster Stelle steht, wirklich das richtige Ergebnis. Das Auswerten der Suchergebnisse ist ein bedeutender Teil der ganzen Arbeit. Viele Kriterien müssen berücksichtigt werden. Mit Erfahrung kann man die Zuordnung auch richtig bewerkstelligen. Erhält man aber kein eindeutiges Resultat, so kann es sein, daß dieses Protein aus dem bestimmten Organismus bisher weder als Protein noch als Gen sequenziert wurde. Dann würde man eine homologe Sequenz aus einem anderen Organismus als Resultat erhalten. Manche Proteine können auch in der untersuchten Probe modifiziert vorliegen und würden deshalb keine 100%ige Übereinstimmung mit der in der Datenbank aufgeführten

Sequenz ergeben. Die Ergebnisse aus den Analysen, die Proteinnamen und die möglichen Unterschiede zu den Datenbanken, sind sehr wichtig. Im nächsten Schritt müssen die Ergebnisse in Zusammenhang mit den Bedingungen und der Beschaffenheit der untersuchten Proben gebracht werden. Wurde z.B. eine subtraktive Proteomanalyse zwischen gesunden und kranken Zellen durchgeführt, müssen die Ergebnisse nun in Zusammenhang mit der Krankheit gebracht werden.

1.3.5.2 2-DE Datenbanken

Als Proteindatenbanken werden auch solche Datenbanken bezeichnet, die die Ergebnisse von Proteomanalysen zusammenfassen. 2-DE Datenbanken enthalten ein Referenzgel der untersuchten Probe und verschiedene Informationen zu den identifizierten Proteinen. Diese Proteindatenbanken spiegeln das Proteom eines Organismus unter bestimmten Bedingungen zu einer bestimmten Zeit wieder. Die Datenbanken sind so aufgebaut, daß man Abfragen nach bestimmten Proteinen durchführen oder Proteine mit bestimmten Eigenschaften anzeigen lassen kann. Die wichtigste Eigenschaft solcher Datenbanken ist die, daß sie eine Referenz für die untersuchte Probe unter den bestimmten Bedingungen, die angegeben sind, darstellen. Man kann in weiteren Versuchen Veränderungen an der Probe oder an den Bedingungen vornehmen und die Ergebnisse mit den Einträgen in der Datenbank vergleichen. Verschiedene 2-DE Proteindatenbanken wurden schon erstellt. Die meisten 2-DE Datenbanken sind unter der "WORLD-2DPAGE" (<http://www.expasy.org/ch2d/2d-index.html>) auf dem "ExPASy Molecular Biology Server" zusammengestellt. Der ExPASy (Expert Protein Analysis System) Server befindet sich im schweizerischen Bioinformatik Institut (SIB) und ist ein Proteomics Server, der von einer Gruppe von Wissenschaftlern betrieben wird, die sich der Analyse von Proteinsequenzen und -strukturen verschrieben hat.

1.4 Mausmodelle

Mit Experimenten an Tieren versuchen Wissenschaftler unter anderem Reaktionen und Zusammenhänge des Metabolismus zu erkennen und zu verstehen. Auf diese Weise konnten bisher sehr viele wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Den lebenden Organismus verstehen zu können und bei Fehlfunktionen den Fehler zu beheben oder die Ausmaße des Fehlers zu verringern, das ist das Hauptziel der Forschung.

Obwohl mit vielen unterschiedlichen Tierarten geforscht wird, stellt die Maus ein sehr geeignetes Modell für den Menschen dar. Der hauptsächliche Grund hierfür liegt in der hohen genetischen Homologie des Mausgenoms zum Genom des Menschen. Mäuse werden schon seit vielen Jahrhunderten für wissenschaftliche Zwecke in der Forschung eingesetzt. Der erste verzeichnete Mäuseversuch wurde im Jahr 1664 von Robert Hooke durchgeführt. Am Anfang des 20. Jahrhunderts erstellte Clarence Cook Little den DBA (dilute brown non-agouti) Stamm, den ersten Inzucht-Mäusestamm. 1921 züchtete Little den Mäusestamm C57BL. Dieser Stamm wurde später zu einem der am meisten benutzten und wichtigsten Stämme für die Genetiker (Pennisi, 2000).

Seitdem 1980 ein fremdes Gen erfolgreich in das Genom einer Maus transfiziert wurde, eröffneten sich neue Möglichkeiten für die Wissenschaftswelt (Gordon *et al.*, 1980). Mit dieser Technologie wurden seither unterschiedliche Gene transfiziert und die Auswirkungen untersucht. Tiere, die die transfizierten Gene exprimieren, werden transgene Tiere genannt. Die Erkenntnisse seit diesen ersten Versuchen zeigen, daß die Transfektion humaner Gene in Tiere gut durchführbar ist und dadurch wichtige Einblicke in die Humanbiologie gewonnen werden können. Den Wissenschaftlern werden vor allem die Untersuchungen von Humankrankheiten und ihrer Behandlungen ermöglicht (Crystal, 1995). 1987 wurde durch Mario Capecchi's Gruppe die erste 'knockout' Maus hergestellt. Die Herstellung erfolgte durch gezielte Manipulation von embryonalen Stammzellen. 1998 entstand der erste Mausklon. Mit der transgenen Technologie ist es möglich für jedes einzelne Gen ein Modell zu generieren. Der Anzahl an möglichen Stämmen ist keine Grenze mehr gesetzt.

1999 wurde das 'Mouse Genome Sequencing Consortium' gegründet, das mit der Sequenzierung des Mausgenoms begann. Schließlich, am 5. Dezember 2002 wurde ein, zu 95% fertiger Entwurf des sequenzierten Mausgenoms veröffentlicht (Waterston *et al.*, 2002). An der Sequenzierung waren 26 Institute aus sechs Ländern beteiligt. Die Sequenzierung wurde an dem C57BL/6J Mäusestamm durchgeführt. Das Genom der Maus besteht aus ca. 2,5 Gigabasen und enthält etwa 30 000 Gene auf insgesamt 40 Chromosomen. Nach dem Vergleich dieses ersten Entwurfs des Mausgenoms mit dem humanen Genom wurden zu 90% der humanen Gene ein Gegenstück im Mausgenom gefunden (Waterston *et al.*, 2002).

Ein weiterer Grund warum die Maus ein geeignetes Modell darstellt, ist das Bestehen von vergleichbaren physiologischen Systemen wie z. B. das Immun-, Nerven- oder Endokrinsystem. Zudem entwickeln Mäuse vergleichbare Krankheiten wie Arteriosklerose, Diabetes oder Krebs ganz natürlich. Krankheiten, die bei der Maus natürlicherweise nicht

vorkommen, wie z. B. zystische Fibrose oder die Alzheimer Krankheit können durch Manipulation des Genoms induziert werden (Spencer, 2002). Außerdem ist die Aufzucht von Mäusen leicht und die Generierungszeit von Nachkommen ist mit 2-3 Monaten verhältnismäßig kurz. Bei einer Geburt werden 6-12 Jungen geboren, was den Zeitfaktor eines Projektes beeinflusst. Außerdem können Embryonen wertvoller Stämme eingefroren und so über längere Zeiträume gelagert werden.

Bei der Erzeugung transgener Tiere werden hauptsächlich zwei Methoden verwendet. Diese Methoden sind a) die Mikroinjektion eines Genkonstrukts in die befruchtete Eizelle und b) die gezielte Manipulation eines bestimmten Gens in embryonalen Stammzellen. Nach beiden Methoden wird das Transgen an die Nachkommen nach der Mendelschen Verteilung weitergegeben.

Bei der Mikroinjektion erfolgt der Transfer von mehreren Kopien (bis zu einigen Hundert) eines Genkonstrukts in einen der Vorkerne (pronucleus) einer befruchteten Eizelle. Die ovulierte befruchtete Eizellen werden den Weibchen entnommen während die Eizellen noch im Vorkernstadium sind. Im Vorkernstadium enthält die Eizelle einen haploiden (einfacher Chromosomensatz) Vorkern von der Mutter und einen halpoiden Vorkern vom Vater. Innerhalb von 12 Stunden verschmelzen diese Kerne miteinander. Nach der Mikroinjektion wird das Transgen in das Genom der Maus zufällig eingebaut. Die mikroinjizierten Eizellen werden anschließend in ein scheinchwangeres Weibchen eingepflanzt und durch sie ausgetragen.

Bei der Transformation von embryonalen Stammzellen werden diese Zellen in Kultur mit einem bestimmten Vektor manipuliert. Der zielgerichtete Vektor ersetzt ein ganz bestimmtes Segment der DNS der Stammzellen. Dies wird auch als 'gene targeting' bezeichnet. Das eingebaute Genkonstrukt enthält zusätzlich Resistenzgene durch die eine Selektion der Zellen, die das Konstrukt wirklich eingebaut haben, möglich ist. Die transformierten Stammzellen werden dann in Mausblastocysten injiziert und diese dann in Mäuse eingepflanzt (Gossler *et al.*, 1986).

Seit Anfang der 90er Jahre gibt es eine weitere Methode, bei der durch gezielte gewebsspezifische Deaktivierung eines bestimmten Gens ein 'konditionaler' Knockout möglich ist. Auf diese Weise kann zu einem bestimmten Zeitpunkt des Mauslebens ein Knockout induziert werden, der sich nur in einem bestimmten Organ zeigt (Lakso *et al.*, 1992, Orban *et al.*, 1992).

Die Sequenzierung der Gene stellt nur den ersten Schritt zu ihrer funktionellen Analyse dar, daher muß mit anderen Technologien und auf anderen Ebenen weitergeforscht

werden. Untersuchungen auf der Proteinebene oder der RNS (Ribonukleinsäure) Ebene sind daher unentbehrlich. Proteomics- und Transkriptomics-Analysen haben sich in den letzten Jahren stark vermehrt. Nach dem humanen Genomprojekt wurde im Jahre 2001 das humane Proteomprojekt gestartet (<http://www.hupo.org/>, HUPO, 1st World Congress, 2002).

Mit der Generierung von zahlreichen Mausekrebsmodellen wurde auf dem Gebiet der Krebsforschung in den letzten Jahren auf molekularer und Protein-Ebene das Verständnis über Wachstum und Differenzierung erweitert. Wachstumsfaktoren, die wichtige Regulatoren für die Zellteilung und Differenzierung sind, scheinen große Rollen in der Entstehung von Entwicklungsfehlern und von Krebs zu spielen (Aaronson, 1991). Die Einflüsse zahlreicher Onkogene (z. B. SIS, erbB) und Tumor-Suppressorgene (z. B. p53, RB Retinoblastoma Gen, werden auf diese Weise untersucht.

1.5 Krebs

Die Krankheit Krebs gibt es wahrscheinlich schon seit den Anfängen der Menschheit. Mehrere Jahrtausende alte Überlieferungen bezeugen Krebsdiagnosen der damaligen Ärzte. Die ältesten Beweise sind Manuskripte und Mumien aus dem alten Ägypten. Die Skelette der Mumien weisen Knochentumoren auf. Die älteste Beschreibung von Krebs finden wir in dem Edwin Smith Papyrus, das in Ägypten gefunden und auf etwa 1600 Jahre vor unserer Zeitrechnung datiert wurde. In diesem Schreiben werden acht Fälle von Tumoren und Geschwüren beschrieben. Den Namen bekam diese Krankheit vom "Vater der Medizin", dem griechischen Mediziner Hippocrates (460-370 v. Chr.). Inspiriert von der Form eines Krebses, wie er die Ausbreitung der Krankheit sah, benutzte er den Begriff *carcinus* zur Beschreibung von Nicht-Geschwür-bildenden und *carcinoma* für Geschwür-bildende Tumoren. Nach Hippocrates gab es sehr viele Wissenschaftler, die sich mit derartigen Krankheiten beschäftigten. Die Untersuchungen an Verstorbenen brachten viele neue Erkenntnisse über den Körper des Menschen. Im Jahre 1761 führte der Mediziner Giovanni Morgagni die Autopsie ein. Die pathologischen Ergebnisse versuchte er mit der Krankheit in Verbindung zu setzen. Somit wurden die Voraussetzungen für die wissenschaftliche Onkologie geschaffen. Die Entwicklung des Mikroskops im 19. Jahrhundert schaffte die wissenschaftliche Basis, die für die moderne pathologische Untersuchung des Krebs' nötig war. Mit dem Einsatz des Mikroskops versuchte Rudolf Virchow als erster die mikroskopische Pathologie mit der Krankheit zu korrelieren. Diese Methode erlaubte eine genauere Diagnose und bessere Untersuchung des Gewebes (http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric_2_6x_the_history

_of_cancer_72.asp?sitearea=cri).

Die Wissenschaft hat seither viele Errungenschaften erzielt. Mögliche Ursachen, die zum Krebs führen, wurden erkannt. Die genauen Entstehungsmechanismen jedoch konnten bisher nicht nachvollzogen werden. Die Listen der möglichen Ursachen sind lang. Veränderungen im Erbgut, d.h. Mutationen in der DNS stellen ein hohes Krebsrisiko dar. Mutationen können geerbt sein oder aber durch äußere Einflüsse entstehen. Krebserregende Substanzen können auf den Körper eines Menschen einwirken, wenn man diese Substanzen mit der Nahrung, der Luft oder über Hautkontakt aufnimmt. Schädliche Strahlung aus verschiedenen Quellen kann unter Umständen auch zu Krebs führen. Eine weitere mögliche Krebsursache stellen manche Viren (z.B. Hepatitis Virus) und Bakterien (z.B. *Helicobacter pylori*) dar. Die Ernährungsgewohnheiten eines Menschen können in manchen Fällen auch Krebs auslösen.

Krebs wird als ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen beschrieben. Normale Zellen, die zu Krebszellen transformierten, leben nicht mehr nach dem normalen Zellzyklus. Sie reagieren nicht mehr auf die normale Wachstumskontrolle und teilen und vermehren sich ungehemmt. Krebszellen besitzen meistens mehrere mutierte Gene. Fast immer sind davon die Gene betroffen, die an der Zellteilung beteiligt sind. Meistens besitzen diese Gene solch eine Mutation, daß sie überexprimiert werden. Eine Überexprimierung von z. B. dem SIS Gen, dem Gen des 'platelet-derived growth factor (PDGF)' und dem erbB Gen, dem Gen für einen der Rezeptoren des epidermalen Wachstumsfaktors, aktivieren die Zellteilung ohne das natürliche Wachstumsfaktoren anwesend sind. Durch die übermäßige Zellteilung wird ein Tumor gebildet. Ein Tumor kann schon durch eine einzige entartete Zelle entstehen. Ein wachsender Tumor zerstört immer mehr von dem umgebenden Gewebe. Manche Zellen können aus der Gruppe der Tumorzellen ausbrechen und mit dem Blut- oder dem Lymphsystem in andere Regionen des Körpers transportiert werden. Wenn sie sich ansiedeln bilden sie neue Tumoren. Diese werden Metastasen genannt.

Alle Organe des Körpers, die Knochen und das Blut können von Krebs befallen werden. Der Krebs wird nach seinem primären Entstehungsort benannt. Da der Krebs sehr leicht metastasiert, d.h. sich ausbreiten kann, muß der primäre Entstehungsort lokalisiert und dementsprechend therapiert werden. Zur Zeit können verschiedene Therapieformen bei Krebs eingesetzt werden. Hier werden diese Therapieformen namentlich erwähnt, ohne auf ihre Wirkungsweisen einzugehen. In einigen Fällen genügt eine Operation vollkommen. Meistens wird nach der Operation, manchmal aber auch ohne Operation, Radiotherapie und/oder Chemotherapie durchgeführt. Da die Erkrankung bei jeder Person unterschiedlich verlaufen

kann, müssen die Ärzte individuelle Therapien zusammenstellen.

In Deutschland sind zur Zeit Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Kreislaufsystems. Dies gilt für Frauen und Männer. Die häufigste Krebserkrankung bei Frauen ist noch immer der Brustkrebs. Männer hingegen erkranken am häufigsten an Lungenkrebs. Die amerikanische GLOBOCAN 2000 Datenbank veröffentlichte im Jahr 2000 weltweit die in Tabelle 1.1 aufgeführten Zahlen.

Tabelle 1.1: Auszug aus der GLOBOCAN 2000 Datenbank über die Anzahl von jährlichen Neuerkrankungen und Todesfällen bei einigen Krebsarten weltweit und in Deutschland

weltweit	Neuerkrankungen pro Jahr	Todesfälle pro Jahr
alle Krebsarten außer Hautkrebs	10 055 551	6 208 679
Brustkrebs bei Frauen	1 050 346	372 969
Lungenkrebs bei Männern	901 746	810 419
in Deutschland		
alle Krebsarten außer Hautkrebs	386 593	226 112
Brustkrebs bei Frauen	51 710	19 149
Lungenkrebs bei Männern	33 568	31 294

Diese Werte stellen nicht die genauen Daten für das Jahr 2000 dar. Sie wurden in den letzten 3-5 Jahren bis zum Ende des Jahres 2000 bei der IACR (International Association of Cancer Registries) aus nahezu allen Ländern der Erde gesammelt und gemittelt (the globocan 2000 database). Nicht in jedem Land können die Statistiken genau geführt werden. Daher ist anzunehmen, daß die tatsächlichen Werte sehr viel höher sind.

Da heutzutage beinahe jede zehnte Frau von Brustkrebs betroffen ist, in manchen westlichen Ländern steigt die Häufigkeit sogar auf jede achte Frau, ist die Notwendigkeit Brustkrebsforschungen voranzutreiben offensichtlich.

1.6 Brustkrebs

Brustkrebs ist eine Erkrankung, bei der eine Brustdrüse von einem bösartigen Tumor befallen ist. Beim Menschen weisen manchmal gleichzeitig beide Drüsen Tumoren auf. Brustkrebs kann bei Frauen und auch, jedoch seltener, bei Männern auftreten.

Die Brustdrüse, in der Medizin Mamma genannt, weist eine heterogene Struktur auf. Sie besteht aus Drüsen-, Fett- und Bindegewebe. Das Drüsengewebe ist ein komplexes System und besteht aus Drüsenläppchen ('lobes') und Kanälen ('ducts'). In den Läppchen wird die Muttermilch produziert und mit den Kanälen, den Milchgängen, wird sie zur Brustwarze transportiert. Dieses Drüsensystem liegt eingebettet in Fett- und Bindegewebe. Zusätzlich durchziehen Netzwerke von Blut- und Lymphgefäßen sowie Lymphknoten die Brust. Die Brustdrüse verändert sich im Laufe des Lebens unter dem Einfluß von Hormonen.

Vom Bindegewebe oder dem Fettgewebe ausgehende Tumoren sind in der Regel gutartig und werden als Fibrome oder Lipome bezeichnet. Bösartige Tumoren entstehen im Drüsengewebe und werden als Mammakarzinome bezeichnet. Ein Mammakarzinom kann sowohl von den Drüsenläppchen als auch den Duktalen ausgehen. Hierbei geht die Entartung immer von Epithelzellen aus. Epithelzellen kleiden sowohl die Läppchen als auch die Kanäle nach innen hin mit einer einschichtigen Zellreihe aus.

Es gibt sehr unterschiedliche Brustkrebsarten. Wie zum Beispiel das duktales Karzinom in situ (DCIS), das sich auf einen kleinen Raum beschränkt. Die häufigste Art ist der invasive duktales Krebs, dieser beginnt in den Duktalen und bildet einen harten Tumor, der sich von dort ausbreitet. Andere Formen von Karzinomen kommen seltener vor.

Mit den Methoden von Proteomics wurde der Krebs bisher vorrangig aus Kulturzellen untersucht. Zellkulturen sind Kulturen von Zellen eines Zelltyps. Der Vorteil bei der Untersuchung von Kulturzellen ist der, daß man homogene Proben hat. Dadurch vereinfacht sich die Deutung von Untersuchungsergebnissen gegenüber denen aus heterogenen Proben. Der Nachteil, den Kulturzellen haben, ist die mangelnde bzw. veränderte Zellkommunikation über den Zell-Zell-Kontakt. Weiterhin fehlen entscheidende hormonelle, neuronale und immunologische Einflüsse. Unter Umständen spielt diese Kommunikation eine wichtige Rolle in der Entartung einer Zelle. Franzen *et al.* überführten aus humanen Brustdrüsentumoren Tumorzellen. Mit der 2-DE entdeckten sie große Unterschiede zwischen hoch malignen und wenig malignen Läsionen. In den hoch malignen Läsionen fanden sie niedrigere Konzentrationen für die Cytokeratine (CK7, CK8, CK15 und CK18) und die hochmolekularen Tropomyosine (Franzen *et al.*, 1997). Rasmussen *et al.* haben Proteine untersucht, die im speziellen an die SH3 Domäne des MLK2 binden. MLK2 ist ein Mitglied der 'mixed lineage kinase' Familie von Proteinkinasen. Die SH3 (*src* homology-3) Domäne ist die kinase-katalytische Domäne. Es wurden zwei Proteine aus dem Zellysat von MDA-MB231 Zellen über 2-DE charakterisiert (Rasmussen *et al.*, 1997). Giometti *et al.* benutzten die 2-DE um Proteine aus unterschiedlichen humanen Brustdrüsenzellen, wie

Milch-produzierende und nicht-produzierende Zellen, Östrogen-Rezeptor-positive und -negative Zellen, normale und maligne Zellen. Sie kreierten eine Datenbank mit einem synthetischen Gelbild (Giometti *et al.*, 1997). Williams *et al.* untersuchten menschliche normale Brustdrüsenepithelzellen und 13 Brustkrebszelllinien. Signifikante Unterschiede fanden sie nicht nur zwischen normalen und Tumorzellen sondern auch zwischen den Tumorzelllinien untereinander. Unter den Unterschieden waren vor allem die intermediären Filamentkomponenten Vimentin und Cytokeratine (Williams *et al.*, 1998). Page *et al.* fanden im 2-DE Vergleich von luminalen (liegen im Inneren und bilden Milch) und myoepithelialen (bilden die äußere Schicht, umfassen luminale Zellen) Zellen 170 variierende Proteine (Page *et al.*, 1999). Schließlich Bini *et al.* verglichen das erste Mal aus zehn Patientinnen histologisch normales Brustdrüsengewebe mit Tumorgewebe aus Biopsien vom duktalem Karzinom. Sie detektierten auf silbergefärbten 2-DE Gelen 32 Spots, die im Tumorgewebe intensiver waren als im normalen Gewebe (Bini *et al.*, 1997).

Bei etwa 48% der menschlichen Brusttumoren wurde eine Überexprimierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl. epidermal growth factor receptor, EGFR) im Tumorgewebe festgestellt (Klijn *et al.*, 1992). Der EGF Rezeptor gehört zu den Tyrosin-Kinase Rezeptoren. Bei Säugetieren gibt es eine ganze Reihe von Tyrosin-Kinase Rezeptoren. Sie haben alle unterschiedliche Strukturen, besitzen aber zwei Gemeinsamkeiten. Diese Rezeptor Arten haben alle eine Kinaseeinheit und besitzen nur eine Transmembranregion. Die Subfamilie zu der der EGFR gehört, wird ErbB Rezeptor Tyrosin-Kinase Subfamilie genannt und besteht aus vier Rezeptoren. Diese sind der EGF Rezeptor, auch ErbB1 genannt, und die Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4. Diese vier Rezeptoren werden beim Menschen auch mit den Abkürzungen HER1 – 4 ('human epidermal growth factor receptor') angegeben. Das Signalsystem des EGFR wurde bisher am besten untersucht. Bindet an den Rezeptor ein Ligand wird eine Reaktionskaskade ausgelöst, die zur Zellvermehrung führt. Der EGFR ist ein ca. 170 kDa großes Membranprotein. Seine Liganden sind der epidermale Wachstumsfaktor EGF, das 'transforming growth factor α ' TGF α und andere Wachstumsfaktoren. Dieser Rezeptor besitzt sowohl beim normalen Wachstum als auch beim Wachstum von Tumoren eine große Bedeutung.

Um die Regulierung des Wachstums zu untersuchen, wurden Mausmodelle generiert, die eine Überexprimierung des humanen EGF Rezeptors im Mammaepithel besitzen (Brandt *et al.*, 2000). Transgene virgine und laktierende Mäuseweibchen entwickelten Veränderungen im Brustdrüsengewebe. Bei den virginen Transgenmäusen entstanden epitheliale Hyperplasien (Vergrößerung des Organs oder Gewebes durch die Erhöhung der Zellanzahl),

wobei die laktierenden transgenen Mäuse Dysplasien (unnormale Entwicklung) und tubulare Adenokarzinome entwickelten, d.h., die Überexprimierung des EGFR induziert die Umwandlung von Epithelzellen in Tumorzellen (Brandt *et al.*, 2000).

2 Aufgabenstellung

Mit den gängigen Methoden der Proteomics, wie der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) und der Massenspektrometrie, sind Untersuchungen der gesamten Proteinzusammensetzung von Zellen oder Geweben möglich. Die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Eigenschaften wie isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht erfolgt durch die 2-DE nach Klose und Kobalz (Klose und Kobalz, 1995). Aus diesen zweidimensionalen Polyacrylamidgelen heraus kann die Identifizierung der einzelnen Proteinspezies durchgeführt werden. Hierfür werden die zuverlässigen und schnellen Identifizierungsmethoden MALDI-Massenspektrometrie und die Edman'sche Mikrosequenzierung verwendet.

Anhand von Veränderungen der Proteinmuster auf 2-DE Gelen zweier oder mehrerer zu vergleichender Zustände können Proteinspezies gefunden werden, die mit dem zu untersuchenden Zustand korrelieren. Durch die Identifizierung solcher Proteine wird das Verständnis von Mechanismen verbessert oder wenn möglich zur Entwicklung von Diagnose- oder Therapieansätzen beigetragen.

Unter Krebserkrankungen stellt der Brustkrebs noch immer die zweithäufigste Todesursache nach kardiovaskulären Erkrankungen bei Frauen dar. Auf der ganzen Welt erkranken etwa eine Million Menschen jährlich und mehr als 350000 Menschen sterben an Brustkrebs (The GLOBOCAN 2000 Database). An Mausmodellen können Mammakarzinome gezielt induziert werden und durch den Einsatz der 2-DE nach tumor-assoziierten Proteinen gesucht werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte zunächst eine Empfindlichkeitssteigerung bei 'peptide mass fingerprint' (PMF) Spektren von schwach gefärbten CBB-Proteinspots erreicht werden.

Bevor auf subtraktive Analysen übergegangen wurde, sollte eine 2-DE Datenbank für die Brustdrüsenproteine der Wildtyp-Maus, also nicht-transgenen Maus, erstellt werden. Solch eine Referenzdatenbank für Brustdrüsenproteine aus Gewebeproben der Maus gab es bisher nicht. Mit den Ergebnissen der Identifizierungen sollte eine neue Kalibrierungsmethode für 2-DE Gelbilder erarbeitet werden, die eine genauere Kalibrierung ermöglicht.

Schließlich sollten Veränderungen in den Proteinmustern von tumorigenen Brustdrüsen Geweben aus transgenen Mäusen gefunden und identifiziert werden. Im speziellen sollte versucht werden Einsicht in die Signaltransduktionskaskaden zu gewinnen, die mit der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors ausgelöst werden.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Acetonitril	Sigma-Aldrich
Acrylamid für IEF	BioRad
Acrylamid für SDS-PAGE	Serva
Agarose	BioRad
Aktivkohle, z. A.	Fluka
Amberlite MB-1	Serva
Ammoniumbicarbonat	Merck
Ammoniumpersulfat	BioRad
Ammoniumsulfat	Merck
Ampholyte (Servalyte, pH 2 – 4)	Serva
Ampholyte (Servalyte, pH 2 – 11)	Serva
Benzamidin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Bisacrylamid	Serva
Borsäure, z. A.	Merck
Bovine serumalbumin Fraktion V	Serva
Bromphenolblau	Merck
Coomassie Brilliant Blue G-250	BioRad
Coomassie Brilliant Blue R-250	BioRad
α -Cyano-4-hydroxymizimsäure	Sigma-Aldrich
Dinatrium-ethylendiamin-tetra-acetat (Titriplex [®] III, z. A.)	Merck
Deconex [®] 12	Borer Chemie AG
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Bruker
Dithiothreitol	Biomol
Essigsäure z. A.	Merck
Ethanol, vergällt (1% MEK)	Bundesmonopolverwaltung Branntwein
Ethylendiamin, z. A.	Merck
Fast Red TR/Naphthol AS-MX	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteus Phenol-Reagenz	Merck

Formaldehydlösung, (35%), z. A.	Merck
Glutardialdehydlösung (25%)	Merck
Glycerin	Merck
Glycin, z. A.	Roth
Harnstoff	BioRad
Harnstoff, Perlform	Merck
Isobutanol	Merck
Kaliumchlorid z. A.	Merck
Di-Kaliumtartrat-hemihydrat	Merck
Kupfer-II-sulfat-pentahydrat, z. A.	Merck
Leupeptin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumacetat wasserfrei z. A.	Merck
Natriumcarbonat, z. A.	Merck
Natriumdesoxycholat	Merck
Natriumdodecylsulfat	BioRad
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natriumfluorid	Fluka
Natriumhydrogencarbonat, z. A.	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck
Natronlauge 1 N	Merck
Pepstatin A	Serva
Phenylmethylsulfonylfluorid	Serva
Phosphorsäure 85%	Merck
Piperazindiacrylamid	BioRad
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Salzsäure 1 N	Merck
Sephadex G200 Superfine	Amersham Pharmacia
Serva Blue R-250 (CBB R-250)	Serva
Silbernitrat, z. A.	Roth
Silbernitrat, z. A.	Merck
Silvosol	Roth

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	BioRad
Thimerosal	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Trifluoressigsäure	Merck
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-Base) (TRIZMA Base)	Sigma-Aldrich
TRIS/HCl (TRIZMA Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich
Trockenmilchpulver	Reformhaus
Trypsin, TPCK-vorbehandelt (Schwein)	Promega

Die Chemikalien für die automatische N-terminale Sequenzierung von Proteinen wurden von Applied Biosystems bezogen. Alle anderen Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders erwähnt, von der Firma Roth, Karlsruhe in z. A. Qualität bezogen.

3.2 Geräte

Blot-Kammern	Trans-Blot SD (BioRad, München)
	Hoefer TE 77 Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Gefrierschrank	Herafreeze (Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau)
Geltrockner	UniEquip Geltrockner (UniEquip, München)
HPLC	SMART™ System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
	HPLC-Säule μ RPC C2/C18 SC 2.1/10,3 μ m, 120 Å (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Hochspannungsnetzgeräte	Multi drive XL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
	EPS 3501 XL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
	Hoefer EPS 2A200 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
IEF-Apparatur	(Wita GmbH, Teltow)
Massenspektrometer	Voyager™-Elite (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)
Mikrozentrifuge	Biofuge 13 (Heraeus Instruments, Newtown, CT, USA)
N-terminaler Sequenzer	ABI Procise 494 A (Applied Biosystems, Foster City, USA)
pH-Meter	Knick Mikroprozessor 766 Calimatic Set (Merck, Darmstadt)
Schüttler	SM-30 B Control (Merck, Darmstadt)

SDS-PAGE- Kleingelkammer	Mini PROTEAN II™-Kleigekammer (BioRad, München)
SDS-PAGE- Großgelkammer	DESAPHOR VA 300 Großgelkammer mit DESAPHOR VA- Gelgießständer (Desaga, Heidelberg)
Thermomixer	Comfort 5335 (Eppendorf, Hamburg)
Thermostate	RCB 300 (Hoefer Scientific, CA, USA) Multi Temp III (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Ultraschallbad	Typ USR 30H (Merck, Darmstadt)
Ultrazentrifuge	Beckmann TL-100 (Palo Alto, CA, USA)
Ultrazentrifugenrotor	Beckman TLA 100,2 (Palo Alto, CA, USA)
Vakuum-Zentrifugen	SpeedVac (Savant, Hicksville, NY, USA) Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
Waage	Sartorius Modell Basiclite Typ BL6100 (Merck, Darmstadt)

3.3 Probenmaterial

Gewebematerial von Mausbrustdrüsen wurde freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. Franz Theuring von der Universitätsklinik Charité, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Humboldt Universität zu Berlin zur Verfügung gestellt. Die Wildtyp-Proben waren Drüsengewebe von NMRI (Naval Medical Research Institute) Auszucht-Mäusen. Die Wildtyp-Brustdrüsen wurden Weibchen entnommen, die durch 4 Laktationsperioden gegangen waren.

Die transgenen Mäuse trugen zwei Transgenkonstrukte, zum einen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und zum anderen den humanen 'transforming growth factor α ' (TGF α), einen der Liganden des EGFR (sogenannte bitransgene bzw. doppeltransgene Mäuse). Zur Analyse wurden doppeltransgene Weibchen mit mindestens einem erkennbaren Tumor verwendet. Die Kontrollproben waren histologisch-normal eingestufte, gesunde Brustdrüsen aus der selben Maus.

Alle Proben wurden gleich nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Der Transport der Proben verlief ausschließlich in Trockeneis.

4 Methoden

4.1 Probenaufarbeitung für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Proben aus Gewebematerial wurden unaufgetaut in einem mit flüssigen Stickstoff gekühlten Quarzmörser und mit einem vorgekühlten Pistill zu Pulver zermahlen. Das homogenisierte Pulver wurde in ein vorher abgewogenes Gefäß überführt. Um das Gewicht der Probe zu bestimmen wurde das Gefäß nochmal abgewogen. Dann wurde zu jeder Probe in einem Masse/Volumen (m/v) - Verhältnis von 1:6 Aufarbeitungspuffer gegeben. Der Aufarbeitungspuffer bestand aus 9 M Harnstoff, 70 mM DTT, 2 % Ampholyte (Servalyte 2-4), 25 mM Tris/HCl, pH 7,1, 50 mM KCl, 3 mM EDTA, 2,9 mM Benzamidin und 2,1 μ M Leupeptin. Hierzu wurden in einem m/v-Verhältnis von 1:0,02 zum Puffer zusätzliche Proteaseinhibitoren hinzugefügt. Als zusätzliche Proteaseinhibitoren wurde ein Gemisch von 5 μ M Pepstatin und 50 mM PMSF-Lösung benutzt. Mit Plastikrührstäbchen wurden die Proben 30 Minuten lang alle 5 Minuten bei RT leicht gerührt. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben in Zentrifugengefäße überführt, austariert und 30 Minuten lang bei 20°C und 100000g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand jeder Probe wurde entnommen und in 10 bis 200 μ l Fraktionen aliquotiert. Die einzelnen Aliquots wurden gleich in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben wurde nach der von Peterson vereinfachten Lowry-Methode durchgeführt (Peterson, 1977). Die Eichkurve wurde aus einer Reihe von BSA-Lösungen gewonnen. Zuerst wurden folgende Lösungen angesetzt: a) 0,5 mg/ml BSA-Lösung, b) 0,15% Natriumdesoxycholatlösung, c) 72% Trichloressigsäurelösung (TCA), d) Lösung A, die aus 0,8% Kaliumtartrat, 0,4% Kupfersulfat, 20% Natriumcarbonat, 0,8 N Natriumhydroxid und 10% SDS bestand und e) 0,33 N Folin-Ciocalteus Phenol-Reagenz. Für die Kalibrierungsreihe wurden 5, 10, 20, 25, 37,5, 50, 75 und 100 μ g BSA pro ml Reagenzlösung eingesetzt. Für die Nulleinstellung des UV-Spektrometers wurde reines Wasser als Ausgangsmaterial genommen. Zu jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung mit zwei verschiedenen Probenmengen durchgeführt. Von den für die 2-DE aufgearbeiteten Proben wurden je 2 und 5 μ l Probe eingesetzt. Sowohl die Proben als auch die BSA-Lösungen wurden mit Wasser auf 1ml aufgefüllt. Zu jedem

Reagenzgläser wurden je 100 µl 0,15% Natriumdesoxycholatlösung gegeben. Das Gemisch wurde geschüttelt und 10 Minuten lang bei RT stengelassen. Danach wurden die Reagenzgläser in Eis gestellt und es wurden je 100 µl 72% TCA-Lösung hinzugefügt. Nach gutem Schütteln wurde 15 Minuten lang bei 3000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig verworfen und die Reagenzgläser wurden 30 Minuten lang mit der offenen Seite nach unten auf Filterpapier stengelassen. Zu dem Pelet wurden je 1 ml Wasser und je 1 ml Lösung A gegeben, geschüttelt und 10 Minuten bei RT stengelassen. Als Letztes wurde je 500 µl des 0,33 N Folin-Reagenzes dazugegeben und sofort das Gemisch geschüttelt. Erneut wurden die Reagenzgläser 30 Minuten bei RT stengelassen und dann bei 750 nm Wellenlänge die Absorption der Flüssigkeiten gemessen. Bei der Messung wurde als Referenz das Glas genommen, in dem keine Proteine waren. Mit den Ergebnissen der BSA-Reihe wurde ein Kalibrierungsdiagramm erstellt. Durch Ablesen der Absorptionwerte der eigentlichen Proben konnte über die Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt werden.

4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen wurde durch die Kombination von isoelektrischer Fokussierung (IEF) und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Trennung verlief in zwei unterschiedliche Richtungen so daß man eine Auftrennung in zwei Dimensionen erhielt. Die Proteine wurden in der ersten Dimension nach ihrer Gesamtladung und in der zweiten Dimension nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die verwendeten Gellösungen, wie Separations- und Capgellösung für die erste Dimension und SDS-Gellösung für die zweite Dimension, wurden nach den Vorschriften angesetzt, die in der Publikation von Klose und Kobalz veröffentlicht sind (Klose und Kobalz, 1995).

4.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Die erste Dimension der 2-DE besteht aus einer Auftrennung der Proteine nach deren isoelektrischen Punkt. Die Proteine wurden im Separationsgel, einem 3,5%igen Polyacrylamidgel (3,5% Acrylamid, 0,3% Piperazindiacrylamid, 2% Ampholyte (Servalyte 2-11), 9 M Harnstoff, 5% Glycerin, 0,06% TEMED und 0,02% Ammoniumpersulfat), aufgrund ihrer Gesamtladung getrennt. Um das Herauslaufen der Proteine zu verhindern legt

man an das Ende des Röhrchengels ein konzentrierteres etwa 0,5 cm hohes Cappel (12% Acrylamid, 0,13% Piperazindiacrylamid, 2% v/v Ampholyte (Servalyte 2-11), 9M Harnstoff, 5% Glycerin, 0,06% TEMED und 0,02% Ammoniumpersulfat) an. Das Cappel soll auch das Separationsgel vor dem Kathodenpuffer und dem Kathodendrift schützen.

4.3.1.1 Vorbereiten der Röhrchengele

Es können 9,5 (für Kleingele) bzw. 23 cm (für Großgele) lange Glasröhrchen mit unterschiedlichen Innendurchmessern für die IEF genommen werden. Für analytische Gele wurden 0,9 mm und für mikropräparative Gele 1 bzw. 1,5 mm dicke Gele benutzt. Die sauberen Gelröhrchen wurden in eine spezielle Vorrichtung eingeklemmt. Die Separationsgellösung wurde in gewünschter Menge aufgetaut und nach dem Entgasen mit 1/40 Volumen 0,8%iger (m/v) Ammoniumpersulfatlösung (APS) vermischt. Die Gellösung wurde dann in das Reservoir der Vorrichtung gefüllt und mittels Spritzen, die am anderen Ende der Glasröhrchen befestigt waren, hochgezogen. Wenn alle Röhrchen bis zur Markierung gefüllt waren, wurde das drehbare Reservoir nach unten gedreht, so daß die Enden der Röhrchen frei waren. Nun wurde die Gellösung in den Röhrchen erneut um 0,5-0,8 mm nach oben gezogen und zur Polymerisation 30 Minuten lang stengelassen. In dieser Zeit wurde eine gewünschte Menge Cappelösung aufgetaut und entgast. Nach den 30 Minuten wurde zuerst das Polymerisationswasser an dem Gelende an das das Cappel hinzugefügt wurde mit Filterpapierstreifen entfernt. Auf die getrocknete Oberfläche wurde je Röhrchen etwa 0,5 cm hoch mit APS versetzte Cappelösung aufgebracht. Erneut wurden 30 Minuten für die Polymerisation abgewartet und dann an beiden Enden der Röhrchen eine Feuchtkammer angelegt, in dem man die Enden mit je einem Tropfen Wasser bedeckte und mit Parafilm verschloß. Die Feuchtkammern an den Enden sollten das Austrocknen der Gele verhindern. Für die Auspolymerisation wurden die kleinen Gele 24 Stunden, die großen Gele 3 Tage bei RT im Dunkeln gelagert. Diese Wartezeiten erwiesen sich für die mechanische Stabilität der Gele als optimal.

4.3.1.2 Auftragen der Probe

Vor dem Start des IEF-Laufs wurden die Röhrchengele an beiden Enden mit Filterpapierstreifen getrocknet. Mit dem Cappelende nach unten wurden die Glasröhrchen in das obere Reservoir der IEF-Kammer eingespannt. Eine IEF-Kammer ist zylinderförmig und

besteht aus mehreren herausnehmbaren Teilen. Für das untere Reservoir wurde 250 ml Kathodenlösung (9M Harnstoff, 5% Glycerin, 5% Ethylendiamin) angesetzt und entgast. Die Capgelenden wurden mit einer Spritze mit Kathodenlösung aufgefüllt und das Einspannteil mit den Röhren auf das Kathodenlösungsreservoir aufgesetzt. Die Röhrenenden tauchten in die Kathodenlösung ein. Bei den 23 cm langen Röhren wurde ein zylindrischer Zwischenteil zwischen den Reservoirs benutzt. Das obere Gelende wurde nun mit Probe beladen. Bei Probenmengen über 5 μ l wurde zuerst eine 2 mm hohe Sephadex-Lösung (12,5% Sephadex/Glycerin, 9M Harnstoff, 70 mM DTT, 2% Ampholyt-Mix 2-11) aufgetragen. Die gewünschte Probenmenge wurde luftblasenfrei auf das Gel oder die Sephadexschicht aufgetragen und mit 5 μ l Überschichtungslösung (5M Harnstoff, 2% Ampholyte (Servalyte 2-4) und 5% Glycerin) überschichtet. Der Freiraum über der Überschichtungslösung wurde mit Anodenlösung luftblasenfrei aufgefüllt. Die Anodenlösung (3M Harnstoff, 7,27% Phosphorsäure) wurde in das obere Reservoir gefüllt, so daß die Röhrenenden unterhalb der Oberfläche lagen.

4.3.1.3 Fokussierung

Nachdem die Proben aufgetragen wurden, wurde die IEF-Kammer an ein Netzgerät angeschlossen. Bei der Kleingeltechnik wurde insgesamt 5 h 15 min lang fokussiert. Die Spannung wurde folgendermaßen schrittweise erhöht: 75 min bei 100V, 75 min bei 200V, 75 min bei 400V, 75 min bei 600V, 10 min bei 800V und 5 min bei 1000V. Bei der Großgeltechnik wurde insgesamt 21 h 15 min lang fokussiert. Hierbei wurde die Spannung nach folgendem Protokoll erhöht: 1 h bei 100V, 1 h bei 200V, 17,5 h bei 400V, 1 h bei 600V, 30 min bei 1000V, 10 min bei 1500V und 5 min bei 2000V. In Abbildung 4.1 sind die Schichten eines Röhrengels und der Ampholytengradient während der Fokussierung dargestellt.

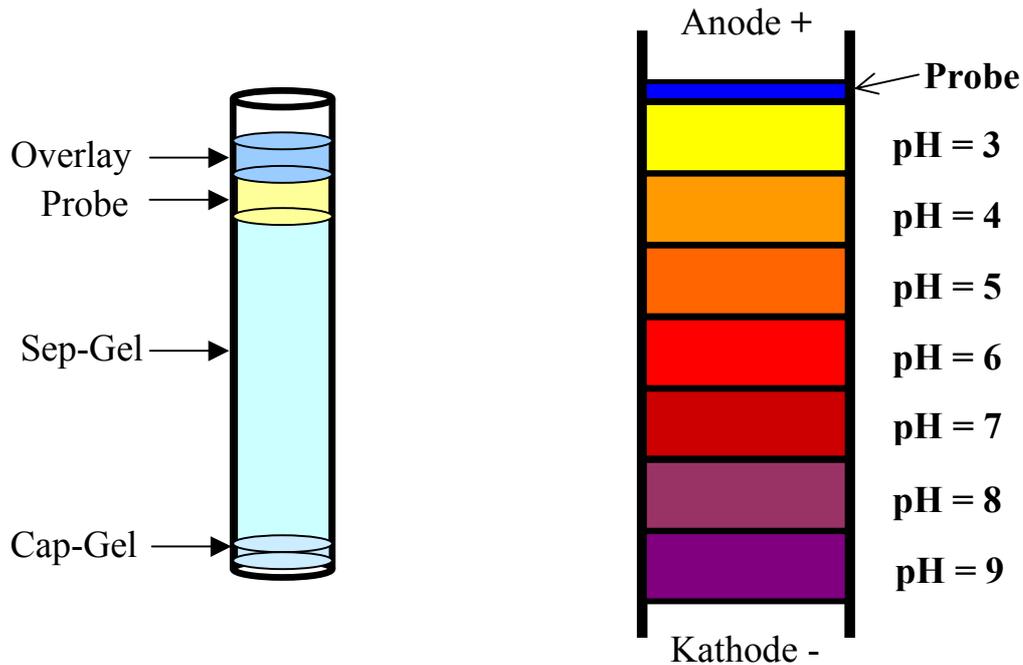


Abbildung 4.1: Schichten eines Röhrgels (links) und der Ampholytgradient während der Fokussierung (rechts)

4.3.1.4 Equilibrierung und Lagerung der Röhrgengele

Am Ende des IEF-Laufs wurde die Kammer zerlegt und die Röhrcchen wurden aus ihrer Halterung herausgenommen. An beiden Gelen wurde die Flüssigkeit über den Gelen mit einer Spritze entnommen. Kleine Gele wurden in 5 ml, große Gele in 10 ml Inkubationslösung (125 mM Tris/H₃PO₄, pH 6,8, 40% Glycerin, 65 mM DTT, 3% SDS) ausgestoßen. Hierfür wurde die Inkubationslösung zuerst in Petrischalen vorgelegt, dann wurde in jede Schale ein Röhrgengel mit Hilfe einer wassergefüllten Spritze in die Inkubationslösung ausgestoßen. Die Spritze wurde am Capgelende des Gels angebracht und das Gel wurde vorsichtig herausgedrückt. Die Equilibrierung wurde für genau 10 min bei leichtem Schütteln vorgenommen. Nach dieser Zeit wurde die Lösung vorsichtig abgegossen, so daß das Gel am Rand der Petrischale lag. Auf diese Weise wurden die Röhrgengele bei -80°C eingefroren und gelagert.

4.3.1.5 Reinigung der IEF-Glasröhrcchen

Das Reinigen der Glasröhrcchen ist ein wichtiger Schritt, da unsaubere Röhrcchen die Qualität der Gele beeinflussen können. Nach dem Ausstoßen der IEF-Gele wurden die

Röhrchen mit deionisiertem Wasser gespült. Zur Reinigung wurde 6%ige Deconex-Lösung und 0,1 M HCl Lösung benutzt. Deconex[®] 12 ist ein mildalkalisches Reinigungskonzentrat, das für Glasutensilien verwendet wird. Die zu reinigenden Röhrchen wurden in einen schmalen langen Glasbehälter gestellt. Hierzu wurde auf 60°C erhitzte Deconex-Lösung gegeben bis diese die Röhrchen bedeckte. Nach etwa zehn Minuten wurde die Lösung wieder in den Behälter gegossen, in dem man sie erneut auf 60°C erhitzte. Nachdem die Lösung wieder auf 60°C erhitzt war, wurde die Prozedur 2-3 Mal wiederholt. Auf diese Weise wurden die Röhrchen je zehn Minuten lang behandelt. Dann wurden die Röhrchen ein bis zweimal mit deionisiertem Wasser gespült. Danach wurde die vorherige Behandlung mit auf 95°C erhitzter HCl Lösung mehrmals durchgeführt. Zum Schluß wurden die Röhrchen einzeln mit deionisiertem Wasser gründlich gespült und in einem Brutschrank getrocknet.

4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-PAGE wurde eine 15%ige Polyacrylamid-Gellösung (15% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,03% TEMED, 0,1% SDS, 0,08% APS) zwischen zwei Glasplatten luftblasenfrei gegossen. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten wurde eine 1-2 ml Isobutanol-Schicht auf die Gellösung gegeben. Nach etwa 30 Minuten wurde das Isobutanol abgegossen und durch die Schutzlösung (375 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,1% SDS) ersetzt. Dann wurde die obere Öffnung mit einem Parafilm-Streifen abgedeckt. So wurde das Gel im Kühlraum bis zum nächsten Tag gelagert, damit es auspolymerisieren konnte.

Der Lauf wurde in einer Vorrichtung durchgeführt in der zwei Gele parallel laufen können. Es wurden zwei Röhrchengele aufgetaut und mit Hilfe eines Spatels auf die Oberfläche der SDS-Gele aufgetragen. Die Schutzlösung wurde vorher abgegossen und die überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier aufgesaugt. Um das Röhrchengel zu stabilisieren wurde es mit Agarose-Lösung (1% Agarose, 0,1% SDS, 125 mM Tris/H₃PO₄, pH 6,8) überschichtet. Diese Halterung wurde in der Kammer so positioniert, daß ein Großteil der Glasplatten in den SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS) eingetaucht waren. Dieser Puffer wurde während des Laufs auf 15°C gekühlt, damit sich das Gel nicht zu sehr erwärmt. Außerdem wurde mit einer Pumpe der Laufpuffer in der Kammer umgewälzt damit sich überall die gleiche Temperatur einstellt. In das obere Reservoir wurde auch Laufpuffer gegeben, so daß die Elektrode überdeckt war.

Je nach Geldicke wurde eine andere Startstromstärke gewählt und während dem Lauf

einmal erhöht. Die Stromstärke-Einstellungen wurden wie in Tabelle 4-1 angegeben je nach Geldicke gewählt.

Tabelle 4-1: Stromstärkeeinstellungen bei der SDS-PAGE bei unterschiedlichen Geldicken

Geldicke	Anfangsstromstärke für 15 Minuten	Stromstärke während des Laufs
0,9 mm	80 mA	100 mA
1,0 mm	80 mA	120 mA
1,5 mm	120 mA	150 mA

Die SDS-PAGE wurde nach Ankommen der, durch Bromphenol, blau gefärbten Lauffront am unteren Ende des Gels abgebrochen. Das SDS-Gel wurde direkt in die Fixierungslösung überführt. Die Gele wurden je nach Vorhaben unterschiedlich weiterbehandelt. In Abbildung 4.2 ist ein SDS-Gel dargestellt, auf dem ein IEF-Gel aufgetragen ist. So sitzt das SDS-Gel zwischen zwei Glasscheiben. Rechts und links ist das Gel mit Spacern und Dichtungen abgedichtet. Oben und unten ist es offen. Somit wird auch die Richtung der Elektrophorese bestimmt.

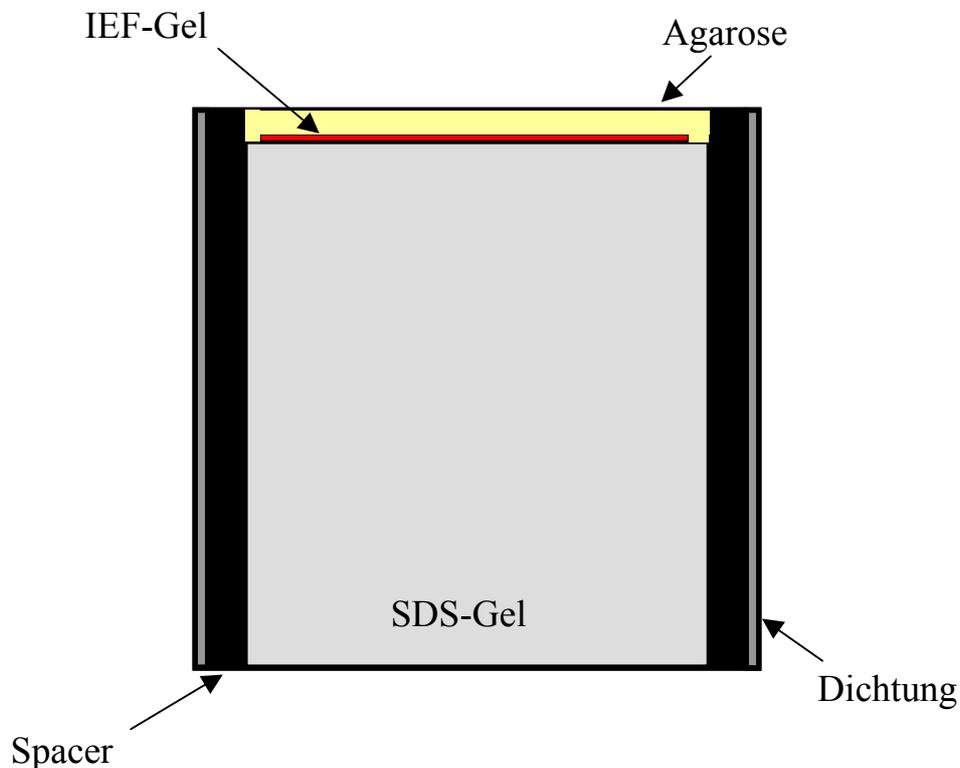


Abbildung 4.2: Anordnung eines SDS-Gels

Die Laufbedingungen bei den Kleingelen waren anders. Die SDS-PAGE der Kleingele wurde bei RT durchgeführt. Hier wurde die Spannung als limitierender Faktor gewählt. Für die 1,5 mm dicken Gele wurde am Anfang für 5 Minuten 35V eingestellt. Dann wurde für 10 Minuten 55V, für 15 Minuten 100V und für 60 Minuten 150V eingestellt. Die Lauffront erreichte in 1,5 h das Ende des Gels.

4.4 Gelfärbemethoden

4.4.1 Silberfärbung

Es wurde die von Merril *et al.* (Merril *et al.*, 1979) und Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven und Dernick, 1985) beschriebene und von Jungblut und Seifert (Jungblut und Seifert, 1990) modifizierte Färbemethode angewendet. Eine weitere Modifizierung wurde in der Zusammensetzung der Entwicklungslösung vorgenommen (nicht publiziert). Alle Gele, die nur zur Analyse verwendet wurden, wurden silbergefärbt und getrocknet. Nach der SDS-PAGE wurde das SDS-Gel zwischen den zwei Glasscheiben herausgeholt und direkt in die Fixierungslösung (50% Ethanol, 10% Essigsäure) überführt. In der Fixierungslösung wurden die Gele über Nacht geschwenkt. Nach der Fixierung wurden die Gele zwei Stunden lang inkubiert. Die Inkubationslösung (30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutardialdehyd, 0,2% Natriumthiosulfat) erhöhte den pH Wert der Gele. Nach der Inkubation wurden die Gele 3 x 20 min lang in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden sie 30 Minuten lang in der Silberlösung (0,1% Silbernitrat, 0,01% Formaldehyd) geschwenkt. Dann wurden die Gele in einer neuen Wanne einige Sekunden lang in reichlich Wasser geschüttelt. Um die Gele zu entwickeln, wurde Entwicklungslösung (2,5% Natriumcarbonat, 0,05 mM Natriumthiosulfat, 0,01% Formaldehyd, Einstellung des pH's mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 11,3) zu den Gelen gegossen. Wurde eine bestimmte Stärke erreicht, wurde die Färbung mit der Stopplösung (0,05 M Titriplex, 0,02% Thimerosal) abgebrochen. Nach 15 Minuten wurde die Stopplösung erneuert. Diese Stopplösung (0,05 M Titriplex) enthielt kein Thimerosal mehr.

4.4.2 Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbung

Für präparative Gele wurde die CBB R-250 Färbung (Eckerskorn *et al.*, 1988) angewendet. Als erstes wurden die Gele in der Fixierungslösung (50% Ethanol, 10% Essigsäure) über Nacht geschwenkt. Nach der Fixierung wurden die Gele in die CBB-

Färbelösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,035% CBB R-250) überführt. Die Gele wurden über Nacht in der Färbelösung geschüttelt werden. Am Tag darauf wurden die Gele entfärbt. Die Gele wurden so lange in der Entfärbelösung (5% Methanol, 12,5% Essigsäure) geschwenkt, bis ein nahezu klarer Hintergrund erreicht wurde. Während der Entfärbung wurde die Entfärbelösung im Abstand von 20-30 Minuten gewechselt und durch frische Lösung ersetzt. Diese Gele wurden mit ein wenig 7%iger Essigsäurelösung in Folien eingeschweißt und so aufbewahrt. Die Entfärbelösung wurde durch filtrieren mit Aktivkohle zurückgewonnen und mehrmals verwendet.

4.4.3 Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbung

Die CBB G-250 Färbung erfolgte nach dem Protokoll von Neuhoff *et al.* (Neuhoff *et al.*, 1988). Die Gele wurden nach der SDS-PAGE gleich in die Fixierungslösung (50% Methanol, 2% Phosphorsäure) überführt und über Nacht fixiert. Am Tag darauf wurden die Gele als erstes 3 x 30 Minuten lang in Wasser geschüttelt. Danach wurden sie eine Stunde lang in der Inkubationslösung (34% Methanol, 2% Phosphorsäure, 17% Ammoniumsulfat) unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Zeit wurde abgewogenes CBB G-250 Pulver in die Inkubationslösung gegeben, so daß eine Endkonzentration von 0,066% CBB G-250 erreicht wird. Die Gele wurden fünf Tage lang in dieser Lösung geschwenkt. Der Farbstoff löste sich während der ersten paar Stunden in der Lösung auf. Am Ende der fünf Tage war eine Entfärbung der Gele nicht notwendig. Die Gele wurden in eine 25%ige Methanol-Lösung überführt um kurz die Oberfläche des Gels zu spülen und von eventuell am Gel klebenden Farbpartikel zu befreien. Die Gele wurden dann mit ein wenig Wasser in Folien eingeschweißt.

4.5 Gel Trocknung

Die SDS-Gele wurden zwischen zwei Bögen Cellophanfolie getrocknet. Hierfür wurde auf den porösen Gelträger des Gelrockners ein Bogen Filterpapier gelegt. Das Filterpapier wurde vorher in einer Wanne mit Wasser getränkt. Dann wurde ein Bogen Cellophanfolie mit Wasser benetzt und luftblasenfrei auf das Filterpapier gelegt. Das zu trocknende Gel wurde ebenfalls luftblasenfrei darübergerlegt und mit der zweiten Folie überdeckt. Die Dichtungsmatte des Gelrockners wurde über dieses Sandwich gelegt und Vakuum angelegt. Es konnten unterschiedliche Temperaturen eingestellt werden. Ein Gel wurde bei einer

Temperatur von 70°C in ca. 2,5 Stunden trocken.

4.6 Semidry-Gelblotting

Die Laufbedingungen für das Blotten wurden, wie im Protokoll (Jungblut et al., 1990) festgelegt, auf 1 mA/cm² für drei Stunden bei 4°C eingestellt. Da das Stromstärkelimit der Blotkammern nicht sehr hoch ist, mußte die Größe der Blotmembran und damit auch die des Gels eingeschränkt werden. Deshalb konnte mit einer Blotkammer nur die Hälfte eines großen Gels geblottet werden. Der Transfer der Proteine aus einem 2-DE Gel auf PVDF-Membran erfolgte nach folgenden Schritten. Sechs Bögen Filterpapier wurden etwas größer als das zu blottende Gel zurechtgeschnitten und in den Blotpuffer (100 mM Borat, 20% Methanol, eingestellt mit 1N NaOH auf pH 9,0) eingetaucht. 3 x 5 Minuten lang wurden sie in dem Puffer gewaschen. Auch die zurechtgeschnittene Membran wurde zuerst mit Methanol benetzt und dann in dem Blotpuffer 3 x 5 Minuten lang gewaschen. Zum Ende des Gellaufs wurde die Oberfläche der Graphit-Elektrode in der Blotkammer gesäubert und mit Blotpuffer benetzt. Dann wurden drei Lagen des Filterpapiers luftblasenfrei übereinander gelegt. Nach dem Zurechtschneiden des Gels, wurde die PVDF-Membran auf das Filterpapier gelegt und gleich darauf das Gel. Auf das Gel wurden dann die restlichen drei Filterpapierbögen luftblasenfrei gelegt. Die zweite Elektrode wurde benetzt und aufgelegt und die Kammer geschlossen. Die Stromstärke wurde eingestellt und das Blotten begonnen. Das Gel wurde mit CBB R-250 gefärbt, um zu sehen, ob die Proteine effizient transferiert wurden. Die Membran wurde luftgetrocknet.

4.7 Blotfärbemethoden

4.7.1 Färbung der Blotmembran mit CBB R-250

War die PVDF-Membran vorher getrocknet worden, wurde sie als erstes mit Methanol benetzt. Die feuchte Membran wurde dann 5 Minuten in der Färbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% CBB R-250) geschwenkt. Die gesamte Membran färbte sich somit blau. Um den Hintergrund der Membran wieder zu entfärben, wurde sie in der Entfärbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) geschwenkt. Die Entfärbelösung wurde alle 5 Minuten erneuert. Die Entfärbung erfolgte solange bis der Hintergrund entfärbt wurde und nur die

Proteinspots blau waren. Die blau gewordene Entfärbelösung wurde über Aktivkohle filtriert und somit zurückgewonnen. Danach wurde die Membran luftgetrocknet und in einer Folie aufbewahrt.

4.7.2 Färbung der Blotmembran mit Ponceau S

Die Ponceau S Färbung erfolgte nach Salinovich und Montelaro (Salinovich und Montelaro, 1986). Die mit Methanol benetzte PVDF-Membran wurde zweimal 10 Minuten lang mit Wasser gewaschen. Dann wurde sie 3-5 Minuten lang in der Färbelösung (1% Essigsäure, 0,5% Ponceau S) geschüttelt. Die Membran bekam eine rosa Verfärbung. Durch mehrmaliges kurzes Schütteln in Wasser wurde der Hintergrund entfärbt.

4.8 Auswertung von 2-DE Gelen

Bei der subtraktiven Analyse wurden die Proben mit den Kontrollproben visuell verglichen. Die silbergefärbten 2-DE Gele waren jeweils mit 50µg Gesamtprotein beladen. Im paarweisen Vergleich wurde nach Unterschieden im Proteinmuster gesucht. Die Proteinspots wurden nach unterschiedlicher Intensität und Position durchgesehen. Die Spots, die in allen Paaren die gleiche Veränderung besaßen, wurden weiter untersucht.

Das Referenzgel, das in der Proteindatenbank veröffentlicht ist, wurde mit dem Auswerteprogramm TopSpot bearbeitet. Das eingescannte Gelbild wurde hierfür zunächst in sechs gleichgroße Teile zerlegt. Die Teilbilder wurden einzeln zuerst automatisch dann manuell editiert.

4.9 Enzymatische Spaltung von Proteinen

4.9.1 Tryptischer Verdau mit ZipTip-Aufarbeitung

Aus CBB gefärbten 2-DE Gelen wurden die zu identifizierenden Spots ausgestochen und je ein Spot in kleine Reaktionsgefäße überführt. In den Gefäßen wurden die Gelstücke zuerst mit einer Pipettenspitze zerkleinert. Um den Farbstoff herauszuwaschen wurden die Gelstückchen mit 500 µl Wasch- und Schrumpfpuffer (50% 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 50% Acetonitril (ACN)) bei 30°C 30 Minuten lang gewaschen. Bei stark gefärbten Spots wurde der Wasch- und Schrumpfpuffer nach 10 Minuten erneuert. Nach Ablauf der Zeit wurde der

Puffer verworfen. Dann wurde der pH-Wert der Proben durch Zugabe von 500µl Equilibrierungspuffer (95% 50 mM Ammoniumbicarbonat (ABC), pH 7,8, 5% ACN) auf pH 7,8 herabgesetzt. Dann wurden sie 30 Minuten lang bei 30°C im Thermomixer geschüttelt. Auch dieser Puffer wurde nach der Einwirkzeit verworfen. Das Gelmaterial in den Gefäßen wurde dann mit offener Kappe in einer Speedvac 20–30 Minuten getrocknet. Als nächstes wurde je nach Gelmenge 15-30µl Equilibrierungspuffer (95% 50 mM ABC, pH 7,8, 5% ACN) mit 0,1µg Trypsin pro Gefäß dazugegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C unter Schütteln der Gefäße. Am nächsten Tag erfolgte die ZipTip-Aufarbeitung. Um den ACN-Gehalt zu senken wurde zu jeder Probe das gleiche Volumen, auf Spaltpuffer bezogen, 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben. Aus diesem Gemisch wurden die Peptide mit den ZipTips extrahiert und in ein anderes Gefäß eluiert. Dieser Prozeß erfolgte nach den Herstellerangaben aus der mitgelieferten Vorschrift. Hierfür wurde das ZipTip mit 50%iger ACN-Lösung gewaschen. Die Lösung wurde 2-3 mal mit der ZipTip-Spitze auf- und abgezogen. Dann wurde das ZipTip mit 0,1%iger TFA-Lösung equilibriert. Die Peptide wurden extrahiert in dem man mehrmals die Probe mit dem ZipTip aufzog. Dann wurde 1-2 mal 0,1%ige TFA-Lösung aufgezogen und die Probe in 5µl 50% ACN eluiert. Die ZipTip-Spitzen wurden für bis zu 15 Proben nach gründlichem Waschen mit 50%iger ACN-Lösung benutzt. Für den Verdau wurde modifiziertes Trypsin verwendet.

4.9.2 Tryptischer Verdau ohne ZipTip-Aufarbeitung

Die zu identifizierenden Spots wurden ausgestochen und einzeln in Reaktionsgefäße überführt. Mit einer Pipettenspitze wurden sie zuerst zerkleinert. Zu jeder Probe wurden je 500µl Waschpuffer (50% 200 mM ABC, 50% ACN) zugegeben und bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Danach wurde der Puffer verworfen und die Proben wurden mit je 500µl Equilibrierungspuffer (95% 50 mM ABC, 5% ACN) bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Nachdem dieser Puffer verworfen wurde, kamen die Proben in die Speedvac und wurden bei 30°C etwa 30 Minuten lang getrocknet. Den eingetrockneten Gelstücken wurden je 0,1µg Trypsin in 25µl Spaltpuffer (95% 50 mM ABC, 5% ACN) zugegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Am nächsten morgen wurden die Gefäße zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zu den Gelresten wurden je 25µl 60%ige ACN-Lösung dazugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Danach wurde der Überstand zu dem vorherigen dazugegeben. Dann wurden die Proben in der Speedvac lyophilisiert und in 0,8-2µl 33% ACN/0,1% TFA gelöst.

4.10 Automatische N-terminale Mikrosequenzierung von Proteinen

Zur Sequenzierung von Proteinen aus 2-DE Gelen wurden die Gele direkt nach der SDS-PAGE auf PVDF-Membranen geblottet. Die Blots wurden mit CBB R-250 gefärbt und die zu sequenzierenden Spots ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Membranstücke wurden direkt für die N-terminale Sequenzierung benutzt. Die Sequenzierungen wurden mit einem ABI Procise 494A Sequenzer (Applied Biosystems) durchgeführt.

4.11 Massenspektrometrie

Die 'peptide mass fingerprint' (PMF) Spektren für die Proteine aus 2-DE Gelen wurden mit einem Voyager Elite 'matrix-assisted laser desorption/ionisation' (MALDI) 'time-of-flight' (TOF) Massenspektrometer (MS) aufgenommen (Applied Biosystems). Die Messungen wurden im Reflektronmodus mit 'delayed extraction' und Detektion von positiv geladenen Ionen durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Geräteeinstellungen verwendet. Die konstant gehaltenen Parameter waren die Beschleunigungsspannung von 20000 V und das 'low mass gate' bei m/z 500. Die Spektren wurden über die Voyager Elite Biospectrometry Workstation aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Softwareprogramm Perseptive GRAMS/386.

Vor dem Auftrag der Proben auf den Probenträger wurden sie im Verhältnis 1:1 mit der Matrix vermischt. Als Matrix wurden α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet. CHCA wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in 50% ACN, 0,3% Trifluoressigsäure und DHB in einer Konzentration von 50 mg/ml in 1/3 Acetonitril und 2/3 0,5% TFA angesetzt.

Mit einem Peptidgemisch aus drei synthetischen Peptiden wurde zuerst das Gerät extern kalibriert. Bei älteren Messungen erfolgte die Kalibrierung der Spektren intern, in dem ein Teil der Proben mit dem Peptidgemisch der drei synthetischen Peptide, die als Marker bezeichnet wurden, vermischt und vermessen wurde. Ein anderer Teil der Proben wurde ohne die Marker vermessen. Beide Spektren wurden mit Hilfe der Markerpeptide kalibriert. Bei neueren Messungen wurden die Markerpeptide nicht mehr benutzt. Die Kalibrierung erfolgte intern über zwei autoproteolytisch entstehende Peptide des Trypsins (m/z 842,51 und m/z 2211,11).

4.12 Computergestützte Identifizierung

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte über den Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit Proteindatenbanken. Die über N-terminale Sequenzierung ermittelten Teilsequenzen wurden mit Proteinsequenzen aus Datenbanken verglichen. Die über MALDI-MS ermittelten Peptidmassen wurden mit Massen aus Proteindatenbanken verglichen, die aus einem theoretischen Verdau mit Trypsin stammten. Hierfür wurden verschiedene Internet-basierte Programme verwendet. Die Identifizierungen von den meisten Teilsequenzen wurden mit dem Programm MS-Pattern (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/mspattern.htm>) und für einige mit dem ProteinInfo-Tool des Programms PROWL (<http://prowl.rockefeller.edu>) durchgeführt. Die Identifizierungen der 'peptide mass fingerprints' wurden mit den Programmen MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>) und Mascot (<http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=../home.html>) durchgeführt. Diese Suchprogramme greifen unter anderem auf Proteindatenbanken wie SwissProt und NCBI zurück. Diese Datenbanken werden regelmäßig aktualisiert.

Die Suche mit MS-Pattern wurde mit den Einstellungen a) alle Spezies, b) gesamter Massenbereich, c) gesamter *pI*-Bereich, d) höchstens zwei fehlerhaft sequenzierte Aminosäuren durchgeführt. Bei MS-Fit und Mascot wurden folgende Einstellungen gewählt: a) Spaltenzym Trypsin, b) alle Spezies, c) gesamter Massenbereich, d) gesamter *pI*-Bereich, e) Anzeigen aller Ergebnisse mit mindestens vier übereinstimmenden Peptidmassen (nur bei MS-Fit), f) freier N- und C-Terminus, g) Massentoleranz +/- 100 ppm, h) höchstens eine übersprungene Spaltstelle, i) erlaubte mögliche Modifikationen waren N-terminales Glutamin und Glutamat zu Pyroglutamat, Oxidation von Methionin, N-terminale Acetylierung des Proteins und mit Acrylamid modifizierte Cysteine.

5 Ergebnisse

5.1. Vorarbeiten zur Empfindlichkeitssteigerung bei PMF-Spektren

Um die Identifizierung eines Proteins als eindeutig einzustufen, müssen bestimmte Kriterien erfüllt werden. Diese Kriterien sind im einzelnen: a) mindestens 30% Sequenzabdeckung, b) +/- 100 ppm als erlaubte Massentoleranz zu der Masse eines einfach protonierten monoisotopischen Peptids ($[M+H]^+$), c) höchstens eine übersprungene Spaltstelle und d) mindestens vier übereinstimmende Peptidmassen. Stuft man die Färbeintensität von CBB-gefärbten Spots in stark, mittel, schwach und sehr schwach ein, kann gesagt werden, daß stark und mittel gefärbte Proteinspots mittels Massenspektrometrie gut zu identifizieren sind. Die Identifizierung von schwach und sehr schwach gefärbten Spots war bisher schwierig. Die PMF-Spektren führten nicht immer zu einer Identifizierung nach den obigen Kriterien. In solchen Fällen wurde bisher der gleiche Spot aus zwei oder mehr Gelen herausgeschnitten und zusammen bearbeitet.

Aus MALDI-TOF-MS-Messungen nach einem tryptischen Verdau von gelösten Proteinproben, die nicht aus Polyacrylamidgelen stammen, weiß man, daß das Detektionslimit des Massenspektrometers im femtomol Bereich liegt. Für unterschiedliche Proteine gilt jeweils ein anderer Wert. Dies beruht auf den unterschiedlichen Flugeigenschaften der Peptide. Da das Detektionslimit der CBB G-250 Färbung im picomol Bereich liegt, sollten theoretisch alle angefärbten Proteinspots zu identifizieren sein.

Die Identifizierung von schwach gefärbten Proteinspots scheitert hauptsächlich an der Qualität der PMF-Spektren. In solchen Spektren ist die Anzahl der detektierten Peaks relativ gering und die Intensität der Peaks ist meistens relativ niedrig. Um die Qualität der Spektren für solche Fälle zu verbessern, wurde das Verdauprotokoll modifiziert und die Meßparameter optimiert. Zu diesen Versuchen wurden sowohl gereinigte Proteine in Lösung als auch Proteine aus Gelspots als Testproteine verwendet. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Monika Schmid durchgeführt.

Die Sekretionsproteine des Bakteriums *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) stellen für die Anwendung ein geeignetes Modell dar. Auf CBB gefärbten zweidimensionalen Großgelen wurden von den Sekretionsproteinen, die aus dem Überstand einer Flüssigkultur von *H. pylori* 26695 stammen, 33 Proteine angefärbt. Aus Spotreihen wurde jeweils nur ein Spot gezählt. Die Proteinspots sind über das gesamte Gel verteilt und gut voneinander getrennt. Sie sind unterschiedlich stark angefärbt, was auf unterschiedliche Konzentrationen zurückzuführen ist.

Alle 33 Sekretionsproteine wurden ausgestochen, enzymatisch verdaut und massenspektrometrisch vermessen. Für den Verdau wurden die frühere und die in diesem Labor neu eingeführte Methode verwendet. Die MS-Messungen wurden mit unterschiedlichen Meßmethoden aufgenommen. (siehe folgende Kapitel)

5.1.1 Modifizierung des 'in-gel' Verdauprotokolls

Ausgehend von der bestehenden Methode wurde das 'in-gel' Verdauprotokoll schrittweise verändert, um eine Erhöhung der Sensitivität der PMF-Messungen von schwach gefärbten Gelspots zu erreichen. Folgende Veränderungen wurden vorgenommen. Um die Probe zu konzentrieren wurde das Peptidgemisch nach dem Verdau in geringeren Lösungsvolumen als bisher gelöst. Zusätzlich wurden die Proben nach dem Verdau nicht mehr mit ZipTips aufgereinigt, sondern lyophilisiert, in Acetonitrillösung aufgenommen und vermessen.

Die bisher durchgeführte Verdaumethode beinhaltete einen Waschschrift der Gelspots mit einem Tris-Puffer, gefolgt von einem Equilibrierungsschritt mit einem Ammoniumbicarbonat (ABC)-Puffer. Der Verdau fand über Nacht mit Trypsin in ABC-Puffer statt und die Peptide wurden anschließend mit ZipTips chromatographisch aufgereinigt. Schließlich wurden die Peptide von der Minisäule eluiert. Die Elution erfolgte in 5µl Elutionslösung. Aus dieser Lösung wurden 2µl entnommen und für die PMF-Messung verwendet. Auf diese Weise behielt man noch genug Material für eventuelle Neuvermessungen oder Messungen an anderen Massenspektrometern wie z. B. einem ESI-MS für eine Sequenzierung.

Bei schwach angefärbten Proteinspots, die wenig Protein beinhalten, führt diese Methode nicht immer zu einer Identifizierung. Einer der Gründe hierfür scheint das Elutionsvolumen zu sein. Die Probe wird zu sehr verdünnt und die PMF-Spektren weisen geringe Intensitäten und geringe Anzahl von Peaks auf.

In einem ersten Schritt wurde nach dem tryptischen Verdau des Proteins die ZipTip-Aufarbeitung durchgeführt und die Peptide in 2,5µl Elutionslösung eluiert. Dies bewirkte eine geringe Intensitätserhöhung der Peaks im PMF-Spektrum, führte aber nicht immer zu einer Identifizierung, die alle Kriterien erfüllte.

Aus Messungen von Proben, die nicht mit ZipTips aufgearbeitet wurden, sondern durch Trocknung des Verdauüberstands und Lösung in kleinem Volumen erhalten wurde, sah man, daß in den meisten Fällen anzahlmäßig mehr Peaks detektiert wurden, als in den

Spektren nach einer ZipTip-Aufarbeitung. Deshalb wurde anstelle der ZipTip-Aufarbeitung eine Lyophilisierung des Verdauüberstands in einer Speedvac und anschließendes Lösen der Peptide in 33% ACN, 0,1% TFA durchgeführt. Zum Lösen wurden Volumina zwischen 0,8-2µl eingesetzt. Aus dieser Lösung wurden für die PMF-Messung Volumina zwischen 0,25-0,5µl entnommen. Mit dem Lösen in geringerem Lösungsvolumen wird für die PMF-Messung eine konzentriertere Probe eingesetzt. Zum Beispiel, wenn aus 1,5µl Peptidgemisch 0,25µl entnommen und mit 0,25µl Matrix vermischt werden, ist auf dem Probenträger eine dreimal konzentriertere Probe, als wenn aus 5µl Eluat 2µl entnommen und mit 2µl Matrix vermischt und aufgetragen werden.

Da in der bisherigen Methode der Waschschrift der Gelstücke mit Tris-Puffer durchgeführt wurde, mußte eine ZipTip-Aufarbeitung folgen. Tris-Puffer ist ein nicht-flüchtiger Puffer und kann ab einer bestimmten Konzentration bei der MALDI-MS interferieren. Da keine ZipTip-Aufarbeitung mehr vorgenommen wurde, mußte der Tris-Puffer durch einen anderen Puffer ersetzt werden. Hierfür wurde ABC-Puffer mit einer Konzentration von 200 mM eingesetzt. Die weiteren Schritte des Verdauansatzes wurden unverändert mit ABC-Puffer durchgeführt. Die Lösung von 50% 200 mM Ammoniumbicarbonat (pH 7,8)/ 50% ACN ist in der Entfärbung ein gleichstarker Puffer wie die Lösung von 50% 100 mM Tris (pH 8,5)/ 50% ACN. Eine pH Einstellung bei ABC ist nicht notwendig da sie in gelöster Form von sich aus basisch ist und einen pH von etwa 7,8 besitzt. ABC ist ein flüchtiger Puffer, der während der Lyophilisierung verdampft. Eventuelle Rückstände sind so gering, daß sie mit der MS nicht interferieren.

5.1.2 Benutzung von unterschiedlichen Matrices

Nach Vermessungen von Peptidgemischen mit unterschiedlichen Matrices hat sich gezeigt, daß in vielen PMF-Spektren, die mit DHB als Matrix vermessen wurden, mehr Peptidpeaks detektiert wurden, als mit CHCA. In Abb. 5.1 sind als Beispiel die Spektren von 10pmol/µl Cytochrom C in A) mit CHCA und in B) mit DHB als Matrix nach einem tryptischen Verdau und einer ZipTip-Aufarbeitung dargestellt. In diesem Fall konnten mit DHB eindeutig mehr Peaks detektiert und dem Cytochrom C zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurden schwache Spots vorrangig mit DHB als Matrix vermessen.

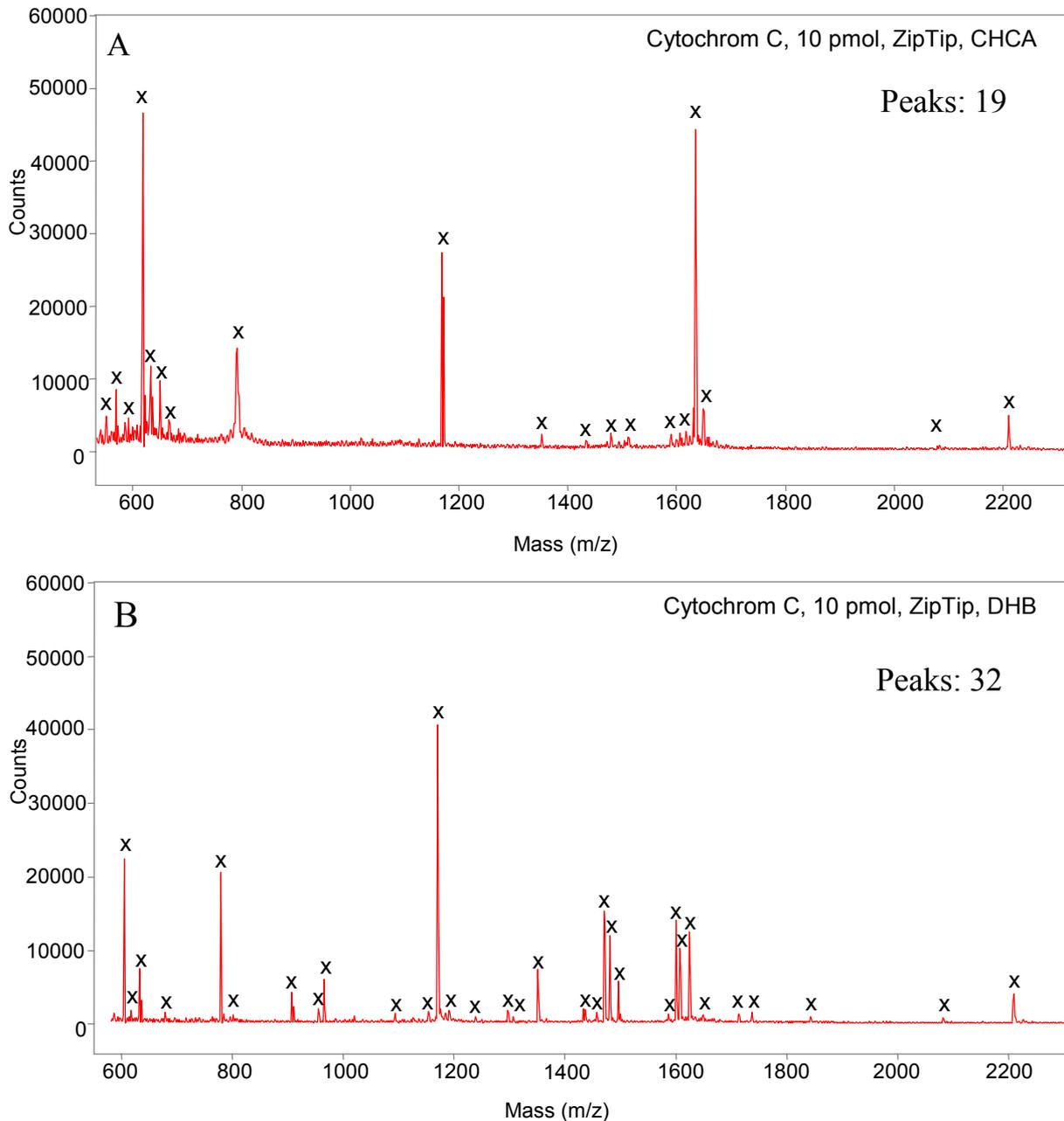


Abbildung 5.1: PMF-Spektren von 10pmol/ μ l Cytochrom C nach tryptischen Verdau und ZipTip-Aufarbeitung. A) mit CHCA und in B) mit DHB als Matrix gemessen. Mit x markierte Peaks stimmen mit Massen von Peptiden aus Cytochrom C überein.

5.1.3 Optimierung der Geräteeinstellungen

Mit der Variation einiger Meßeinstellungen am Massenspektrometer können für die selbe Probe unterschiedliche Spektren aufgenommen werden. Die Unterschiede zwischen den Spektren betreffen Intensität, Anzahl und Auflösung der Peaks und Hintergrundrauschen. Die Auswirkungen folgender Parameter wurden untersucht: Delay-Zeit, Grid Spannung, Guide

Wired Spannung und Beschleunigungsspannung. Die Delay-Zeit ist die Zeitspanne, in der die gebildeten Ionen kurz verweilen bevor sie von der Beschleunigungsspannung erfaßt werden und zum Detektor fliegen. Die Beschleunigungsspannung wird zwischen dem Probenträger und dem Grundgrid angelegt und ist die Spannung, mit der die Ionen vom Probenträger aus ins Flugrohr beschleunigt werden. Die Grid Spannung wird an einem zweiten Grid, dem variablen Spannungsgrid angelegt. Dieses Grid ist zwischen dem Probenträger und dem Grundgrid positioniert. Durch das Zusammenwirken von zwei Grids entsteht ein einstellbarer Potentialgradient unmittelbar im Bereich der Ionisierung. Die Guide Wire Spannung wird an das Guide Wire im Flugrohr angelegt. Grid Spannung und Guide Wire Spannung sind als Prozentsätze der Beschleunigungsspannung angegeben.

In der Software befinden sich mehrere vom Hersteller eingestellten Standardmethoden bei denen diese Parameter bestimmte Werte haben. Diese Methoden wurden für Messungen im Linearmodus und Reflektormodus für bestimmte Proteine und Peptidgemische mit kleinen und großen Massen angepaßt und eingestellt. Diese Methoden werden zwar angeboten, es wird aber vorgeschlagen, daß bei eigenen Messungen die Einstellungen der genannten Parameter an die Proben angepaßt werden sollen.

Die bisher verwendete Meßmethode hatte bestimmte Einstellungen, die für Messungen von Peptidgemischen mit CHCA als Matrix gewählt wurden. Die Spektren zeigten jedoch keine gute Auflösung für Peaks mit m/z Werten größer als 2000 und für schwach angefarbte Gelspots wurden unter Umständen sehr schlechte Spektren erhalten. Mit dem Ziel bessere Auflösung für Peaks der größeren Massen zu erhalten wurden die im weiteren beschriebenen Versuche durchgeführt. Die Messungen wurden mit DHB als Matrix durchgeführt.

5.1.3.1 Vergleich dreier Meßmethoden nach Auflösung und Intensität

Die Parametereinstellungen der getesteten Methoden sind in Tabelle 5-1 aufgeführt. Methode 1 ist die Meßmethode, die bisher für PMF-Messungen mit CHCA als Matrix gewählt wurde. In der Methode 2 wurde nur der Delay-Zeit Parameter gegenüber der Methode 1 verändert. Methode 3 ist eine vom Gerätehersteller empfohlene Meßmethode. Die Proben wurden nach der in 4.9.2 beschriebenen Methode verdaut. Auf den Probenträger wurde 1µl Probe und 1µl DHB als Matrix aufgetragen. Alle Messungen erfolgten bei gleicher Laserintensität.

Tabelle 5-1: Geräteeinstellungen der Meßmethoden

	Methode 1	Methode 2	Methode 3
Beschleunigungsspannung (Volt)	20000	20000	20000
Grid Spannung (%)	70	70	74
Guide Wire Spannung (%)	0,05	0,05	0,08
Delay-Zeit (Nanosekunden)	100	200	280

Wenn man im ‘delayed’ Extraktionsmodus Messungen vornimmt, kann man, in Verbindung mit der Delay-Zeit, mit Veränderung der Grid Spannung die Auflösung optimieren. Die maximal einstellbare Beschleunigungsspannung ist 25000V. Je höher die Beschleunigungsspannung desto effektiver ist die Detektion, im besonderen für große Massen, die für den gleichen Weg längere Zeit brauchen. Für die Auflösung der Peaks von kleineren Massen als 2000 Da ist jedoch ein niedrigerer Wert z. B. 20000 V von Vorteil. Die Einstellung der Grid Spannung hat einen großen Einfluß auf die Qualität der Daten. Für jede Grid Spannung gibt es eine optimale Delay-Zeit. Mit der Erhöhung der Guide Wire Spannung wird auch die Sensitivität erhöht. Um jedoch die Auflösung zu erhöhen muß die Guide Wire Spannung herabgesetzt werden (user’s guide).

Ein Peptidgemisch aus drei synthetischen Peptiden mit den Massen 896,57 Da, 1503,88 Da, 2154,16 Da, eine 10pmol/µl konzentrierte BSA (bovine serum albumin) Probe und drei Proteinspezies aus dem *H. pylori* Gel wurden mit MALDI-MS vermessen. BSA und die Proteine aus den Gelspots wurden vorher tryptisch verdaut. Die Spektren wurden nach der Auflösung der höheren Massen und der Peakintensitäten des Gesamtspektrums beurteilt. In den Tabellen 5-2 und 5-3 werden die dreistufigen (+, ++, +++) Auswertungen dargestellt.

Tabelle 5-2: Spektrenauswertung nach Auflösung

	Peptidgemisch	BSA	Gelspot 1	Gelspot 2	Gelspot 3
Methode 1	+	++	+	++	+++
Methode 2	+++	++	+++	++	++
Methode 3	+	+++	++	+++	++

Tabelle 5-3: Spektrenauswertung nach Intensität

	Peptidgemisch	BSA	Gelspot 1	Gelspot 2	Gelspot 3
Methode 1	++	+	++	+	+
Methode 2	++	++	++	++	++
Methode 3	+++	+	+++	+++	+++

Die Erhöhung der Delay-Zeit (Methode 2) hat in zwei Spektren (für das Peptidgemisch und Gelspot 1) eine wesentliche Verbesserung der Auflösung gebracht. Jedoch für zwei andere Proben (BSA und Gelspot 2) wurde keine Verbesserung der Auflösung erreicht. Für den Gelspot 3 gab es sogar eine Verringerung der Auflösung. Die Methode 3 brachte für drei Proben (BSA, Gelspot 1 und Gelspot 2) eine Verbesserung in Hinsicht auf Auflösung, für das Peptidgemisch wurde keine bessere Auflösung und für Gelspot 3 wurde eine geringere Auflösung erreicht.

In Hinsicht auf die Intensität der Spektren kann über die Methode 2 gesagt werden, daß mit höherer Delay-Zeit für manche Proben gleiche und für manche Proben höhere Intensitäten erzielt werden als mit der Methode 1. Die höheren Einstellungen in Methode 3 ergaben in allen Spektren, außer für BSA, höhere Intensitäten als mit den ersten beiden Methoden.

Nach dieser Auswertung würde man meinen, daß die Methode 3 die optimalen Einstellungen besitzt. Jedoch sollten die Spektren im Gesamten beurteilt werden. Auffällig an den Spektren, die mit der Methode 3 aufgenommen wurden, ist das sehr viel stärkere Hintergrundrauschen. Außerdem besitzen die Spektren sehr viele kleine Peaks, die keinen Peptiden zuzuordnen sind. Die Methode 2 erzielt vergleichsweise eine geringere Intensität mit besserer Auflösung. Die Spektren beinhalten nur noch wenige, nicht zu Peptiden zuzuordnende Peaks.

5.1.3.2 Intensitätsvergleich der Spektren einer Probe bei unterschiedlichen Geräteeinstellungen

Bei MALDI-MS-Messungen an einer Probe aus dem 2-DE Gel von *H. pylori*, dem sogenannten ‘conserved hypothetical ATP binding protein’, wurden die Parameter einzeln verändert und der Effekt ausgewertet. Die Probe wurde tryptisch nach der modifizierten Methode verdaut und mit DHB als Matrix vermessen. Die Messungen wurden alle bei einer

Beschleunigungsspannung von 20000V durchgeführt.

Ausgehend von den Einstellungen der Methode 1 (Tabelle 5-1) wurde die Delay-Zeit von 100 über 200 zu 300 nsek erhöht. Dies bewirkte eine Verbesserung der Intensität der Spektren. In dem Spektrum, das mit Delay-Zeit 300 nsek aufgenommen wurde, detektierte man im Massenbereich unterhalb m/z 1000 viele kleine Peaks.

Eine Erhöhung der Grid Spannung von 70 über 72 auf 74%, bei Delay-Zeit 100 nsek, brachte keinen Effekt für die Intensität. Die Intensität der großen Massen verringerte sich in geringem Maße.

Bei Grid Spannung 74% wurden zwei Spektren mit Delay-Zeit 100 und 200 nsek aufgenommen. Es konnte jedoch kein Unterschied beobachtet werden.

Die Erhöhung der Guide Wire Spannung von 0,05 auf 0,1%, bei den Zusatzeinstellungen Delay-Zeit 200 nsek und Grid Spannung 70%, erzeugte eine drastische Intensitätssteigerung. Die Peakintensität erhöhte sich auf das Doppelte. Somit wurde das Spektrum im höheren Massenbereich besser.

Wurde die Delay-Zeit auf 100 nsek herabgesetzt erhielt man bei den gleichen Einstellungen (Grid Spannung 70%, Guide Wire Spannung 0,1%) einen geringfügigen Abfall der Intensität. In der Abbildung 5.2 sind exemplarisch Spektren dargestellt, die die Auswirkungen der veränderten Einstellungen verdeutlichen.

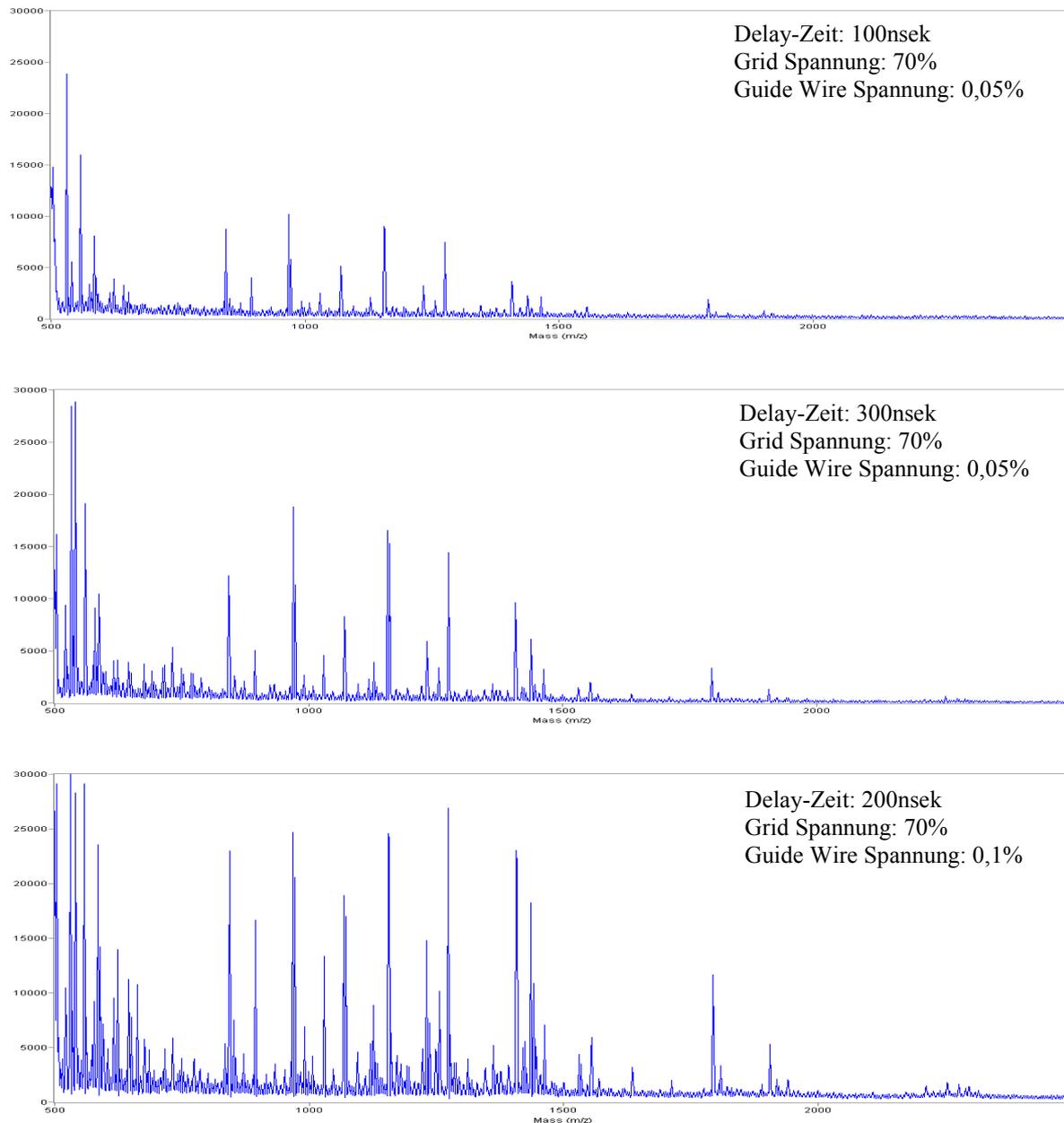


Abbildung 5.2: PMF-Spektren des ‘conserved hypothetical ATP binding‘ Proteins bei unterschiedlichen Einstellungen der Meßparameter

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die Einstellung der Grid Spannung auf 70% zu guten Ergebnissen führt bei angepaßter Delay-Zeit und Guide Wire Spannung. Die Delay-Zeit 200nsek ergibt eine gute Intensität und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Mit einer höheren Guide Wire Spannung wird erreicht, daß in der gleichen Zeit sehr viel mehr Peptide den Detektor erreichen. Deshalb steigt auch die Intensität.

Aus diesen Erkenntnissen resultierend wurden am Massenspektrometer mehrere Meßmethoden eingerichtet. Die Meßmethoden erhielten unterschiedliche Einstellungen und Namen. Bei Messungen neuer Proben wurden von nun an PMF-Spektren je nach Notwendigkeit mit unterschiedlichen Methoden vermessen. Das beste Spektrum wurde dann bearbeitet. Bei Spektren mit niedriger Intensität und Auflösung wurden die Methoden mit höherer Delay-Zeit, Grid Spannung und Guide Wire Spannung gewählt. Bei stark gefärbten Spots dagegen wurde die Methode gewählt, bei denen diese Werte eher niedrig sind. Die Parametereinstellungen der unterschiedlichen Meßmethoden sind in Tabelle 5-4 aufgeführt.

Tabelle 5-4: Parametereinstellungen der eingestellten Meßmethoden

	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4
Beschleunigungsspannung (V)	20000	20000	20000	20000
Grid Spannung (%)	70	70	70	70
Guide Wire Spannung (%)	0,05	0,05	0,08	0,1
Delay-Zeit (Nanosekunden)	100	200	200	200

5.1.4 Identifizierung von *H. pylori* Sekretionsproteinen unter Verwendung von unterschiedlichen Verdauprotokollen und Meßmethoden

Die zehn intensivsten Spots wurden als erstes ausgestochen und nach dem Verdauprotokoll mit der ZipTip-Aufarbeitung bearbeitet. Die Peptideluate wurden mit der früheren Meßmethode (Methode 1, Tabelle 5-4) vermessen. Sechs der Proteine wurden eindeutig identifiziert. Bei vier Proteinen erhielt man niedrige Sequenzabdeckungen. Die Ergebnisse für diese Proteine wurden als Kandidaten betrachtet und mußten verifiziert werden.

Die nicht eindeutig identifizierten, einige der identifizierten und die restlichen Spots wurden nach dem neuen Verdauprotokoll bearbeitet und mit unterschiedlichen Meßmethoden massenspektrometrisch vermessen. Insgesamt 29 Spots konnten identifiziert werden. Für die vorher schon identifizierten Spots erhielt man teilweise intensivere Spektren und höhere Sequenzabdeckungen. Bei drei der sehr schwachen Spots (Spot Nr. 3_4, 1_5 und 1_4) konnten erst mit den höchsten Einstellungen (Methode 4) auswertbare Spektren erhalten werden, was dann auch zur Identifizierung dieser Proteine führte.

In Abbildung 5.3 ist ein CBB gefärbtes Gel dargestellt. 32 der bearbeiteten Spots sind eingezeichnet. Ein Spot war auf diesem Gel nicht eindeutig zu erkennen, wurde aber aus einem anderen Gel ausgestochen. Die identifizierten Proteinspezies sind in Tabelle 5-4 aufgelistet. Der Spot 1_7 ist kein Sekretionsprotein. Es ist Urease B, das Protein, daß in *H. pylori* Zellen am häufigsten vorkommt. Daß es sich in kleinen Mengen unter den Sekretionsproteinen befindet ist auf die Lysis eines kleinen Teils der Zellen zurückzuführen.

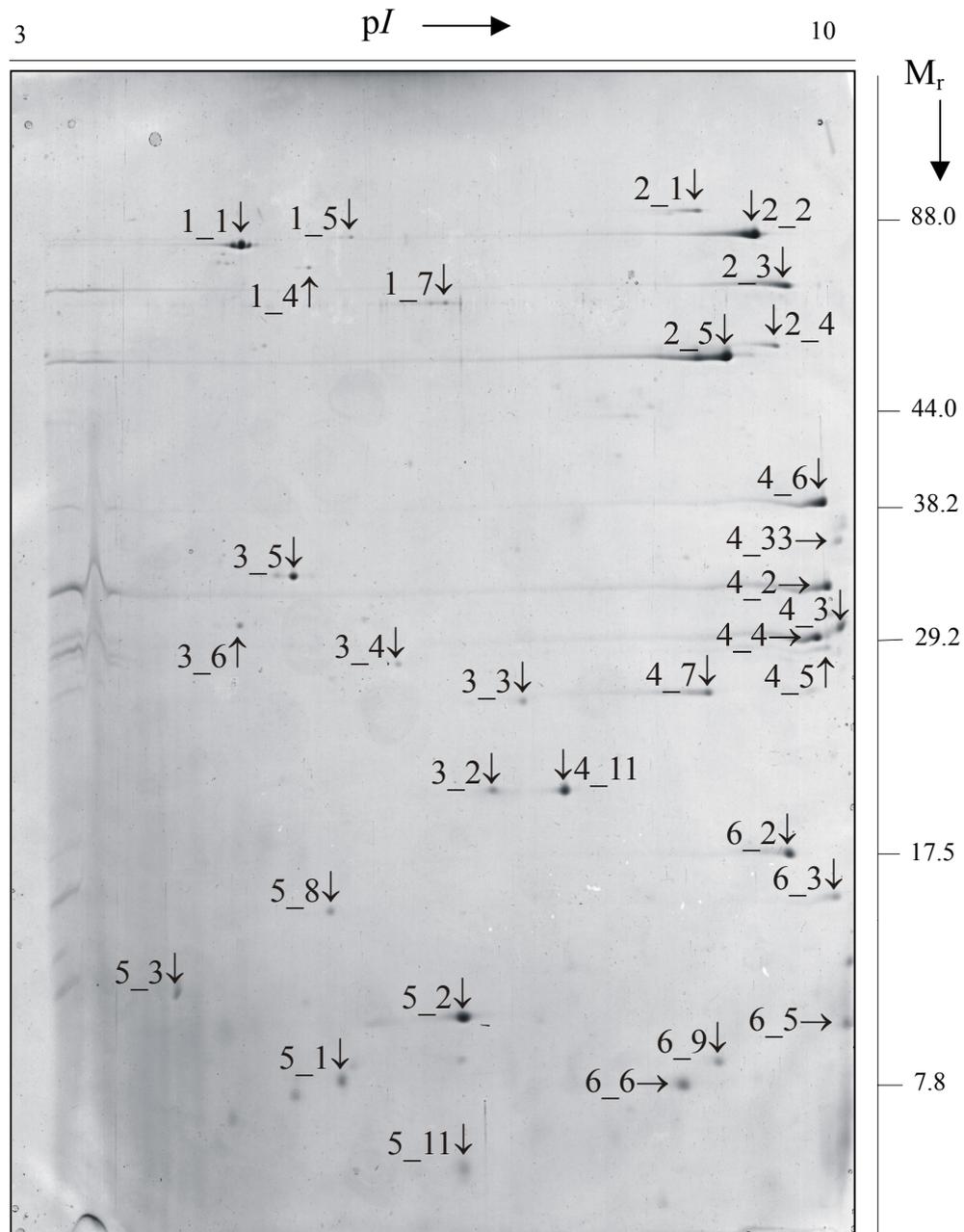


Abbildung 5.3: CBB gefärbtes 2-DE Gelbild der Sekretionsproteine von *H. pylori* (Gesamtproteinmenge 110µg)

Tabelle 5-5: Identifizierte Proteinspezies der Sekretionsproteine von *H. pylori*

Topspot Nr.	Protein Name	M _r (theor.)	pI (theor.)	Sequenz-abdeckung
1_1	Flagellar hook protein HP0870 (FlgE)	76 207,0	5,04	39%
1_4	Flagellar hook-associated protein 2 HP0752 (fliD)	72 761,0	5,23	31%
1_5	Flagellin B homolog HP0295 (fla)	91 998,0	5,30	36%
1_7	Urease B HP0072 (UreB)	61 671,7	5,64	28%
2_1	Vacuolating cytotoxin HP0887 (VacA) (Fragment)	139 313,3	9,02	47%
2_2	Vacuolating cytotoxin HP0887 (VacA) (Fragment)	139 313,3	9,02	43%
2_3	Hypothetical protein HP0906	58 161,2	9,14	44%
2_4	γ -glutamyltranspeptidase HP1118 (GGT)	61 151,9	9,27	45%
2_5	Serine proteinase HP1019 (HtrA)	47 983,8	8,96	45%
3_2	γ -glutamyltranspeptidase HP1118 (GGT) (Fragment)	61 151,9	9,27	17%
3_3	Thiol-disulfide interchange protein HP0377 (DsbC)	25 340,0	8,18	31%
3_4	Translation elongation factor EF-P HP0177 (efp)	20 775,0	5,43	49%
3_5	Hook assembly protein, flagella HP0907 (FlgD)	33 710,3	5,14	43%
4_11	γ -glutamyltranspeptidase HP1118 (GGT) (Fragment)	61 151,9	9,27	19%
4_2	Cell binding factor 2 HP175	34 031,2	9,29	30%
4_3	Conserved hypothetical secreted protein HP1098	31 594,4	8,77	43%
4_33	Hypothetical protein HP1454	33 871,1	9,31	67%
4_4	Hypothetical protein HP0231	29 459,3	9,09	33%
4_5	Carbonic anhydrase HP1186	23 215,8	9,23	57%
4_6	γ -glutamyltranspeptidase HP1118 (GGT) (Fragment)	61 151,9	9,27	35%
4_7	Hypothetical protein HP0367	23 211,0	7,85	62%
5_1	Thioredoxin HP0824 (TrxA)	11 854,8	5,16	52%
5_2	Vacuolating cytotoxin HP0887 (VacA) (Fragment)	139 313,3	9,02	6%
5_3	Flavodoxin HP1161 (FldA)	17 492,5	4,45	57%
6_2	Conserved hypothetical secreted protein HP1286	20 614,9	9,21	46%
6_3	Hypothetical protein HP1173	20 586,0	8,95	34%
6_5	γ -glutamyltranspeptidase HP1118 (GGT) (Fragment)	61 151,9	9,27	21%
6_6	Thioredoxin HP1458 (TrxC)	11 744,8	7,72	67%
6_9	Flagellar hook-basal body complex protein HP1557 (FliE)	12 195,9	7,97	38%

Sieben der Proteinspezies sind als Fragmente gekennzeichnet. Sie gehören zu zwei

großen Proteinen, dem Vacuolating cytotoxin (Spots 2_1, 2_2, 5_2) und der γ -glutamyltranspeptidase (3_2, 4_6, 4_11, 6_5). Da ein Proteinfragment aus einem Teil des Gesamtproteins besteht, kann die Sequenzabdeckung nicht zu der Gesamtsequenz berechnet werden. Kennt man die Start- und Endpunkte des Fragmentes, kann die Sequenzabdeckung zu diesem Fragment berechnet werden. Auf diese Weise wurden auch für diese Fragmente Sequenzabdeckungen von über 30% erhalten.

Für das Vacuolating cytotoxin, das eine Sequenz von 1290 Aminosäuren besitzt, ist es bekannt, daß es nach der Sekretion ins Zelläußere, die Signalsequenz verliert und in mehrere Fragmente gespalten wird (Nguyen *et al.*, 2001). Für den Spot 2_2 wurde mit den detektierten Massenpeaks eine Übereinstimmung für Peptide zwischen den Aminosäuren 74 bis 851 erhalten. Dieses Fragment stimmt mit dem Hauptfragment des Proteins, das die Sequenz von Aminosäure 34 bis 854 abdeckt, überein. Bei Spot 5_2 deckten die Massenpeaks eine Teilsequenz zwischen den Aminosäuren 894 bis 981 ab. Im PMF-Spektrum befanden sich jedoch zwei intensive Peaks, die nicht zugeordnet werden konnten. Diese Peptide wurden freundlicherweise von Dr. Katharina Janek an einem ESI-Massenspektrometer (LCQ, Finnigan) ansequenziert. Hieraus ergaben sich für den Peak bei m/z 1018,46 die Sequenz HTNNIDSFA und für den Peak bei m/z 1174,57 die Sequenz RHTNNIDSFA. Diese Sequenzen entsprechen den Fragmenten zwischen den Aminosäuren 982 bis 991 und 983 bis 991 des Vacuolating cytotoxins. Da die Aminosäure 991 kein Arginin oder Lysin ist, kann dieses Fragment nicht von Trypsin gespalten worden sein. Es muß der C-Terminus des Fragments in Spot 5_2 sein. Daher liegt die Annahme nahe, daß der Spot 5_2 ein kleines natürliches Fragment des Vacuolating cytotoxins beinhaltet. Das Fragment reicht von Aminosäure 854 bis 991. Somit wurde eine vorher nicht bekannte Schnittstelle einer Domäne dieses Proteins gefunden. Für den Spot 2_1 erhielt man über PMF-Messung eine Sequenzabdeckung zwischen den Aminosäuren 89 bis 981. In diesem Fall handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Fragment, das aus dem kleinen Fragment von Spot 5_2 und dem Hauptfragment von Spot 2_2 besteht. Bei dem Fragment in Spot 5_2 erhält man eine Sequenzabdeckung von 6% des gesamten Proteins. Wenn jedoch berücksichtigt wird, daß das Fragment nur 137 Aminosäuren lang ist und die Massenpeaks des Spektrums insgesamt 98 Aminosäuren abdecken, wird eine Sequenzabdeckung von 71,5% erreicht. In Abbildung 5.4 ist das PMF-Spektrum von Spot 5_2 dargestellt. Abbildung 5.5 zeigt das ausgewertete MS/MS Spektrum zu dem Peak bei m/z 587,8. Dieser Peak entspricht dem zweifach geladenen Peptid mit der Masse m/z 1174,57.

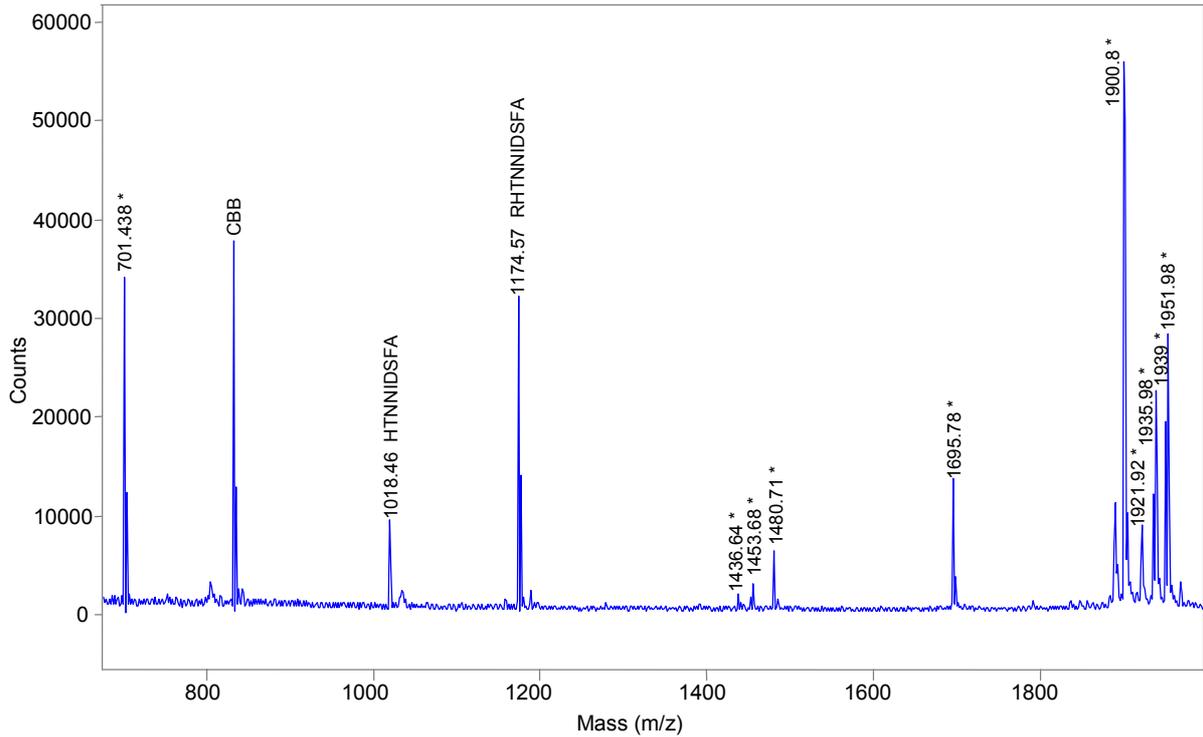


Abbildung 5.4: PMF-Spektrum von Spot 5_2. Mit * markierte Peaks werden dem Vacuolating cytotoxin zugeordnet. Der mit CBB markierte Peak entspricht dem Farbstoff CBB.

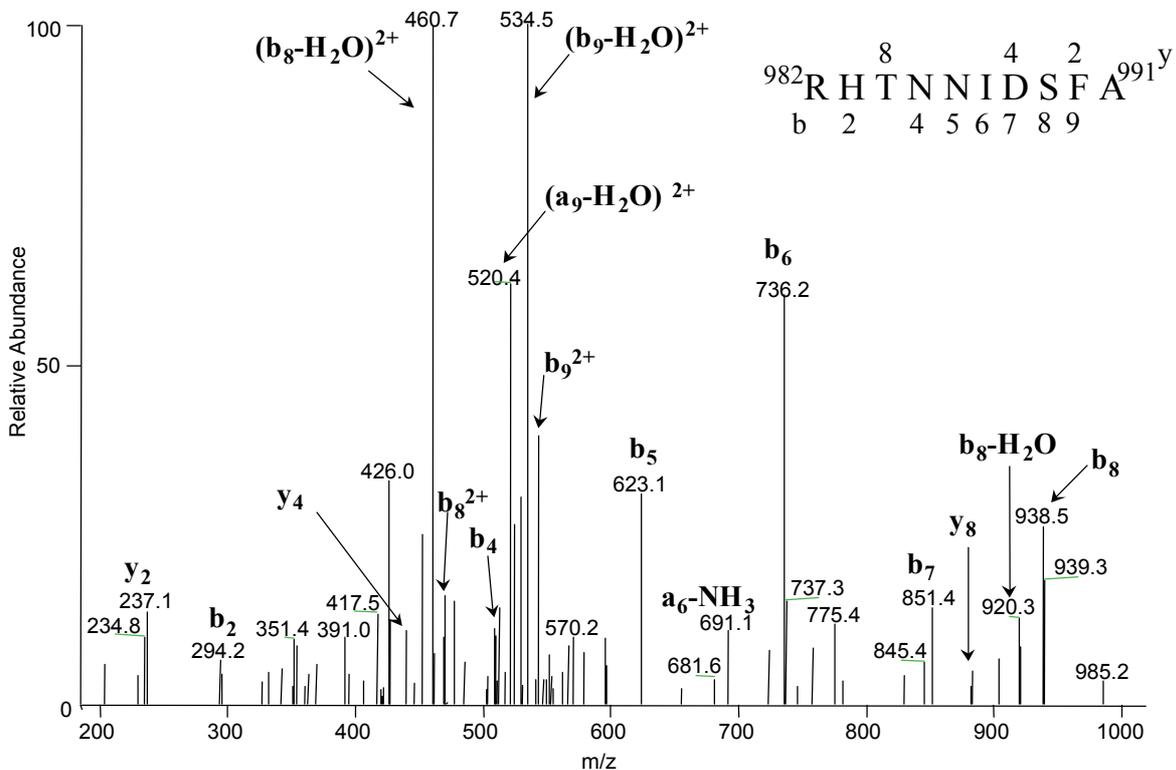


Abbildung 5.5: MS/MS Spektrum des Massenpeaks m/z 1174,57 aus dem Spot 5_2

5.2. Proteomanalyse der Brustdrüsenproteine der Maus

Unter Anwendung der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) wurden die Proteine aus dem Brustdrüsen Gewebe der Maus aufgetrennt und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und N-terminaler Sequenzierung identifiziert. Die Identifizierungen wurden an Brustdrüsen Gewebe von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Auftrennung der Brustdrüsenproteine der Maus durch die 2-DE Technik wurde erstmals für Gewebeproben angewendet.

Die identifizierten Proteine wurden in einer relationalen Proteindatenbank zusammengestellt. Die Datenbank ist im Internet frei zugänglich. In der Datenbank ist ein silbergefärbtes 2-DE Gelbild der Mausbrustdrüsenproteine abgebildet. Auf diesem Bild sind die identifizierten Proteinspots gekennzeichnet. Durch Anklicken der markierten Spots können spezifische Informationen zu den Proteinen abgerufen werden.

Anhand der identifizierten Proteine wurde eine neue Kalibrierungsmethode für 2-DE Gele etabliert. Die N-terminale Sequenzierung ermöglichte für die Proteine, die über diese Methode identifiziert wurden, die Zuordnung der N-terminalen Aminosäure. Dabei wurde erkannt, daß viele Proteine z. B. keine Signalsequenz mehr besaßen oder durch unbekannte Prozesse fragmentiert worden waren. Die Kenntnis der N- und C-terminalen Aminosäuren einer Proteinspezies ermöglicht die Berechnung von Eigenschaften, wie pI und Molekulargewicht (M_w), aus der Sequenz der Polypeptidkette der analysierten Proteinspezies. Mit Hilfe dieser Informationen wurde eine iterative Kalibrierungsmethode für 2-DE Gele etabliert. Diese Kalibrierungsmethode ermöglicht nicht nur eine genauere Kalibrierung von 2-DE Gelen, sondern ermöglicht auch die Erkennung von posttranslational modifizierten Proteinspezies.

Durch die subtraktive Proteomanalyse wurden die Proteinmuster aus Brustdrüsen Gewebelysaten von doppeltransgenen Mäusen untersucht. Bei doppeltransgenen Mäusen, die in ihrem Genom die zusätzlichen humanen Gene des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl. EGFR) und des 'transforming growth factor α ' (TGF α) besitzen, entwickelte sich in einer Brustdrüse ein Tumor. Der Vergleich von histologisch normalem Brustdrüsen Gewebe mit Tumorgewebe aus der selben transgenen Maus erfolgte an vier Probenpaaren. Es wurden quantitative Veränderungen einiger Proteinspezies detektiert.

5.2.1 Identifizierung und Charakterisierung von Wildtyp-Mausbrustdrüsenproteinen und Zusammenstellung in einer Proteindatenbank

Brustdrüsen Gewebeprobe aus zwei Wildtyp-Mäuseweibchen, die durch vier Laktationsperioden gegangen waren, wurden nach der in 4.1 beschriebenen Methode für die 2-DE aufgearbeitet. Mehrere reproduzierbare silbergefärbte und CBB gefärbte Gele im 30 x 23 cm Format wurden nach der hochauflösenden 2-DE gefertigt. Zusätzlich wurde ein Gel auf PVDF Membran geblottet. Die Blotmembran wurde zur N-terminalen Sequenzierung verwendet. Aus einem CBB R-250 gefärbten Gel wurden Spots ausgestochen und nach einem 'in-gel' Verdau mit der MALDI-MS Technik vermessen.

Die Proteinspots auf der Blotmembran wurden durch die Färbung mit CBB R-250 sichtbar. Insgesamt wurden 112 Spots nach der automatischen Edman-Sequenzierung an einem Gasphasensequenzierer ansequenziert. 42 dieser Spots konnten durch Datenbanksuche eindeutig identifiziert werden. Sechs weitere Spots konnten im niedermolekularen Bereich des Gels identifiziert werden, sie konnten aber auf dem silbergefärbten Gel nicht eindeutig zugeordnet werden. Bei den restlichen 64 Spots waren entweder die N-terminalen Aminosäuren blockiert oder die Proteinkonzentration reichte für die Sequenzierung nicht aus. Zwei Proteinspots konnten nur zusammen mit den Ergebnissen der PMF-Messung dieser Spots eindeutig identifiziert werden.

Aus einem CBB R-250 gefärbten Gel wurden insgesamt 50 Spots ausgestochen und nach der in 4.9.1 beschriebenen Methode mit Trypsin verdaut. Anschließend wurden PMF-Spektren der Peptidgemische mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer aufgenommen. 34 dieser Spots wurden nach einer Datenbanksuche eindeutig identifiziert. Die restlichen 16 Spots konnten nicht identifiziert werden, da sie die erforderlichen Kriterien (siehe unten) nicht einhielten. Bei der Identifizierung über Peptidmassen wurden folgende Kriterien befolgt: a) mindestens 30% Sequenzabdeckung, b) +/- 100 ppm als erlaubte Massentoleranz zu der Masse eines einfach protonierten monoisotopischen Peptids ($[M+H]^+$), c) höchstens zwei übersprungene Spaltstellen und d) mindestens vier übereinstimmende Peptidmassen. Acht Spots wurden unabhängig voneinander mit beiden Methoden identifiziert.

Somit wurden insgesamt 66 Proteinspezies aus dem Brustdrüsen Gewebe der Wildtyp-Maus identifiziert. Die identifizierten Proteine sind auf dem, in Abbildung 5.6 dargestellten, silbergefärbten Referenzgel markiert. Dieses Gelbild mit den identifizierten Proteinen 1-66 ist in der, im Internet frei zugänglichen, 2-DE Proteindatenbank abgebildet. Die Datenbank ist unter der URL: <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/> einzusehen.

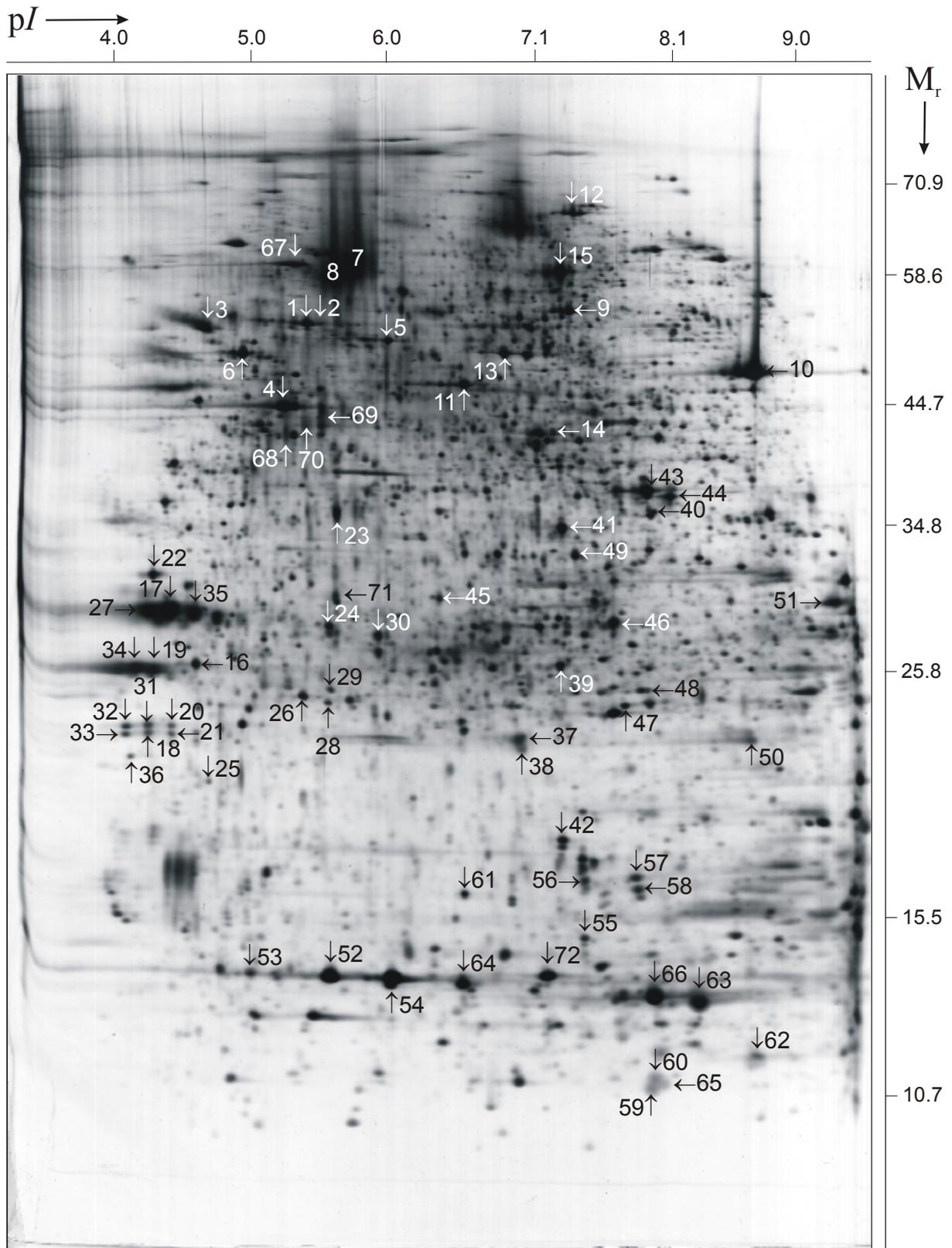


Abbildung 5.6: Silbergefärbtes 2-DE Referenzgel von Mausbrustdrüsen gewebe proteinen. Identifizierte Proteinspots sind nummeriert. Das Gel enthält 170µg Gesamtprotein.

In der Datenbank werden die Namen der identifizierten Proteinspezies angezeigt,

wenn der Cursor auf die Markierungen geschoben wird. Durch das Anklicken der Markierung erscheinen in einem neuen Fenster zusätzliche Informationen zu den Proteinen. Diese Informationen wurden vorher in eine Access Datenbank eingegeben und sind interaktiv mit der Datenbank verbunden. Die in der Datenbank enthaltenen Informationen sind im weiteren beschrieben.

Bevor das Referenzgel in die 2-DE Datenbank gesetzt werden konnte, wurde es mit dem Analyseprogramm TopSpot bearbeitet. Zuerst wurde das Gelbild in sechs gleichgroße und sich überlappende Sektoren geteilt. Dann wurde jeder Sektor einzeln editiert. Die Editierung der Spots erfolgte zuerst automatisch, mußte aber manuell vervollständigt werden. Die Detektion der Spots mit solchen Programmen erfolgt nicht 100%ig richtig. Zum Beispiel werden Spots, die sich überlappen, nicht immer als einzelne Spots erkannt. In solchen Fällen müssen die Spots manuell getrennt werden. Manchmal erscheinen in 2-DE Gelen senkrechte oder horizontale Streifen, ein für Proteinspots untypisches Muster, oder manche Spots ziehen einen Schweif hinter sich. Solche Streifen sollten nicht als ein weiterer Spot detektiert werden. In den sich überlappenden Regionen der Sektoren wurden die Spots nur in einem Sektor markiert. Auf dem Referenzgel wurden nach der Editierung insgesamt 4250 Spots erfaßt. Mit der Editierung wird jedem Spot eine TopSpot Nummer zugeordnet. Nach einer interaktiven Evaluierung wurde zu jedem Sektor ein Map-File kreiert, daß die Koordinaten der detektierten Spots definiert. Zusätzlich wurden 'portable network graphics'-Files kreiert. Diese Files wurden mit den Map-Files und Informationen zu den identifizierten Spots, die in eine Access-Datenbank eingetragen wurden, benutzt um die Datenbank zu erstellen. Diese Datenbank wurde freundlicherweise von Till Eifert erstellt. In die Access-Datenbank wurden Informationen wie Proteinname, NCBI Eintragsnummer, Identifikationsmethode, theoretische und praktische M_r - und pI -Werte, wenn verfügbar, die Swiss-prot Proteinnummer und Genlokus sowie die MS-Fit Sequenzabdeckung und die ermittelte Sequenz eingegeben. In der Tabelle 5-6 sind die 66 identifizierten Proteinspezies mit den entsprechenden Informationen aufgelistet.

Tabelle 5-6: Liste der identifizierten Proteine aus Mausbrustdrüsenewebe mit folgenden Daten: TopSpot Nr., Proteinname, NCBI Nr., Proteinname, NCBI Nr., Swiss-prot Nr., Identifizierungsmethode, Sequenzabdeckung, ermittelte Sequenz, theoretische Sequenz, theoretische M_r , nach der ersten Iteration und praktische Werte für das relative Molekulargewicht M_r und den isoelektrischen Punkt pI .

Spot Nr.	TopSpot Nr.	Proteinname (englisch)	NCBI Nr.	Swiss Prot Nr.	Ident. Meth.	Seq. Abd.	ermittelte Sequenz	theor. M_r	theor. pI	M_r nach 1. Iter.	pI nach 1. Iter.	M_r nach 2-DE	pI 2-DE
1	1_12	60 kDa heat shock protein	3219998	P19226	NTS	-	AKDVKFGAD	60 955.5	5.91	57 925.8	5.35	53837.5	5.40
2	1_13	60 kDa heat shock protein	3219998	P19226	NTS	-	XXDVKVF	60 955.5	5.91	57 925.8	5.35	53641.3	5.51
3	1_30	Protein disulfide-isomerase	129729	P09103	NTS	-	DALEEDNV	57 143.6	4.79	55 175.2	4.75	53248.8	4.68
4	1_4	Gamma-actin	809561	-	PMF	36%	-	41 019.0	5.56	-	-	45124.0	5.23
5	1_406	Keratin, type II cytoskeletal 8	125111	P11679	PMF	43%	-	54 449.1	5.50	-	-	51815.9	6.01
6	1_49	ATP synthase beta chain	20455479	P56480	PMF, NTS	62%	AAQASAAPKA	56 300.5	5.19	51 749.2	4.99	50516.0	4.93
7	1_73	Serum albumin	5915682	P07724	PMF, NTS	49%	QAHXSEIAHR XN	68 692.5	5.75	65 892.1	5.53	61076.5	5.79
8	1_75	Serum albumin	5915682	P07724	PMF, NTS	50%	IAFSQYLQ	68 692.5	5.75	63 118.0	5.44	59299.4	5.62
9	2_112	Pyruvate kinase, M2 isozyme	2506796	P52480	PMF	54%	-	57 887.0	7.17	-	-	55100.3	7.36
10	2_154	Elongation factor 1- α 1	1169475	P10126	PMF	43%	-	50 163.9	9.10	-	-	48457.3	8.73
11	2_207	Alpha-enolase	13637776	P17182	PMF	67%	-	47 140.8	6.37	-	-	47266.2	6.57
12	2_30	Similar to mitochondrial aconitase (BC004645)	13435538	-	PMF	42%	-	85 463.5	8.08	-	-	67521.2	7.38
13	2_576	ATP synthase α -chain, mitochondrial precursor	416677	Q03265	PMF	49%	-	59 752.6	9.22	-	-	50490.6	6.87
14	2_58	Phosphoglycerate kinase I	129903	P09411	PMF	48%	-	44 536.4	7.54	-	-	42639.1	7.24
15	2_77	Transketolase	730956	P40142	PMF	54%	-	67 630.5	7.23	-	-	59789.6	7.29
16	3_1	Translationally controlled tumor protein	136481	P14701	PMF, NTS	83%	MIYRDLISHD	19 462.2	4.76	-	-	26385.9	4.58
17	3_102	Beta casein	115663	P10598	NTS	-	RETF	25 337.3	5.82	23 779.3	5.61	29522.1	4.39
18	3_110	Epsilon casein	115656	P02664	NTS	-	KQRMEQ	16 911.5	5.86	15 309.3	5.44	22800.0	4.23
19	3_138	Gamma casein	543932	Q02862	NTS	-	KHEIKD	21 100.6	6.20	19 446.5	5.96	26056.5	4.24
20	3_145	Epsilon casein	115656	P02664	NTS	-	KQRMEQYI	16 911.5	5.86	15 309.3	5.44	23199.1	4.40

Ergebnisse

21	3_146	Epsilon casein	115656	P02664	NTS	-	KQRMEQYI	16 911.5	5.86	15 309.3	5.44	22800.0	4.40
22	3_241	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	13278099	-	PMF,	42%	GFGDLK	24 693.7	4.53	24 562.5	4.53	31803.3	4.26
23	3_371	Pyruvate dehydrogenase E1 component β -subunit,	12848170	-	NTS	36%	VQLTVRQAIN	38 937.1	6.41	35 768.3	5.39	36097.1	5.62
24	3_39	Actin (fragment)	49864	-	NTS	-	XAIQAVLSXY	37 812.3	5.45	26 931.9	5.32	28621.0	5.57
25	3_46	Epsilon casein	115656	P02664	NTS	-	KQRMEQ	16 911.5	5.86	15 309.3	5.44	20635.2	4.67
26	3_497	Apolipoprotein A-I	231557	Q00623	PMF,	54%	DEPQSQXDK	30 587.5	5.64	27 922.3	5.42	24708.9	5.37
27	3_53	Beta casein	115663	P10598	NTS	-	RETF	25 337.3	5.82	23 779.3	5.61	29522.1	4.22
28	3_567	Apolipoprotein A-I precursor	231557	Q00623	PMF	38%	-	30 587.5	5.64	-	-	24319.5	5.56
29	3_583	Apolipoprotein A-I precursor	231557	Q00623	PMF	34%	-	30 587.5	5.64	-	-	25008.3	5.58
30	3_672	Beta casein	115663	P10598	NTS	-	RETFXVXS	25 337.3	5.82	23 779.3	5.61	27893.1	5.93
31	3_81	Epsilon casein	115656	P02664	NTS	-	KQRMEQ	16 911.5	5.86	15 309.3	5.44	23225.7	4.23
32	3_86	Epsilon casein	115656	P02664	NTS	-	KQRMEQYI	16 911.5	5.86	15 309.3	5.44	23172.5	4.07
33	3_90	Epsilon casein	115656	P02664	NTS	-	KQRMEQYI	16 911.5	5.86	15 309.3	5.44	22773.4	4.06
34	3_911	Gamma casein	543932	Q02862	NTS	-	KHEIKD	21 100.6	6.20	19 446.5	5.96	26146.4	4.13
35	3_928	Beta casein	115663	P10598	NTS	-	RETF	25 337.3	5.82	23 779.3	5.61	29314.2	4.56
36	3_94	Sulfated 50 kDa glycoprotein	401082	Q02596	NTS	-	LLPGSKDEL	16 208.9	4.51	14 267.5	4.44	21762.4	4.10
37	4_153	Beta casein (fragment)	115663	P10598	NTS	-	QLQAEDV	25 337.3	5.82	19 843.0	6.55	22472.3	6.97
38	4_166	Beta casein (fragment)	115663	P10598	NTS	-	AEDVLQAKV	25 337.3	5.82	19 473.6	6.56	21996.1	7.01
39	4_17	Triosephosphate isomerase	2851390	P17751	PMF	58%	-	26 712.6	6.90	-	-	26307.5	7.29
40	4_19	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	7949053	-	PMF	48%	-	35 993.0	8.67	-	-	35946.1	7.96
41	4_228	L-lactate dehydrogenase A chain	126048	P06151	PMF	40%	-	36 497.6	7.61	-	-	35097.8	7.31
42	4_238	Nucleoside diphosphate kinase B	266608	Q01768	PMF	73%	-	17 363.1	6.97	-	-	18275.2	7.31
43	4_24	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	120702	P16858	PMF,	44%	VKGVN	35 810.0	8.44	35 678.8	8.45	37749.4	7.94
44	4_27	Malate dehydrogenase	126897	P08249	NTS	-	AKVAVLGASG GIG	35 596.4	8.82	33 123.6	8.37	37394.2	8.11

45	4_346	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X (fragment)	462146	Q00612	PMF + NTS	18%	VAXEKPATT	59 262.6	6.06	28 006.8	5.84	30392.4	6.39
46	4_348	Carbonic anhydrase III	10717134	-	PMF	70%	-	29 366.3	6.89	-	-	28763.6	7.69
47	4_373	Manganese superoxide dismutase, mitochondrial precursor	3041732	P09671	PMF	56%	-	24 603.0	8.80	-	-	24194.5	7.77
48	4_399	ATP citrate lyase (fragment)	14193670	-	NTS	-	MVTADHXPA V	119 728.0	7.13	22 816.5	7.80	25027.8	7.88
49	4_56	Guanine nucleotide binding protein, beta-2	6680047	-	PMF	48%	920.4 Da (acTEQMTRLR)	35 076.7	7.60	34 945.5	7.57	33109.1	7.40
50	4_584	Alpha casein (fragment)	115650	P19228	NTS	-	XASLAKQASL FQ	35 602.3	5.88	20 023.9	9.44	22445.7	8.71
51	4_91	Putative, ribosomal protein S4, X-linked (AK014210)	12851918	-	PMF	73%	-	29 615.8	10.16	-	-	30066.6	9.33
52	5_16	Fatty acid-binding protein	1706758	P11404	PMF	90%	1036.5 Da (acADAFVGT WK)	14 819.8	5.68	14 688.6	5.69	13774.3	5.58
53	5_196	Cytochrome c oxidase, subunit Va	6680986	-	NTS	-	SHGSHET	16 030.4	6.08	12 436.1	5.01	13855.7	4.99
54	5_57	Fatty acid-binding protein	6753810	-	PMF	78%	1036.5 Da (acADAFVGT WK)	14 818.9	6.11	14 687.7	6.15	13676.7	6.03
55	6_117	Fatty acid synthase (fragment)	119837	P19096	PMF + NTS	3%	XXXXXXDVEH ISVLE	91 213.0	7.66	15 608.7	6.77	14891.5	7.47
56	6_123	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a	118105	P17742	PMF	57%	2047.9 Da (acVNPTVFFD ITADDEPLGR)	17 971.3	7.73	17 840.2	7.88	16785.1	7.47
57	6_152	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a	118105	P17742	NTS	-	VNPTVFF	17 971.3	7.73	17 840.2	7.88	16885.0	7.85
58	6_166	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a	118105	P17742	NTS	-	VNPTV	17 971.3	7.73	17 840.2	7.88	16465.3	7.87
59	6_173	Hemoglobin alpha chain	122441	P01942	NTS	-	VLSGED	14 981.0	8.08	-	-	10822.5	7.97

Ergebnisse

60	6_181	Hemoglobin alpha chain	122441	P01942	NTS	-	VLSGEDKSN	14 981.0	8.08	-	-	11122.2	8.00
61	6_24	Cu/Zn superoxide dismutase	134614	P08228	PMF	32%	-	15 942.7	6.02	-	-	16310.3	6.58
62	6_259	Hemoglobin beta chain (fragment)	122526	P02089	NTS	-	VVYPXTQRYF	15 878.3	7.85	12 386.2	9.10	11633.0	8.76
63	6_36	Hemoglobin alpha chain	122441	P01942	NTS	-	VLSGED	14 981.0	8.08	-	-	13107.0	8.32
64	6_5	Fatty acid-binding protein	6753810	-	PMF	60%	1036.5 Da (acADAFVGT WK)	14 818.9	6.11	14 687.7	6.15	13580.1	6.57
65	6_54	Hemoglobin alpha chain	122441	P01942	NTS	-	VLSGED	14 981.0	8.08	-	-	10968.7	8.07
66	6_74	Hemoglobin beta-1 chain	122513	P02088	NTS	-	VHLTDAEKAA VS	15 840.2	7.13	15 709.0	7.26	13185.8	7.99
67	1_6	Heat shock 70 kD protein 8	20887911	-	PMF	19%	-	64 535.0	5.36	-	-	60 715.8	5.30
68	1_202	Serum albumin (fragment)	20835629	-	PMF	32%	-	68 648.0	5.75	-	-	42 543.2	5.25
69	1_214	Serum albumin (fragment)	20835629	-	PMF	17%	-	68 648.0	5.75	-	-	44 600.9	5.52
70	1_342	Serum albumin (fragment)	20835629	-	PMF	21%	-	68 648.0	5.75	-	-	43 297.3	5.28
71	3_40	Actin (fragment)	49864	-	PMF	22%	-	37 788.0	5.45	-	-	30 007.3	5.63
72	6_6	Fatty acid-binding protein, adipocyte (A-FABP)	14149635	-	PMF	75%	-	14 641.0	8.5	-	-	13 764.7	7.19

(Ident. Meth.: Identifizierungsmethode; Seq. Abd.: Sequenzabdeckung bezüglich der Gesamtsequenz; theor.: theoretische; lter.: lteration; ac: acetyliert; X in der Sequenz: nicht-ermittelte Aminosäure)

5.2.2 Etablierung einer neuen 2-DE Gelkalibrierungsmethode

Nach der Charakterisierung der identifizierten Proteinspots nach ihrem Molekulargewicht und pI Wert werden Referenzgele kalibriert. Für die Kalibrierung eines 2-DE Gels wurde eine neue Kalibrierungsmethode erarbeitet.

Bei der Identifizierung von Proteinen durch den Vergleich von Sequenzabschnitten oder Peptidmassen mit den entsprechenden Daten von bekannten Proteinen aus Proteinsequenzdatenbanken werden die theoretischen Werte für Molekulargewicht und pI angegeben. Diese theoretischen M_w - und pI -Werte beziehen sich jedoch nur auf die Polypeptidkette der Proteine. Das bedeutet, daß auch bei konjugierten Proteinen nur die M_w/pI -Werte für den Aminosäureteil angegeben werden. Da aber nicht alle Programme beide Werte angeben, wurden für die Sequenz jedes identifizierten Proteins über das 'Compute pI/M_w Tool' von ExPaSy die theoretischen M_w - und pI -Werte neu berechnet (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html). Hierbei wird das M_w aus der Summe der mittleren molekularen Massen der einzelnen Aminosäuren unter Berücksichtigung aller Isotopen berechnet. Die pI -Werte werden über die pK -Werte der einzelnen Aminosäuren berechnet (Bjellqvist et al., 1993, 1994).

Nach der Ermittlung der x - und y -Koordinaten der identifizierten Spots auf dem Referenzgel über das Programm TopSpot, wurden die y -Koordinaten gegen das theoretische Molekulargewicht der Spots in einem Punktdiagramm aufgetragen (Abb. 5.7a). Die x -Koordinaten, die ja mit dem pI korrelieren, wurden gegen die theoretischen pI -Werte aufgetragen (Abb. 5.8a). Nach der Annahme, daß das Molekulargewicht der Proteine im 2-DE Gel von unten nach oben einen exponentiellen Anstieg zeigt, wurde in dem Punktdiagramm mit dem Programm Excel eine exponentielle Trendlinie eingezeichnet. Ein exponentieller Anstieg des Molekulargewichts bedeutet, daß die Trennung der niedermolekularen Proteine bis etwa 30000 Da besser ist als die Trennung der hochmolekularen Proteine. Im oberen Gelteil sind die Proteine daher eher gestaucht. Für die Aufteilung des pI 's über die Breite des Gels wurde eine lineare Verteilung vorausgesetzt. Demnach wurde in das (x -Koordinate – pI)-Diagramm eine lineare Trendlinie eingezeichnet.

Durch die Kenntnis der N-terminalen Aminosäure von insgesamt 47 Proteinspezies (42 wurden über N-terminale Sequenzierung und fünf über PMF ermittelt) war es möglich für viele genauere M_w - und pI -Werte zu berechnen. Den meisten dieser Proteinspezies fehlten die Signalsequenzen. Einige waren Fragmente von größeren Proteinen und einige besaßen kein Methionin am N-Terminus, obwohl es in dem Datenbankeintrag so angegeben wurde. Die

Berechnung der genaueren M_w - und pI -Werte für die Proteinspezies, für die bekannt war, daß sie einen Teil ihrer N-terminalen Sequenz verloren hatten, und die Erstellung neuer Punktdiagramme unter Einbeziehung der neuen Daten stellte den ersten Schritt der Kalibrierung dar (Abb. 5.7b und Abb. 5.8b).

Für den zweiten Schritt wurde um die Trendlinie im (y-Koordinate – M_r)-Diagramm ein Intervall von +/- 20% eingezeichnet (Abb. 5.7b). Für das (x-Koordinate – pI)-Diagramm wurde ein Intervall von +/- 0,8 pI Einheiten eingezeichnet (Abb. 5.8b). Alle Spots, die außerhalb dieser Intervalle lagen wurden weggelassen, d. h., unter Berücksichtigung von nur der Werte innerhalb der Intervalle wurden zwei neue Diagramme gezeichnet (Abb. 5.7c und Abb. 5.8c). Spots, deren Werte nur in einem Diagramm außerhalb des Intervalls lagen, wurden trotzdem in beiden Diagrammen weggelassen. Die Spots dieser Diagramme waren sehr viel näher an der Trendlinie. Die Formeln der Trendlinien aus den Abbildungen 5.7c und 5.8c wurden für die Kalibrierung des Gels verwendet.

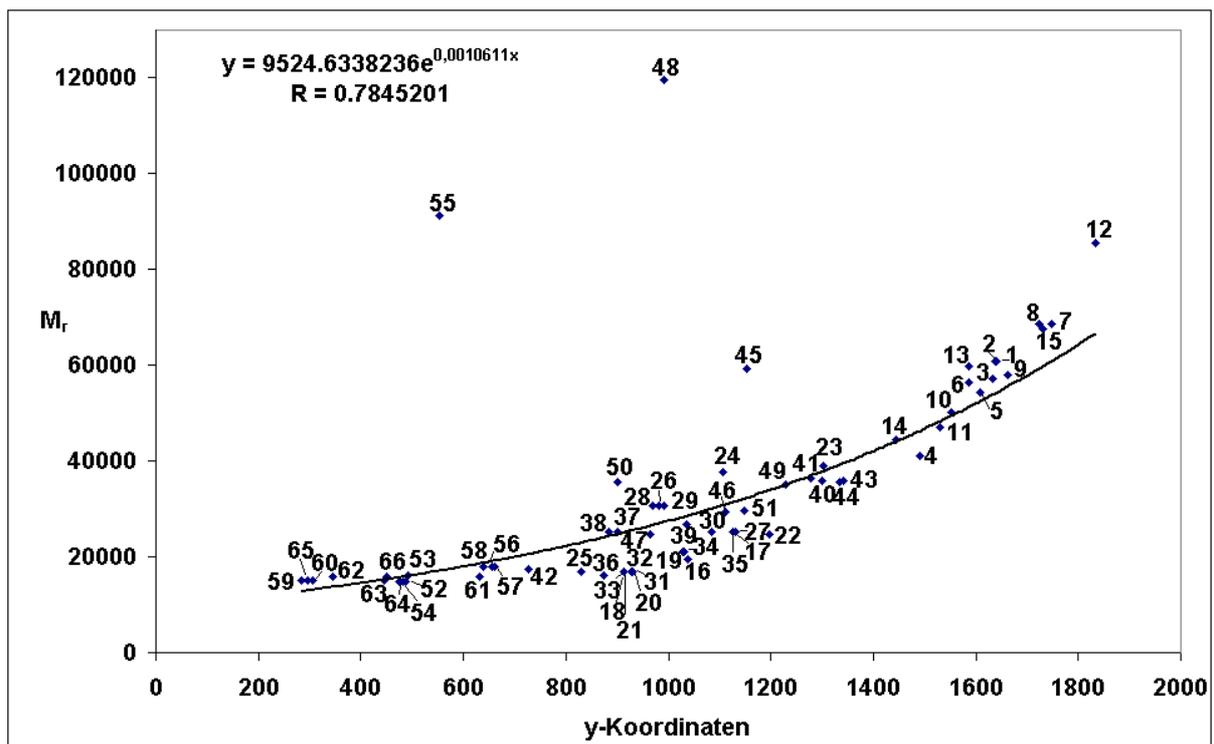


Abbildung 5.7a: Punktdiagramm der theoretischen relativen Molekularmassen der identifizierten Proteinspezies gegen deren y-Koordinaten im 2-DE Gel

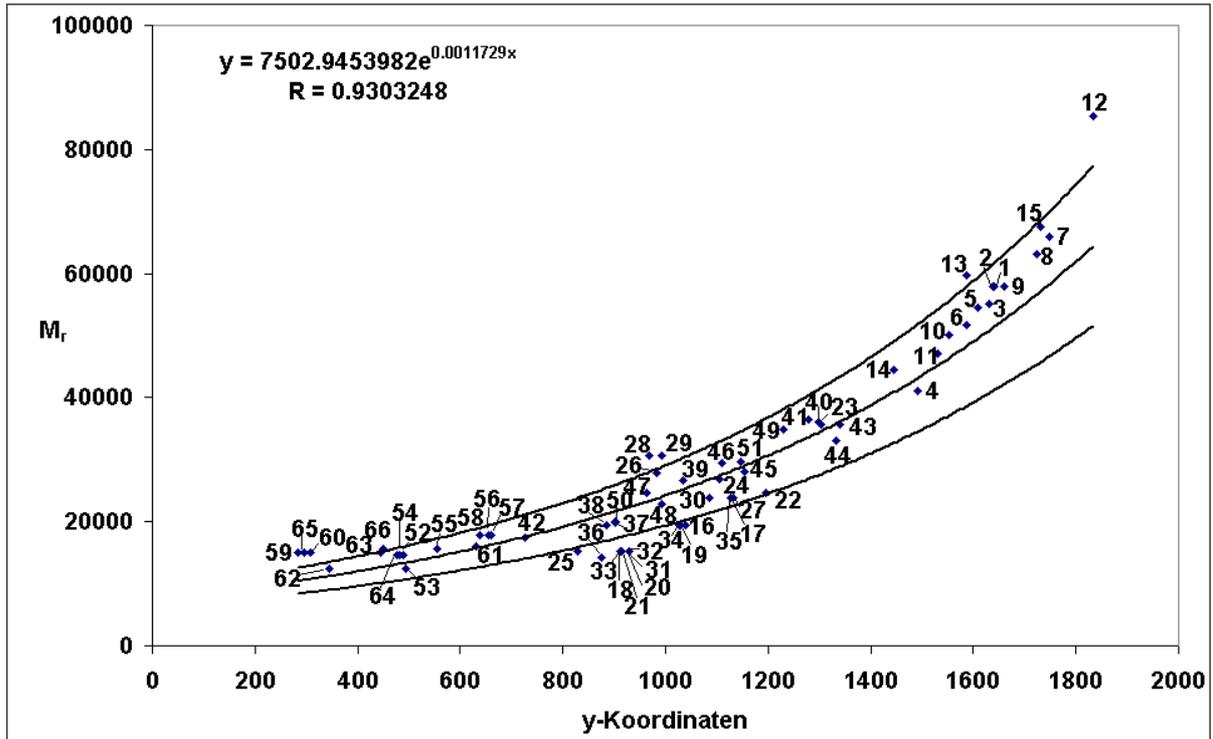


Abbildung 5.7b: Punktdiagramm der relativen Molekularmassen der identifizierten Proteinspezies nach der genaueren M_r Berechnung einiger Proteinspezies gegen deren y-Koordinaten. Ein Intervall von +/- 20% ist eingezeichnet

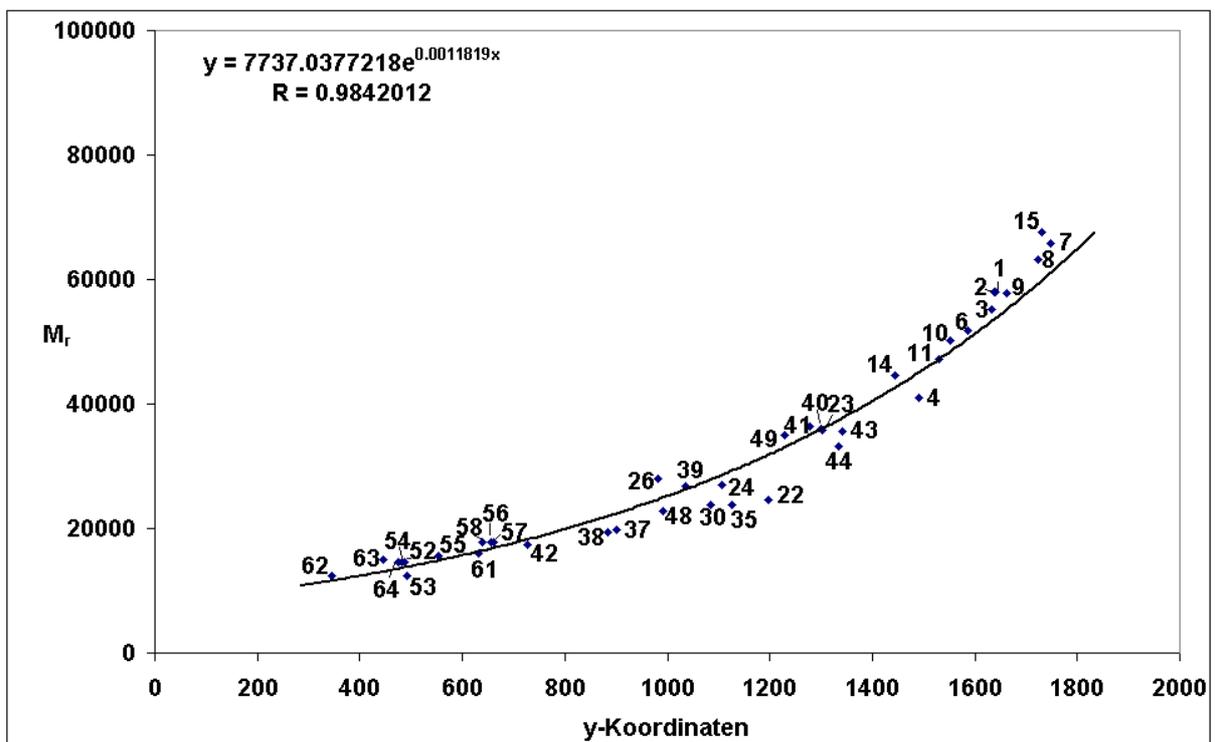


Abbildung 5.7c: Punktdiagramm der relativen Molekularmassen der übriggebliebenen Proteinspezies, nach Abzug der Ausreißer beider Diagramme, gegen deren y-Koordinaten

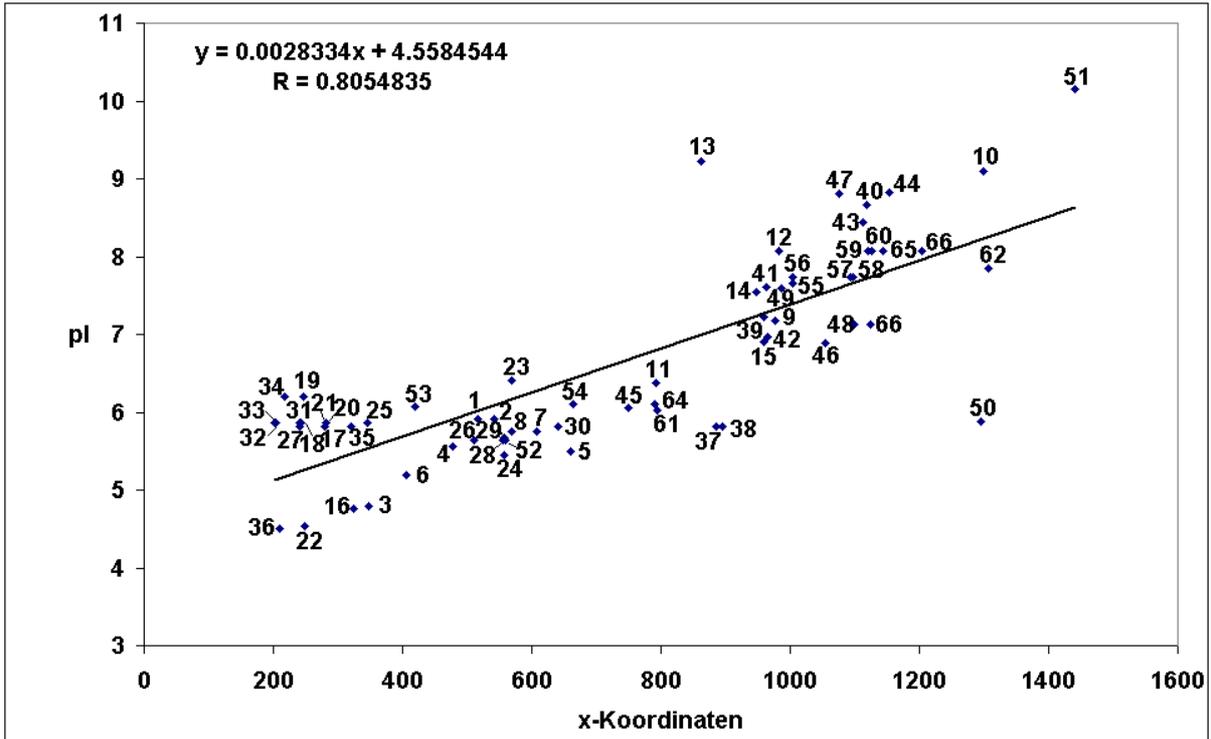


Abbildung 5.8a: Punktdiagramm der theoretischen pI-Werte der identifizierten Proteinspezies gegen deren x-Koordinaten im 2-DE Gel

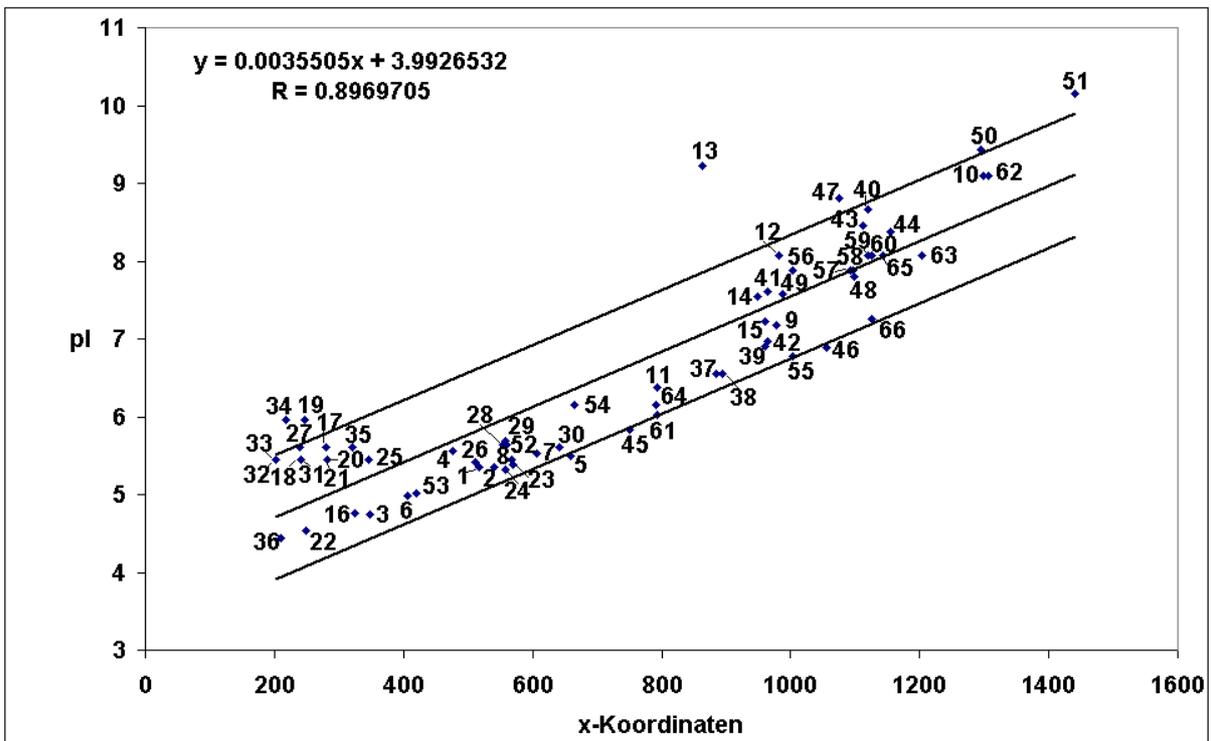


Abbildung 5.8b: Punktdiagramm der pI-Werte der identifizierten Proteinspezies nach der genaueren Berechnung des pI's gegen deren x-Koordinaten. Ein Intervall von $\pm 0,8$ pI Einheiten ist eingezeichnet

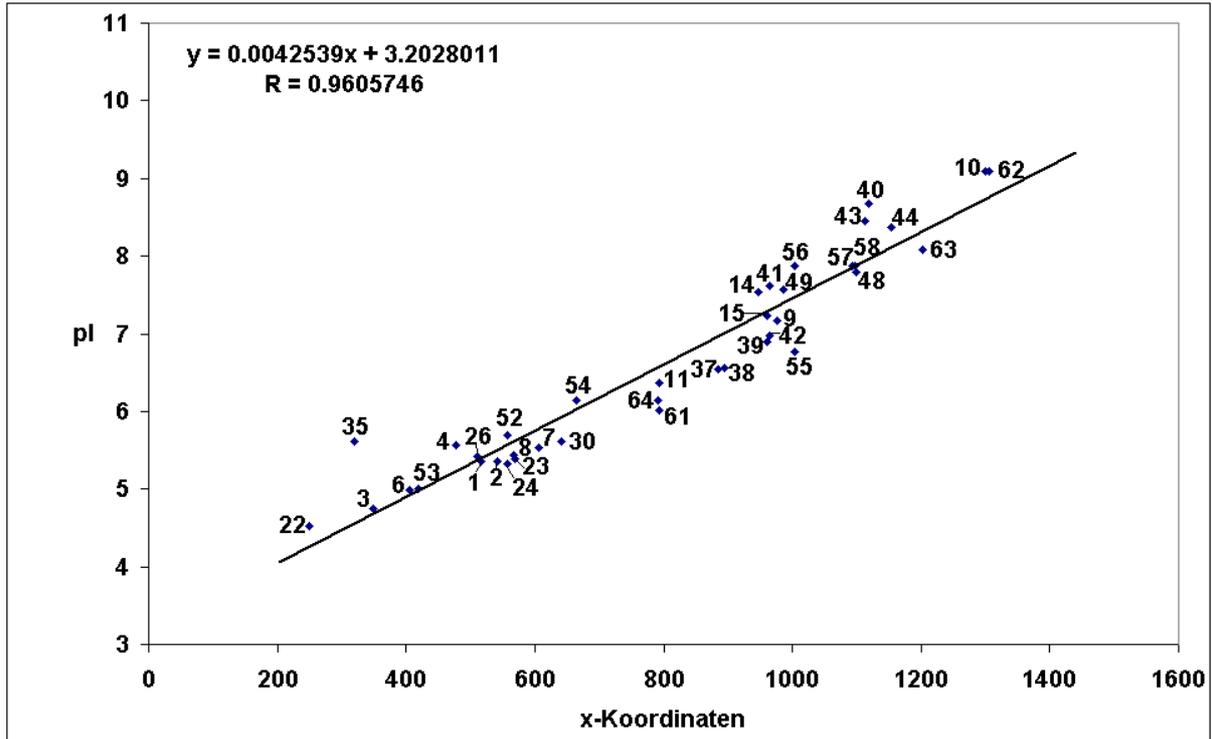


Abbildung 5.8c: Punktdiagramm der pI-Werte, der übriggebliebenen Proteinspezies, nach Abzug der Ausreißer beider Diagramme, gegen deren x-Koordinaten

Die Auswahl von einem Intervall von $\pm 20\%$ bzw. $\pm 0,8$ Einheiten hatte den Grund sichere positive Abweichungen zu erhalten, wobei falsche Vorhersagen posttranslationaler Modifikationen vermieden werden sollten. Mit einer höheren Anzahl an Daten und einer genaueren Trendlinie könnten die Intervalle verkleinert werden. Die gewählten Intervalle sind vorsichtige Annahmen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß modifizierte Proteinspezies innerhalb der Intervalle verblieben sind.

In allen Diagrammen sind die Formeln der Trendlinien und der Korrelationskoeffizient angegeben. Die Korrelationskoeffizienten zeigen eine Erhöhung und Annäherung zum Wert 1 während der Iterationen, was zeigt, daß eine bessere Korrelation der Werte mit der Trendlinie erzielt wird.

Wie in Abb.5.7a zu sehen ist, liegen die Spots 45, 48 und 55 von der Trendlinie sehr weit entfernt. Durch die N-terminale Sequenzierung wurde gezeigt, daß alle drei Proteinspezies Fragmente sind. Durch die Trendlinie in diesem Diagramm wird deutlich, daß diese drei Spots an der Position, an der sie sich im 2-DE Gel befinden, eine viel kleinere Molekularmasse besitzen müssen, als das gesamte Protein. Obwohl die theoretischen M_r -Werte dieser Spots von der Trendlinie stark abweichen, ist in Abb. 5.8a zu sehen, daß die

theoretischen pI -Werte keine so starke Abweichung zeigen. In dieser Abbildung zeigen die Spots 13, 50 und 51 herausragende Abweichungen. Wobei die theoretischen M_r -Werte der gleichen Spots von der Trendlinie nicht stark abweichen.

Nach der Berechnung der M_r -Werte für die vermutlich tatsächlichen Längen einiger Proteinspezies, rutschen, wie in Abb. 5.7b zu sehen ist, viele Spots näher zu der Trendlinie, die somit etwas steiler wird. Nachdem ein Intervall von $\pm 20\%$ um die Trendlinie gelegt wurde, blieben 19 Spots außerhalb des Intervalls. Auch nach der Ermittlung der tatsächlichen pI -Werte einiger Proteinspezies konnte eine Annäherung dieser Spots zu der Trendlinie erzielt werden. Nach Anlegen eines Intervalls von $\pm 0,8$ pI Einheiten um die Trendlinie wurden in diesem Diagramm neun Spots außerhalb des Intervalls detektiert. Da anzunehmen ist, daß alle diese Spots modifiziert sind, wurden alle 28 Ausreißer aus beiden Diagrammen entfernt. Zusätzlich wurden die höchstwahrscheinlich modifizierten Proteinspezies der Caseine entfernt. Das heißt, die Proteinspezies der γ - (Spot 19 und 34) und ε - (Spot 18, 20, 21, 31, 32 und 33) Caseine fielen von selbst aus den Intervallen, wobei, obwohl noch in den Intervallen, die Proteinspezies des β -Caseins (Spot 17 und 27), außer der basischsten Form (Spot 35), wurden nach eigenem Ermessen entfernt.

Mit den übriggebliebenen Spots entstanden neue Diagramme mit neuen Trendlinien. Die Trendlinie des Diagramms in Abb. 5.8c ist noch steiler als vorher und zeigt somit eine Verteilung des pI -Wertes von etwa pI 3 bis 10 über die gesamte Breite des Gels.

Nach der Ermittlung der Funktionen der Trendlinien aus Abb. 5.7c und 5.8c konnte die Kalibrierung des Referenzgels durchgeführt werden. Hierfür wurde das Programm TopSpot verwendet. Die Sektoren wurden einzeln kalibriert. Für die Kalibrierung wurden zuerst in jedem Sektor 14-17 Spots ausgewählt, die über den ganzen Sektor verteilt waren. Durch die abgelesenen x - und y -Koordinaten der ausgewählten Spots wurden die M_r - und pI -Werte berechnet. Diesen Markerspots wurden die berechneten Werte zugeordnet. Nach der Eingabe der Werte wurden die Sektoren durch das Programm kalibriert.

5.2.3 Nutzung der neuen Kalibrierungsmethode zur Vorhersage von posttranslationalen Modifikationen

Mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung und einiger PMF-Ergebnisse wurden viele posttranslationale Modifikationen detektiert, wie z. B. Abspaltung der Signalsequenz, Verlust des N-terminalen Methionins und Acetylierung der N-terminalen Aminosäure. Für 45 der insgesamt 66 Proteinspezies konnten Modifikationen festgestellt werden. In Tabelle 5-7 sind die Namen der Proteinspezies und die ermittelten, sowie die vorhergesagten Modifikationen

aufgelistet. Zu den ermittelten Modifikationen konnten durch die Nutzung der neuen Kalibrierungsmethode zusätzliche Modifikationen erkannt werden.

Zum Beispiel, Spot 13 zeigt eine große Abweichung von dem pI Wert, das dieser Position zugeordnet wurde. Zusätzlich liegt es auch außerhalb des 20%igen Intervalls in Abb. 5.7b. Dieser Spot wurde nur über die Massenspektrometrie identifiziert. Es konnten keine näheren Informationen über den N-Terminus ermittelt werden. Daher konnten für diesen Spot im ersten Schritt der Kalibrierung die M_r - und pI -Werte nicht neu berechnet werden. Es wird für diesen Spot eine Modifizierung vermutet, die sowohl das Molekulargewicht als auch den pI -Wert beeinflusst. In der Literatur sind für dieses Protein Modifizierungen, wie eine abspaltbare Signalsequenz von 43 Aminosäuren und zwei Phosphorylierungen bekannt (Yotov und St-Arnaud, 1993).

Bei den Caseinen werden mehrere Phosphorylierungen vermutet. Werden diese Phosphorylierungen und damit die Erniedrigung des pI -Wertes berücksichtigt, kann eine Annäherung an die Trendlinie festgestellt werden.

Die Spots 26, 28 und 29 wurden als Spezies des Proteins Apolipoprotein A-I identifiziert. Nur der Spot 26 konnte über beide eingesetzten Identifizierungsmethoden bestätigt werden. Bei Spot 28 und 29 konnte keine Sequenz ermittelt werden. Dies weist auf eine Blockierung der N-terminalen Aminosäure hin. Eine vergleichbare Situation zeigte sich auch bei den Spots 56, 57 und 58. Diese drei Spots wurden als Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase a identifiziert. Hier konnte, höchstwahrscheinlich wegen Blockierung, für den Spot 56 keine Sequenz ermittelt werden. Die Spots 57 und 58 besaßen einen freien N-Terminus und die selbe Anfangssequenz. Im PMF-Spektrum des Spots 56 wurde das N-terminale Peptid mit der Masse m/z 2047,9 für das acetylierte Peptid (acVNPTVFFDITADDEPLGR) detektiert. Somit kann festgehalten werden, daß der Unterschied zwischen den jeweils drei Spots auf der pI -Achse auf die Acetylierung zurückzuführen ist. Der Grund für die unterschiedlichen Positionen auf der vertikalen Achse konnte mit diesen Methoden nicht ermittelt werden.

Die Spots 52, 54 und 64 wurden über PMF als ‚fatty acid-binding‘ Proteine identifiziert. Alle drei Spezies besaßen kein Methionin am N-Terminus (was nicht zum Datenbankeintrag paßte) und alle drei waren N-terminal acetyliert. In den PMF-Spektren von Spot 54 und 64 wurde das Peptid zwischen den Aminosäuren 97-106 detektiert. Wobei die 98. Aminosäure ein Asparagin war. Das gleiche Peptid wurde auch bei Spot 52 detektiert. Allerdings war hier die 98. Aminosäure ein Aspartat. Dies bedeutet ein Unterschied von einer negativen Ladung. Mit diesem Unterschied wird diese Proteinspezies in einer etwas saureren Umgebung

fokussiert.

Tabelle 5-7: Proteinspezies mit bekannten und vorhergesagten posttranslationalen Modifikationen

Spot Nr.	Proteinname (englisch)	nach N-terminaler Sequenzierung ermittelte Modifikationen	vorhergesagte Modifikationen
1	60 kDa heat shock protein	Verlust der Signalsequenz (- 26 As)	
2	60 kDa heat shock protein	Verlust der Signalsequenz (- 26 As)	
3	Protein disulfide-isomerase	Verlust der Signalsequenz (- 19 As)	
5	Keratin, type II cytoskeletal 8*		keine Vorhersage über die Art der Modifikation möglich
6	ATP synthase β -chain	Verlust der Signalsequenz (- 46 As)	
7	Serum albumin	Verlust der Signalsequenz (- 24 As)	
8	Serum albumin	C-Fragment (Verlust der Signalsequenz, 24 As, + zusätzlicher Verlust von 24 As)	
12	Similar to mitochondrial aconitase (BC004645)*		keine Vorhersage über die Art der Modifikation möglich
13	ATP synthase α -chain, mitochondrial precursor *		Verlust der Signalsequenz (-43 As) $\Rightarrow M_w=55\ 310.4\ pI=8.28$ + 2 Phosphorylierungen möglich ($> pI \sim 7.1$) (Yotov und St-Arnaud, 1993)
16	Translationally controlled tumor protein*		keine Vorhersage über die Art der Modifikation möglich
17	β -casein	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Yoshimura und Oka, 1990)
18	ϵ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Hennighausen <i>et al.</i> , 1982)
19	γ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Sasaki <i>et al.</i> , 1993)
20	ϵ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Hennighausen <i>et al.</i> , 1982)
21	ϵ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Hennighausen <i>et al.</i> , 1982)
22	Eukaryotic translation elongation factor 1- β -2	Verlust des N-ter. Methionins	
23	Pyruvate dehydrogenase E1 component β -subunit	Verlust der Signalsequenz (- 30 As)	
24	Actin (fragment)	C-Fragment (letzte 242 As)	
25	ϵ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	
26	Apolipoprotein A-I	Verlust der Signalsequenz (- 24 As)	1 Phosphorylierung + 1 Palmitylierung möglich (Beg <i>et al.</i> , 1989, Hoeg <i>et al.</i> , 1986)
27	β -casein	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Yoshimura und Oka, 1990)
28	Apolipoprotein A-I precursor*		Verlust der Signalsequenz, 1 Phosphorylierung + 1 Palmitylierung möglich (Beg <i>et al.</i> , 1989, Hoeg <i>et al.</i> , 1986)
29	Apolipoprotein A-I precursor*		Verlust der Signalsequenz, 1 Phosphorylierung + 1 Palmitylierung möglich (Beg <i>et al.</i> , 1989, Hoeg <i>et al.</i> , 1986)
30	β -casein	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	
31	ϵ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Hennighausen <i>et al.</i> , 1982)
32	ϵ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Hennighausen <i>et al.</i> , 1982)

Ergebnisse

33	ϵ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Hennighausen <i>et al.</i> , 1982)
34	γ -casein*	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Sasaki <i>et al.</i> , 1993)
35	β -casein	Verlust der Signalsequenz (- 15 As)	Phosphorylierung (Yoshimura und Oka, 1990)
36	Sulfated 50 kDa glycoprotein*	Verlust von 18 As, Länge der Signalsequenz ist 19 As lang	
37	β -casein (fragment)	C-Fragment (Verlust der Signalsequenz, 15 As, + zusätzlicher Verlust von 35 As)	
38	β -casein (fragment)	C-Fragment (Verlust der Signalsequenz, 15 As, + zusätzlicher Verlust von 38 As)	
43	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Verlust des N-ter. Methionins	
44	Malate dehydrogenase	Verlust der Signalsequenz (- 24 As)	
45	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X (fragment)*	C-Fragment (letzte 255 As)	
46	Carbonic anhydrase III*		keine Vorhersage über die Art der Modifikation möglich
47	Manganese superoxide dismutase, mitochondrial precursor*		Verlust der Signalsequenz (- 24 As) $M_w=22\ 222.1$ $pI=7.30$
48	ATP citrate lyase (fragment)	C-Fragment (letzte 207 As)	
49	Guanine nucleotide binding protein, β -2	Verlust des N-ter. Methionins, N-Acetylierung	
50	α -casein (fragment)*	C-Fragment (letzte 176 As)	
51	Putative, ribosomal protein S4, X-linked (AK014210)*		keine Vorhersage über die Art der Modifikation möglich
52	Fatty acid-binding protein	Verlust des N-ter. Methionins, N-Acetylierung, As: 98 = D	
53	Cytochrome c oxidase, subunit Va	Verlust der Signalsequenz (- 36 As)	
54	Fatty acid-binding protein	Verlust des N-ter. Methionins, N-Acetylierung, As: 98 = N	
55	Fatty acid synthase (fragment)	C-Fragment (letzte 141 As)	
56	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a	Verlust des N-ter. Methionins, N-Acetylierung	
57	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a	Verlust des N-ter. Methionins	
58	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a	Verlust des N-ter. Methionins	
59	Hemoglobin α -chain *	N-Fragment	
60	Hemoglobin α -chain *	N-Fragment	
62	Hemoglobin β -chain (fragment)	C-Fragment (letzte 114 As)	
63	Hemoglobin α -chain		keine Vorhersage über die Art der Modifikation möglich
64	Fatty acid-binding protein	Verlust des N-ter. Methionins, N-Acetylierung, As: 98 = N	
65	Hemoglobin α -chain *	N-Fragment	
66	Hemoglobin β -1 chain*	Verlust des N-ter. Methionins	

(Mit * markierte Proteinspezies sind in den Diagrammen von Abb. 5.7b und 5.8b außerhalb der Intervalle; As: Aminosäure/n)

5.2.4 Subtraktive Proteomanalyse von Brustdrüsengewebeproteinen doppeltransgener Mäuse

Die subtraktive Proteomanalyse wurde an Gewebeproben von doppeltransgenen Mäusen durchgeführt. Durch Mikroinjektion von humanen Genen a) des EGFR in NMRI Mäuse und b) des TGF α in Mäuse des B6D2-Stammes und durch Kreuzung der entstandenen transgenen Tiere wurden doppeltransgene Mäuse erhalten. Bei diesen Mäusen entwickelte sich nach etwa sechs Monaten mindestens ein tastbarer Tumor in den Brustdrüsen. Nach etwa 15 Monaten hatten beinahe 60% dieser Tiere einen Tumor. In einem Alter von 15-18 Monaten wurden vier Weibchen getötet und es wurde ihnen jeweils das Tumorgewebe und Gewebe aus einer normalen Brustdrüse entnommen. Der Tumor hatte sich über mehrere Brustdrüsen ausgebreitet so, daß keine Differenzierung zwischen Gewebeteilen, die zum Tumor gehörten und denen, die nicht zum Tumor gehörten, möglich war. Deshalb wurde das gesamte Brustdrüsengewebe mit dem Tumor entnommen, unabhängig davon ob der Tumor in den vorderen oder hinteren Brustdrüsen entstand. Die entnommenen Proben wurden in mehrere Teile getrennt und die Teile, die für die Proteomanalyse bestimmt waren, wurden gleich in flüssigen Stickstoff eingefroren. An einem der anderen Teile wurden die Proben histologisch untersucht um eine Einstufung der Proben zu erhalten. Die Präparierung der Tiere, die Entnahme und die histologische Untersuchung der Proben wurden freundlicherweise von Dr. Nicole Focks aus der Gruppe von Prof. Dr. Franz Theuring durchgeführt.

Bei der histologischen Untersuchung wurde die Proliferation der Brustdrüsen als Epithel-Hyperplasien erkannt. Zum Teil waren Adenome, Karzinome und zum Teil auch Nekrosen vorhanden. Die als Kontrollproben verwendeten normalen Proben waren weitgehend normal, drei der Proben wiesen aber gerade erkennbare kleine Hyperplasien auf.

Für die Proteomanalyse wurden die insgesamt acht Proben nach der in 4.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Nach der Proteinbestimmung wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen festgestellt. Wobei auffiel, daß die histologisch normalen Proben viel niedrigere Proteinkonzentrationen zeigten als die Tumorproben. Danach wurden silbergefärbte zweidimensionale Großgele hergestellt. Die Gele wurden jeweils mit 50 μ g Gesamtprotein beladen. Die Gele wurden paarweise verglichen. Das bedeutet, daß das Gel mit der Tumorprobe aus der ersten Maus mit dem Gel der normalen Probe ebenfalls aus dieser Maus verglichen wurde. Der Vergleich der Proteinspots auf den Gelen wurde visuell durchgeführt.

Beim visuellen Vergleich wurden deutliche Unterschiede zwischen den Proteinmustern

erkannt. Ein Teil dieser Proteinspots wurden durch den Vergleich mit den aus Wildtyp-Brustdrüsengewebe identifizierten und im Referenzgel markierten Proteinspezies identifiziert. Einige andere Spots, die noch nicht identifiziert waren, wurden über PMF mit MALDI-TOF-MS identifiziert. Auch wenn beim Vergleich eines Probenpaares viele Unterschiede auffielen, waren nicht alle durchgehend in allen Vergleichspaaren wiederzufinden.

Spots, die in den Gelen der Tumorproben eine Intensitätsabnahme zeigten wurden als Carbonic anhydrase III, Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), Fruktose-biphosphat Aldolase I, Kreatinkinase, Enolase 3 identifiziert. Spots, die in den Gelen der Tumorproben eine Intensitätssteigerung aufwiesen, waren das Tropomyosin 5, das 'eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2' Protein und mehrere Spots von Serumalbumin Fragmenten.

5.2.4.1 Carbonic Anhydrase III

Im Falle der Carbonic Anhydrase III wurde ein starker Intensitätsabfall detektiert. In Abbildung 5.10 sind exemplarisch Ausschnitte aus Originalgelen eines Vergleichspaares dargestellt. Der mit 2 gekennzeichnete Spot wurde als Carbonic Anhydrase identifiziert. In Abbildung 5.11 ist das PMF-Spektrum von Carbonic Anhydrase III zusehen. Die Peaks, die mit den entsprechenden m/z Werten beschriftet sind, wurden Peptiden der Carbonic Anhydrase III zugeordnet und entsprachen 70% der Proteinsequenz.

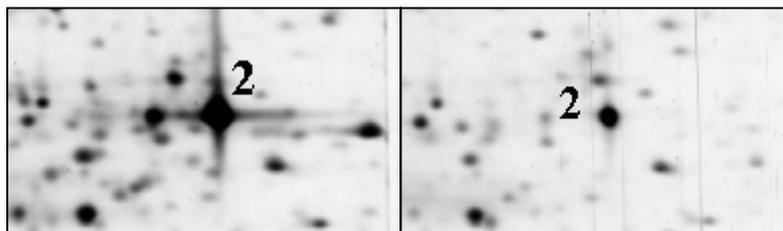


Abbildung 5.10: Vergrößerte Ausschnitte aus den Originalgelen eines Paares. Links: Kontrollprobe. Rechts: entsprechende Tumorprobe. Spot 2: Carbonic Anhydrase III

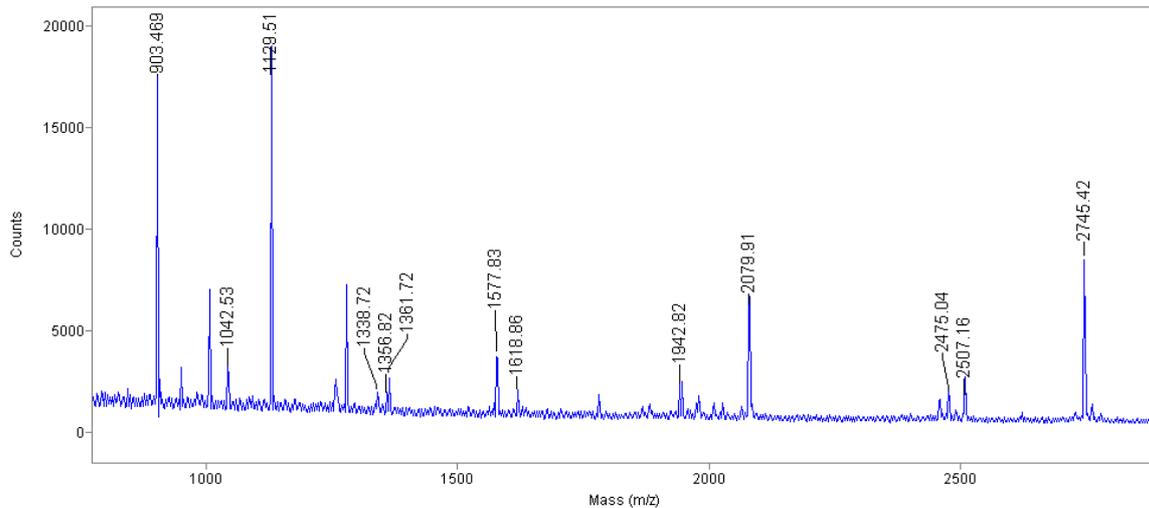


Abbildung 5.11: ‘peptide mass fingerprint’-Spektrum der Carbonic Anhydrase III. Nach der proteolytischen Spaltung mit Trypsin wurde das Peptidgemisch über MALDI-MS vermessen.

5.2.4.2 Intensitätsabfall bei GAPDH, Fruktose-bisphosphat Aldolase I, Kreatinkinase und Enolase 3

In Abbildung 5.12 sind vergrößerte Ausschnitte aus den Originalgelen exemplarisch von nur einem Paar dargestellt, die den Intensitätsunterschied für die Proteine GAPDH, Fruktose-bisphosphat Aldolase I, Kreatinkinase und Enolase 3 verdeutlichen. In allen vier Vergleichspaaren sind die Spots dieser Proteine in den Tumorproben in geringerer Intensität als in den Kontrollproben.

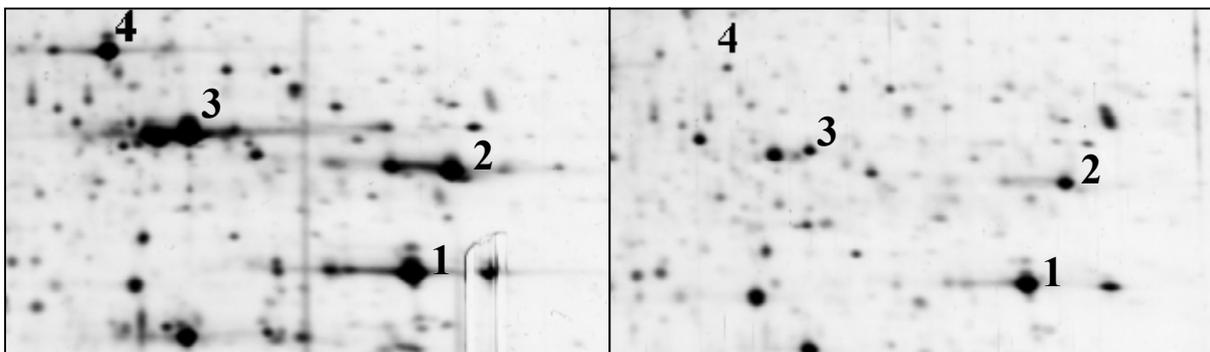


Abbildung 5.12: Vergrößerte Ausschnitte aus den Originalgelen eines Paares. Links: Kontrollprobe. Rechts: entsprechende Tumorprobe. Spot 1: GAPDH, Spot 2: Fruktose-bisphosphat Aldolase I, Spot 3: Kreatinkinase und Spot 4: Enolase 3.

5.2.4.3 Tropomyosin 5 und 'eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2'

In dem 2-DE Gel befinden sich das Tropomyosin 5 und das 'eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2' in der Region um 30000 Da und pI 4,2 - 4,5. In den Gelausschnitten in Abbildung 5.9 ist klar zu erkennen, daß die Spots dieser Proteine in den Tumorproben intensiver sind als in den Kontrollproben.

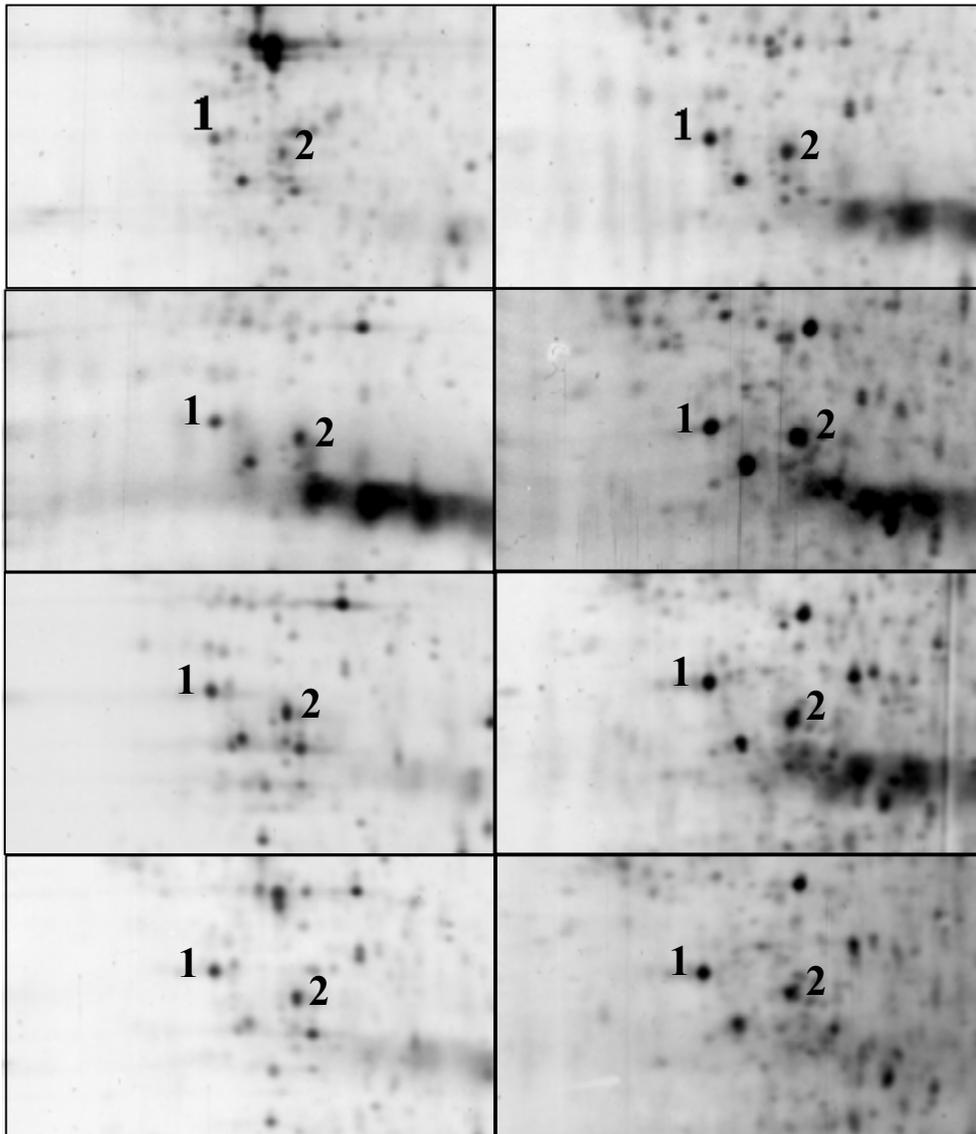


Abbildung 5.9: Vergrößerte Ausschnitte aus den Originalgelen. Links: Kontrollproben. Rechts: entsprechende Tumorproben. Spot 1: 'eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2'. Spot 2: Tropomyosin 5.

5.2.4.4 Fragmente des Serumalbumins

In einem Massenbereich um 28000 Da und einem pI Bereich zwischen 6,4 – 7,3 waren in den Tumorproben mehrere Spots mit erhöhter Intensität aufgefallen. Diese Spots wurden sowohl in den Kontrollproben als auch in den Tumorproben als Fragmente des Serumalbumins identifiziert. In einem anderen Bereich, dem Bereich um etwa 45000 Da und dem pI Bereich zwischen 4,7 – 6,5 fiel eine Anordnung von Spots auf, bei der die Spots, ähnlich wie Stufen, von links nach rechts aufsteigend, sich in einer höheren Masse und höheren pI Position versetzt zueinander befanden. Es handelte sich hierbei um eine Spotreihe von etwa 10-11 Spots. Hiervon wurden vier Spots als Serumalbumin identifiziert. Auch diese Spotreihe war in den Tumorproben intensiver.

In Abbildung 5.10 sind Ausschnitte aus dem Bereich um 28000 Da und dem pI Bereich zwischen 6,4 – 7,3 dargestellt. Die drei markierte Spots sind als Serumalbumin identifiziert worden. In diesem Massenbereich kann es sich aber nur um Fragmente des Serumalbumins handeln. Es wird hier exemplarisch an einem Probenpaar gezeigt, daß die Intensität dieser Spots im Tumorgewebe erhöht ist.

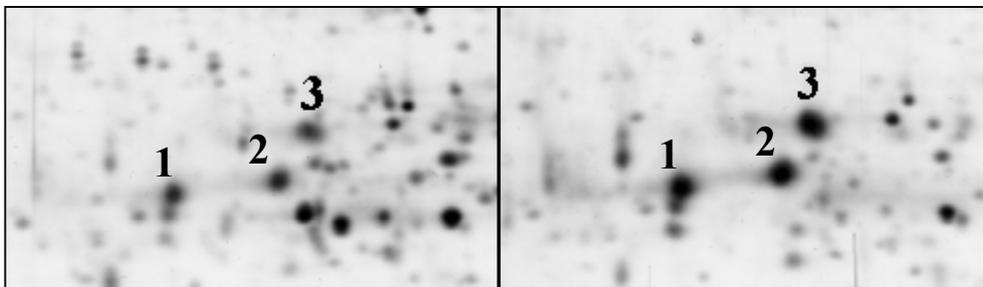


Abbildung 5.10: Vergrößerte Ausschnitte aus den Originalgelen eines Paares. Links: Kontrollprobe. Rechts: entsprechende Tumorprobe. Spots 1, 2, und 3 wurden als Serumalbumin identifiziert.

6 Diskussion

6.1 Empfindlichkeitssteigerung bei PMF-Spektren

Seit der Entwicklung der MALDI-Massenspektrometrie wird sie für die Identifizierung von Proteinen über die Messung des 'peptide mass fingerprints' (PMF) eingesetzt. Bei der Messung der PMFs wird das Peptidgemisch mit einer Matrixverbindung gemischt und die Peptide werden durch die MALDI-Technik zur Ionisierung und Desorption in die Gasphase gebracht. In einem Flugrohr werden die Peptide nach ihren Masse/Ladungsverhältnissen getrennt. Der Vorteil der MALDI-Technik ist der, daß theoretisch nur einfach protonierte Ionen entstehen. Dies vereinfacht die Spektren und somit ihre Deutung.

Obwohl das Prinzip sehr einfach klingt, ist es nicht selbstverständlich, gute Spektren zu erhalten. In jedem Schritt, angefangen von dem Verdau bis zur Detektion der Peptide, können Probleme auftauchen. Für die Identifizierung von Proteinen aus 2-DE Gelen müssen die Proteine als erstes aus dem Gel extrahiert werden. Jedoch sind Proteine zu große Moleküle, so daß sie nicht von alleine aus dem Gel diffundieren. Deshalb werden die Proteine noch im Gel mit einem proteolytischen Enzym, meistens Trypsin, verdaut. Solche Enzyme greifen nur an bestimmte Spaltstellen an. Trypsin spaltet die Proteine an den Peptidbindungen nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Diese Aminosäuren kommen in der Natur sehr oft vor, so daß durch die Spaltung mit Trypsin, mit den Messmethoden kompatibel lange Peptide entstehen. Je nach der Länge der Peptide ist das Extrahieren der Peptide aus dem Gelmaterial möglich. Sind die Peptide in Lösung, können sie massenspektrometrisch vermessen werden. Hierfür müssen sie mit einem Überschuß an Matrixmolekülen gemischt werden. Als Matrix werden kleine Moleküle, die bei einer bestimmten Wellenlänge Licht absorbieren können, verwendet. Bei Massenspektrometern, die einen UV-Laser besitzen muß die Matrix UV-Licht absorbieren können. Matrix- und Analytmoleküle sollten homogen vermischt werden. Der Überschuß an Matrix hat die Aufgabe, die Analytmoleküle vor der direkten Einstrahlung des Lasers zu schützen. Proteine oder Peptide würden ohne Matrix sofort fragmentiert werden. Es wird ein molarer Überschuß an Matrix im Bereich von 10^3 - 10^4 empfohlen. Wenn die Peptide ohne Schaden erstmal ionisiert und in die Gasphase gebracht werden konnten, werden sie mit der nächsten Hürde konfrontiert. Bei der MALDI-MS können nur positiv geladene Peptide in das Flugrohr gebracht werden, d. h., bei der Ionisierung können positiv geladene, negativ geladene und auch nicht geladene Teilchen entstehen. Außerdem können auch Fragmente entstehen, bei denen die Peptide nicht mehr intakt sind. Alles was positiv geladen ist wird im Flugrohr in Richtung Detektor geleitet. Auf dem Weg dorthin können wiederum z. B. durch

Kollisionen der Ionen untereinander manche Ionen aus der Bahn geworfen werden, oder weitere Fragmentierungen entstehen. All diese Effekte beeinflussen die Detektion und somit die Qualität der Spektren. Da man diese Effekte nicht vermeiden kann, ist ihre Kenntnis von großer Wichtigkeit für die Durchführung der Messung und die Auswertung der Spektren.

6.1.1 Veränderungen an der bestehenden Verdaumethode

Da mit den bestehenden Methoden manchmal, vor allem bei der Identifizierung von Gelspots, die mit CBB nur schwach angefärbt waren, Schwierigkeiten auftraten, wurde nach Verbesserungsmöglichkeiten gesucht. Durch den Einsatz von ZipTip-RP-Säulen war die Erfolgsquote bei schwachen Spots nicht sehr hoch. Um die Qualität der Spektren für solche Spots zu verbessern, lag die Annahme nahe, daß die Intensitäten der Peaks und auch die Detektion von zusätzlichen Peaks sich steigern ließe, wenn mehr Probe bei der Vermessung verwendet werden würde. Die anderen Möglichkeiten, wie z. B. den gleichen Spot aus zwei oder mehreren Gelen zu poolen oder ein neues Gel mit noch mehr Gesamtprotein herzustellen, kam nicht mehr in Frage, da das Sensitivitätslimit des MALDI-MS niedriger war als die Konzentration des Proteins in einem Gelspot, das mit CBB detektiert wurde. Es wurde vermutet, daß die Peptide bei der ZipTip-Aufarbeitung verloren gingen. Außerdem war das Volumen, in das die Peptide nach dem Verdau eluiert wurden, viel zu hoch. Die ZipTip-Aufarbeitung wurde für solche Spots als nicht mehr sinnvoll erachtet. Da für die Bindung an und dann für die Eluierung der Peptide von dem RP-Material bestimmte Bedingungen erforderlich sind, wird vermutet, daß sich nicht alle Peptide gleich verhalten und auch deshalb eine komplette Extrahierung der Peptide nicht möglich ist.

Bei der bisherigen Methode wurde der Waschschrift, für das Waschen und die Entfärbung des Gelstücks, mit einem Tris-Puffer durchgeführt. Wenn jedoch keine ZipTip-Aufarbeitung gemacht wird, darf der Tris-Puffer nicht mehr verwendet werden, da Salze bei der MALDI-MS stören. Anstelle des Tris-Puffers wurde eine Ammoniumbicarbonat-Lösung verwendet. Durch das Lösen der Peptide in kleinem Volumen wurde eine Konzentrierung der Probe erreicht. Zusätzlich wurden im weiteren die Messungen mit DHB als Matrix durchgeführt. Mit DHB scheinen mehr Peptide zum fliegen gebracht zu werden. Es kann jedoch nicht gesagt werden, daß dies in jedem Fall so ist. Mit unterschiedlichen Matrices werden unterschiedliche Laserenergien aufgenommen und weitergegeben. Daher werden wahrscheinlich andere oder mehr Peptide angeregt. All diese Veränderungen führten zu besseren Spektren mit intensiveren Peaks.

6.1.2 Veränderungen der Messparameter

Bei Messungen an einer Probe mit verschiedenen Messparametern konnte gezeigt werden, daß die Parameter bei der Analyse der Massen unterschiedliche Einflüsse ausüben. Die veränderten Parameter waren die Gridspannung, die Guide Wire Spannung und die Delay-Zeit. Alle Parameter sind miteinander verbunden, daher können sie auch keine beliebigen Werte erhalten. Die Grid und die Guide Wire Spannung sind von der Beschleunigungsspannung abhängig. Für die Messungen mit DHB als Matrix hatte sich herausgestellt, daß höhere Einstellungen der Parameter erforderlich waren, als für die Messungen mit CHCA. Vor allem die Delay-Zeit, die eine sehr kurze Zeitspanne beschreibt, in der die ionisierten Peptide für diese Zeit direkt über der Ionenquelle verweilen, bevor die Beschleunigungsspannung auf sie ausgeübt wird.

Es konnte gezeigt werden, daß die Parameter einen großen Einfluß auf die Qualität der Spektren hatten. Es wurde keine Einstellungskombination gefunden, die die optimale Situation darstellt, sondern es wurden mehrere Messmethoden mit unterschiedlichen Parameterwerten eingestellt. Während der Messung kann von einer Methode in die andere gewechselt werden. Vor allem für schwach gefärbte Spots sollten mehrere Messungen mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden.

6.1.3 Anwendung der veränderten Methoden

Mit der Erfahrung aus den vorherigen Versuchen konnten die neuen Methoden an einem Modell angewendet werden. Das *H. pylori* Sekretionsmuster beinhaltet auf einem CBB gefärbten Gel etwa 33 Spots mit unterschiedlichen Intensitäten. Die Spaltung der starken Spots wurde nach der vorherigen Verdaumethode und die PMF-Messung wurde mit CHCA als Matrix durchgeführt. Bei den mittel und schwach gefärbten Spots wurden beide Verdaumethoden und für die Messung unterschiedliche Messmethoden eingesetzt. Teilweise wurden bessere Spektren erzielt, was aber keine Auswirkung auf die Identifizierung hatte und teilweise wurde eine sehr viel höhere Sequenzabdeckung erzielt. Drei der sehr schwachen Spots konnten erst durch die Einstellung von unterschiedlichen Messmethoden identifiziert werden.

6.2 Proteomanalyse der Brustdrüsenproteine der Maus

6.2.1 Identifizierung von Wildtyp-Mausbrustdrüsenproteinen und Zusammenstellung in einer 2-DE Datenbank

Die Brustdrüsenproteine der Wildtyp-Maus wurden aus dem Gewebe präpariert und mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach dem pI und M_w der Proteine aufgetrennt. Auf dem silbergefärbten Referenzgel wurden 4250 Spots detektiert. Insgesamt wurden 72 Proteinspezies aus dieser Probe identifiziert. Zur Identifizierung wurde die N-terminale Sequenzierung und die MALDI-TOF-MS angewendet. Über die N-terminale Sequenzierung wurden nur 42 von 112 Spot identifiziert. Prozentual ist das eher eine gute Ausbeute, da bei Eukaryonten angenommen wird, daß 80% der Proteine N-terminal modifiziert sind. Zwei der Proteine konnten nur mit beiden Methoden zusammen identifiziert werden. Mit der MALDI-MS konnte das Kriterium der 30%igen Sequenzabdeckung nicht erreicht werden. Bei Proteinen, die nur aus einem Teil des Gesamtproteins bestehen, ist eine Sequenzabdeckung von 30% oder mehr nicht einfach zu erreichen. In solchen Fällen werden die Ergebnisse danach beurteilt, in wie weit die detektierten Peaks zugeordnet werden und die übereinstimmenden Peptide einen Teil des Proteins abdecken oder über die gesamte Sequenz verteilt sind. Die Position des Spots im Gel stellt hierfür eine Hilfe dar. Mit der N-terminalen Sequenzierung konnte für diese zwei Proteine eine Teilsequenz gelesen werden, diese Sequenz befand sich aber bei keinem Protein am Anfang oder direkt nach einer Signalsequenz. Hierbei wurden die Ergebnisse der Datenbanksuche mit den PMF-Daten durchsucht um ein Protein zu finden, bei dem die detektierten Peaks nur einen Teil der Sequenz abdeckten. Auf dies Weise wurden die zwei Proteinspezies identifiziert, da sie die über N-terminaler Sequenzierung ermittelten Sequenzen beinhalteten.

6.2.2 Vorteile einer neuen Kalibrierungsmethode von 2-DE Gelen

Mit den erzielten Informationen aus der Identifizierung der Brustdrüsenproteine, genauer, mit der Kenntnis, daß bei vielen Spezies an der N-terminalen Seite einzelne oder mehrere Aminosäuren abgespalten sind, konnten die pI - und M_w -Werte für die restliche Sequenz neu berechnet werden. Bei dem Vergleich der theoretischen Daten von manchen Nachbarspots fiel auf, daß ein Spot, der im Gel positionsmäßig über einen anderen lag, eine kleinere theoretische Masse besaß als der andere. Daher ist es nicht logisch, die theoretischen M_w - und pI -Werte für die Kalibrierung eines 2-DE Gels zu benutzen. Viele im Internet

zugängliche Gelbilder wurden auf diese Weise kalibriert. Es werden für bestimmte Proteinspots die theoretischen Daten in ein Programm eingegeben und das Gel wird danach kalibriert. Hierbei wird darauf, daß die gewählten Spots möglicherweise Fragmente oder konjugierte Proteine sind, keine Rücksicht genommen. Auch wenn solche Spots gewählt werden, von denen man vermutet, daß das Protein wirklich den theoretischen Daten entspricht, ist das eher eine grobe Kalibrierung. Klose und Kobalz (Klose und Kobalz, 1995) lassen hierfür bei der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese ein unbeladenes Gel mitlaufen. Nach der Fokussierung schneiden sie dieses Röhrchengel in 1 cm lange Stücke und equilibrieren es in Wasser. Nach einer gewissen Zeit wird der pH der Lösung gemessen. Auf diese Weise ordnen sie Punkten mit einem bestimmten Abstand dazwischen bestimmte pI -Werte zu. Die Kalibrierung des Gels nach der Längsachse bestimmen sie mit bestimmten Gewichtsmarkern, die im Gel mitlaufen.

Bei der hier eingeführten Methode wurden zuerst die x- und y-Koordinaten der identifizierten Spots notiert. Dann wurden die theoretischen pI -Werte gegen die x-Koordinaten in einem Punktdiagramm gezeichnet. Die theoretischen M_w -Werte wurden gegen die y-Koordinaten aufgetragen. In die Diagramme konnte man Trendlinien einzeichnen lassen. Für das pI -x Diagramm wurde eine lineare Trendlinie eingezeichnet. Bei dieser Kalibrierung wurde für den Anstieg des pI -Wertes von links nach rechts ein linearer Anstieg vorausgesetzt. Für das M_w -y Diagramm wurde eine exponentielle Trendlinie gewählt. Für den Anstieg des M_w -Wertes wurde von unten nach oben ein exponentieller Anstieg des M_w -Wertes vorausgesetzt. In diesen Diagrammen wurde gleich sichtbar, welche Spots nicht in einer Form vorlagen, die den theoretischen Werten entsprachen. Es wurden z.B. Fragmente erkannt, die schon durch die Sequenzierung bestätigt waren. Es waren jedoch auch solche Spots dabei, zu denen keine Sequenzinformation vorlag. Im ersten Schritt der Kalibrierung wurden all die Spots 'verbessert', zu denen Sequenzinformationen vorlagen wobei festgestellt werden konnte, daß sie in einer anderen Form existieren, als in der Datenbank angegeben. Das bedeutet, die M_w - und pI -Werte für die Restsequenz wurden neu berechnet. Die Spots mit den neu berechneten Daten wurden mit den Spots, deren Daten nicht verändert werden konnten, in ein neues Diagramm eingegeben. In diesem Diagramm war zu sehen, daß die meisten Spots sich näher an der Trendlinie befanden. Im zweiten Schritt wurden um die Trendlinien der zweiten Diagramme ein Intervall von $\pm 20\%$ bzw. von $\pm 0,8$ pI Einheiten eingezeichnet. Mit Hilfe dieser Intervalle wurden die Spots, die außerhalb der Intervalle lagen, aussortiert. Nur die Spots innerhalb der Intervalle wurden in ein neues Diagramm überführt und es wurden neue Trendlinien eingezeichnet. Mit den Formeln der letzten Trendlinien wurde die

Kalibrierung durchgeführt.

Diese Kalibrierungsmethode stellt eine Annäherung zu den tatsächlichen Werten dar. Es kann nicht behauptet werden, daß das die beste Methode sei. Vor allem weil erstens bei der Berechnung des Molekulargewichts nur das Gewicht der Polypeptidkette berücksichtigt wird, und zweitens der pI Anstieg nicht durchgehend linear ist, sondern in Wirklichkeit an den Rändern des Gels eher gestaucht und in der Mitte gestreckt ist.

Ein Vorteil dieser Kalibrierungsmethode ist das Erkennen von posttranslational modifizierten Proteinspezies, durch das Anordnen der Spots in Diagrammen. Auf diese Weise wird auf eine andere Art verbildlicht, welche Spots der Masse oder dem pI entsprechen, welche seiner Position zugeordnet wurden.. Unter der Betrachtung in welche Richtung die Abweichung führt können auch Vorhersagen über die Art der Modifikation gemacht werden.

6.2.3 Vergleich der Proteinmuster von Gewebelysaten aus Tumorgewebe und histologisch normalem Gewebe doppeltransgener Mäuse

Der proteomanalytische Ansatz, also die Untersuchung der Proteinzusammensetzung von Zellen, Organen oder Organismen, ermöglicht durch die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) einen quantitativen Vergleich zwischen zwei oder mehr definierten Zuständen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in der ersten Dimension nach ihrer Ladung durch isoelektrische Fokussierung und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht durch SDS-PAGE.

Durch den immer öfteren Einsatz der 2-DE wird seine Ausdruckskraft bezeugt. Heutzutage stellt die 2-DE noch immer die Methode mit der besten Auflösung bei komplexen Proteingemischen dar. Durch die 2-DE wird seit mehreren Jahren versucht Einsichten in die Tumorentstehung und die Entartung von Zellen zu gewinnen. Da Brustkrebs eines der Krankheiten ist, die noch immer mit einer hohen Inzidenz auftritt, werden sehr viele Forschungsprojekte durchgeführt, um die Entstehung von Brustkrebs zu verstehen.

Die Proteomanalyse ermöglicht hierfür einen ganz eigenen Ansatz. Indem die Proteine analysiert werden, gewinnt man einen Einblick in das funktionelle Geschehen der Zelle. So wurden z. B. durch subtraktive Proteomanalyse 20 neue Proteine des MAPK (‘mitogen-activated protein kinase’) Signaltransduktionswegs gefunden. Dieser Signalweg wurde selektiv aktiviert oder inhibiert. Die Proteine der entsprechenden Kulturzellen wurden auf 2-DE Gelen aufgetrennt und die Muster verglichen (Lewis *et al.*, 2000).

Franzen *et al.* zeigten auf 2-DE Gelen, daß unterschiedlich eingestufte Tumorarten

auch unterschiedliche Proteinmuster aufweisen. Vom gutartigen über langsam proliferierenden zum aggressiven Tumor hin erhöhte sich die Anzahl der Unterschiede auf den Gelen (Franzen *et al.*, 1997).

Bei dem Vergleich von Gewebeproben aus duktalem Karzinom und histologisch normalem Gewebe aus humanen Biopsien der Brust von 10 Patientinnen fanden Bini *et al.* 32 Unterschiede im Proteinmuster. Die 32 unterschiedlichen Proteinspots waren in den 2-DE Gelen des Tumorgewebes erhöht (Bini *et al.*, 1997).

Bei vielen humanen Tumoren wurde eine Überexprimierung vom EGFR Gen detektiert (Klijn *et al.*, 1992). Bei vielen anderen die gleichzeitige Überpräsenz des EGFR und des TGF α Proteins, was vermuten läßt, daß die Stimulierung des TGF α eine Rolle im Tumorstadium spielt (El-Obeid *et al.*, 2002). Um die Einflüsse dieser Gene auf das Zellgeschehen zu studieren, wurde ein doppeltransgenes Mausmodell generiert. Durch die gewebespezifische Expression des humanen EGFR und des TGF α , eines der Liganden des EGFR, entstanden im Mammaepithel Tumore. Ab einem Alter von 6 Monaten entwickelten sich bei diesen Mäusen Tumore in der Brustdrüse. Beim Vergleich der Proteinmuster von Geweben aus dem Tumormaterial und aus einer normalen Brustdrüse der selben Maus wurden folgende Unterschiede detektiert. In den Gelen der Tumorproben waren die Spots der Carbonic Anhydrase III, Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), Fruktose-biphosphat Aldolase I, Kreatinkinase und Enolase 3 in einer niedrigeren Intensität als in den Gelen der normalen Brustdrüsen. Spots, die im Tumorgewebe höhere Intensitäten zeigten waren das Tropomyosin 5, das 'eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2' und mehrere Spots von Serumalbumin Fragmenten. Die Proteine GAPDH und Fruktose-biphosphat Aldolase I waren hier im normalen Gewebe intensiver als im Tumorgewebe. Dies korreliert nicht mit den Ergebnissen von Bini *et al.*. Sie fanden die Intensität dieser beiden Proteine im Tumorgewebe erhöht. Hierbei kann nicht klar gesagt werden, ob es sich um die selben Proteinspezies handelt. In dem etwas unterschiedlichen Proteinmuster des humanen Brustdrüsenorgans ist die als erhöht angezeigte Proteinspezies der Fruktose-biphosphat Aldolase I in einem saureren Bereich als das GAPDH. Auf dem 2-DE Gel der Mausbrustdrüse ist die Aldolase basischer als GAPDH. Diese aufgezählten Unterschiede wurden bei dieser Arbeit reproduzierbar detektiert. Eine Korrelation mit der Tumorentwicklung ist im Moment nicht gegeben. Es kann nur gesagt werden, daß es bei diesen doppeltransgenen Mäusen einen Trend bei diesen Proteinen in die erwähnte Richtung gab. Weitere Unterschiede wurden zwar gefunden, konnten aber nicht für alle vier untersuchten Paare bestätigt werden.

Um darstellen zu können, in wie weit die als Unterschiede detektierten und

anschließend identifizierten Proteine eine wichtige Rolle im Tumorprozeß spielen, müssen im weiteren durch *in-vitro* und *in-vivo* Validierungsmethoden bestätigt werden.

7 Ausblick

Für die Proteomforschung stellen Proteindatenbanken informative Referenzquellen dar. Proteinmuster, für die man sich interessiert, können über das Internet eingesehen werden, ohne daß man die 2-DE Gele selbst herstellen muß. Oder es können Vergleiche zwischen unterschiedlichen Zuständen der selben Proben durchgeführt werden wobei man selbst nur den einen Zustand analysiert und mit dem Zustand aus der Datenbank vergleicht. In dieser Arbeit war der Hauptgrund für das Zusammenstellen der identifizierten Proteine in einer Datenbank der, daß es keine Datenbank für die Brustdrüsenproteine der Maus aus Gewebeproben gab. Dies sollte für unsere weitere Arbeit eine Basis darstellen. Es bestehen Datenbanken von Brustdrüsenepithelzellen, die jedoch aus Zellkulturproben entstanden. Bei Zellkulturen gibt es den Vorteil, daß die Probe homogen ist, da sie aus nur einem Zelltyp besteht. Durch die Proteomanalyse von Zellkulturen kann man viel über den Metabolismus im Zellinneren erfahren. Der Nachteil ist jedoch der Verlust von Zellkommunikation und deren Auswirkungen bei den zugrunde liegenden Kultursystemen.

Bei heterogenen Gewebeproben ist anzunehmen, daß durch eine unterschiedliche Anteilsverteilung der verschiedenen Zellarten sich Unterschiede ergeben können. Um dieses Problem zu umgehen gibt es die Möglichkeit auf Zellkulturen zurückzugreifen. Es muß aber in Kauf genommen werden, daß Informationen verloren gehen. Eine alternative und innovative Möglichkeit ist, die zu untersuchenden Zellen aus dem Gewebe selektiv herauszupräparieren. Hierfür wurden in den letzten Jahren hochpräzise 'Skalpelle' aus Laserstrahlen entwickelt. Die 'Laser Capture Microdissection' ist die Methode, mit der man aus Gewebeschnitten Gewebeteile oder sogar einzelne Zellen ausschneiden kann. Die geschnittenen Zellen oder Zellverbände werden in einem Gefäß gesammelt bis man genug Material zusammengestellt hat. Für ein silbergefärbtes Gel braucht man mindestens 10^4 - 10^5 Zellen. Da die Zellen bis zur Entnahme im Gewebe mit Kontakt zu anderen Zelltypen waren und in ihrem natürlichen Lebensraum gewachsen waren, gehen auf diese Weise auch keine Informationen verloren. Für heterogene Proben, wie das Brustdrüsengewebe, empfiehlt sich die Laser Capture Microdissection Methode als Extraktionsverfahren für einzelne Zelltypen. Da sich der EGFR auf der Zellmembran von Epithelzellen befindet sollten die Epithelzellen auf diese Weise extrahiert und über die 2-DE analysiert werden.

8 Literaturverzeichnis

- **Aaronson S. A.**, (1991). Growth factors and cancer. *Science* 254(5035), 1146-1153.
- **Aebersold R. H., Teplow D. B., Hood L. E. und Kent S. B.**, (1986). Electroblothing onto activated glass. High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence analysis. *Journal of Biological Chemistry* 261(9), 4229-4238.
- **Anderson N. G. und Anderson N. L.**, (1981). Photo/essay. The human protein index. *JAMA* 246(22), 2620-2621.
- **Anderson N. G. und Anderson N. L.**, (1982). The human protein index. *Clin. Chem.* 28, 739-748.
- **Appel R. D., Hochstrasser D. F., Funk M., Vargas J. R., Pellegrini C., Muller A. F. und Scherrer J. R.**, (1991). The MELANIE project: from a biopsy to automatic protein map interpretation by computer. *Electrophoresis* 12(10), 722-735.
- **Beg Z. H., Stonik J. A., Hoeg J. M., Demosky S. J. Jr, Fairwell T. und Brewer H. B. Jr.** (1989). Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by covalent phosphorylation. *J Biol Chem.* 264(12), 6913-6921.
- **Bini L., Magi B., Marzocchi B., Arcuri F., Tripodi S., Cintorino M., Sanchez J. C., Frutiger S., Hughes G., Pallini V., Hochstrasser D. F., Tosi P.**, (1997). Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis* 18(15), 2832-2841.
- **Bjellqvist B., Ek K., Righetti P. G., Gianazza E., Gorg A., Westermeier R. und Postel W.**, (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6(4), 317-339.
- **Bjellqvist B., Hughes G. J., Pasquali C., Paquet N., Ravier F., Sanchez J.-Ch., Frutiger S. und Hochstrasser D. F.** (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14(10), 1023-1031.
- **Bjellqvist B., Basse B., Olsen E. und Celis J. E.**, (1994). Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15(3-4), 529-539.
- **Brandt R., Eisenbrandt R., Leenders F., Zschesche W., Binas B., Juergensen C. und Theuring F.**, (2000). Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation. *Oncogene* 19(17), 2129-2137.
- **Brockhaus – Die Enzyklopädie: in 24 Bänden.** 20., neu bearbeitete Auflage. Leipzig, Mannheim: F.A. Brockhaus 1996-99.
- **Clark B. F.**, (1981). Towards a total human protein map. *Nature* 292(5823), 491-492.

-
- **Compton S. J. und Jones C. G.**, (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* 151(2), 369-374.
 - **Crystal R. G.**, (1995). Transfer of Genes to Humans: Early Lessons and Obstacles to Success. *Science* 270(5235), 404-410.
 - **Dale G. und Latner A. L.**, (1969). Isoelectric focusing of serum proteins in acrylamide gels followed by electrophoresis. *Clinica Chimica Acta* 24(1), 61-68.
 - **Eckerskorn C., Jungblut P., Mewes W., Klose J. und Lottspeich F.**, (1988). Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and aminoacid composition analysis. *Electrophoresis* 9(12), 830-838.
 - **Edman P.**, (1950) *Acta Chem. Scand.* 4, 283–293.
 - **Eisenberg D., Marcotte E. M., Xenarios I. und Yeates T. O.**, (2000). Protein function in the post-genomic era. *Nature* 405(6788), 823-826.
 - **El-Obeid A., Hesselager G., Westermarck B. und Nister M.**, (2002). TGF- α -driven tumor growth is inhibited by an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(1), 349-358.
 - **Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F. und Withershouse C. M.**, (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246(4926), 64-71.
 - **Fernandez-Patron C., Madrazo J., Hardy E., Mendez E., Frank R. und Castellanos-Serra L.**, (1995). Single-step electrotransfer of reverse-stained proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel onto reversed-phase minicartridge and subsequent desalting and elution with a conventional high-performance liquid chromatography gradient system for analysis. *Electrophoresis* 16(6), 911-920.
 - **Franzen B., Linder S., Alaiya A. A., Eriksson E., Fujioka K., Bergman A. C., Jörnvall H. und Auer G.**, (1997). Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions. *Electrophoresis* 18(3-4), 582-587.
 - **Garrels J. I.**, (1989). The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. *Journal of Biological Chemistry* 264(9), 5269-5282.
 - **Giometti C. S., Williams K. und Tollaksen S. L.**, (1997). A two-dimensional electrophoresis database of human breast epithelial cell proteins. *Electrophoresis* 18(3-4), 573-581.
 - **Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A. und Ruddle F. H.**, (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(12), 7380-7384.
 - **Görg A., Postel W., Günther S. und Friedrich C.**, (1988). Horizontal two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients using PhastSystem. *Electrophoresis* 9(1), 57-59.

- **Görg A., Boguth G., Obermaier C., Posch A. und Weiss W.** (1995). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 16(7), 1079-1086.
- **Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E. und Kemler R.,** (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 83(23), 9065-9069.
- **Gray W. R. und Hartley B. S.,** (1963). *Biochem. J.* 89, 379-380.
- **Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H. und Aebersold R.,** (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 17(10), 994-999.
- **Hedrick J. L. und Smith A. J.,** (1968). Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disk gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126(1), 155-164.
- **Hennighausen L. G., Steudle A. und Sippel A. E.,** (1982) Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for mouse epsilon casein. *Eur J Biochem.* 126(3), 569-572.
- **Heukeshoven J. und Dernick R.,** (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.
- **Hoeg J. M., Meng M. S., Ronan R., Fairwell T. und Brewer H. B. Jr.,** (1986). Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by fatty acid acylation. *J Biol Chem.* 261(9), 3911-3914.
- **HUPO (Human Proteome Organization) 1st World Congress.** (2002) 21-24 November 2002, Versailles, France. Abstracts. *Mol Cell Proteomics* 1(9), 651-752.
- **Jonscher K. R. und Yates J. R. 3rd,** (1997). The quadrupole ion trap mass spectrometer--a small solution to a big challenge. *Analytical Biochemistry* 244(1), 1-15.
- **Jungblut P. R., Prehm J. und Klose J.,** (1987). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 439.
- **Jungblut P. R. und Seifert R.,** (1990). Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells. *J Biochem Biophys Methods* 21(1), 47-58.
- **Jungblut P. R., Eckerskorn C., Lottspeich F. und Klose J.,** (1990). Blotting efficiency investigated by using two-dimensional electrophoresis, hydrophobic membranes and proteins from different sources. *Electrophoresis* 11(7), 581-588.
- **Jungblut P. R., Thiede B., Zimny-Arndt U., Muller E. C., Scheler C., Wittmann-Liebold B. und Otto A.,** (1996). Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis* 17(5), 839-847.
- **Kahn P.,** (1995). From genome to proteome: looking at a cell's proteins [news]. *Science* 270(5235), 369-370.

- **Karas M. und Hillenkamp F.**, (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60(20), 2299-2301.
- **Klijin J. G., Berns P. M., Schmitz P. I. und Foekens J. A.**, (1992). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev.* 13(1):3-17.
- **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(3), 231-243.
- **Klose J. und Kobalz U.**, (1995). Two dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16(6), 1034-1059.
- **Laemmli U. K.**, (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259), 680-685.
- **Lakso M., Sauer B., Mosinger B. Jr., Lee E. J., Manning R. W., Yu S. H., Mulder K. L. und Westphal H.**, (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14), 6232-6236.
- **Lewis T. S., Hunt J. B., Aveline L. D., Jonscher K. R., Louie D. F., Yeh J. M., Nahreini T. S., Resing K. A. und Ahn N. G.**, (2000). Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell.* 6(6), 1343-1354.
- **Lexikon der Biochemie**, hgg. von Angelika Fallert-Müller. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 1999/2000.
- **Louris J. N., Cooks R. G., Syka J. E. P., Kelley P. E, Stafford G. C. Jr. und Todd J. F. J.**, (1987). Instrumentation, applications, and energy deposition in quadrupole ion-trap tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 59(13), 1677-1685.
- **Louris J. N., Amy J. W., Ridley T. Y. und Cooks R. G.**, (1989). Injection of ions into a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 88(2-3), 97-111.
- **Macko V. und Stegemann H.**, (1969). Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis identification of varieties. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* 350(7), 917-919.
- **Mamyrin B. A.**, (1994). Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* 131, 1-19.
- **Mann M., Hendrickson R. C. und Pandey A.**, (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 437-473.
- **Margolis J. und Kenrick K. C.**, (1967). Polyacrylamide gel-electrophoresis across a molecular sieve gradient. *Nature* 214(95), 1334-1336.

- **Margolis J. und Kenrick K. C.**, (1969). 2-dimensional resolution of plasma proteins by combination of polyacrylamide disc and gradient gel electrophoresis. *Nature* 221(185), 1056-1057.
- **Matsudaira P.**, (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry* 262(21), 10035-10038.
- **Merril C. R., Switzer R. C. und Van Keuren M. L.**, (1979). Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9), 4335-4339.
- **Neuhoff V., Arold N., Taube D. und Ehrhardt W.**, (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9(6), 255-262.
- **O'Farrell P. H.**, (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250(10), 4007-4021.
- **O'Farrell P. Z., Goodman H. M. und O'Farrell P. H.**, (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12(4), 1133-1141.
- **Orban P. C., Chui D., Marth J. D.**, (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15), 6861-6865.
- **Page M. J., Amess B., Townsend R. R., Parekh R., Herath A., Brusten L., Zvelebil M. J., Stein R. C., Waterfield M. D., Davies S. C. und O'Hare M. J.**, (1999). Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22), 12589-12594.
- **Pandey A. und Mann M.**, (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405(6788), 837-846.
- **Pennisi E.**, (2000). A Mouse Chronology. *Science* 288(5464), 248-257.
- **Peterson G. L.**, (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83(2), 346-356.
- **Rabilloud T.**, (1990). Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11(10), 785-794.
- **Rasmussen R. K., Ji H., Eddes J. S., Moritz R. L., Reid G. E., Simpson R. J. und Dorow D. S.**, (1997). Two-dimensional electrophoretic analysis of human breast carcinoma proteins: mapping of proteins that bind to the SH3 domain of mixed lineage kinase MLK2. *Electrophoresis* 18(3-4), 588-598.
- **Raymond S. und Ann N. Y.**, (1964). *Acad. Sci.* 121, 350-365.
- **Salinovich O. und Montelaro R. C.**, (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 156(2), 341-347.

-
- **Sanchez J. C., Ravier F., Pasquali C., Frutiger S., Paquet N., Bjellqvist B., Hochstrasser D. F. und Hughes G. J.,** (1992) Improving the detection of proteins after transfer to polyvinylidene difluoride membranes. *Electrophoresis*. 13(9-10), 715-717.
 - **Sasaki T., Sasaki M. und Enami J.,** (1993). Mouse gamma-casein cDNA: PCR cloning and sequence analysis. *Zoolog Sci.* 10(1), 65-72.
 - **Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. und Mann M.,** (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68(5), 850-858.
 - **Shevchenko A., Chernushevich I., Ens W., Standing K. G., Thomson B., Wilm M. und Mann M.,** (1997). Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 11(9), 1015-1024.
 - **Smithies O. und Poulik M. D.,** (1956). Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. *Nature* 176, 1256-1266.
 - **Spencer G.,** (2002). Background on Mouse as a Model Organism. Newsroom. <http://www.genome.gov/page.cfm?pageID=10005834>
 - **Steinberg T. H., Jones L. J., Haugland R. P. und Singer V. L.,** (1996) SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Analytical Biochemistry* 239(2), 223-237.
 - **Tal M., Silberstein A. und Nusser E.,** (1985). Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J. Biol. Chem.* 260(18), 9976-9980.
 - **Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y. und Yoshida T.,** (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2(8), 151-153.
 - **The GLOBOCAN 2000 Database,** Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>
 - **Vanderkerckhove J., Bauw G., Puype M., Van Damme J. und Van Montagu M.,** (1985). Protein-blotting on Polybrene-coated glass-fiber sheets. A basis for acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomole quantities of protein previously separated on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel. *European Journal of Biochemistry* 152(1), 9-19.
 - **Wade N.,** (1981). The complete index to man. *Science* 211(4477), 33-35.
 - **Waterston R. H., Lindblad-Toh K., Birney E., et al.** (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420(6915), 520-562.
 - **Williams K., Chubb C., Huberman E. und Giometti C. S.,** (1998). Analysis of differential protein expression in normal and neoplastic human breast epithelial cell lines. *Electrophoresis* 19(2), 333-343.
 - **Wilkins M. R., Williams K. L., Appel R. D. und Hochstrasser D. F.,** (1997). Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, Springer Verlag Berlin.

- **Wilson C. M.**, (1979) Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 96(2), 263-278.
- **Yoshimura M. und Oka T.**, (1990). Transfection of beta-casein chimeric gene and hormonal induction of its expression in primary murine mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(10), 3670–3674.
- **Yotov W. V. und St-Arnaud R.**, (1993). Cloning and functional expression analysis of the alpha subunit of mouse ATP synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 191(1), 142-148.
- <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>
- <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/mspattern.htm>
- <http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=../home.html>
- <http://www.hupo.org>
- http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html

9. Anhang

9.1 Abkürzungen

ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovins Serumalbumin
CBB	‘Coomassie Brilliant Blue’
CHCA	α -cyano-4-hydroxyzimtsäure
CNBr	Cyanbromid
Da	Dalton
2-DE	zweidimensionale Elektrophorese
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNP	Dinitrophenyl
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	‘epidermal growth factor receptor’
ESI	‘electrospray ionisation’
ESI-MS	‘electrospray ionisation-mass spectrometry’
FMOC	fluorenylmethyloxycarbonyl
HCl	Salzsäure
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HPLC	‘High Performance Liquid Chromatography’
IACR	‘International Association of Cancer Registries’
ICAT	‘isotope-coded-affinity-tag’
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	‘immobilised pH gradient’
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
LC-MS	‘Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry’
MALDI	‘Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation’
MALDI-MS	‘Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation’-Massenspektrometrie
MALDI-TOF-MS	‘Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-time of flight’- Massenspektrometrie
MDLC	‘Multi-Dimensional-Liquid-Chromatography’
m/v	Masse/Volumen Verhältnis
MS	Massenspektrometrie
M _r	relatives Molekulargewicht
M _w	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	‘National Center for Biotechnology Information’
NEPHGE	‘non-equilibrium-pH-gel-electrophoresis’
NTS	N-terminale Sequenzierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pI	isoelektrischer Punkt
PITC	Phenylisothiocyanat
PMF	‘peptide mass fingerprint’

PMSF	Phenylmethylnsulphonylfluorid
ppm	parts per million
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Poly(vinylidene fluorid)
Q-TOF	‘Quadrupole-Time-of-Flight’
RNS	Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	‘Tris buffered saline’
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF α	‘transforming growth factor α ’
TOF	‘Time-of-Flight’
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	ultraviolet
URL	Uniform Resource Locator
V	Volt

9.2 Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johann Salnikow dafür, daß er mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Max-Volmer-Institut, Fachgebiet Biochemie, durchzuführen. Ich möchte mich für die Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Bei Herrn Dr. Peter R. Jungblut (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) möchte ich mich ebenfalls sehr bedanken. Er ermöglichte es, daß die Arbeit zu Ende geführt werden konnte. Ich bedanke mich für die durchgehende Betreuung und Unterstützung.

Auf gleiche Weise danke ich Herrn Prof. Dr. Franz Theuring (Universitätskrankenhaus Charité, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Berlin) dafür, daß er mir das Probenmaterial zur Verfügung gestellt hat und für die wertvollen Besprechungen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Starnick und Herrn Prof. Dr. Jörn Müller danke ich dafür, daß Herr Starnick einer der Gutachter und Herr Müller der Berichter bei der mündlichen Aussprache geworden ist.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann Yilmaz Aksu, vor allem wegen seiner stetigen Unterstützung und Hilfe ist es mir gelungen diese Arbeit fertigzustellen.

Meinen Eltern möchte ich ganz herzlich für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen danken.

Frau Gisela Haeselbarth möchte ich im besonderen für ihre Freundschaft danken und für all die Sequenzierungen, die sie durchgeführt und ausgewertet hat.

Herrn Dr. Christian Scheler und Frau Dr. Xiping Li habe ich ebenfalls für ihre Freundschaft zu danken und dafür, daß sie mir die Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese beigebracht haben.

Frau Dr. Nicole Focks danke ich sehr für die Präparation der transgenen Tiere, die Weitergabe der Proben an mich und für die fruchtbringenden Diskussionen während der Arbeit.

Zu danken habe ich ferner Frau Dr. Ursula Zimny-Arndt, Frau Stephanie Lamer, Frau Monika Schmid, Frau Ina Wagner, Frau Renate Ackermann, Frau Hajar Habibi, Frau Karina Barthel, Frau Fenya Kähne, Herrn Till Eifert, Herrn Dr. Bernd Thiede, Herrn Dr. Jens Mattow, Herrn Frank Schmidt, Herrn Alexander Krahl, Herrn Wolfgang Höhenwarter und Herrn Dr. Dirk Bumann vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie für ihre Freundschaft, stetige Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit. Herrn Frank Schmidt, Herrn Alexander Krahl und Frau Monika Schmid danke ich besonders für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Im weiteren bedanke ich mich für die Stipendien, ohne die diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre, bei "YÖK", dem türkischen Amt für Hochschulwesen, für das vierjährige Promotionsstipendium und dem "Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre" für das Promotionsabschlußstipendium.

9.3 Lebenslauf

Name: AKSU
Vorname: Sevil
Geburtsdatum: 11.12.1969
Geburtsort: Ankara/ Türkei
Staatsangehörigkeit: türkisch
Familienstand: verheiratet
Schulbildung: 1976-1980: Grundschule an der Manzostraße, München
1980-1981: Haldenberger Hauptschule, München
1981-1988: Moosacher Gymnasium, München
1988-1989: Izmir Özel Türk Lisesi, Izmir/Türkei
Studium: 1990-1994: Studium an der Akdeniz Universität, Antalya/Türkei
Studiengang: Chemie mit dem Abschluß Bachelor
1994-1996: Studium an der Akdeniz Universität, Antalya/Türkei
Studiengang: Chemie mit dem Abschluß Master of Science
Promotion: seit Januar 1998: AG Prof. Dr. Salnikow, Max-Volmer-Institut,
Technische Universität Berlin
Auszeichnungen: 17.06.1994: Auszeichnung als beste Absolventin des Jahrganges 1994
im Fachbereich Chemie und der Natur- und
Literaturwissenschaftlichen Fakultät
Stipendien: 1991-1994: Studiumsstipendium von TÜBİTAK/Türkei für
überdurchschnittliche Leistungen
1998-2001: Promotionsstipendium von YÖK/Türkei
März 2002-Feb. 2003: Promotionsabschlußstipendium vom ‘Berliner
Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen
in Forschung und Lehre’
Sprachkenntnisse: Türkisch, Deutsch und Englisch

9.4 Eigene Veröffentlichungen

1. **Aksu S., Scheler C., Focks N., Leenders F., Theuring F., Salnikow J., Jungblut P. R.,** (2002). An iterative calibration method with prediction of post-translational modifications for the construction of a two-dimensional electrophoresis database of mouse mammary gland proteins. *Proteomics* 2(10), 1452-1463.
2. **Bumann D., Aksu S., Wendland M., Janek K., Zimny-Arndt U., Sabarth N., Meyer T. F., Jungblut P. R.,** (2002). Proteome Analysis of Secreted Proteins of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 70(7), 3396-3403.
3. **Gorinstein S., Caspi A., Libman I., Zemser M., Aksu S., Salnikow J., Scheler C., Lerner H. T., Trakhtenberg S.,** (2001). Positive and negative effects of short-term moderate beer consumption. *Alcohol Research* 6(6), 233-239.
4. **Gorinstein S., Zemser M., Vargas-Albores F., Ochoa J. L., Paredes-Lopez O., Scheler C., Aksu S., Salnikow J.,** (1999). Stability of some Cactaceae proteins based on fluorescence, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. *Journal of Protein Chemistry* 18(2), 239-247.
5. **Aksu S., Scheler C., Focks N., Leenders F., Theuring F., Jungblut P. R., Salnikow J.,** (2000). A two-dimensional electrophoresis database of mouse mammary gland proteins. *BIOTECHNOLOGY 2000*, 3-8 September 2000, Berlin. (Poster)
6. **Scheler C., Lamer S., Li X. P., Aksu S., Thies S., Salnikow J., Jungblut P. R.,** (1999). Identification of proteins by MALDI-MS separated by two-dimensional electrophoresis and stained by different methods. ABRF '99, Durham, North Carolina, USA. (Poster)