

Massenspektrometrie-basierte Analyse von Tumorzelllinien
mit neuartigen peptidspezifischen Antikörpern
– ein universeller Ansatz zur Proteomanalyse

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Sibylle Judith Höppe, geb. Großmann

aus Hechingen

vorgelegte

D i s s e r t a t i o n

2010

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2010

Dekan: Prof. Dr. Hanspeter A. Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee



INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	13
1.1	Methoden zur Proteomanalyse	14
1.2	Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse	15
1.2.1	Theoretische Grundlagen	16
1.2.2	Methoden zur Separation	18
1.2.2.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese	18
1.2.2.2	Umkehrphasen-, Größenausschluss- und Ionenaustausch-Chromatographie	19
1.2.2.3	Abreicherung hochkonzentrierter Proteine	19
1.2.2.4	Isolierung von glykosylierten Analyten	20
1.2.2.5	Präfraktionierung von Phosphopeptiden	20
1.2.2.6	Anreicherung von Peptiden über seltene Aminosäuren	20
1.2.2.7	Immunaффinitätsbasierte-Präfraktionierung	21
1.2.3	Ein neuartiger Ansatz: Immunaффinität mit kurzen terminalen Peptidepitopen	22
1.2.3.1	Der Wnt-Signalweg - β -Catenin als Modellprotein	24
1.3	Aufgabenstellung	26
2	EXPERIMENTELLER TEIL	29
2.1	Material, Geräte und Software	29
2.2	Reagenzien und Chemikalien	31
2.3	Generierung polyklonaler Antikörper	35
2.3.1	Auswahl von Peptiden zur Immunisierung	35
2.3.2	Kopplung von Peptiden an Trägerproteine	36
2.4	Mikrosphären-basierte Peptid-Mikroarrays	37
2.4.1	Charakterisierung von polyklonalen Antisera	37
2.4.1.1	Kopplung von Peptiden auf Mikrosphären	37
2.4.1.2	Multiplexer Immunoassay zur Serumcharakterisierung	39
2.4.2	Funktionstest aufgereinigter Antikörper	39
2.4.2.1	Kopplung von gereinigten Antikörpern auf Mikrosphären	39
2.4.2.2	Funktionstest	40
2.5	Aufreinigung von Antikörpern aus Serum	41
2.5.1	Herstellung der Affinitätsmatrix	41
2.5.2	Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie	42

2.6	Affinitätsanreicherung tryptischer Fragmente	42
2.6.1	Herstellen der Immunaффinitätssäulen	42
2.6.2	Test der Immunaффinitätssäulen	43
2.6.3	Immunaффinitätsanreicherung aus komplexen Proben	44
2.7	Identifikation von tryptischen Fragmenten	45
2.7.1	Probenpräparation	45
2.7.2	Generierung von MS- und MS/MS-Spektren	45
2.7.3	Identifikation mittels Datenbanksuche	46
2.8	Zellkultur	47
2.8.1	Transformierte <i>E. coli</i>	47
2.8.2	Maus-Lebertumorzelllinie HepF1	47
2.8.3	Humane HEK 293 Zellen	48
2.9	Biochemische Methoden	49
2.9.1	Denaturierende Zellyse	49
2.9.2	Proteinbestimmung	49
2.9.3	Enzymatischer Proteinabbau	49
2.9.4	Gelelektrophorese	50
2.9.4.1	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung	51
2.9.5	Western Blot	51
3	ERGEBNISSE	53
3.1	Generierung polyklonaler Antikörper für kurze terminale Epitope	54
3.2	Charakterisierung der generierten Antikörper	57
3.3	Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren	62
3.3.1	Affinitäts- und Gelchromatographie zur Antikörperaufreinigung	63
3.4	Charakterisierung der Epitope der polyspezifischen Antikörper	66
3.5	Einsatz der Antikörper zur Immunaффinitätsanreicherung	70
3.5.1	Funktionalitätstest der Antikörper	70
3.5.2	Herstellung einer Affinitätsmatrix zur Anreicherung tryptischer Peptidfragmente	72
3.5.3	Funktionalitätstest der Affinitätsmatrix mit Peptidgemisch	73

3.6	Immunaффinitäts-MS von enzymatisch verdauten biologischen Proben	77
3.6.1	Anreicherung und Nachweis tryptischer β -Cateninfragmente aus überexprimierenden <i>E.coli</i>	77
3.6.2	Nachweis von β -Cateninfragmenten aus Maus- und humanen Zelllinien	82
3.6.3	Aффinitätsanreicherung und Nachweis von tryptischen Fragmenten mit spezifischen Termini aus einer Maus-Zelllinie	84
3.6.4	Aффinitätsanreicherung und Nachweis von tryptischen Fragmenten mit spezifischen Termini aus humaner Zelllinie	92
4	DISKUSSION	101
4.1	Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse	102
4.2	Immunaффinitätsbasierte Probenfraktionierung	103
4.2.1	MS-basierte Proteomanalyse mit peptidspezifischen Antikörpern	104
4.3	Neuartige Antikörper gegen kurze terminale Peptidepitope	105
4.3.1	Charakterisierung der generierten Antiseren	107
4.3.2	Immunaффinitätschromatographie mit TXP-Antikörpern	109
4.3.3	Analyse komplexer Proben mit TXP-Antikörpern	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	118
7	PUBLIKATIONSLISTE	123
8	LEBENS LAUF	124
9	DANKSAGUNG	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers (modifiziert nach Lottspeich/Zorbas)	16
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung Immunaффinitäts-MS mit neuartigen Antikörpern	24
Abbildung 1.3 Vereinfachte Darstellung des Wnt-Signalweges	26
Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Proteins β -Catenin	54
Abbildung 3.2 Schematische Darstellung einer mit Peptidkonjugat belegten Mikrosphäre	58
Abbildung 3.3 Reaktivität der peptidspezifischen Antiseren im Mikrosphären-basierten Multiplex-Assay	61
Abbildung 3.4 Kopplungskontrolle der für die Immunaффinitätsreinigung eingesetzten Peptidkonjugate	63
Abbildung 3.5 SDS-Gel zur Überprüfung aufgereinigter Antikörper	64
Abbildung 3.6 Test der Aufreinigung von Antikörpern mittels Mikrosphären-basiertem Peptid-Mikroarray	66
Abbildung 3.7 Antikörpercharakterisierung mittels auf Mikrosphären immobilisierten Positionsbibliotheken	69
Abbildung 3.8 Funktionalitätstest von immobilisierten Antikörpern mittels Mikrosphären-basiertem Protein-Mikroarray	71
Abbildung 3.9 Schematische Darstellung der TXP Immunaффinitäts-MS	74
Abbildung 3.10 Anreicherung und Identifizierung synthetischer Peptide	75
Abbildung 3.11 SDS-Gel zur Kontrolle von β -Catenin überexprimierenden <i>E. coli</i>	78
Abbildung 3.12 Immunaффinitätsanreicherung von β -Cateninfragmenten aus <i>E. coli</i>	80
Abbildung 3.13 Coomassie-Gel und Western Blot zum Nachweis von β -Catenin	83
Abbildung 3.14 SDS-Gel zur Kontrolle des Lysatverdaus	84
Abbildung 3.15 MALDI-TOF-Spektrum eines HepF1-Verdaus nach Immunaффinitätsanreicherung mit anti-LGYR T2	86
Abbildung 3.16 MALDI-TOF-Spektrum von verdaulichem und Immunaффinitätsangereichertem HEK 293-Lysat	95
Abbildung 3.17 Mit anti-LGYR angereicherte und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierte Proteinfragmente aus verdaulichem HEK 293-Lysat	96
Abbildung 3.18 Mit anti-AMTR angereicherte und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierte Proteinfragmente aus verdaulichem HEK 293-Lysat	98
Abbildung 4.1 MS-basierte Proteomanalytik im Überblick	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Chromatographische Methoden zur Präfraktionierung von komplexen biologischen Proben (modifiziert nach Callesen <i>et al.</i> 2009)	22
Tabelle 3.1 Charakteristik der ausgewählten tryptischen β -Catenin-Fragmente	55
Tabelle 3.2 Anzahl der mit peptidspezifischen Antikörpern theoretisch nachweisbaren humanen Proteine	56
Tabelle 3.3 Zur Immunisierung eingesetzte Konjugate	57
Tabelle 3.4 Auf Mikrosphären immobilisierte Peptidkonjugate zur Charakterisierung der Antiseren im Multiplex-Immunoassay	59
Tabelle 3.5 Menge aufgereinigter Antikörper	64
Tabelle 3.6 Epitopanalyse mit Hilfe von Peptidpositionsbibliotheken	67
Tabelle 3.7 Immunaффinitätsanreicherung mit artifiziellen Peptiden	71
Tabelle 3.8 Bestimmung der Säulenkapazität mit DNP-Peptid-Konjugat (LGYR)	73
Tabelle 3.9 Auflistung affinitätsangereicherter und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierter Peptidsequenzen	76
Tabelle 3.10 Identifizierte Proteinfragmente aus β -Catenin überexprimierendem <i>E. coli</i>	81
Tabelle 3.11 Mit anti-LGYR angereicherte und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierte Peptide aus verdautem HepF1-Lysat	88
Tabelle 3.12 Mit anti-AMTR angereicherte und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierte Peptide aus verdautem HepF1-Lysat	90
Tabelle 3.13 Übersicht über die Anzahl massenspektrometrisch identifizierter Proteine aus HEK 293 nach der Affinitätsanreicherung mit anti-LGYR T2	93
Tabelle 3.14 Übersicht über die Anzahl massenspektrometrisch identifizierter Proteine aus HEK 293 nach der Affinitätsanreicherung mit anti-AMTR T2	94

Abkürzungen und Nomenklatur

BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescent</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
etc.	und so weiter (<i>et cetera</i>)
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 beta
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O _{dd}	Deionisiertes Wasser
HA	Hämagglutinin
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IAA	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)

MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid Ester
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MFI	Median der Fluoreszenzintensitäten
ms	Maus
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MSDB	Proteindatenbank
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
PAC	<i>prespotted anchor chip</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEEK	Polyetheretherketon
ppm	<i>parts per million</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
rb	Kaninchen
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SMCC	Succinimidyl-4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylat
SMPB	Succinimidyl 4-[<i>p</i> -maleimidophenyl]butyrat
sulfo-MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimid Ester
sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
sulfo-SMPB	Sulfosuccinimidyl 4-[<i>p</i> -maleimidophenyl]butyrat
TBST	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung mit 0,1% (v/v) Tween20
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
w/w	Gewicht pro Gewicht (<i>weight per weight</i>)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Arbeit am Humangenomprojekt wurde 1988 mit dem Ziel der vollständigen Entschlüsselung und Kartierung des menschlichen Genoms aufgenommen. Mit der Veröffentlichung der Arbeit „Initial sequencing and analysis of the human genome“ in der Zeitschrift Nature im Jahre 2001 war ein Meilenstein in den Lebenswissenschaften erreicht. 94% des humanen Genoms waren entschlüsselt (Lander *et al.* 2001). Ein erklärtes Ziel des Projektes war es, Zusammenhänge zwischen genetischen Variationen und Erkrankungen aufzuklären. Die Hoffnung, dass mit Kenntnis der genetischen Information hinreichende Grundlagen für Diagnose, Behandlung und Heilung oder Prävention von Erkrankungen gegeben sei, war Triebfeder dieses Ansatzes.

Mit dem heutigen Wissen ist klar, dass die alleinige Betrachtung der im Genom codierten Information unzureichend ist. Aus den im humanen Genom codierten 20.000 bis 25.000 Genen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) – die genaue Zahl ist noch immer unbekannt - entsteht durch Spleißvarianten ein Vielfaches an mRNA-Molekülen. Mit der Entwicklung von quantitativen PCR-Methoden (Liang *et al.* 1992) und chipbasierter Hybridisierungstechnologie (Shalon *et al.* 1996) war es möglich mRNA-Expressionsanalysen zu erstellen. Mit diesem experimentellen Ansatz lassen sich Aussagen über die genetische Variabilität einer Population durch Bestimmung von Einzelnukleotid-Polymorphismen treffen und quantitative mRNA-Profile erstellen (Morley 2004). Für die alleinige Beschreibung eines biologischen Systems ist diese Methode jedoch nicht ausreichend. Aussagen über die tatsächlich vorhandene Menge, die intrazelluläre Lokalisation oder die Halbwertszeit der aus der mRNA entstehenden Produkte sind nicht möglich. Korrelationsstudien in Hefe (Gygi *et al.* 1999) und humanen Leberzellen (Anderson *et al.* 1997) zeigten, dass sich aufgrund von quantitativen RNA-Daten keine verlässliche Aussage über die Menge an tatsächlich exprimierten Proteinen treffen lässt.

mRNA-Moleküle dienen hauptsächlich als Matrize für die eigentlichen funktionellen Einheiten eines biologischen Systems. Des Weiteren erhalten Proteine nicht selten durch posttranslationale Modifikationen wie Proteolyse, Phosphorylierung, Glykosylierung etc. ihre Funktionalität oder pathogenen Eigenschaften (Nedelkov *et al.* 2007). Eine globale Analyse des Proteoms, ein Begriff, der 1996 von Mark Wilkins eingeführt wurde, ist daher für das Verständnis eines biologischen Systems unabdingbar. Wilkins definierte diesen Begriff als die Gesamtheit der aus einem Genom zu einem bestimmten Zeitpunkt und

genau definierten Bedingungen resultierenden Proteine (Wilkins *et al.* 1996; James 1997). Das Proteom eines Lebewesens, einer Zelle oder einer Pflanze ist hoch dynamisch und unterscheidet sich, im Gegensatz zum relativ statischen Genom, je nach Zeitpunkt und äußeren Bedingungen. So unterscheidet sich ein Organismus im Genotyp während der Embryogenese nicht vom erwachsenen Organismus, deutlich jedoch in ihrem Phänotyp. Diese Änderungen in der Morphologie werden über hochkomplexe Regulationsmechanismen gesteuert und können z.B. durch Umweltfaktoren beeinflusst werden.

Die Proteomik ist eine Richtung in der biologischen Forschung, die sich mit der Identifikation, Sequenzierung, Quantifizierung, Struktur- und Interaktionsanalysen des Proteoms befasst.

1.1 Methoden zur Proteomanalyse

Die größte Herausforderung in der Proteomanalyse liegt in der Tatsache begründet, dass biologische Proben eine extrem hohe Komplexität besitzen und die Konzentration der vorhandenen Proteine über einen sehr hohen dynamischen Bereich variieren (Anderson *et al.* 2002). Sie überfordern damit die Leistungsfähigkeit momentan verfügbarer analytischer Plattformen. Bis heute existiert keine Methode und kein Instrument, welches die Identifizierung und Quantifizierung von Komponenten komplexer Proben in einem einfachen Einschrittexperiment möglich macht (Aebersold *et al.* 2003).

Für die Analyse von Proteinen aus komplexen biologischen Proben steht eine Vielzahl von Technologien zur Verfügung. Die Reinigung und Isolierung eines Proteins oder Peptids ist oft eine wesentliche Voraussetzung für die anschließende Untersuchung von Struktur und Funktion. Die Trennung und Reinigung kann über Fraktionierung oder Extraktion wie z.B. elektrophoretische Auftrennung oder chromatographische Verfahren erfolgen. Die anschließende Analyse der Proteine kann mittels chemischer, immunologischer oder physikalischer Verfahren erfolgen.

Die Bestimmung von Peptid- bzw. Proteinsequenzen nach Edman (Edman 1949) erfolgt durch einen zyklischen chemischen Mechanismus. Bei diesem wird das N-terminale Ende der zu analysierenden Sequenz chemisch modifiziert und Aminosäure für Aminosäure abgespalten. Die entstandenen Reaktionsprodukte können chromatographisch aufgetrennt und photometrisch detektiert werden. Mit dieser Methode können Sequenzlängen von bis zu 40 Aminosäuren analysiert und damit eindeutig identifiziert werden. Für die Analyse werden ca. 10 pmol der reinen Substanz benötigt. Die Nachweisgrenze liegt im niedrigen Picomol- bis höheren Femtomol-Bereich.

Immunologische Methoden basieren auf dem dem Nachweis eines Proteins oder Proteinfragments durch die Bindung an einen Antikörper. Diese Art der Protein- oder Peptiddetektion wird in gut etablierten Standardmethoden wie Western Blot oder dem enzymgekoppelten Immunoabsorptions-Assay (ELISA) eingesetzt. Bei diesen Methoden werden ein oder zwei analytenspezifische Antikörper eingesetzt, um bestimmte Analyten aus komplexen Probengemischen zu detektieren. Der Nachweis erfolgt durch katalytische Umsetzung eines Substrates durch ein am Detektionsantikörper gebundenes Enzym. Diese Methode des Nachweises ist sehr sensitiv ($< \text{pM}$) und für den Hochdurchsatz bedingt geeignet (Whiteaker *et al.* 2007). Es wird jedoch für jedes nachzuweisende Protein oder Peptid ein Antikörper bzw. eine Kombination aus zwei spezifischen Antikörpern benötigt, die an unabhängige Epitope binden, was umso schwieriger wird je kleiner das Antigen ist. Der Nachweis der jeweiligen Analyten hängt von der Verfügbarkeit monospezifischer Antikörper ab.

Klassische Methode benötigen somit reine Proteine oder spezifische Bindereagenzien, welche nur über zeitaufwändige Ansätze zu bekommen sind, so dass neue Methoden die klassischen Ansätze komplementiert und tatsächlich weitgehend verdrängt haben. Im Besonderen massenspektrometrische Methoden haben in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht und sich zu einer Standardmethode in der Protein- und Peptidanalytik entwickelt.

1.2 Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse

Diese Methoden basieren auf der Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Die Probenmoleküle werden ionisiert und die entstehenden freien Ionen bezüglich ihrer Masse/Ladungsverhältnisse aufgetrennt und detektiert. Neben der molekularen Masse eines Proteins oder Peptids lässt sich auch deren Aminosäuresequenz bestimmen. Komplexe Proteingemische können ohne den Einsatz von Bindemolekülen auf deren Zusammensetzung analysiert werden. Die Massenspektrometrie ist die einzige Detektionsmethode, die ohne vorheriges Wissen Informationen über strukturelle Variationen, posttranslationale und chemische Modifikationen eines bestimmten Proteins geben kann (Nedelkov *et al.* 2006).

1.2.1 Theoretische Grundlagen

Der Erfolg der letzten Jahre zeigt, dass die Massenspektrometrie-basierte Proteomik ein unverzichtbares Instrument für die molekulare und zelluläre Biologie und der neuen Disziplin Systembiologie ist (Aebersold *et al.* 2003).

Massenspektrometrische Messungen werden in der Gasphase ionisierter Analyten ausgeführt. Ein Massenspektrometer besteht per Definition aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, welcher die erzeugten Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) auftrennt und einem Detektor, der die Anzahl der einzelnen Ionen für jeden m/z -Wert registriert. Für die Ionisierung der Analyten steht eine Vielzahl an Ionisationsmethoden zu Verfügung. In der Praxis haben sich hauptsächlich die beiden Techniken Elektrospray-Ionisation (ESI) und Matrixunterstützte Laserdesorption/-Ionisierung (MALDI) durchgesetzt. Ein schematischer Aufbau eines Massenspektrometers ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

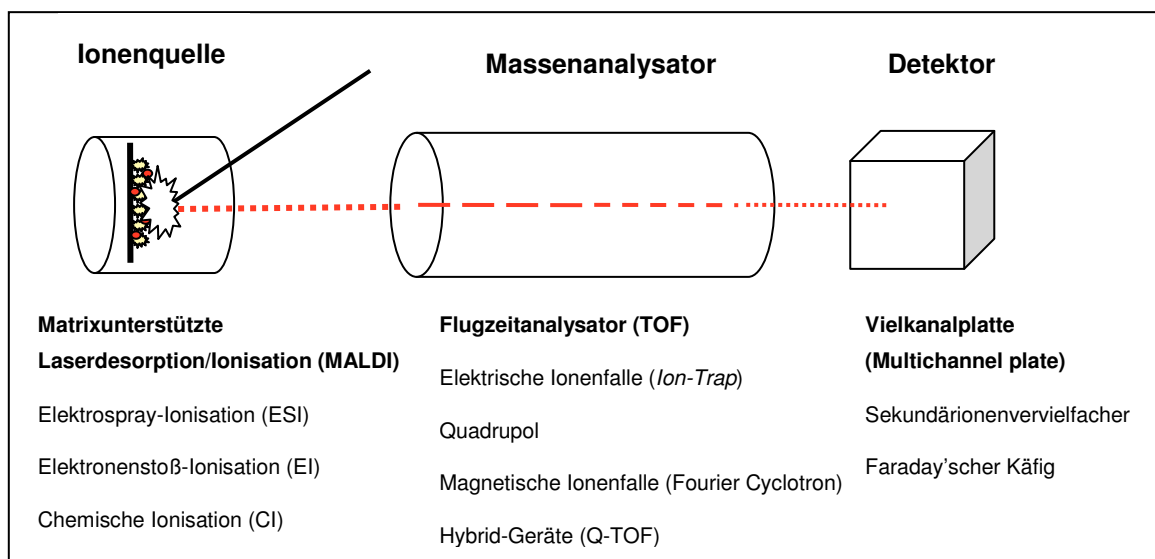


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers (modifiziert nach Lottspeich/Zorbias)

Praktische Bedeutung bekam die MALDI-Technologie mit der Arbeit von Hillenkamp und Karas (Karas *et al.* 1985), die die Wechselwirkung zwischen ultraviolettem Laserlicht und organischen Molekülen untersuchten. Diese Technik ermöglicht die Ionisierung von zwischen Matrixkristallen eingelagerten Peptiden oder Proteinen durch Laserbeschuss: Die Energie eines Laserpulses wird von den Matrixmolekülen absorbiert, was zur Desorption der Matrix und den darin eingebetteten Analytmolekülen von der Oberfläche des Probenträgers führt. In diesem Prozess wird in der Matrix-Analyt-Wolke Energie und

Ladung auf die Protein- oder Peptidmoleküle übertragen. Als Folge daraus liegen sie als einfach geladene freie Ionen in der Gasphase vor. Voraussetzung hierfür sind Matrices, die Absorption und Transfer der Laserenergie ohne Schädigung der Analyten ermöglichen. In Kombination mit der MALDI-Ionisierung wird meist eine Flugzeitmassenanalyse (TOF = time of flight) eingesetzt. Hierbei werden die Analytionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und aufgrund unterschiedlicher Geschwindigkeiten separiert. Grundlage hierfür ist die Tatsache, dass Ionen mit unterschiedlichem Quotienten aus Masse m und Ladung z nach erfolgter Extraktion aus der Matrix und Beschleunigung in der Ionenquelle die gleiche Energie, aber unterschiedliche Geschwindigkeiten besitzen. Ionen mit einem kleinen m/z -Verhältnis erreichen den Detektor schneller als Ionen mit einem größeren m/z -Verhältnis. Neben der Bestimmung des Molekulargewichts können durch Fragmentierung Informationen über die Sequenz oder Primärstruktur des Analyten gewonnen werden. In diesem Fall spricht man von Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Dies kann z.B. mit einem MALDI-TOF/TOF MS realisiert werden. Aufgrund der zugeführten Energie brechen viele Peptidbindungen des Analytmoleküls schon im TOF-Analysator auseinander und es entsteht eine Reihe von Fragmentationen, die über ihre Massendifferenz einen direkten Rückschluss auf die Aminosäuresequenz des Analytmoleküls zulassen. Diesen Effekt nenne man *post-source-decay* (PSD). Die Identifizierung kann über *De Novo*- Sequenzierung oder eine Datenbanksuche erfolgen.

Die wesentlichen Vorteile der MALDI- gegenüber der ESI-Ionisierung sind die beinahe ausschließliche Entstehung einfach geladener Ionen (Karas *et al.* 2000) was die Bestimmung der Masse leicht macht, sowie die relativ hohe Toleranz gegenüber Verunreinigungen, z.B. mit Salzen oder Detergenzien. Die Detektionsgrenze liegt im niedrigen Femto- bis höheren Attomol-Bereich. Relativ einfache Bedienbarkeit und die schnelle Generierung von Spektren ermöglichen einen hohen Probendurchsatz. Diese Art der Instrumentierung führt zu einer hohen Sensitivität, Auflösung und Massengenauigkeit (Aebersold *et al.* 2003). Ein Nachteil ist, dass nur definiert gepulste Messungen durchgeführt werden können und somit keine direkte Kopplung mit Flüssigkeitschromatographie möglich ist. ESI-Geräte dagegen ionisieren die in Lösung vorliegenden Analyten und lassen sich daher direkt mit Chromatographiegeräten koppeln.

Die Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse ist in der Regel mit einem hohen instrumentellen Aufwand verbunden und daher kostenintensiv. Für die Analyse und Identifizierung einzelner Analyten aus komplexen Proben ist eine Probenvorfractionierung meist unumgänglich.

1.2.2 Methoden zur Separation

Die extrem hohe Komplexität und der sehr große dynamische Bereich von biologischen Proben stellt die Proteomanalyse in vielen Fällen vor große Herausforderungen. Da viele Zielproteine z.B. Biomarker im mittleren bis niedrigen Konzentrationsbereich (\leq nM) einer komplexen Probe vorliegen, sind die selektive Anreicherung des Zielmoleküls und die Abreicherung von hochkonzentrierten Molekülen (\geq mM) für die Massenspektrometrie-basierte Analyse notwendig, um Unterdrückungs- und Maskierungseffekte zu vermeiden (Sparbier *et al.* 2009). Hierfür gibt es zwei Herangehensweisen. Beim *Top-down*-Ansatz werden intakte Proteine separiert, die anschließend enzymatisch verdaut und analysiert werden. In Falle des *Bottom-up*-Ansatzes wird die gesamte komplexe Probe enzymatisch verdaut und danach analysiert. In beiden Fällen müssen die Proben vor der massenspektrometrischen Analyse zur Reduktion der Komplexität fraktioniert werden. Die Fraktionierungsmethode muss in der Lage sein, die durch die Komplexität und den hohen dynamischen Bereich resultierenden Probleme bei der Analyse zu minimieren. Gleichzeitig dürfen quantitative Informationen nicht verloren gehen und die Probe sollte so vollständig wie möglich repräsentiert werden. Gegenwärtig sind zwei Ansätze zur Probenfraktionierung vorherrschend. Die Auftrennung nach elektrophoretischen oder chromatographischen Prinzipien.

1.2.2.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der elektrophoretischen Trennung hoch komplexer Proteingemische kommt in der Regel eine Kombination aus isoelektrischer Fokussierung (IEF) und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zum Einsatz. Die Auftrennung bei diesem *Top-down* Ansatz erfolgt in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach der Molekülmasse. Die Auflösung liegt bei einigen tausend Proteinen und wird häufig zur Proteinseparation eingesetzt. Sehr kleine, sehr große, stark saure oder basische Proteine sowie Membranproteine lassen sich mit dieser Methode nur sehr bedingt auftrennen (Rabilloud 2002). Nachteil dieser Methode ist der hohe Arbeitsaufwand und Schwierigkeiten bezüglich der Reproduzierbarkeit und der Automation, was sie für den Hochdurchsatz ungeeignet macht (Jiang *et al.* 2008).

1.2.2.2 Umkehrphasen-, Größenausschluss- und Ionenaustausch-Chromatographie

Bei chromatographischen Systemen erfolgt die Trennung je nach Wahl der stationären und flüssigen Phase aufgrund von Ladung, Größe und Hydrophobizität. Da die Trennung in einer Dimension meist nicht ausreichend ist, können zur Verbesserung der Trennleistung die unterschiedlichen Methoden kombiniert werden (Link *et al.* 1999; Wolters *et al.* 2001). Üblicherweise werden für die mehrdimensionale chromatographische Trennung komplexer Peptidgemische starke Ionenaustauscher und Umkehrphasen-Matrices kombiniert. Diese Art der Trennung ist gut automatisierbar und kann direkt *online* an ein Massenspektrometer gekoppelt werden. Theoretisch ist in diesem *Bottom-up* Ansatz so die Analyse aller in einer Probe enthaltenen Proteine möglich. Die Auftrennung hochkomplexer Peptidgemische kann je nach gewählter Methode und gewünschter Trennleistung zu sehr vielen Fraktionen und damit zu sehr langen Analysezeiten führen. Um diesen Nachteil zu kompensieren werden beim sogenannten *selected reaction monitoring* (SRM) oder *multiple reaction monitoring* (MRM) die Trennparameter auf eine bzw. mehrere definierte Analyten abgestimmt.

1.2.2.3 Abreicherung hochkonzentrierter Proteine

Eine Möglichkeit die Sensitivität der Detektion von gering konzentrierten Proteinen oder Peptiden in einer komplexen Probe zu erhöhen ist die Abreicherung von Proteinen mit hoher Konzentration. Hierzu gibt es unterschiedliche affinitätsbasierte Verfahren, die in der Lage sind hochkonzentrierte Proteine wie zum Beispiel Albumin, Immunglobuline und andere prominente Proteine aus Plasmaproben oder Kulturüberständen zu entfernen. Eine Abreicherung der sechs höchstkonzentrierten Proteine einer Plasmaprobe kann zu einer Reduktion des Gesamtproteingehaltes um 85% führen. Zu berücksichtigen ist, dass Zielanalyten unspezifisch an die eingesetzte Matrix binden können und somit aus der Probe entfernt werden (Echan *et al.* 2005). Einige der hochkonzentrierten Proteine fungieren als Trägerproteine. Mit ihrer Entfernung aus der Probe werden auch daran gebunden Analyten entfernt. Die Analyse der aus einer Serumprobe abgereicherten *High-abundance*-Proteine zeigte, dass zusätzlich 210 assoziierte Proteine identifiziert werden konnten, von den 73% in der Analyse der abgereicherten Serumprobe nicht wieder gefunden werden konnten (Zhou *et al.* 2004).

1.2.2.4 Isolierung von glykosylierten Analyten

Die Aufreinigung von glykosylierten Analyten kann über die Affinität zu Lektinen realisiert werden. Hierfür können einzelne Lektine für die spezifische Anreicherung oder verschiedene Kombinationen an Lektinen (Yang *et al.* 2004) zur Anreicherung größerer Subpopulationen eingesetzt werden. Die Änderung im Glykosilierungsmuster spielt bei einigen pathologischen Veränderungen eine wichtige Rolle (Kobata 2005). Dieses Subproteom ist daher von großem Interesse. Da aber viele der hochkonzentrierten Proteine ebenfalls glykosyliert sind wird der dynamische Bereich der meisten Proben durch diese Fraktionierung nicht signifikant reduziert, was die Analyse von niedrigkonzentrierten Analyten erschwert.

1.2.2.5 Präfraktionierung von Phosphopeptiden

Die Phosphorylierung von Proteinen stellt wahrscheinlich den wichtigsten Regulationsmechanismus biologischer Prozesse dar. Zur Anreicherung eines Phosphosubproteoms kann die Eigenschaft der Affinität von Phosphatgruppen an Metallionen genutzt werden. Hierfür können Metalloxidpartikel oder metallionenhaltige Chromatographiesäulen verwendet werden. Gute Resultate zeigen Matrices aus Titandioxid, Zirkondioxid, Galliumoxid und Eisenoxid (Machida *et al.* 2007 und Feng *et al.* 2007). Da Phosphopeptide in der Gegenwart von nicht phosphorylierten Peptiden nur sehr schwer massenspektrometrisch zu analysieren sind, sind sehr reine Fraktionen notwendig.

1.2.2.6 Anreicherung von Peptiden über seltene Aminosäuren

Wird das aus einer komplexen Probe resultierende Peptidgemisch auf die Fragmente reduziert die eine der selten vorkommenden Aminosäuren Cystein, Methionin, Tryptophan oder Histidin enthalten, verringert sich die Komplexität des Gemisches um ein bis zwei Größenordnungen. Bei einem theoretischen Verdau der in Datenbanken verzeichneten humanen Proteine besitzen weniger als 31% der Peptidfragmente die oben genannten Aminosäuren und repräsentieren dabei mehr als 91% aller humanen Proteine (Zhang *et al.* 2004). Die am häufigsten angewendete Methode ist die Anreicherung über cysteinhaltige Peptide. Sie werden über die Thiolgruppe durch Bindung an cysteinreaktive Gruppen angereichert. Mit diesen Methoden kann die Komplexität eines Peptidgemisches effektiv reduziert werden. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Verteilung von seltenen Aminosäuren über verschiedene Proteine nicht gleichmäßig ist. Im Falle der

Anreicherung von cysteinhaltigen Peptiden aus Serum stammen ca. 95% dieser Peptide von den zwei hochkonzentrierten Proteinen Albumin und Transferrin (Pernemalm *et al.* 2009).

1.2.2.7 Immunaффinitätsbasierte-Präfraktionierung

Für die Anreicherung spezifischer Proteine oder Peptide aus hochkomplexen Proben können auf festen Phasen wie Mikrosphären oder Chromatographiesäulen immobilisierte Antikörper eingesetzt werden. Mit dieser Methode ist es möglich, niedrig konzentrierte Zielmoleküle aus komplexen Proben hoch spezifisch anzureichern und zu analysieren (Nicol *et al.* 2008). Die SISCAPA-Plattform (Anderson *et al.* 2004) ermöglicht die Quantifizierung und Identifizierung spezifischer Peptide in einer Probe durch Zugabe von isotopenmarkierten internen Standards und anschließender Affinitätsanreicherung und massenspektrometrischer Analyse. Die Methode ist hoch selektiv und sensitiv. Die Auflösung ist jedoch auf die Anzahl der verfügbaren Antikörper begrenzt. Für jeden zu analysierenden Analyten wird ein spezifisches Bindemolekül benötigt, was diese Methode sehr kostenintensiv macht. Zudem ist sie sehr fokussiert und kann daher nicht ohne weiteres für die Entdeckung neuer Biomarker eingesetzt werden. Diese Limitierung lässt sich umgehen, wenn Antikörper eingesetzt werden, die in der Lage sind Subproteome zu binden. Dies kann durch Antikörper erreicht werden, welche gruppenspezifische Motive wie z.B. phosphotyrosinhaltige Peptide erkennen. Somit lässt sich mit einem solchen Antikörper eine ganze Population an Proteinkinasen analysieren (Rush *et al.* 2005). Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von Antikörpern welche MHC-Moleküle binden. MHC-Komplexe repräsentieren auf der Zelloberfläche Peptide aus dem proteasomalen Degradationsprozess des Zellproteoms. Sie stellen somit ein in der Komplexität reduziertes Subproteom der Zelle dar. Mit diesem Ansatz konnten bereits erfolgreich tumorassoziierte und tumorspezifische Peptide identifiziert werden, welche für eine Immuntherapie nutzbar gemacht werden können (Stevanovic 2002).

Für die MS-basierte Proteomanalyse ist eine Probenfraktionierung, welche die Selektivität und somit die Sensitivität mit einer höheren Auflösung durch die Anreicherung eines Subproteoms anstelle eines einzelnen Analyten verbindet von großem Vorteil. Dies ist bis jetzt jedoch nicht gezielt für zuvor definierte Analyten möglich.

Tabelle 1.1 Chromatographische Methoden zur Präfraktionierung von komplexen biologischen Proben (modifiziert nach Callesen *et al.* 2009)

Chromatographisches Prinzip	Interaktion	Stationäre Phase	Elution
Umkehrphase	Hydrophobizität	Lineare Kohlenstoffketten	Organische Lösungsmittel
Ionenaustausch	Elektrostatische Kräfte	Geladene Gruppen	Änderung pH- Wert oder der Ionenkonzentration
Affinität	Glykane	Lektine	Änderung Ionenkonzentration oder kompetitive Binder
Affinität	Phosphatgruppen	Metallchelate	Kompetitive Binder
Affinität	Albumin	Farbstoff Cibacron Blau	-
Affinität	IgGs	Protein A und/oder Protein G	-
Affinität	spezifische Analyten	Antikörper	Chaotrope Salze, Änderung pH-Wert
Kovalente Bindung	Cysteinhaltige Peptide	Thiopropyl Sepharose	Reduktionsmittel

1.2.3 Ein neuartiger Ansatz: Immunaaffinität mit kurzen terminalen Peptidepitopen

In der Proteomforschung haben sich Massenspektrometrie-basierte Strategien zur Schlüsseltechnologie für die Identifizierung von Proteinen entwickelt. Trotz großer Fortschritte in den letzten Jahren stellt die effiziente Präfraktionierung komplexer Proben vor der Analyse eine große Herausforderung dar. Mit Immunaaffinitätsbasierten Methoden, wie zum Beispiel ELISA oder Protein-Mikroarrays können niedrig konzentrierte Analyten durch den Einsatz von hoch selektiven Bindemolekülen aus einer komplexen Probe angereichert und analysiert werden. Um Sensitivität und Spezifität zu gewährleisten, müssen für jeden Analyten ein bis zwei hoch selektive Bindemoleküle zur Verfügung stehen. Durch Kombination einer Immunaaffinitätsbasierten Fraktionierungsmethode mit einem Massenspektrometrie-basierten Ausleseverfahren können definierte Zielmoleküle selektiv und sensitiv analysiert und quantifiziert werden (Anderson *et al.* 2003). Die Limitierungen der bestehenden Immunaaffinitätsbasierten Probenpräfraktionierung bestehen in der geringen Verfügbarkeit geeigneter Bindemoleküle und der hieraus resultierenden niedrigen Auflösung dieser Methode (Wingren *et al.* 2009). Um diese Limitierungen zu umgehen wurde ein Konzept, basierend auf einer neuen speziellen Art von peptidspezifischen Antikörpern, entwickelt. Diese Antikörper erkennen kurze, aus vier Aminosäuren bestehende Epitope, die sich am N- oder C-Terminus eines

Proteinfragments befinden. Diese Antikörper binden nicht nur einen spezifischen Analyten. Sie sind in der Lage Gruppen von Peptiden mit demselben kurzen terminalen Motiv zu binden. Je nach Wahl des Epitops können die Subproteome aus wenigen Dutzend bis einigen Hundert Analyten mit demselben Terminus bestehen. Im Gegensatz zum Ein-Analyt-Ein-Antikörper Ansatz bleibt hier die Möglichkeit zur Biomarkerentdeckung bestehen. Die Epitope können so gewählt werden, dass Sequenzen aus hochkonzentrierten Proteinen unberücksichtigt bleiben und mehrheitlich Peptidsequenzen aus mittleren bis niedrigen Konzentrationsbereichen bevorzugt werden. Je nach Wahl der Sequenz lässt sich die Größe des gewünschten Subproteoms steuern. Mit dem klassischen Ansatz, der auf der Grundlage protein- bzw. peptidspezifischer Antikörper beruht sind für die Analyse des humanen Genoms über 20.000 Bindemoleküle notwendig. Mit dem hier beschriebenen neuartigen Ansatz können theoretisch mit wenigen tausend Antikörpern über 90% des in Datenbanken verzeichneten humanen Proteoms abgedeckt werden. Die benötigte Anzahl an Bindemolekülen kann somit um das Zehnfache reduziert werden (Poetz *et al.* 2009).

Für die Analyse des Wnt-Signalweges, welcher aus 139 Proteinen besteht, werden z.B. nach bioinformatischen Berechnungen auf Grundlage der KEGG-Signalweg-Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway Database; <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> / Stand 12.2006) 44 dieser Antikörper benötigt, um den gesamten Signalweg analysieren zu können. Diese Antikörper können ebenfalls für die Analyse weiterer Analyten eingesetzt werden, welche nicht mit diesem Signalweg assoziiert sind, aber denselben Terminus tragen. Ein weiterer Vorteil der kurzen terminalen Erkennungssequenzen ist der speziesunabhängige Einsatz der Bindemoleküle. Spezifität wird durch die massenspektrometrische Analyse gewährleistet, die im übertragenen Sinn den zweiten Antikörper eines *Sandwichassays* darstellt.

Mit den hier beschriebenen neuartigen Bindemolekülen könnten Gruppen von Peptiden, die das selbe Epitop bestehend aus einer kurzen terminalen Sequenz von vier Aminosäuren tragen, aus verdauten komplexen Proben, unabhängig der Ursprungsspezies des Proteoms, selektiv angereichert und massenspektrometrisch analysiert und quantifiziert werden. Limitierungen bezüglich der Verfügbarkeit geeigneter Bindemoleküle und der geringen Auflösung bisheriger Immunaффinitäts-basierender Fraktionierungsmethoden könnten durch die Generierung einiger Hundert bis weniger Tausend dieser speziellen Antikörper aufgehoben werden.

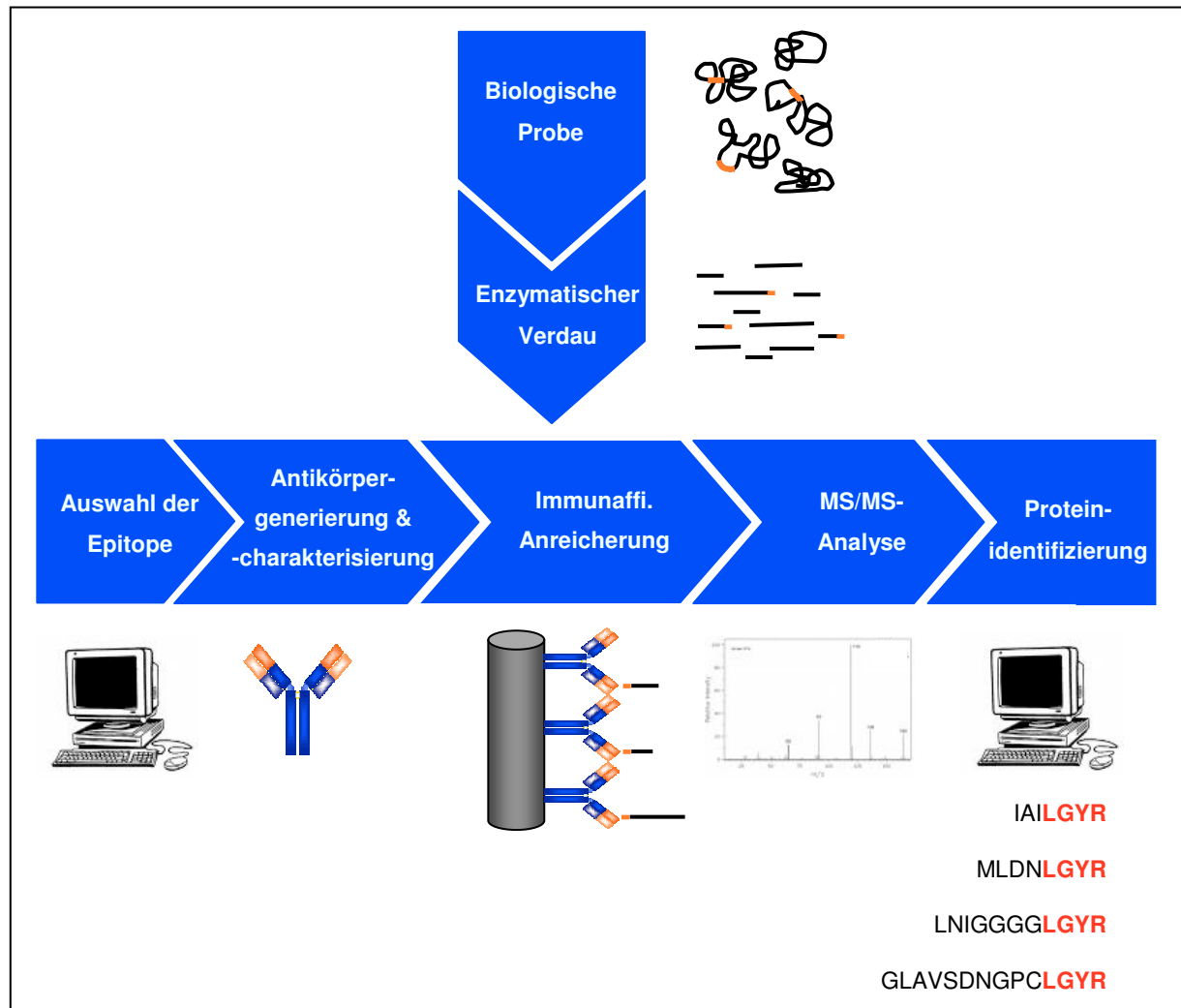


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung Immunaffinitäts-MS mit neuartigen Antikörpern

Aus dem *in silico* Verdau des Zielproteins werden Fragmente gewählt gegen deren Terminus Antikörper generiert werden sollen. Es werden vier Aminosäuren des jeweiligen Terminus für die Generierung von subproteomspezifischen Antikörpern eingesetzt. Nach der Charakterisierung der Antikörper werden diese auf einer festen Phase immobilisiert und zur Adsorptionsextraktion komplexer Proben eingesetzt. Das angereicherte Subproteom wird anschließend massenspektrometrisch analysiert.

1.2.3.1 Der Wnt-Signalweg - β -Catenin als Modellprotein

Zur Durchführung der Dissertation wurde β -Catenin als Modellprotein ausgewählt. Hierbei handelt es sich um ein zentrales Protein aus dem Wnt-Signalweg. Dieser Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Embryogenese, der Organentwicklung und bei der Entstehung von Krebs. Er hat auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Zell-Zellinteraktion, Zellmobilität, Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose Einfluss (Willert *et al.*

2006). Benannt ist der Signalweg nach einer Familie von Wachstumsfaktoren, den Wnts (*Wingless* & *Int-1*), die zu seiner Aktivierung führen.

In einer unstimulierten Zelle ist β -Catenin hauptsächlich an der Zelladhäsion beteiligt, wo es im Komplex mit α -Catenin das Transmembranprotein E-Cadherin mit dem Zytoskelett verbindet. Um die Gesamtmenge an ständig neu synthetisiertem zytoplasmatischem β -Catenin niedrig zu halten wird es kontinuierlich einem Abbaukomplex bestehend aus Axin, adenomatösem Polyposis Coli Protein (APC), Proteinphosphatase 2A (PP2A), Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) und Caseinkinase 1 γ (CK1 γ) zugeführt. Die Bindung an diesen Komplex führt zur sequenziellen Phosphorylierung des β -Catenins. Dies führt zur Markierung durch eine Ubiquitinligase und somit zum proteasomalen Abbau von zytosolischem β -Catenin (Price 2006). Durch die Bindung von Wnt-Liganden an den Rezeptorkomplex wird der Signalweg aktiviert. Dies führt zu einer Zerstörung des Abbaukomplexes, wodurch sich β -Catenin im Zytosol stabilisieren kann. Im Zytosol befindliches β -Catenin kann durch die Bindung an Kerntransfer-Proteine in den Zellkern translozieren (Townesley *et al.* 2004), wo es durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (*T cell-specific transcription factor / lymphoid enhancer-binding factor 1*) die Transkription vieler Zielgene reguliert. Eine Hyperaktivierung des Wnt-Signalwegs z.B. durch Mutationen im β -Catenin sowie die Zerstörung des Abbaukomplexes durch Mutationen in den am Abbaukomplex beteiligten Proteinen können zu einer nukleären Akkumulation von β -Catenin führen, wodurch die Zellproliferation positiv beeinflusst und unkontrolliertes Zellwachstum gefördert wird. β -Catenin stellt somit ein klassisches Proto-Onkogen mit hoher onkologischer Relevanz dar.

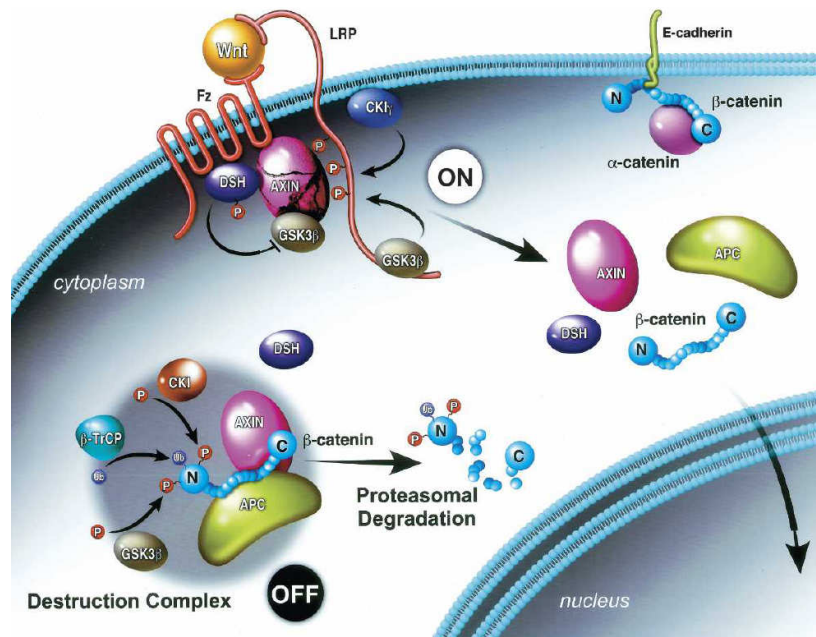


Abbildung 1.3 Vereinfachte Darstellung des Wnt-Signalweges

In Abwesenheit des Rezeptorliganden Wnt führt die Bindung von β -Catenin an den Degradationskomplex zur Phosphorylierung, Ubiquitylierung und proteasomalem Abbau. Nach Bindung von Wnt an den Rezeptorkomplex wird die Ausbildung des Degradationskomplexes gehemmt. β -Catenin akkumuliert, transloziert in den Kern und reguliert dort die Expression der Zielgene durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie. In seiner zweiten Funktion wirkt β -Catenin als Bindeglied mit an der Vermittlung von Zell-Zellkontakten und der Interaktion mit Aktin als Teil des Zytoskeletts (Abbildung aus Willert *et al.* 2006)).

1.3 Aufgabenstellung

Peptidspezifische Antikörper werden in der Regel gegen lineare Epitope bestehend aus einer Sequenz von 8 bis 14 Aminosäuren generiert. Die Zielanalyten können hierzu enzymatisch *in silico* verdaut werden. Aus den erhaltenen Proteinfragmenten können bestimmte Sequenzen ausgewählt werden, die hoch spezifisch für den jeweiligen Analyten sind, eine hohe Antigenizität besitzen, und eine geringe Wahrscheinlichkeit für chemische und posttranslationale Modifikationen aufweisen (Anderson *et al.* 2004). Peptidspezifische Antikörper sind jedoch nur in geringem Umfang kommerziell erhältlich. Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die gezielte Generierung von Antikörpern gegen kurze terminale Erkennungssequenzen bestehend aus vier Aminosäuren möglich

ist. Erwartungsgemäß müsste mit abnehmender Anzahl der am Epitop beteiligten Aminosäuren die Bindung an mehrere Peptide oder Protein zunehmen. Diese gewollte Spezifität für mehrere Moleküle ermöglicht es mit diesen Antikörpern Subproteome von mehreren Dutzend bis wenigen Hundert Analyten mit demselben kurzen terminalen Epitop zu binden. Ziel ist es, diese Antikörper für die Immunaффinitätsbasierte Anreicherungen von Peptiden aus tryptischen Verdaus einzusetzen um gezielt bestimmte Subproteome analysieren zu können.

Anhand des gewählten Modellproteins sind Sequenzen auszuwählen, gegen die polyklonale terminusspezifische Antikörper im Kaninchen generiert werden. Die erzeugten Antiseren sind mit Hilfe von Peptid-Mikroarrays auf Spezifität und Selektivität zu untersuchen. Die Epitope positiv getesteter Antikörper sollen unter Verwendung von Peptidpositionsbibliotheken genau charakterisiert werden. Für die ausgewählten Seren wird eine affinitätsbasierte chromatographische Aufreinigungsmethode etabliert. Die aufgereinigten terminusspezifischen Antikörper sollen zur Herstellung einer Immunaффinitätsmatrix verwendet werden. Die Funktionalität dieser Immunaффinitätsmatrix wird anhand synthetischer Peptide getestet. Die Auslesung erfolgt mit massenspektrometrischen Methoden. Hierfür soll eine geeignete Probenpräparationsmethode etabliert werden. Zur Validierung der Methode mit biologischen Proben werden β -Catenin-überexprimierende *E. coli*-Zellen sowie die Maus - Zelllinie HepF1 eingesetzt. Es sind geeignete Lyse- und Verdauprotokolle zu etablieren. Mit Hilfe von behandelten und unbehandelten HEK 293 Zellen soll ermittelt werden, ob diese Methode in der Lage ist unterschiedliche Zustände in komplexen biologischen Proben darzustellen. Der speziesübergreifende Einsatz soll durch den Einsatz humaner und Maus-Proben demonstriert werden. Neben den Fragmenten des Modellproteins β -Catenin soll vor allem die Anreicherung der entsprechenden Subproteome gezeigt werden.

2 Experimenteller Teil

2.1 Material, Geräte und Software

Material

Chromatographiesäulen	HiTrap Desalting 5 mL, HiTrap NHS-aktiviert HP 1 mL, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Einmalküvetten	UVette, Eppendorf, Hamburg
Filtereinheit	Ultrafree-MC (Durapore, 0,65 µm), Millipore, Billerica, MA, USA
Filterpapier	Gel-Blotting-Papier, Whatman, Maidstone, Kent, UK
HPLC-Säulen	PEEK HPLC-Säulengehäuse (10 mm x 4 mm), PEEK Anschlussstücke, PEEK Fritten (2 µm), PTFE Dichtungsringe, Alltech Grom GmbH, Rottenburg
Mikrosphären	Carboxylierte Mikrosphären, Luminex, Austin, TX, USA POROS Protein G Mikrosphären, Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Mikrotiter-Filterplatte	1,2 µm Durapore PVDF, Millipore, Billerica, MA, USA
Mikrotiterplatten	Microplatte, 96 Well, F-Boden, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nitrocellulosemembran	Protran (0,2 µm), Whatman, Maidstone, Kent, UK
PAC-Propbenplatten	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Plastikwaren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Eppendorf, Hamburg,
Polyacrylamid-Gele	NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele, 1 mm Dicke, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Probenplatten	Pre Spotted Anchorchip, Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Spritzenfilter	Rotilabo, steril (0,22 µm PES), Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Zellschaber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

Geräte

Chromatographiesysteme	ÄKTExpress und ÄKTA FPLC mit der Steuerungssoftware Unicorn 5.1, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden HPLC Gynkotek 480 UVD340U mit der Steuerungssoftware ..., Dionex, Sunnyvale, CA, USA Easy-nLC mit der Steuerungssoftware Easy-nLC HPLC-24#2921, Proxeon, Odense, Dänemark
Gel- und Blotdokumentation	Kodak Image Station 440 CF, Kodak Eastman, Rochester, NY, USA
Gelelektrophorese System	XCell Sure Lock Mini Cell, Power Ease 500, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Inkubatoren	C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA WTB CO ₂ -Inkubator, Binder GmbH, Tuttlingen
Massenspektrometer	MALDI-TOF/TOF ultraflex III mit der Software Flexcontrol 3.0, Flexanalysis 3.0, BioTools 3.1, Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Mikrosphären-Auslesegerät	Luminex L100 mit Steuerungssoftware IS 2.2, Luminex, Austin, TX, USA
Orbitalschüttler	KL-2, Edmund Bühler GmbH, Hechingen
pH-Meter	pH Meter 766, Knick, Berlin
Photometer	BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettoren	Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäßeschüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	Arium 61316 / 611VF, Sartorius, Göttingen
Schüttler	Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Spektrometer	Fluostar OPTIMA mit Steuerungssoftware Fluostar OPTIMA V1.32 R2, BMG Labtech GmbH, Offenburg
Spritzenpumpe	Model 22, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Taumelroller	RM5, Assistent, Sondheim
Tischzentrifugen	5415D und 5810R, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	RK 31, Bandelin, Berlin
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD 60, Bandeline electronic, Berlin
Vakuum-Absaugstation	Millipore, Billerica, MA, USA
Vakuumpumpe	Laboprot, KnF Neuberger, Freiburg
Waagen	Explorer E12140, OHAUS, Pine Brook, NJ, USA; MC1 Research RC210, Sartorius AG, Göttingen
Western Blot Systeme	XCell II Blot Module, Power Ease 500, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Datenbanken und Suchmaschinen

Datenbanken	SwissProt, Swiss Institute of Bioinformatics, Basel, Schweiz; www.expasy.ch/sprot/
	MSDB, Proteomics Department, Hammersmith Campus of Imperial College London, London, UK; www3.imperial.ac.uk/
Datenbanksuchmaschine	MASCOT Version 2.2, Matrix Science Ltd., London, UK; www.matrixscience.com/

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Antigengenerierung

DMSO	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
KLH	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
PBS (-)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
sulfo-MBS	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
TXP-Peptide	NMI Peptides, NMI Technologietransfer GmbH, Reutlingen
TCEP	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA

Mikrosphären-basierte Mikroarrays

Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt
BSA (Albumin Fraktion V, Protease-frei)	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
EDC	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Esel anti-Kaninchen-Phycoerythrin	Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, Suffolk, UK
Maus anti-c-myc	Klon 9E10, Institut für molekulare Immunologie, Helmholtzzentrum, München
MES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Streptavidin-Phycoerythrin	Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, Suffolk, UK

sulfo-NHS	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
sulfo-SMPB	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Tween20	Merck KGaA, Darmstadt
Ziege anti-Maus-Phycoerythrin	Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, Suffolk, UK
Aktivierungspuffer	100 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 6,2
Kopplungspuffer	50 mM MES, pH 5,0
Lagerlösung	10 mg/mL BSA in PBS
Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween20 in PBS

Antikörperaufreinigung

Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Citrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe
Maleimid-aktiviertes BSA (SMCC)	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Aktivierungspuffer	1 mM Salzsäure
Bindungspuffer	PBS (-)
Deaktivierungspuffer I	0,5 M Ethanolamin, 0,5 M Natriumchlorid, pH 8,3
Deaktivierungspuffer II	0,1 M Acetat, 0,5 M Natriumchlorid, pH 8,3
Elutionspuffer I	0,1 M Citrat, pH 2,5

Immunaффinitäts-Chromatographie

Dimethylpimelimidate dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Abstopplösung	150 mM Ethanolamin, pH 9,0
Elutionspuffer II	Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure
Quervernetzerlösung	30 mM Dimethylpimelimidate dihydrochlorid, 200 mM Triethanolamin, pH 8,5

Zellkultur

Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM-Medium (4,5 g/L Glucose)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fötales bovines Serum (Gold)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Lagerlösung	10% DMSO in Zellkulturmedium
LB-Medium	0,8% NaCl (w/v), 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Trypton, 100 μ g/mL Ampicillin
Zellkulturmedium	2 mM L-Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 10% Fötales bovines Serum in DMEM-Medium

Zellyse und Verdau

Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
DTT	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
Harnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IAA	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
PMFS	Roche Diagnostics, Mannheim
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin Gold	Promega, Madison, WI, USA
Lysepuffer	100 mM Tris, 6 M Harnstoff, pH 8,5
Verdünnungspuffer	0,1 M Tris, 1 mM Calciumchlorid, pH 8,5

Proteinbestimmung

BCA-Reagenz Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA

Gelelektrophorese und Western Blot

Antioxidanzmittel NuPage Antioxidant, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

ECL Entwicklungsreagenz SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA

Esel anti-Kaninchen-HRP Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, Suffolk, UK

Ethanol Merck KGaA, Darmstadt

Kaninchen anti- β -Catenin AB19022, Millipore, Billerica, MA, USA

Laufpuffer NuPage SDS MES Runningbuffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Probenpuffer NuPage LDS Samplebuffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Protein-Größenstandard SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Reduktionsmittel NuPage Sample Reducing Agent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Transferpuffer NuPage Transferbuffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Blockierlösung 3% (v/v) BSA in TBST

Coomassie-Lösung 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blau, 50% Methanol, 10% Essigsäure

Entfärberlösung I 50% Ethanol, 10% Essigsäure

Entfärberlösung II 10% Ethanol, 5% Essigsäure

Inkubationslösung 1% (v/v) BSA in TBST

TBST 10 mM Tris, 150 mM Natriumchlorid, 0,1% (v/v) Tween20 in H₂O_{dd}

2.3 Generierung polyklonaler Antikörper

2.3.1 Auswahl von Peptiden zur Immunisierung

Die Auswahl der zur Immunisierung verwendeten Peptide erfolgt anhand der bekannten Sequenz des Zielproteins β -Catenin (CTNB1_HUMAN / 30.05.2006 Version 70 / <http://www.uniprot.org/uniprot/P35222>). Für die Selektion der Peptide wird mit Hilfe eines EDV-Programms (<http://expasy.org/tools/peptidecutter/>) die Zielsequenz *in silico* mit der Endopeptidase Trypsin verdaut. Aus den 67 entstehenden tryptischen Peptidfragmenten (TF) werden vier Fragmente (TF1-TF4) ausgewählt. Die Auswahl erfolgte aufgrund folgender Kriterien:

- Fragmentgröße (definiert durch die geplante Analysemethode)
- Phosphorylierungsstellen / Mutationen
- Speziespezifische Unterschiede

Die gewählte Analysemethode zur Identifizierung der angereicherten Fragmente mittels MALDI-MS beschränkt die Fragmentgröße erfahrungsgemäß auf ca. 1000 bis 5000 Da. Kleinere Peptide sind aufgrund von Matrixeffekten bei der MS/MS-Analyse schwer zu identifizieren. Sind die Peptide jedoch größer als 5000 Da ist eine Detektion im Fragmentgemisch aufgrund von Unterdrückungseffekten meist nicht möglich. Hinzu kommt bei größeren Peptiden eine Verringerung der Auflösung und eine reduzierte Empfindlichkeit der Detektion. Die beiden Proteinfragmente bcat_TF2 und bcat_TF3 (im Folgenden nach ihrer C-terminalen Peptidsequenz AMTR- und QMLK-Fragmente genannt) wurden zur Überprüfung der oberen und unteren Massengrenze der Methode ausgewählt. Das Fragment bcat_TF1 (im Folgenden LSGK-Fragment genannt) wurde aufgrund der dort vorhandenen Phosphorylierungsstellen und der bekannten Mutationsstellen gewählt. Diese drei Fragmente stammen aus dem N-terminalen Bereich des β -Catenins. Das Fragment bcat_TF4 stammt aus dem C-terminalen Bereich des Proteins und wurde gewählt, weil es bei dem hohen Konservierungsgrad des Modellproteins einen Aminosäureaustausch zwischen der humanen und der Maus-Sequenz enthält.

Zur Generierung spezifischer Antikörper für die vier terminalen Aminosäuren werden diese in Form von synthetischen Peptiden zur Immunisierung verwendet. Die ersten drei

Aminosäuren sind spezifisch für den jeweiligen Terminus des gewählten Peptides, die vierte Aminosäure wird durch die Spaltstelle der Endopeptidase definiert. Die kurzen Peptidsequenzen wurden am N-Terminus mit einem Cystein für die Ankopplung an ein Trägerprotein sowie mit drei Abstandshalter-Molekülen zur Verbesserung der Löslichkeit und der Zugänglichkeit für die Antikörper-Peptid-Interaktion versehen.

2.3.2 Kopplung von Peptiden an Trägerproteine

Da es sich bei den zur Immunisierung ausgewählten Peptiden um sehr kleine Moleküle mit einfacher Struktur handelt, welche nur geringe Antigenizität besitzen, werden sie für die Immunisierung an ein hochmolekulares Trägerprotein gekoppelt. Dies erfolgt durch die Immunisierung an ein hochmolekulares Trägerprotein gekoppelt. Dies erfolgt durch das heterobifunktionale Kopplungsreagenz sulfo-MBS, welches über einen Aktivester kovalent an die Aminogruppe des Trägerproteins gekoppelt wird. Die am Kopplungsreagenz befindliche Maleimidgruppe reagiert dann mit der Thiolgruppe des am N-Terminus der Peptidsequenzen befindlichen Cysteins. Durch diese Art der Kopplung wird eine definierte räumliche Anordnung der Sequenz auf dem Trägerprotein erreicht.

Als Trägerprotein wird das Protein *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) eingesetzt. Das Trägerprotein wird in sterilem H_2O_{dd} mit einer Konzentration von 10 mg/mL gelöst. Frisch in DMSO präpariertes sulfo-MBS mit einer Konzentration von 40 mg/mL wird in einem Verhältnis von 1:10 mit dem gelösten KLH gemischt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumelroller inkubiert. Nicht gebundenes Kopplungsreagenz wird mittels Größenausschlusschromatographie unter Verwendung eines ÄKTA FPLC Chromatographiesystems und einer HiTrap Entsalzungssäule vom präaktivierten Trägerprotein abgetrennt.

Die zur Immunisierung ausgewählten Peptide werden in PBS mit einer Konzentration von 4 mg/mL gelöst. Um sicher zu stellen, dass die Thiolgruppen der Cysteine nicht oxidiert sind, werden die Peptide vor der Kopplung mit einem Äquivalent Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) reduziert. Die Peptide werden 1:1 (w/w) mit dem präaktivierten KLH gemischt und 3 Stunden bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. Zur Lagerung bei +4 °C wird 0,01% Natriumazid zugegeben.

Die Immunisierung der Kaninchen mit den hergestellten Konjugaten erfolgt bei der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin, Deutschland) nach einem Standardprotokoll. Es werden je drei Tiere mit demselben Antigen immunisiert. Den Tieren wird zuvor Präimmunserum entnommen. Um die Immunreaktion der Tiere auf das applizierte Antigen zu überprüfen, wird den Tieren nach dem 32. und dem 61. Immunisierungstag eine Probe

entnommen und mit einem Mikrosphären-basierten Peptid-Mikroarray getestet. Nach dem 81. Immunisierungstag werden die Tiere getötet und das Serum gewonnen, welches mit 0,05% Natriumazid versetzt wird. Das Serum wird nach Erhalt aliquotiert und bei -20 °C bis zur Aufreinigung gelagert.

2.4 Mikrosphären-basierte Peptid-Mikroarrays

Zur Herstellung von Peptid-Arrays werden farbcodierte Polystyrol-Mikrosphären mit carboxylierter Oberfläche als feste Phase verwendet. Die Analyse erfolgt mittels Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Luminex L100 Systems. Zur Auswertung der Reporterfluoreszenzen wird der Median aus mindestens 100 Ereignissen einer Mikrosphärenpopulation gebildet und als Median der Fluoreszenzintensitäten (MFI) ausgegeben.

2.4.1 Charakterisierung von polyklonalen Antiseren

Zur Charakterisierung der Antikörper wird ein auf Mikrosphären basierendes Mikroarrayformat verwendet. Vor der Kopplung der Peptidsequenzen auf die Mikrosphären werden diese zur Kapazitätsvergrößerung mit BSA belegt, an welches dann unter Verwendung eines heterobifunktionalen Kopplungsreagenzes die Peptide gekoppelt werden. Die mit Peptid belegten Mikrosphären werden mit Antiserum inkubiert. Gebundene Antikörper werden durch einen fluoreszenzmarkierten speziesspezifischen Sekundärantikörper detektiert. Um zu verhindern, dass Antikörper, die gegen das zur Immunisierung verwendete Kopplungsreagenz gerichtet sind, detektiert werden, wird ein alternatives heterobifunktionales Kopplungsreagenz eingesetzt.

2.4.1.1 Kopplung von Peptiden auf Mikrosphären

Um die Bindekapazität der Mikrosphären zu vergrößern, werden diese mit bovinem Serumalbumin (BSA) belegt. Die Mikrosphärenlagerlösung wird vor der Entnahme der gewünschten Menge an Mikrosphären 2 Minuten mit 10000 g zentrifugiert, anschließend kurz sonifiziert und für 10 Sekunden geschüttelt. Von jeder Mikrosphärenart werden 375 µL ($4,7 \times 10^6$ Mikrosphären) in eine Filtereinheit überführt, kurz zentrifugiert und zweimal mit je 500 µL Aktivierungspuffer gewaschen. In jede Filtereinheit wird 400 µL frisch präparierte Aktivierungslösung, bestehend aus 50 mg/mL sulfo-NHS und 50 mg/mL EDC gelöst in Aktivierungspuffer, gegeben. Die Aktivierung erfolgt bei Raumtemperatur im

Dunkeln auf einem Taumelroller. Nach 20 Minuten werden die Filtereinheiten kurz zentrifugiert und die Mikrosphären zweimal mit je 500 μL Kopplungspuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 500 μL in Kopplungspuffer präparierter BSA-Lösung (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Kopplung erfolgt im Dunkeln bei Raumtemperatur für mindestens 2 Stunden auf einem Taumelroller. Um den Überschuss an nicht gebundenem BSA zu entfernen, werden die Mikrosphären dreimal mit je 500 μL Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden die Mikrosphären in Waschpuffer resuspendiert.

Zur Bestimmung der Ausbeute an Mikrosphären wird eine Zählung mittels Luminex L100 durchgeführt. Die Mikrosphärenlösung wird hierzu 1 Minute bei 10000 g zentrifugiert, anschließend kurz sonifiziert und für 10 Sekunden geschüttelt. Der Mikrosphärenlösung werden 2 μL entnommen und in 1000 μL Waschpuffer resuspendiert. Es werden je 100 μL pro Mikrotiterplattenkavität eingesetzt. Die Zählung der Mikrosphären erfolgt in Duplikaten, wobei 50 μL Probenvolumen in einer Messzeit von 80 Sekunden gemessen werden. Die minimale Anzahl beträgt bei der Zählung 10000 Mikrosphären. Aus der gemessenen Anzahl kann die Mikrosphärenkonzentration der Ausgangslösung kalkuliert werden.

Für die Kopplung der Peptide werden von jeder Mikrosphärenart 2×10^6 mit BSA belegte Mikrosphären in eine Filtereinheit transferiert. Für die Aktivierung wird 5,3 mg sulfo-SMPB in 350 μL DMSO gelöst und in 6,7 mL PBS aufgenommen. Der Waschpuffer, in dem sich die Mikrosphären befinden, wird abzentrifugiert. Jedem Kopplungsansatz werden 150 μL frisch präparierte Aktivierungslösung zugesetzt. Die Inkubation erfolgt für 30 Minuten bei Raumtemperatur und konstantem Schütteln bei 750 rpm auf dem Reaktionsgefäßschüttler. Zur Entfernung von ungebundenem sulfo-SMPB werden die Mikrosphären zweimal mit PBS gewaschen. Die Peptide werden in 50% Acetonitril in PBS gelöst (1 mM). Je 50 μL Peptidlösung werden durch Zugabe von 100 μL in PBS gelöstem TCEP (300 μM) reduziert, um zu gewährleisten, dass die Cysteine an den N-Termini der Sequenzen nicht in oxidierte Form vorliegen. Nach 10 Minuten wird die reduzierte Peptidlösung zu den mit PBS gewaschenen Mikrosphären gegeben und 2 Stunden unter Schütteln im Reaktionsgefäßschüttler inkubiert. Die gekoppelten Mikrosphären werden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in Lagerlösung resuspendiert. Zur Lagerung bei +4 °C werden die Mikrosphärenlösungen in Reaktionsgefäße überführt und mit 0,05% Natriumazid versetzt.

2.4.1.2 Multiplexer Immunoassay zur Serumcharakterisierung

Für die multiplexe Serumcharakterisierung werden gleiche Mengen an peptidgekoppelten Mikrosphären in einer Mikrosphärenlösung vereinigt. In der Mikrosphärenlösung befinden sich mindestens 100 Mikrosphären jedes Typs pro Mikroliter Suspension. 10 µL der Mikrosphärenlösung werden in die Kavität einer Mikrotiter-Filterplatte transferiert, mit in PBS verdünntem Kaninchenserum (1:10.000 und 1:100.000) gemischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Reaktionsgefäßschüttler bei 650 rpm inkubiert. Zur Kontrolle wird 0,1 µg/mL anti-c-myc Antikörper aus Maus eingesetzt. Als Negativkontrolle wird PBS verwendet. Die Lösung in den Kavitäten wird durch Anlegen eines Unterdrucks auf einer Vakuum-Absaugstation abgesaugt. Anschließend werden die Kavitäten zweimal mit 100 µL Waschpuffer gewaschen. 25 µL Phycoerythrin-markierter anti-speziespezifischer Sekundärantikörper (2,5 µg/mL) werden hinzugegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Reaktionsgefäßschüttler bei 650 rpm inkubiert. Um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen wird jede Kavität abgesaugt und dreimal mit 100 µL Waschpuffer gewaschen. Die Mikrosphärenlösung wird in 100 µL Lagerlösung resuspendiert und die Filterplatte vorsichtig geschüttelt. Die Fluoreszenzsignale werden im Luminex L100 ausgelesen. Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) wird aus der Reporterfluoreszenz von mindestens 100 Ereignissen einer Mikrosphärenpopulation gebildet.

2.4.2 Funktionstest aufgereinigter Antikörper

Zur Überprüfung der Funktionalität der aufgereinigten Antikörper werden diese auf Mikrosphären gekoppelt und mit biotinyliertem Peptid inkubiert. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat.

2.4.2.1 Kopplung von gereinigten Antikörpern auf Mikrosphären

Die Mikrosphärenlagerlösung wird vor der Entnahme der gewünschten Menge an Mikrosphären 2 Minuten mit 10000 g zentrifugiert, anschließend kurz sonifiziert und für 10 Sekunden geschüttelt. Von jeder Mikrosphärenpopulation werden 300 µL ($3,75 \times 10^6$ Mikrosphären) in eine Filtereinheit überführt, kurz zentrifugiert und zweimal mit je 300 µL Aktivierungspuffer gewaschen. In jede Filtereinheit werden 150 µL frisch präparierte Aktivierungslösung, bestehend aus 50 mg/mL sulfo-NHS und 50 mg/mL EDC gelöst in Aktivierungspuffer, gegeben. Die Aktivierung erfolgt bei Raumtemperatur im Dunkeln auf

dem Taumelroller. Nach 20 Minuten werden die Mikrosphären abzentrifugiert und zweimal mit je 400 μL Kopplungspuffer gewaschen. Zu den gewaschen Mikrosphären werden 250 μL in Kopplungspuffer präparierte Antikörperlösung (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugegeben. Die Kopplung erfolgt im Dunkeln bei Raumtemperatur für mindestens 2,5 Stunden auf dem Taumelroller. Um den Überschuss an nicht gebundenem Antikörper zu entfernen werden die Mikrosphären erneut kurz zentrifugiert und dreimal mit je 400 μL Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss werden die Mikrosphären in 200 μL Waschpuffer resuspendiert. Zur Lagerung bei +4 - 8°C wird 0,05% Natriumazid zugegeben.

2.4.2.2 Funktionstest

Es werden 1 mM Stammlösungen von biotinylierten Peptiden in 50% Acetonitril in PBS hergestellt. Diese werden 1:1000 in PBS verdünnt. Für den Assay wird eine Mikrosphärenlösung mit einer Konzentration von 100 Mikrosphären jedes Mikrosphärentyps pro μL hergestellt. Pro Kavität werden 10 μL der Mikrosphärenlösung und 35 μL Peptidlösung bzw. 35 μL PBS gemischt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Thermomixer bei 650 rpm inkubiert. Um ungebundene Peptide zu entfernen, werden die Kavitäten mit einer Vakuum-Absaugstation abgesaugt und zweimal mit je 100 μL PBS gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Peptide werden 25 μL Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat-Lösung (2,5 mg/mL) in jede Kavität gegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Thermomixer bei 650 rpm inkubiert. Zur Entfernung des nichtgebundenen Konjugats wird erneut abgesaugt und zweimal mit 100 μL PBS gewaschen. Vor der Messung mit dem Luminex L100 System wird jede Kavität mit 100 μL Lagerpuffer gefüllt und die Filterplatte vorsichtig geschüttelt.

2.5 Aufreinigung von Antikörpern aus Serum

Für die Aufreinigung der generierten Antikörper wird eine Äffinitäts-basierte Chromatographiemethode eingesetzt. Hierfür werden die jeweiligen Antigene auf einer festen Phase immobilisiert. Durch Adsorption an diese Matrix werden die spezifischen Antikörper aus dem Serum extrahiert, eluiert und fraktioniert. Für die anschließende Verwendung werden die im Eluat befindlichen Antikörper durch Gelfiltration umgepuffert.

2.5.1 Herstellung der Affinitätsmatrix

Als Ausgangsmaterial dienen kommerziell erhältliche Säulen, welche mit N-Hydroxy-succinimid-aktivierter Sepharose gepackt sind. An dieses Matrixmaterial wird über die aminoreaktive Gruppe peptidbeladenes BSA gebunden.

Zur Kopplung von Peptid an das Trägerprotein wird mit Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) aktiviertes BSA verwendet. So wird verhindert, dass Antikörper die gegen das zur Immunisierung verwendete Trägerprotein bzw. Kopplungsreagenz gerichtet sind an die Affinitätsmatrix binden können. Das präaktivierte BSA wird in H₂O_{dd} gelöst (10 mg/mL). Um mögliche Antikörper gegen den verwendeten Abstandshalter im Eluat zu vermeiden werden zur Affinitätsaufreinigung Peptide eingesetzt, bei welchen die im Immunogen enthaltenen Abstandshalter durch eine Myc-Sequenz (EQKLISEEDL) bzw. eine HA-Sequenz (YPYDVPDYA) ersetzt wurden. Die Peptide werden in PBS gelöst (5 mg/mL). Die Myc- und HA-Peptide mit den gleichen Termini werden in äquivalentem Verhältnis gemischt. 400 µL der Peptidlösung werden mit 20 µL frisch präparierter TCEP-Lösung (30 mM) reduziert. Die reduzierte Peptidlösung wird mit 200 µL gelöstem präaktiviertem BSA gemischt und 2 Stunden bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln bei 300 rpm inkubiert. Nicht gebundenes Peptid wird durch Zentrifugation in einer Filtereinheit mit einer Größenausschlussgrenze von 50 kDa entfernt. Das BSA-Konjugat wird in 1 mL PBS resuspendiert.

Die Belegung der Säulen erfolgt mittels einer Spritzenpumpe (1 mL/min). Die N-Hydroxysuccinimid-aktivierten Sepharosesäulen werden nach der Spülung mit Aktivierungspuffer mit 1 mL BSA-Peptid-Konjugat befüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Deaktivierung der aktiven Gruppen durch abwechselnde Spülung mit Deaktivierungspuffer I und Deaktivierungspuffer II. Die

vier Deaktivierungszyklen werden mit einem Volumen von 6 mL und eine Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Im Anschluss wird jede Säule mit 30 mL PBS gespült und für die Lagerung mit PBS / 0,01% Natriumazid befüllt.

2.5.2 Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wird ein ÄKTExpress System (Software Unicorn 5.11) eingesetzt. Zur Aufreinigung werden ~ 10 mL Kaninchenserum aufgetaut und mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,22 µm) filtriert. Zur Affinitätschromatographie wird die jeweilige zum Antiserum gehörende Peptidsäule eingesetzt. Für die anschließende Gelfiltration werden mit quervernetztem Dextrangel gefüllte Säulen verwendet. Die Säulen werden vor dem Beginn der Aufreinigung mit Bindungspuffer gespült und equilibriert.

Das Serum wird mit einer Flussrate von 0,5 mL/min auf die Affinitätssäule aufgetragen. Nach erfolgtem Auftrag werden ungebundene Bestandteile durch Spülen mit Bindungspuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgt durch Applikation von 5 mL Elutionspuffer I (1 mL/min). Die eluierten Antikörper werden durch Gelfiltration (5 mL/min) in Bindungspuffer umpuffert. Um eine ausreichende Trennkapazität zu erreichen, werden drei Säulen mit einem Bettvolumen von jeweils 5 mL hintereinander geschaltet. Die gesammelte Fraktionsgröße beträgt 1 mL. Der Proteingehalt wird photometrisch bestimmt. Die Hauptfraktionen werden vereinigt. Zur Lagerung bei +4°C wird 0,05% Natriumazid zugegeben.

2.6 Affinitätsanreicherung tryptischer Fragmente

Zur Extraktion von tryptischen Fragmenten wird mit den generierten Antikörpern eine Immunaффinitätsmatrix hergestellt. Hierfür werden die gereinigten Antikörper auf mit Protein G überzogenes HPLC-Material gekoppelt, welches in Säulen überführt wird und so als feste Phase dient.

2.6.1 Herstellen der Immunaффinitätssäulen

Die Generierung der Affinitätsmatrix zur Anreicherung tryptischer Fragmente wird mit geringen Änderungen nach einem bestehenden Protokoll (Anderson, 2004 (a)) durchgeführt. Als Matrixmaterial werden mit Protein G überzogene POROS 20 G Mikrosphären eingesetzt. 1,4 mL Mikrosphärensuspension werden in ein Reaktionsgefäß

überführt und bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Mikrosphären werden in 1 mL PBS resuspendiert. Die Suspension wird erneut zentrifugiert und der abgenommene Überstand verworfen. Der Waschvorgang wird nochmals wiederholt. Die Mikrosphärensuspension wird anschließend zu gleichen Teilen in vier Reaktionsgefäße verteilt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Zu den Mikrosphären werden je 500 µL Antikörperlösung (0,7 mg/mL) hinzugegeben. Die Suspension wird gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumelroller inkubiert. Nach der Inkubation wird die Suspension erneut zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und zur Überprüfung der Kopplungseffizienz im Photometer vermessen. Das Mikrosphärenpellet wird zweimal mit 1 mL PBS gewaschen. Anschließend werden die Mikrosphären in frisch präparierter Quervernetzerlösung aufgenommen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumelroller inkubiert. Der Quervernetzer wird durch Zentrifugation entfernt. Das Mikrosphärenpellet wird in Abstopplösung resuspendiert und für 30 Minuten auf dem Taumelroller inkubiert. Im Anschluss werden die Mikrosphären erneut zweimal mit PBS gewaschen und zur Lagerung in PBS 0,1% Natriumazid aufgenommen.

Zur Herstellung der Affinitätssäulen werden HPLC-Säulen aus Polyetheretherketon (PEEK) verwendet. Die Mikrosphären werden in 5 mL PBS aufgenommen und unter Verwendung einer Spritzenpumpe in die Säule überführt. Die Säulen werden mit PEEK-Fritten (2 µm) und Dichtungsringen verschlossen. Die Lagerung der Säulen erfolgt in PBS / 0,1% Natriumazid.

2.6.2 Test der Immunitätssäulen

Zur Funktionalitätsprüfung der Antikörpersäulen wird eine Mischung aus synthetischen Proteinfragmenten eingesetzt. Die Sequenz der drei Peptide TF1, TF3 und TF4 entspricht der jeweiligen Sequenz des natürlichen tryptischen Fragments. Das natürliche Fragment für TF2 ist mit über 4700 Da zu groß um synthetisiert zu werden. In diesem Fall wurden die 8 Aminosäuren des N-Terminus über drei Abstandshalter-Moleküle mit den 10 Aminosäuren des C-Terminus verbunden. Das Peptidgemisch enthält 5 nmol von jedem Peptid. Zum Auftrag des Peptidgemisches auf die Säulen wird ein ÄKTA FPLC-System eingesetzt. Die Antikörpersäulen werden hintereinander geschaltet und mit 2 mL Peptidgemisch (0,1 mL/min) beladen. Ungebundene Peptide werden durch Spülen mit 1 mL PBS (0,1 mL/min) entfernt. Die hintereinander geschalteten Säulen werden voneinander getrennt und einzeln mit 2 mL Elutionspuffer I (1 mL/min) eluiert. Das Eluat

wird auf einer Säule mit Umkehrphase (RP) aufkonzentriert. Diese Säule wird mit 20 µL Entsalzungspuffer (2 µL/min) gespült und die gebundenen Peptide mit 40 µL Elutionspuffer II (2 µL/min) eluiert. Die Entsalzung und Elution erfolgt mit einem Nano-LC-System. Die Eluate werden mit der Dünnschichtmethode auf eine Probenplatte präpariert. Die getrockneten Proben werden durch Eintauchen der Probenplatte in Entsalzungspuffer II gewaschen und nach der Trocknung mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert.

Um die tatsächlichen Kapazitäten der antikörpergekoppelten Säulen zu bestimmen werden diese mit Dinitrophenol-gekoppelten Peptiden beprobt. Es wird von jedem Peptidkonjugat eine Verdünnungsreihe über fünf Stufen von 0,05 µg/mL bis 5 µg/mL hergestellt. Die Antikörpersäulen werden sequenziell mit steigenden Mengen an Peptidkonjugat beladen. Hierzu wird ein ÄKTA-FPLC System verwendet. Es wird ein Volumen von 2 mL mit einer Flussrate von 100 µL/min aufgetragen. Die gebundenen Peptidkonjugate werden mit Elutionspuffer I von der Antikörpersäule eluiert. Das Eluat wird auf einer RP-Säule aufkonzentriert. Die RP-Säule wird in ein HPLC-System überführt. Die gebundenen Peptidkonjugate werden mit Elutionspuffer II eluiert. Die Messung des im Eluat enthalten Peptidkonjugats erfolgt bei 349 nm. Die Menge wird über eine mit dem entsprechenden Peptidkonjugat angefertigte Standardreihe bestimmt.

2.6.3 Immunaffinitätsanreicherung aus komplexen Proben

Zur Anreicherung der gewünschten tryptischen Fragmente aus komplexer Probe wird 50 µg bzw. 100 µg verdautes Gesamtlysate in 2 ml PBS aufgenommen und mit einer Flussrate von 0,1 µL/min auf die vier hintereinander geschalteten Säulen aufgetragen. Ungebundene Proteinfragmente werden durch Spülen mit Bindungspuffer entfernt. Die vier Antikörpersäulen werden voneinander getrennt und die gebundenen Proteinfragmente mit 1,5 mL Elutionspuffer I und einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Das Eluat wird auf einer RP-Säule aufkonzentriert. Die beladene RP-Säule wird in ein Nano-LC Gerät überführt und mit 20 µL Entsalzungspuffer I gespült. Die gebundenen Proteinfragmente werden über die Dauer von 20 Minuten mit einer Flussrate von 2 µL/min und einem Gradienten von 30-85% an Elutionspuffer II eluiert. Das Eluat wird in 10 µL Fraktionen gesammelt und auf eine mit α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure vorpräparierte Probenplatte pipettiert. Von jeder Fraktion werden sechs Spots mit je 0,5 µL Probe präpariert.

2.7 Identifikation von tryptischen Fragmenten

Zur Analyse der über die Immunaффinitätsmatrix angereicherten tryptischen Fragmente wird die Matrix-unterstützte Laserdesorption / Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) verwendet. Hierzu wird das Ultraflex III TOF/TOF System eingesetzt.

2.7.1 Probenpräparation

Aufgrund einer höheren Sensitivität sowie der Homogenität der vorpräparierten Matrix- und Kalibrationspositionen und somit der guten Reproduzierbarkeit werden Einwegprobenplatten verwendet, die keine Memory-Effekte zeigen und auch im präparierten Zustand über mehrere Monate gelagert werden können.

Nach dem Aufbringen von 0,5 µL Probenvolumen und der anschließenden 10 minütigen Trocknung bei Raumtemperatur im Dunkeln werden die Probenplatten in Entsalzungspuffer II getaucht um noch eventuell vorhandene Salzaddukte zu entfernen. Nach der Trocknung werden die Probenpositionen mit Rekristallisationspuffer behandelt, was zu einer verbesserten Sensitivität speziell für Proteinfragmente im höheren Massenbereich führt. Es werden je sechs Positionen mit derselben Probe präpariert.

2.7.2 Generierung von MS- und MS/MS-Spektren

MS und MS/MS-Spektren werden unter Verwendung eines Ultraflex III MALDI TOF/TOF Massenspektrometers und der FlexControl Software 3.0 generiert. Die Messung wird im positiven Reflektron-Modus in einem Massenbereich von 700 bis 5000 Da durchgeführt. Um zu verhindern, dass unerwünschte Matrixionen frühzeitig den Detektor absättigen, wird die Deflektionseinheit auf 500 Da gesetzt. Die Beschleunigungsspannung sowie die Detektoreinstellungen werden in der Grundeinstellung (Ionenquelle 1 25 kV; Ionenquelle 2 21,5 kV; Linse 9,7 kV; Reflektor 26,3 kV; Reflektor 2 13,8 kV) belassen. Die Laserstärke sowie die Anzahl der Schüsse werden für jede Probe angepasst. Zur externen Kalibrierung des Gerätes werden die auf der Probenplatte vorpräparierten Kalibrationspositionen für den Massenbereich von 757,34 bis 3657,93 Da verwendet. Die Kalibrierung erfolgt quadratisch aus 800 aufsummierten Spektren und wird, um eine möglichst hohe Massengenauigkeit zu erreichen jeweils für die vier um die Kalibrierposition angeordneten Proben verwendet.

Die Signale werden im MS-Modus zwischen 800 und 5000 Da generiert. Signale mit einem Signal-Rausch-Verhältnis größer 10 werden automatisch mit der „Peptide Mass Fingerprint“-Methode der flexAnalysis-Software annotiert. Die von den einzelnen Probenpunkten stammenden Signallisten werden zu einer Gesamtsignalliste zusammengefasst. Traten Signale mit denselben m/z-Werten auf, wird jeweils das Signal mit dem höchsten S/N-Wert in die Gesamtliste aufgenommen. Die den annotierten Signalen entsprechenden Peptide werden im MS/MS-Modus fragmentiert. Laserstärke und Anzahl der Schüsse werden für jedes Peptid angepasst. Die im Massenbereich, welcher durch das jeweilige Ursprungsignion definiert wird, erhaltenen Fragmentensignale werden automatisch prozessiert. Hierbei wird die Basislinie abgezogen, die Spektren anschließend geglättet und die monoisotopischen Massen der Signale annotiert und in Signallisten dargestellt.

2.7.3 Identifikation mittels Datenbanksuche

Mit Hilfe der Software BioTools 3.1 werden die in Signallisten transformierten Fragmentenspektrendaten in die Datenbanksuchmaschine *MASCOT* geladen. Mit Hilfe dieser Datenbanksuchmaschine werden die generierten uninterpretierten Fragmentenspektren mit den Datenbanken SwissProt (Swiss Institute of Bioinformatics, Basel) und MSDB (Proteomics Department, Hammersmith Campus of Imperial College London) abgeglichen.

Um die Auswertung zu beschleunigen werden zuerst alle Spektren nur mit der SwissProt Datenbank abgeglichen. Es wurden maximal 150 ppm Massentoleranz für die Fragmentenspektren und 0,75 Da Massentoleranz für die Mutterionen zugelassen. Ausnahmen wurden nur bei höheren Massen zwischen 3650 und 5000 Da zugelassen, da sich Peptide dieser Größe außerhalb des kalibrierten Massenbereiches befinden und es hierdurch zu größeren Abweichungen kommen kann. Die Datenbanksuche wird auf die jeweilige Taxonomie der Probe beschränkt. Als Enzym wird Trypsin festgelegt. Beim ersten Suchlauf wird nur die chemische Modifikation Carbaminomethylierung und vollständige Spaltung zugelassen. Spektren, die auf diese Weise nicht identifiziert werden können werden weiteren Suchläufen zugeführt, in welche Modifikationen wie die Deamidierung von Asparagin und Glutamin, die Oxidation von Methionin, Histidin und Tryptophan, die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin sowie die Zyklisierung von Glutamin und die Möglichkeit nichtgespaltener Schnittstellen zugelassen werden. Verbleibende nicht identifizierte Fragmentenspektren werden auf dieselbe Weise mit der

MSDB-Datenbank abgeglichen. Es werden nur Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ akzeptiert.

2.8 Zellkultur

Zur Überprüfung der Methode werden mit pGEX- β -Catenin-Plasmid (Rolf Kemler, Max Planck-Institut für Immunologie, Freiburg) transformierte *E. coli* BL21, Maus-Lebertumorzellen (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Tübingen, Arbeitsgruppe Schwarz) und humane HEK 293 Zellen verwendet.

2.8.1 Transformierte *E. coli*

Aus der Stammlösung werden 10 μ L Bakteriensuspension entnommen und zur Vorkultivierung in 20 mL LB-Medium, welchem 2 mg Ampicillin zugesetzt wurde, überführt und über Nacht bei 37°C in einem Inkubator bei 160 rpm geschüttelt. Aus der Vorkultur wird 10 mL Bakteriensuspension entnommen und in 1 L ampicillinhaltiges (100 μ g/mL) LB-Medium überführt. Die Kultivierung erfolgt bei 30°C unter Schütteln im Inkubator. Das Wachstum der Bakterien wird mittels Messung der Optischen Dichte (OD) kontrolliert. Bei einer OD von 0,7 wird die Expression von rekombinantem GST-Fusionsprotein mit Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Hierzu werden 283,3 mg IPTG in 1 mL H₂O_{dd} gelöst und der Bakteriensuspension zugegeben. Die Induktion erfolgt bei 30°C für 60 Minuten unter Schütteln auf dem Inkubator. Die Bakterien werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 4000 g geerntet. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet bei -80°C gelagert.

2.8.2 Maus-Lebertumorzelllinie HepF1

Im Rahmen der Arbeit werden zur Etablierung der Methode Lysate aus Maus-Lebertumorzellen verwendet. Diese wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Michael Schwarz, Abteilung Toxikologie, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte durch Dr. Albert Braeuning. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert und vor der Ernte zweimal mit PBS gewaschen. Die Ernte erfolgte mittels Zellschaber. Die Zellen wurden pelletiert, der Überstand verworfen. Die Zellen wurden als trockene Pellets in Reaktionsröhrchen bei -80°C gelagert.

2.8.3 Humane HEK 293 Zellen

Zur Kultivierung von HEK 293 Zellen wird eine Lagerlösung von 2 mL (Passage 12) aufgetaut und in 8 mL Zellkulturmedium aufgenommen. Die Suspension wird bei 800 rpm zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 10 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Die Suspension wird in eine Kulturflasche (25 cm²) überführt und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator bis zur Konfluenz kultiviert. Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums wird 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben und für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden durch leichtes Klopfen vom Boden gelöst. In die Kulturflasche wird 9 mL Kulturmedium zugegeben. Die Zellsuspension wird in ein 10 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 6 mL Kulturmedium resuspendiert. Es werden je 27 mL Zellkulturmedium in zwei T175-Zellkulturflaschen (175 cm²) vorgelegt. Es wird je 3 mL Zellsuspension in jede T175-Flasche gegeben. Die Zellen werden durch vorsichtiges Schwenken verteilt und bis zur Erreichung einer Konfluenz von 85% im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Nach Erreichen von 85% Konfluenz wird einer Kulturflasche Glykogen Synthase Kinase 3-Inhibitor zugegeben. 30 µL des in DMSO gelösten Inhibitors (1000x) werden vor der Zugabe 1:20 in Kulturmedium verdünnt und tröpfchenweise in der Kulturflasche verteilt. Anschließend wird die Kulturflasche zur besseren Verteilung des Inhibitors vorsichtig geschwenkt. Als Lösungsmittelkontrolle wird 30 µL DMSO in 570 µL Kulturmedium aufgenommen und in der zweiten Zellkulturflasche gegeben. Nach einer Inkubation von 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator werden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen werden durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellpellets bei -80°C gelagert.

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 Denaturierende Zellyse

Die Zellpellets werden bei -80°C gelagert. Zur Lyse wird die 10-fache Menge des Pelletvolumens an frisch präpariertem gekühltem Lysepuffer zu den gefrorenen Zellen zugegeben. Das Reaktionsgefäß wird solange auf dem Schüttler geschüttelt, bis sich das Zellpellet im Lysepuffer vollständig gelöst hat. Anschließend erfolgt eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Nach der Inkubation wird die Lösung für 4×10 Zyklen von je 5 Sekunden bei 40% Leistung mit einem Ultraschall-Homogenisator sonifiziert. Um eine möglichst vollständige Lyse der Zellen zu erhalten wird nach der Ultraschallbehandlung 10%-ige Natriumdodecylsulfat-Lösung (1:10 v/v) zugegeben und für 30 Minuten auf dem Taumelroller inkubiert. Das Zellysate wird für 15 Minuten bei 4°C und 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.9.2 Proteinbestimmung

Der quantitative Nachweis des Proteingehalts aus dem komplexen Gemisch erfolgt photometrisch über die Farbreaktion von Bicinchoninsäure (BCA) mit reduziertem Kupfer bei 562 nm. Wegen der hohen Konzentration an störenden Substanzen im Lysepuffer werden die Proben zur Bestimmung des Proteingehaltes in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt. Als Standardprotein wird BSA in Lysepuffer gelöst und ebenfalls in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt. Mit der Standardlösung wird eine Verdünnungsreihe im Bereich von $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ bis $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ angesetzt. Die Bestimmung erfolgt in Mikrotiterplatten. Es werden je $150 \mu\text{L}$ Probe bzw. Standardproteinlösung und $150 \mu\text{L}$ frisch präpariertes BCA-Färbereagenz in einer Kavität gemischt. Die Inkubation erfolgt für 2 Stunden bei 37°C . Nach dem Abkühlen wird die Absorption bei 562 nm im Spektrometer gemessen. Die Bestimmung des Proteingehalts der affinitätsgereinigten Antikörper erfolgt über die Messung der Absorption bei 280 nm im Photometer.

2.9.3 Enzymatischer Proteinabbau

Für den enzymatischen Verdau des Proteingemisches wird die Endopeptidase Trypsin verwendet. Sie spaltet Proteine selektiv an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und

Argininresten. Ausnahmen bilden Stellen, bei welchen die Aminosäure Prolin nachfolgt, diese sind trypsinresistent. Peptidbindungen zwischen Lysin bzw. Arginin und einer sauren Aminosäure werden nur langsam gespalten. Der Verdau wird daher für 16 Stunden durchgeführt.

Da Proteine in linearer Struktur für die Protease besser zugänglich sind, wird das Proteingemisch durch Zugabe von Dithiothreitol (5 mM) reduziert und anschließend bei 60°C für eine Stunde denaturiert. Um eine Reorganisation der geöffneten Disulfidbrücken zu verhindern wird die Probe nach dem Abkühlen mit Iodacetamid (10 mM) versetzt und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Da das Gemisch eine zu hohe Konzentration an SDS und Harnstoff enthält, wird es vor der Zugabe von Trypsin in Verdünnungspuffer verdünnt. Der Puffer gewährleistet den optimalen pH-Bereich. Um den Selbstverdau des Trypsins zu verhindern wird dem Verdünnungspuffer Calciumchlorid zugesetzt (1 mM). Das Trypsin wird laut Herstellerangabe in 50 mM Essigsäure gelöst und in einem Enzym/Substratverhältnis von 1:40 (w/w) dem Proteingemisch zugegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C und 450 rpm auf dem Reaktionsgefäßeschüttler. Danach wird das Enzym durch Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS, 17 µg/mL) inhibiert und bei -80°C gelagert. Der Verdau wird mittels Gelelektrophorese überprüft.

2.9.4 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wird das Prinzip der diskontinuierlichen denaturierenden Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Zur Durchführung der Experimente wird das NuPAGE-Gelelektrophorese-System verwendet. Pro Geltasche werden 5 µg Protein in einem Volumen von 20 µL aufgetragen. Das Probenvolumen wird entsprechend dem Proteingehalt berechnet und mit 5 µL Probenpuffer (4x) und 2 µL Reduktionsmittel (10x) versetzt. Die Lösung wird bis zum Volumen von 20 µL mit H₂O_{dd} ergänzt und bei 80°C für 10 Minuten denaturiert. Es werden 4-12% Bis-Tris-Polyacrylamid-Gardientengele mit 1 mm Dicke und 12 Geltaschen verwendet. Als Laufpuffer wird MES eingesetzt. Der inneren Kammer des Systems wird 500 µL Antioxidanzmittel zugesetzt. Zur Größenreferenzierung werden 5 µL eines Proteinstandards aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei 125 V, 40 – 120 mA für 2 Stunden.

2.9.4.1 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Zur Anfärbung der Proteine im Gel wird der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau eingesetzt. Das Gel wird nach der Elektrophoreseprozedur für 10 Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen. Danach wird das Gel für 45 Minuten in Coomassie-Lösung gelegt und auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Im Anschluss wird das Gel zuerst für 30 Minuten in Entfärberlösung I entfärbt, dann über Nacht in Entfärberlösung II. Die Dokumentation erfolgt mit der Kodak Image Station 440 CF.

2.9.5 Western Blot

Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden für die weitere Analyse im Western Blot-Verfahren elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgt bei einer konstanten Spannung von 30 V über die Dauer von 1 Stunde in Transferpuffer. Um unspezifische Bindungen zu minimieren wird die Membran 30 Minuten in Blockierpuffer I inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBST erfolgt die Antikörperinkubation. Hierfür wird der Primärantikörper in 5 mL Inkubationslösung verdünnt (1: 5000) und über Nacht bei 4°C auf dem Taumelroller mit der Membran inkubiert. Die Membran wird drei Mal mit 10 mL TBST gewaschen. Im Anschluss wird die Membran mit in 5 mL Inkubationslösung verdünntem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (1:4000) auf dem Taumelroller für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wird erneut dreimal mit 10 mL TBST gewaschen. Zur Detektion wird die Membran mit 4 mL ECL-Entwicklerlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumelroller inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase setzt das in der Entwicklerlösung enthaltene Luminol unter Lichtemission um. Die Dokumentation erfolgt mit der Kodak Image Station 440 CF.

3 Ergebnisse

Proteine oder Peptide in komplexen biologischen Proben werden meist über ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften aufgetrennt. Zur Trennung werden häufig die 2-D-Gelelektrophorese oder chromatographische Methoden wie Ionenaustausch und Umkehrphase verwendet. Beide Methoden sind für den Durchsatz nur bedingt geeignet da sie arbeits- und zeitintensiv sind. Ihre Auflösung und Sensitivität sind limitiert. Ansätze mit Immunaффinitätsbasierter Probenfraktionierung insbesondere durch den Einsatz peptidspezifischer Antikörpern zeigen eine deutliche Verbesserung bezüglich der Sensitivität und des Probendurchsatzes. Die Quantifizierung mittels isotope-markierter Standardpeptide ist möglich (SISCAPA; Anderson, N.L. et al. 2004). Der Einsatz und die Auflösung dieser Methode hängt jedoch direkt von der Verfügbarkeit geeigneter Antikörper ab, und die Tatsache, dass pro nachzuweisendem Protein ein Antikörper notwendig ist, limitieren ihren Nutzen stark.

Zur weiteren Optimierung der Präfraktionierung komplexer Proben wurde ein Konzept entwickelt, welches auf der Grundlage spezieller monospezifischer Antikörper beruht. Diese Antikörper sind gegen kurze terminale Sequenzen aus vier Aminosäuren gerichtet und sind somit in der Lage nicht nur ein Proteinfragment zu binden sondern eine ganze Gruppe von Zielanalyten, die das gleiche Epitop aufweisen. Dies erlaubt eine verbesserte Auflösung bei hoher Sensitivität. Die Möglichkeit zur Entdeckung von neuen Biomarkern bleibt hierbei, wenn auch eingeschränkt, bestehen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Generierung von Antikörpern gegen kurze terminale Sequenzen und deren Eignung zur Anreicherung von Gruppen von Peptiden für die Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse zu prüfen. Die generierten Antikörper sollen hierfür genau charakterisiert werden, Methoden zur Durchführung des Experiments etabliert und die Analyse definierten Probenmaterials durchgeführt werden.

Für die Überprüfung des Konzeptes wurde das Protein β -Catenin zur Generierung von Antikörpern für kurze terminale Epitope und deren Einsatz für die Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse ausgewählt. Es ist ein zentrales Protein des Wnt-Signalwegs und besitzt als Protoonkogen eine hohe medizinische Relevanz. Bei nukleärer Akkumulation dieses Proteins werden Gene, welche die Zellproliferation fördern und damit zu unkontrolliertem Zellwachstum führen aktiviert.

3.1 Generierung polyklonaler Antikörper für kurze terminale Epitope

Die Auswahl der zur Immunisierung verwendeten Peptidepitope erfolgte anhand der publizierten Sequenz des humanen β -Catenin (CTNB1_HUMAN / 30.05.2006 Version 70 / <http://www.uniprot.org/uniprot/P35222>). Für die Selektion der Peptide wurde die Zielsequenz mit Hilfe des Programms *Peptide cutter* (<http://expasy.org/tools/peptidecutter>) *in silico* in Bruchstücke zerlegt, die den mit der Endopeptidase Trypsin erzeugten Fragmenten entsprechen. Aus den 67 entstandenen tryptischen Peptidfragmenten (TF) wurden vier Fragmente (TF1-TF4) für die weitere Bearbeitung ausgewählt.

Die Auswahl erfolgte nach folgenden Kriterien:

- im Fragment sind Phosphorylierungsstellen oder bekannte Mutation zu finden
- Fragmentgröße liegt, definiert durch die geplante Analysemethode, zwischen 800 - 5000 Da
- Fragmentsequenz zeigt Unterschiede zwischen humanem und Maus- β -Catenin

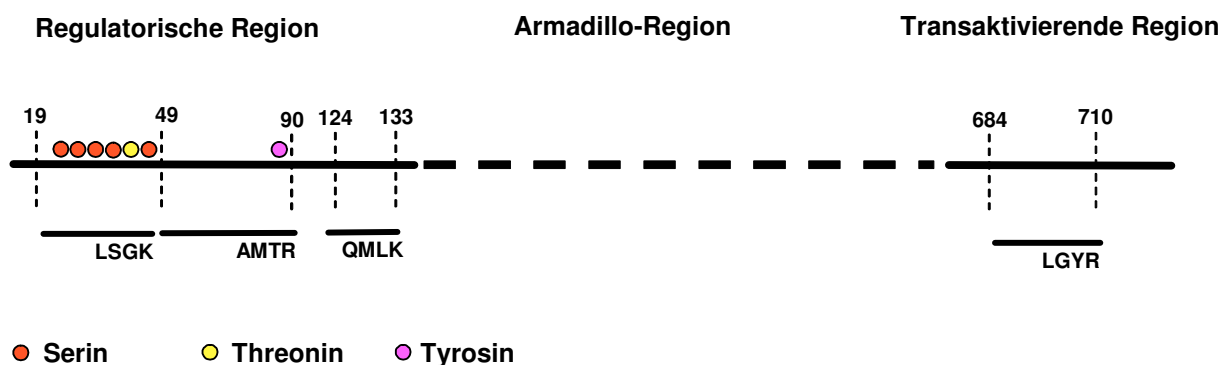


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Proteins β -Catenin

Oberhalb der schematischen Darstellung sind die Domänen von β -Catenin dargestellt. Im N-terminalen Bereich sind die für den Abbau des Proteins benötigten Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen sowie die Tyrosin-Phosphorylierungsstelle markiert. Unterhalb der Darstellung sind die gewählten Fragmente aufgeführt.

Tabelle 3.1 Charakteristik der ausgewählten tryptischen β -Catenin-Fragmente

Ausgewählte tryptische Fragmente (TF) des *in silico* verdauten Modellproteins β -Catenin (bcat). Die Auswahl richtet sich nach der durch die Analysemethoden definierten Fragmentgröße (TF2 und TF3) sowie speziesspezifischen Unterschieden in der Aminosäuresequenz (TF4h (human) und TF4m (Maus)) und vorhandenen Phosphorylierungsstellen (TF1) sowie die vorhandene Mutationsstellen (TF1m* (Maus)) in der verwendeten Maus-Zelllinie.

Fragmentbezeichnung	Fragment	AS-Position	Länge [AS]	Masse [Da]
bcat_TF1h	AAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPSLSGK	19-49	30	3086,324
bcat_TF1m*	AAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPPLSGK			3096,362
bcat_TF2	GNPEEEDVDTSQVLYEWEQGFQSFTQEVA DIDGQYAMTR	49-90	41	4728,946
bcat_TF3	LAEPSQLK	124-133	9	1016,221
bcat_TF4h	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEPLGYR	684-710	26	2805,068
bcat_TF4m	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEALGYR			2778,030

Am N-terminalen Bereich des Proteins befinden sich viele regulatorische Phosphorylierungsstellen, welche die Stabilität des Proteins bestimmen und somit an der Signaltransduktion beteiligt sind. Im gleichen Bereich des Proteins befinden sich zudem bekannte Mutationsorte, die Phosphorylierung und damit den Abbau des Proteins verhindern. Wichtig ist insbesondere das Serin an Position 45, welches im ersten Schritt des Degradationsprozesses von der Glykogensynthasekinase β phosphoryliert wird. Wird dieses durch ein Prolin ersetzt, wird der Abbau des Proteins vollständig verhindert.

Da die massenspektrometrische Analyse als MALDI-TOF/TOF durchgeführt wird, sind Fragmente kleiner als 1000 Da häufig schwer nachzuweisen, da diese kleineren Peptide aufgrund von Matrixeffekten verdeckt werden können. Fragmente größer als 5000 Da werden nicht berücksichtigt, da bei dieser Größe Auflösung und Empfindlichkeit der Detektion nachlässt. Die hier ausgewählten Peptide besitzen Massen, die in diesem Fenster liegen.

Um den Einsatz der Antikörper für die Anreicherung von Proteinfragmenten unabhängig von ihrer Ursprungsspezies zu prüfen, wurden humane und Maus-Zelllinien eingesetzt. Für diese Überprüfung wurden zwei Fragmente aus der konservierten β -Catenin-Sequenz gewählt, in welcher sich die humane vom Maus-Sequenz unterscheidet.

Antikörper gegen die vier gewählten Proteinfragmente sollen die jeweils vier am C-Terminus befindlichen Aminosäuren erkennen. Drei Aminosäuren in diesem terminalen Epitop werden durch das Fragment bestimmt, die terminale Aminosäure wird durch die Spaltstelle des verwendeten Enzyms bestimmt und ist immer ein Lysin oder Arginin.

So wurden für die Überprüfung des Konzeptes vier von β -Catenin abgeleitete Peptide ausgewählt, um gegen deren kurze Termini Antikörper zu generieren. Diese Antikörper erkennen auch alle weiteren Proteinfragmente, die ein identisches kurzes terminales Epitope aufweisen und können zur Anreicherung und Identifizierung dieser Peptide genutzt werden. Bioinformatische Berechnungen (Hannes Planatscher, Zentrum für Bioinformatik, Wilhelm-Schickard-Institut, Tübingen) ergaben einige Dutzend bis wenige Hundert Fragmente, die sich nach dem enzymatischen Verdau des gesamten humanen Proteoms so nachweisen lassen.

Tabelle 3.2 Anzahl der mit peptidspezifischen Antikörpern theoretisch nachweisbaren humanen Proteine

Die Anzahl der nach einem enzymatischen Verdau mit Trypsin entstehenden Proteinfragmente mit den C-terminalen Epitopen LSGK, AMTR, QMLK und LGYR im Massenbereich von 800 bis 5000 Da wurde bioinformatisch berechnet. Der Berechnung liegt das in der SwissProt Datenbank verzeichnete humane Proteom zu Grunde. Redundanzen wurden nicht berücksichtigt.

Epitop	Anzahl identifizierbarer humaner Proteinfragmente
-LSGK	166
-AMTR	27
-QMLK	53
-LGYR	58

Zur Immunisierung der Kaninchen wurden diese kurzen Peptide, die aus den vier terminalen Aminosäuren bestehen, in hoher Dichte an das hochmolekulare Trägerprotein KLH gekoppelt, um eine gute Immunogenität zu erzielen. Die gewählten Peptidsequenzen wurden bei der Synthese am N-Terminus mit drei Abstandshalter-Molekülen und einem Cystein versehen. Bei den Abstandshalter-Molekülen handelt es sich um eine gestreckte, hydrophile Struktur, die der Verbesserung der Löslichkeit und der Zugänglichkeit der Peptidsequenz dient. Das Cystein ermöglicht eine orientierte Kopplung und somit eine gute Präsentation des Epitops. Da zu erwarten war, dass die Bildung von Antikörpern gegen diese kurzen Peptidepitope mit nur geringer Effizienz erfolgt, wurden die Peptide

über das heterobifunktionale Kopplungsreagenz sulfo-MBS an hochmolekulare immunogenitätsvermittelnde Trägerproteine gekoppelt.

Tabelle 3.3 Zur Immunisierung eingesetzte Konjugate

Die zur Immunisierung eingesetzten Peptidsequenzen besitzen eine geringe Antigenität und werden daher an das Trägerprotein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) gekoppelt. Aus sterischen Gründen ist die Peptidsequenz mit einem Abstandshalter (A) versehen. Um eine orientierte Bindung der Peptidsequenz an das Trägerprotein zu realisieren wird das heterobifunktionale Kopplungsreagenz sulfo-MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimid-ester) eingesetzt.

Peptidbezeichnung	Trägerprotein	Kopplungsreagenz	Abstandshalter	Peptidsequenz
D_TF1	KLH	sulfo-MBS	AAA	C-AAA -LSGK
D_TF2	KLH	sulfo-MBS	AAA	C-AAA -AMTR
D_TF3	KLH	sulfo-MBS	AAA	C-AAA -QMLK
D_TF4	KLH	sulfo-MBS	AAA	C-AAA -LGYR

3.2 Charakterisierung der generierten Antikörper

Zum Nachweis der gebildeten Antikörper wurden Serumproben nach dem 32. und dem 61. Immunisierungstag sowie Präimmunsereen auf die Reaktivität mit den terminalen Peptidsequenzen des eingesetzten Antigens untersucht. Zur Detektion von Reaktivität wurde ein multiplexes Analysesystem verwendet, bei dem farbcodierte Mikrosphären als feste Phase eingesetzt werden. Definierte Populationen farbcodierter Mikrosphären wurden mit spezifischen Peptiden belegt und mit den zu testenden Seren inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gebunden Antikörper mit einem fluoreszenzmarkierten antispeziesspezifischen Antikörper detektiert.

Bei der Generierung von Antikörpern mit an ein Trägerprotein gekoppelten Peptidsequenzen werden im Rahmen der Immunantwort Antikörper gegen die Peptidsequenz, aber auch gegen den in der Sequenz enthaltenen Abstandshalter, das verwendete Trägerprotein und das eingesetzte Kopplungsreagenz sowie gegen Kombinationen hieraus gebildet. Dieses Analysesystem hat den großen Vorteil, dass durch die Mischung verschiedener Mikrosphärenpopulationen (Abbildung 3.2)

Reaktivitäten gegen die verschiedenen Peptidepitope und gegen die verschiedenen Teile des jeweiligen Immunogens gleichzeitig detektiert und unterschieden werden können.

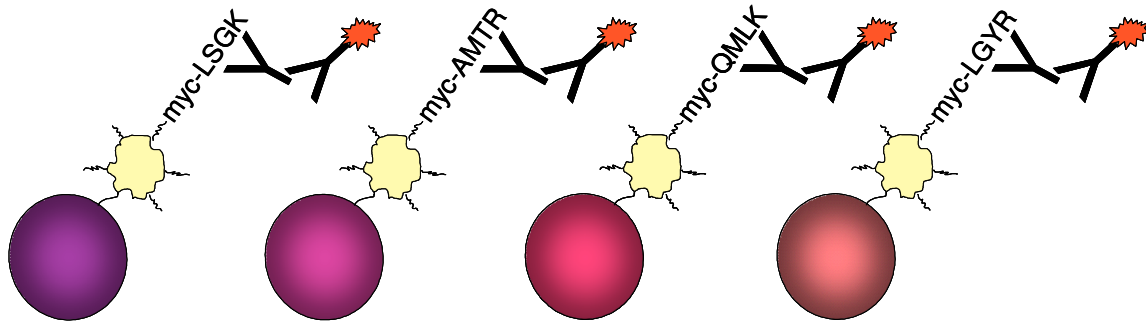


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung einer mit Peptidkonjugat belegten Mikrosphäre

Für die Serumcharakterisierung wird jeweils eine Population an farbcodierten Mikrosphären mit einer Sorte Peptidkonjugat belegt. Die gekoppelten Mikrosphärenpopulationen werden in einer Lösung vereinigt und mit dem zu charakterisierenden Serum inkubiert. Die gebundenen Antikörper werden durch einen phycoerythrin-konjugierten Sekundärantikörper nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie detektiert.

Um die Detektion eventuell vorhandener Reaktivitäten mit dem zur Immunisierung verwendeten Trägerprotein und Kopplungsreagenz im Assay auszublenden, wurde dies durch analoge Strukturen ersetzt. Um die generelle Reaktivität auf die zur Immunisierung eingesetzte Sequenz, bestehend aus terminalem Peptidepitop und Abstandshalter, festzustellen, wurden diese Sequenzen auf definierten Mikrosphärenpopulationen immobilisiert. Hierbei kann jedoch nicht zwischen Reaktivitäten gegen den Abstandshalter, das Peptidepitop oder einer Kombination hieraus unterschieden werden. Um Kreuzreaktivitäten auszuschließen und ausschließlich die gegen das jeweilige Peptidepitop gerichtete Reaktivität detektieren zu können, wurden auf weiteren Mikrosphärenpopulationen Peptidsequenzen immobilisiert, bei denen der zur Immunisierung verwendete Abstandshalter durch das Epitop von anti-HA (Klon 3F10) und anti-c-myc (Klon 9E10) ersetzt wurde (Tabelle 3.4). Das Myc-Epitop diente in Kombination mit einem Maus anti-Myc-Antikörper als Kontrolle. Zur Überprüfung, ob es sich bei den generierten Antikörpern um terminusspezifische Antikörper handelt, wurden Peptidsequenzen eingesetzt, deren C-Terminus mit einer Amidgruppe blockiert wurde. Die Peptide tragen keine terminale Ladung mehr, was das Vorhandensein einer internen Peptidsequenz initiiert.

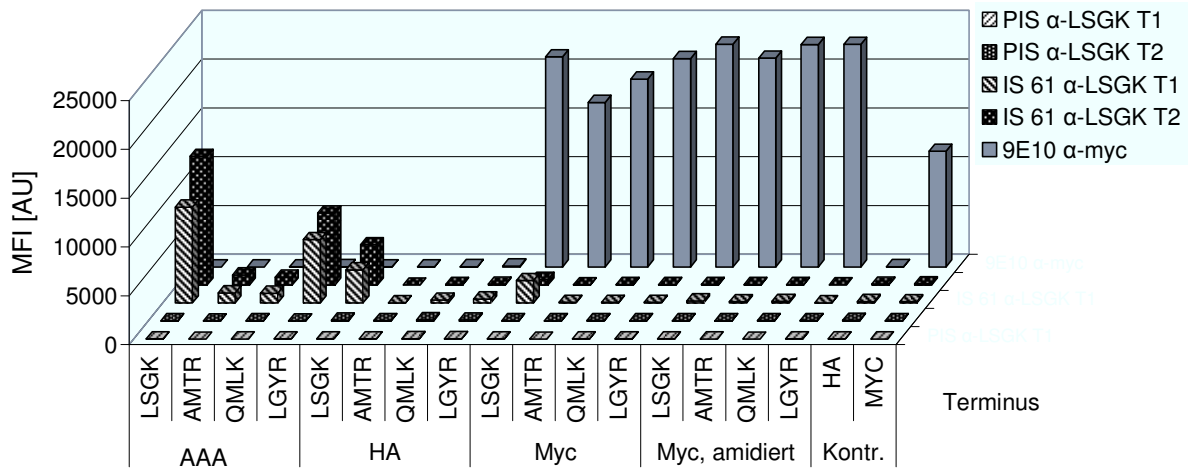
Tabelle 3.4 Auf Mikrosphären immobilisierte Peptidkonjugate zur Charakterisierung der Antisera im Multiplex-Immunoassay

Die zur Serumcharakterisierung verwendeten Peptidsequenzen werden auf BSA-belegten Mikrosphären immobilisiert. Um zu verhindern, dass Antikörper gegen das im Immunogen enthaltene Kopplungsreagenz detektiert werden, wird dieses gegen sulfo-SMPB (Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrat) ausgetauscht. Um Kreuzreaktivitäten mit dem Abstandshalter (A) des Immunogens auszuschließen, werden zusätzlich Peptidsequenzen mit einer Myc- (EQKLISEEDL) und HA- (YPYDVPDYA) Sequenz eingesetzt.

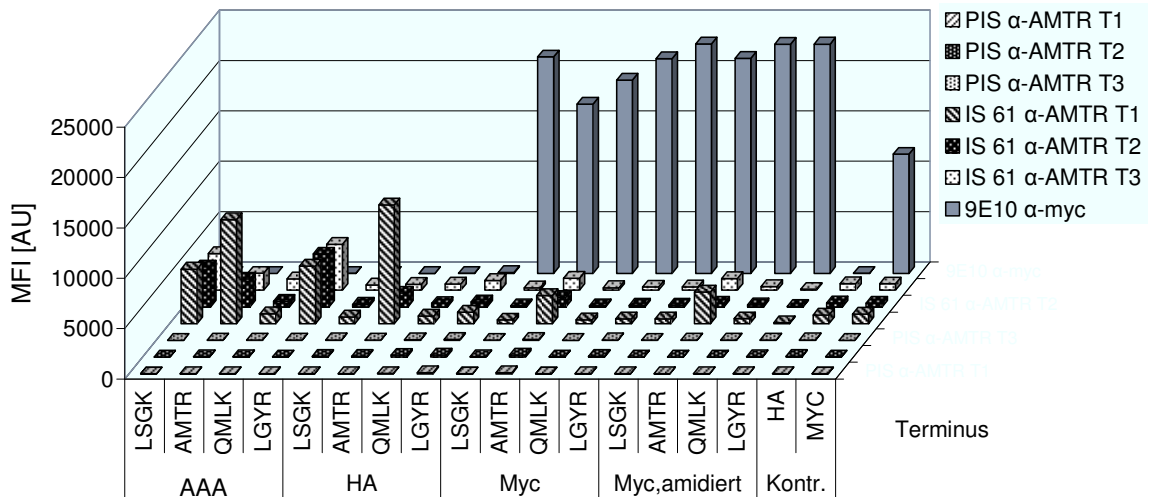
Peptidbezeichnung	Trägerprotein	Kopplungsreagenz	Abstandshalter	Peptidsequenz
D_TF1	BSA	sulfo-SMPB	AAA	C-AAA-LSGK
D_TF2	BSA	sulfo-SMPB	AAA	C-AAA-AMTR
D_TF3	BSA	sulfo-SMPB	AAA	C-AAA-QMLK
D_TF4	BSA	sulfo-SMPB	AAA	C-AAA-LGYR
Myc_TF1	BSA	sulfo-SMPB	myc	C-EQKLISEEDL-LSGK
Myc_TF2	BSA	sulfo-SMPB	myc	C-EQKLISEEDL-AMTR
Myc_TF3	BSA	sulfo-SMPB	myc	C-EQKLISEEDL-LGYR
Myc_TF4	BSA	sulfo-SMPB	myc	C-EQKLISEEDL-QMLK
HA_TF1	BSA	sulfo-SMPB	HA	C-YPYDVPDYA-LSGK
HA_TF2	BSA	sulfo-SMPB	HA	C-YPYDVPDYA-AMTR
HA_TF3	BSA	sulfo-SMPB	HA	C-YPYDVPDYA-LGYR
HA_TF4	BSA	sulfo-SMPB	HA	C-YPYDVPDYA-QMLK
Amid_TF1	BSA	sulfo-SMPB	myc	C-SEEDL-LSGK-Amid
Amid_TF2	BSA	sulfo-SMPB	myc	C-SEEDL-AMTR-Amid
Amid_TF3	BSA	sulfo-SMPB	myc	C-SEEDL-LGYR-Amid
Amid_TF4	BSA	sulfo-SMPB	myc	C-SEEDL-QMLK-Amid

Abbildung 3.3 zeigt die Reaktivitäten der mit der jeweiligen Peptidsequenz immunisierten Tiere. Dargestellt wird die Reaktivität der vor der Immunisierung gewonnenen Seren sowie die Immunsereen nach dem 61. Immunisierungstag.

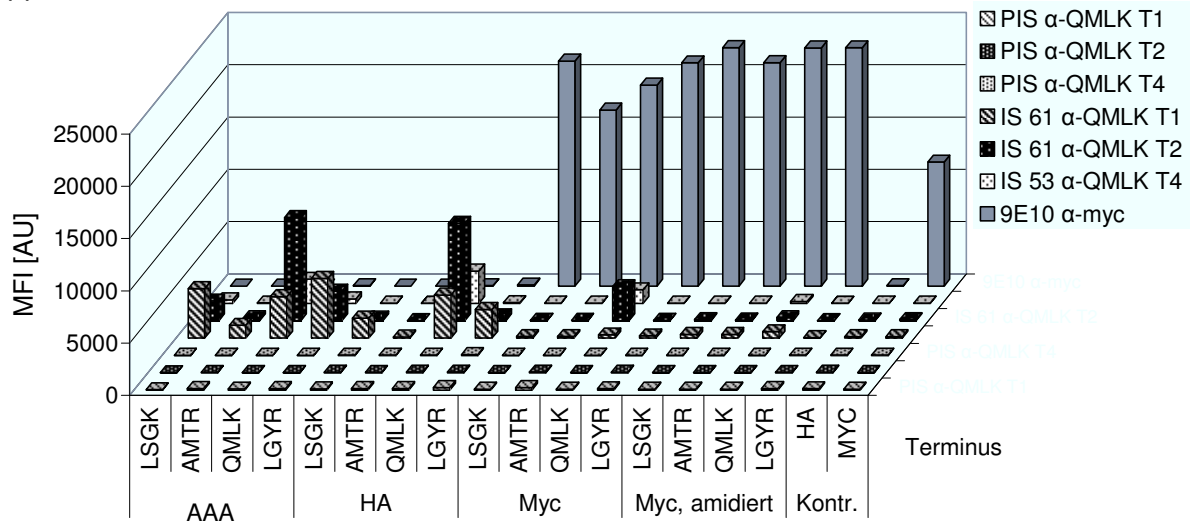
(a) anti-LSGK Seren



(b) anti-AMTR Seren



(c) anti-QMLK Seren



(d) anti-LGYR Seren

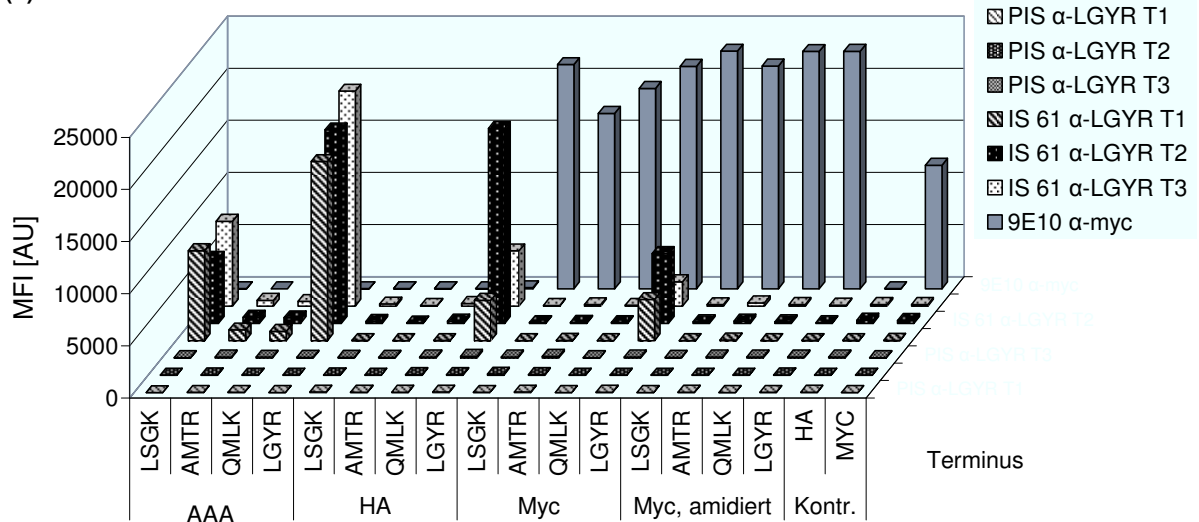


Abbildung 3.3 Reaktivität der peptidspezifischen Antiseren im Mikrosphären-basierten Multiplex-Assay

Bestimmung der Antiserumreaktivität gegen die terminalen Peptidepitope von (a) anti-LSGK; (b) anti-AMTR; (c) anti-QMLK; (d) anti-LGYR gegen die vier zur Immunisierung eingesetzten Immunogene. Auf der x-Achse sind die auf den Mikrosphären immobilisierten Peptidsequenzen aufgetragen. Die z-Achse gibt den Median der gemessenen Fluoreszenzintensität (MFI) wieder. Die Mikrosphären wurden mit dem Präimmunserum (PSI 1:10.000) und mit dem Immunserum des 61. Immunisierungstages (IS 1:100.000) inkubiert. Zur Kontrolle wurden PBS und Maus anti-c-myc (0,1 mg/mL) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch einen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten antispeziespezifischen Antikörper. Die gemessene Signalintensität wurden aus mindestens 100 Ereignissen einer Mikrosphärenpopulation gebildet und als Median der Fluoreszenzintensitäten (MFI) ausgegeben.

Im Fall von Mikrosphären bei denen der Abstandshalter des Immunogens eingesetzt wurde, war deutliche Reaktivität zu detektieren. Da die Signale jedoch nicht nur spezifisch bei der jeweiligen zur Immunisierung eingesetzten Peptidsequenz zu finden war, sondern auch bei den drei anderen Sequenzen zu messen war, liegt vermutlich eine Reaktion gegen die am N-Terminus der Sequenzen befindlichen Abstandshalter-Moleküle vor.

Bei Mikrosphären, bei denen der Abstandshalter des Immunogens durch HA-Sequenzen bzw. Myc-Sequenzen ersetzt wurden, sind keine Kreuzreaktivitäten zu detektieren. Eine Ausnahme ist das anti-QMLK Serum Tier 1(c). Die gemessenen Signale sind bei den HA-Sequenzen höher als bei den Myc-Sequenzen, was für eine bessere Präsentation durch diese Abstandshaltersequenz sprechen dürfte. Auch ein störender Einfluss der negativen Ladungen der Myc-Sequenz kann nicht ausgeschlossen werden.

Bei den Sequenzen mit amidiertem C-Terminus sind keine Reaktivitäten festzustellen, was darauf schließen lässt, dass die generierten Antikörper als Teil des Epitops die geladene terminale Aminosäure erkennen und somit neben der Sequenzspezifität auch eine Terminusspezifität besitzen. Eine Ausnahme bildet das anti-AMTR Serum, Tier 1 was auf die mögliche Erkennung intern vorkommender Sequenzen hindeutet.

Die Präimmunseren zeigen keine Reaktivitäten auf die im Assay eingesetzten Peptid-konjugate.

Die Charakterisierung der gewonnenen Antiseren zeigt, dass die Generierung von Antiseren mit Reaktivitäten gegen kurze terminale Aminosäuresequenzen möglich ist. Zur Aufreinigung und somit für alle weiteren Experimente wurden die Seren ausgewählt, die die höchste Reaktivität auf die spezifische Sequenz, keine Kreuzreaktionen und keine Reaktivität bei amidierten Termini zeigten. Aufgrund dieser Kriterien wurden die Seren anti-LSGK Tier 1, anti-AMTR Tier 2, anti-QMLK Tier 2 und anti-LGYR Tier 2 gewählt.

3.3 Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Aufreinigungsstrategie zu etablieren, die die Isolierung terminusspezifischer Antikörper erlaubt. Die Verwendung solcher polyspezifischen Antikörper ist eine Voraussetzung für die Herstellung von Immunaффinitätssäulen guter Qualität. Je homogener die Antikörperpräparationen sind, desto geringer sind Competitionseffekte durch Serumproteine und kreuzreaktive Antikörper und desto höher sind die Sensitivitäten, die mit der Analysemethode erzielt werden können. Bei der Herstellung der zur Aufreinigung eingesetzten Affinitätsmatrix ist es daher wichtig, dass

die Epitope, an welche die unerwünschten kreuzreaktiven Antikörper binden, nicht mehr vorhanden sind. So wurde bei der Generierung der Affinitätsmatrix zur Aufreinigung der Distanzhalter, das Trägerprotein sowie das Kopplungsreagenz gewechselt.

Für die Herstellung der Affinitätsmatrices wurde mit SMCC voraktiviertes BSA verwendet. Als Distanzhalter in der Peptidsequenz dienen anstelle des bei der Immunisierung verwendeten Abstandshalters HA- und Myc-Teilsequenzen. Die Peptide werden mit voraktiviertem BSA gemischt und inkubiert. Ungebundene Peptide wurden durch Zentrifugation in einer Filtereinheit abgetrennt. Die Kopplung wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Hierbei konnte das Konjugat aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Die Kopplung von Peptid an das voraktivierte BSA ist durch eine deutliche Zunahme der Masse zu sehen. Die beobachtete Massenzunahme entspricht einer Anzahl von 15 bis 20 an BSA gebundenen Peptiden. Die generierten Konjugate wurden auf N-Hydroxysuccimid-aktivierten Sepharosesäulen immobilisiert.

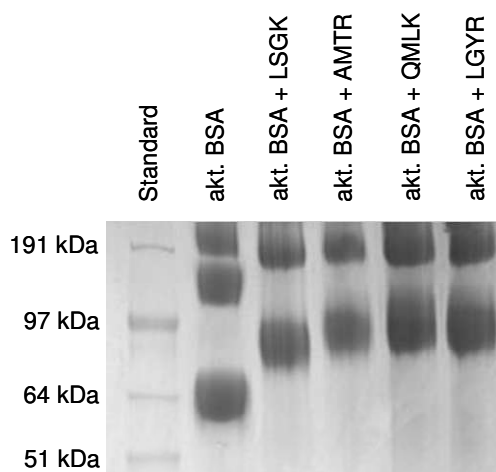


Abbildung 3.4 Kopplungskontrolle der für die Immunaffinitätsreinigung eingesetzten Peptidkonjugate

Zur Herstellung der Affinitätsmatrix für die Aufreinigung der Antikörper werden die Peptide an präaktiviertes BSA gekoppelt, welches dann auf einer Sepharosesäule immobilisiert wird. Vor der Immobilisierung auf der Säule werden die BSA-Peptid-Konjugate durch Auftrennung und Coomassie-Färbung im Polyacrylamid-Gel kontrolliert.

3.3.1 Affinitäts- und Gelchromatographie zur Antikörperaufreinigung

Die Affinitätsaufreinigung der Antikörper wurde aus jeweils 10 mL Antiserum durchgeführt. Die Seren wurden auf die jeweilige Affinitätsmatrix appliziert, der Durchlauf wurde aufgefangen. Gebundene Antikörper wurden durch Absenkung des pH-Wertes auf pH 2,5 eluiert und mittels Gelfiltration in PBS umgepuffert. Der Proteingehalt der gesammelten Fraktionen wurde photometrisch bestimmt, mit Natriumazid versehen und bei + 4 °C gelagert.

Tabelle 3.5 Menge aufgereinigter Antikörper

Für die Aufreinigung von peptidspezifischen Antikörpern wird 10 mL Immuns Serum eingesetzt. Die gewonnene Menge an Antikörper wird durch photometrische Messung bei 280 nm bestimmt.

Affinitätssäule	Serum	Volumen Serum [mL]	Antikörper [mg]
LSGK	Tier 1	10	7,67
AMTR	Tier 2	10	3,62
QMLK	Tier 2	10	2,54
LGYR	Tier 2	10	5,77

Um zu überprüfen, ob sich in den Eluaten neben den aufgereinigten Antikörpern noch größere Mengen an Serumproteinen befinden, wurden die gereinigten Antikörper mittels Gelelektrophorese analysiert. Als Kontrolle wurde ein in PBS gelöster monoklonaler Antikörper aus der Maus eingesetzt.

Abbildung 3.5 zeigt die reduzierten und denaturierten Antikörperlösungen nach der Auftrennung und Anfärbung im Polyacrylamidgel. Es sind keine Verunreinigungen mit Serumproteinen zu erkennen. Da es sich um polyspezifische Antikörper handelt, sind unterschiedliche Isotypen sowie Unterschiede in der Aminosäuresequenz der variablen Regionen der Antigenbindungsstelle zu erwarten, was das Auftreten von mehrfachen Banden im Bereich um 25 kDa bis 30 kDa erklärt.

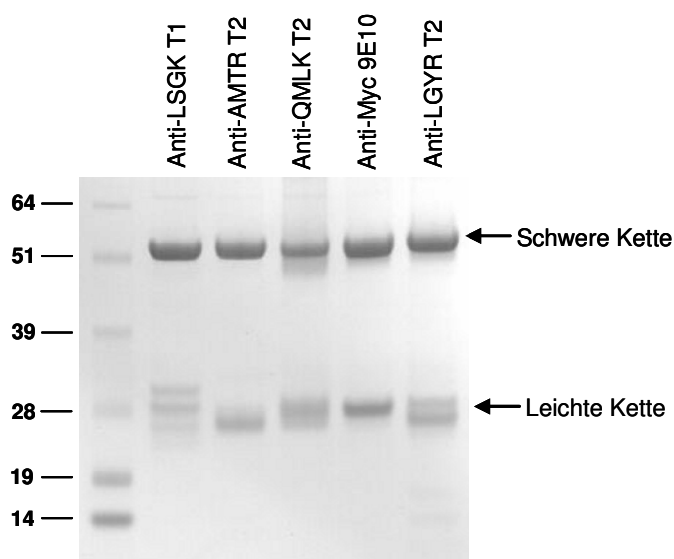


Abbildung 3.5 SDS-Gel zur Überprüfung aufgereinigter Antikörper

Die aufgereinigten Antikörper wurden reduziert, denaturiert, im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit einer Coomassie-Färbung angefärbt. Die schweren und leichten Ig-Ketten sind durch Pfeile markiert.

Um die Effektivität der Aufreinigung und die Funktionalität der Antikörper nach erfolgter Aufreinigung zu überprüfen wurde die Antikörperlösung, das Immuneserum und der aufgefangene Durchlauf mittels Mikrosphärenbasiertem Assay untersucht. Hierzu wurden farbcodierte Mikrosphären eingesetzt auf denen die vier unterschiedlichen Peptidsequenzen gekoppelt vorlagen. Als Kontrolle dienten mit Ovalbumin belegte Mikrosphären.

Die gereinigten Antikörperlösungen zeigen unterschiedlich intensive Reaktivität auf die spezifische Sequenz. Bezogen auf die Myc-Kontrolle zeigen die Eluate von anti-LSGK T1, anti-AMTR T2 und anti-QMLK T2 sehr ähnliche Reaktivitäten. Die höchste Reaktivität zeigen die anti-LGYR T2 Antikörper. In den Durchläufen von anti-LSGK T1, anti-QMLK T2 und anti-LGYR T2 konnten keine für die jeweilige Peptidsequenz spezifischen Reaktivitäten mehr gemessen werden. Im Durchlauf anti-AMTR T2 waren noch spezifische Reaktivitäten zu detektieren, was auf eine Überschreitung der Bindekapazität der Affinitätssäule bzw. eine niedrige Affinität der Antikörper hindeutet.

Aus 10 mL eingesetztem Antiserum konnten zwischen 2,5 mg und 7,7 mg polyspezifische Antikörper gewonnen werden. Die Antikörperaufreinigung war für diese drei Immuneseren sehr effektiv. Im Durchlauf sind mit einer Ausnahme keine polyspezifischen Antikörper mehr enthalten. Die gereinigten Antikörperlösungen zeigen keine Verunreinigungen mit anderen Serumproteinen.

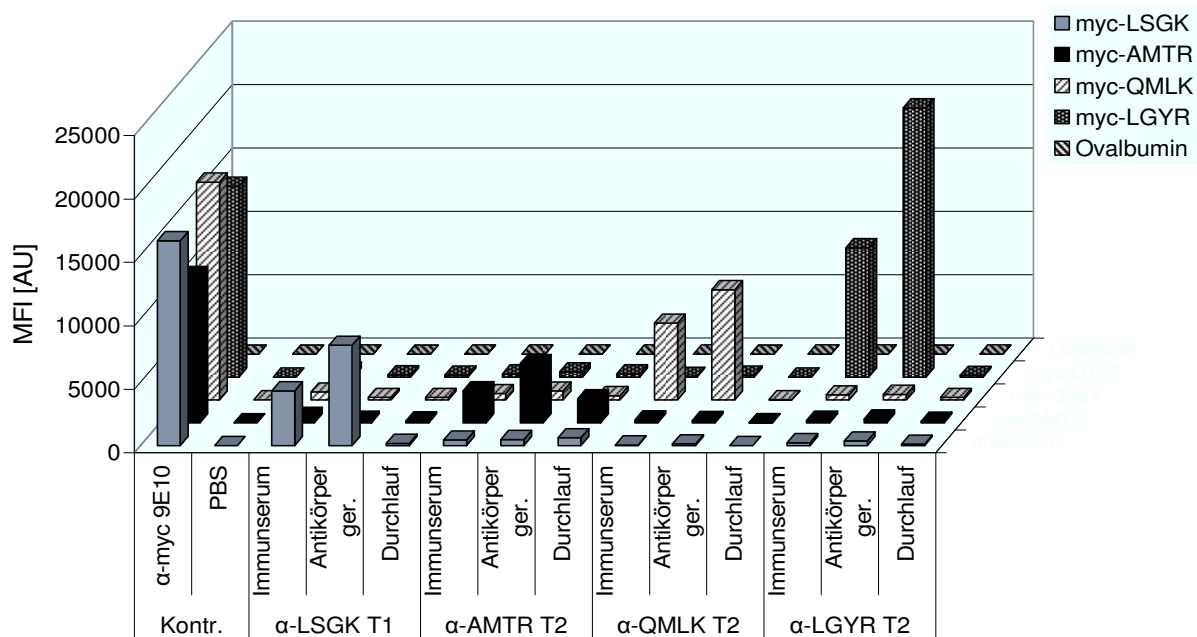


Abbildung 3.6 Test der Aufreinigung von Antikörpern mittels Mikrosphären-basiertem Peptid-Mikroarray

Zur Überprüfung der Funktionalität der aufgereinigten Antikörper und der Aufreinigungseffizienz wurde ein Mikrosphären-basierter Peptid-Mikroarray eingesetzt. Auf jeder Mikrosphärenpopulation wurde eine Sorte Peptide immobilisiert. Die Mikrosphären wurden vereinigt und mit dem zur Aufreinigung verwendeten Immuneserum (1:50.000), dem gereinigten Antikörper (0,1 µg/mL) und dem Durchlauf (1:25.000) inkubiert. Zur Kontrolle wurden PBS und ms anti-c-myc (1 µg/mL) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch einen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten antispeziespezifischen Antikörper.

3.4 Charakterisierung der Epitope der polyspezifischen Antikörper

Um detaillierte Informationen über das Epitop der terminusspezifischen Peptidantikörper zu bekommen, wurden im Mikrosphären-basierten Assay Positionsbibliotheken eingesetzt. Mit diesem Assay lässt sich herausfinden, welche Bedeutung die einzelnen Aminosäuren der Sequenz für die Erkennung und Bindung durch den Antikörper haben.

Die vier zur Immunisierung verwendeten Sequenzen wurde positionsspezifisch randomisiert, ein Aminosäureaustausch an jeder Position im Epitop vorgenommen (Tabelle 3.6). Bei der Synthese der Positionsbibliotheken wurde an der Austauschposition ein Gemisch der 19 proteinogenen Aminosäuren und Aminobuttersäure (anstatt Cystein) eingesetzt. Die Immobilisierung der Positionsbibliotheken auf die Mikrosphären erfolgte

wie zuvor beschrieben. Die Mikrosphärenpopulationen wurden vereinigt und mit dem entsprechenden Immuns serum inkubiert. Die gemessenen Signale der Originalsequenzen ohne Aminosäureaustausch wurden auf 100% gesetzt und die Signale der Positions-bibliotheksequenzen relativ dazu dargestellt. Je höher das generierte Signal, desto unbedeutender ist die der Austauschposition entsprechenden Aminosäure (in der Darstellung durch ein X markiert) für die Bindung des Antikörpers.

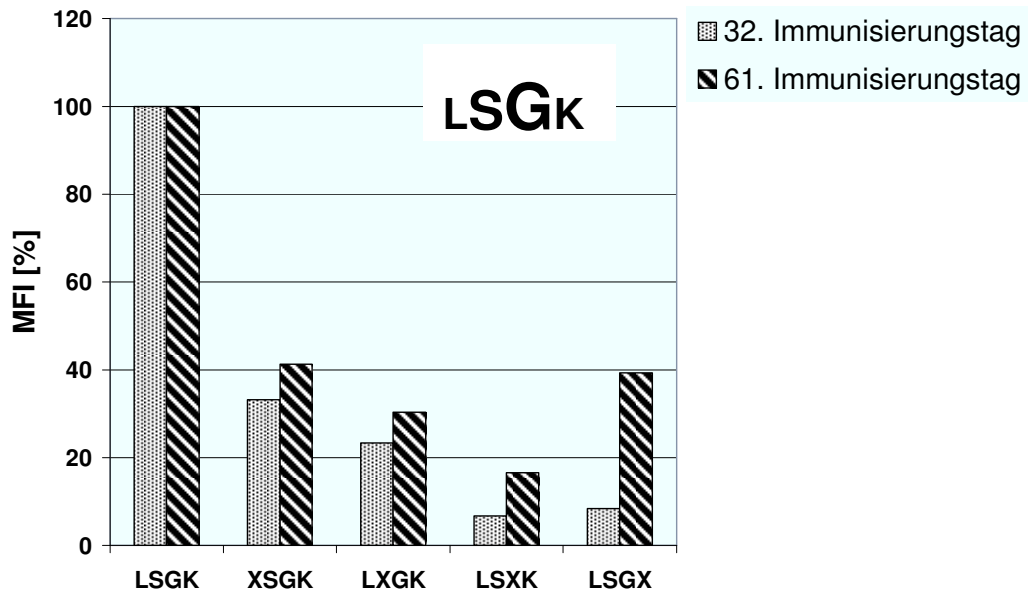
Tabelle 3.6 Epitopenalyse mit Hilfe von Peptidpositionsbibliotheken

Für die Charakterisierung des Epitops der generierten Antikörper wurden Positionsbibliotheken eingesetzt. Jede der vier Aminosäuren eines jeden Epitops wird bei der Synthese zufällig durch eine von 19 proteinogenen Aminosäuren ersetzt. Die jeweilige Austauschposition ist durch ein X markiert.

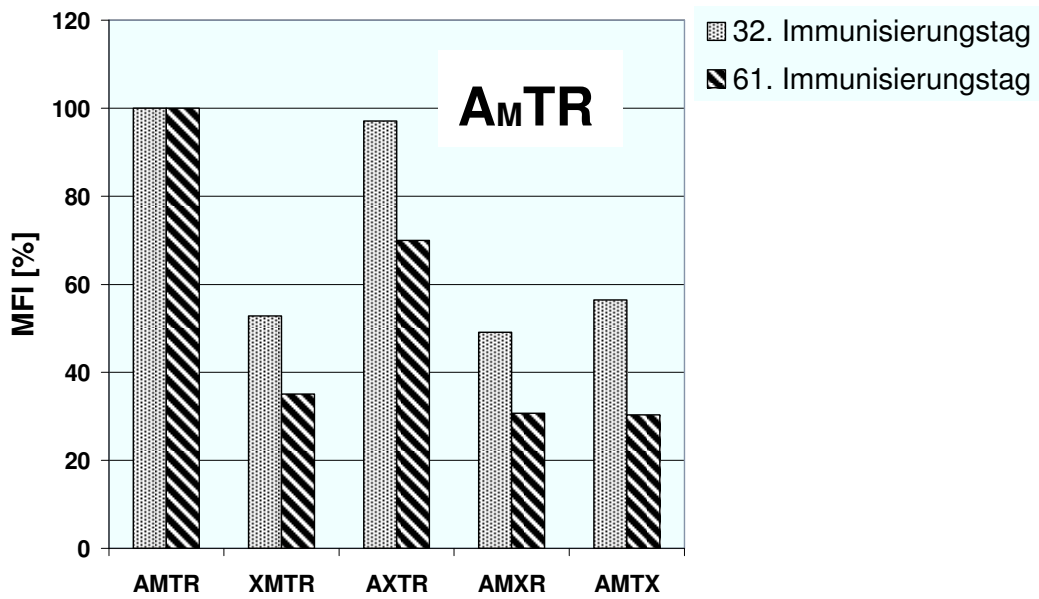
anti-LSGK T1	anti-AMTR T2	anti-QMLK T2	anti-LGYR T2
CEQKLISEEDL LSGX	CEQKLISEEDL AMTX	CEQKLISEEDL QMLX	CEQKLISEEDL LGYX
CEQKLISEEDL LSXK	CEQKLISEEDL AMXR	CEQKLISEEDL QMXK	CEQKLISEEDL LGXR
CEQKLISEEDL LXGK	CEQKLISEEDL AXTR	CEQKLISEEDL QXLK	CEQKLISEEDL LX YR
CEQKLISEEDL XSGK	CEQKLISEEDL XMTR	CEQKLISEEDL XMLK	CEQKLISEEDL XGYR

Im Verlauf der Immunantwort ist nach der dritten Antikörperinjektion zum Teil noch eine deutliche Verschiebung der Reaktivität auf bestimmte Positionen des Epitops zu sehen. Im Fall des anti-LSGK T1 Serums scheint die Bedeutung des Lysins an der letzten Position der Sequenz für die Antikörperbindung an Bedeutung zu verlieren. Im Fall des anti-QMLK T2 Serums gewinnt das Glutamin an erster Position der Sequenz dagegen an Bedeutung für die Antikörperbindung.

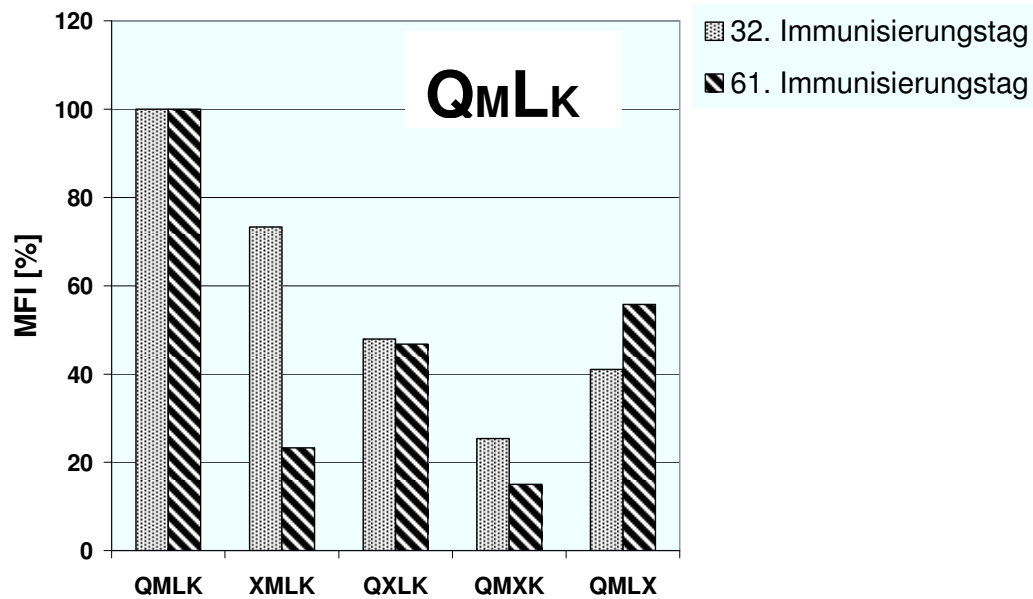
(a) anti-LSGK T1 Serum



(b) anti-AMTR T2 Serum



(c) anti-QMLK T2 Serum



(d) anti-LGYR T2 Serum

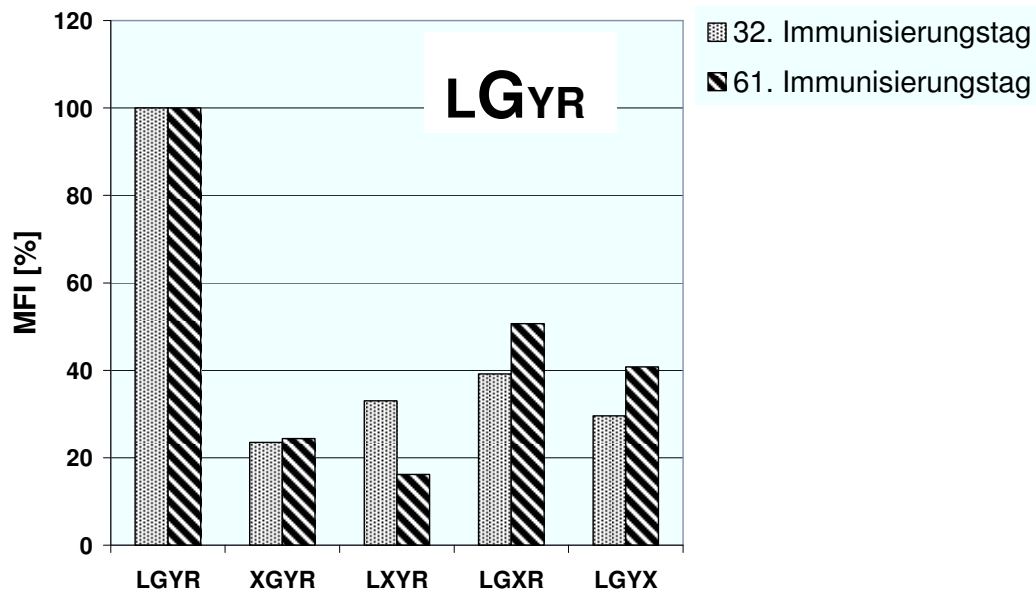


Abbildung 3.7 Antikörpercharakterisierung mittels auf Mikrosphären immobilisierten Positionsbibliotheken

Zur Charakterisierung des Epitops wurden die auf Mikrosphären immobilisierte Positionsbibliotheken mit den entsprechenden Antisera des 32. und des 61. Immunisierungstags (1:100.000) inkubiert. Die Austauschposition der Aminosäuren ist mit einem X gekennzeichnet. Die Detektion erfolgt durch einen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten antispeziespezifischen Antikörper.

Die Analyse der generierten polyklonalen Seren hat gezeigt, dass die Anwesenheit aller vier Aminosäuren zur höchsten Reaktivität führt. Naturgemäß sind jedoch nicht alle vier Aminosäuren des jeweiligen Epitops für die Bindung des Antikörpers von gleicher Bedeutung. Zu erwarten ist, dass Sequenzen gebunden werden, die gering vom verwendeten Antigen abweichen, was die Größe des berechneten Subproteoms vergrößert, was zwar die Auflösung erhöht, die Sensitivität jedoch beeinträchtigen könnte.

3.5 Einsatz der Antikörper zur Immunaффinitätsanreicherung

Die charakterisierten Antikörper sollten zur Reduktion der Komplexität von Proben vor der MS-Analyse in einer Immunaффinitätschromatographie eingesetzt werden. In Analogie zur SISCAPA Technik (Anderson *et al.* 2004) sollten peptidspezifische Antikörper auf einer festen Phase immobilisiert und zur Anreicherung spezifischer Peptide aus verdauter komplexer Probe eingesetzt werden. Anderson und Kollegen konnten mit dieser Strategie die Identifizierung und Quantifizierung von niedrig konzentrierten Analyten bereits demonstrieren.

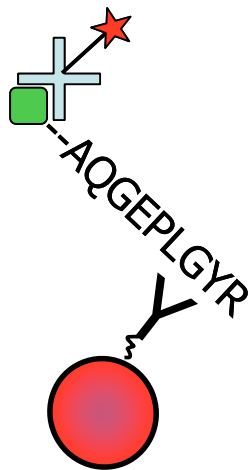
3.5.1 Funktionalitätstest der Antikörper

In einem ersten Schritt wurden die Antikörper für diese Anwendung mit einem Mikrosphären-basierten Assaysystem getestet. Zur Herstellung der Affinitätsmatrix werden die aufgereinigten Antikörper unter Verwendung von EDC/NHS-Chemie auf der carboxylierten Oberfläche der Mikrosphären immobilisiert. Die gekoppelten Mikrosphären wurden mit Peptiden, an deren N-Terminus sich ein Biotin befindet, inkubiert. Die neun Aminosäuren lange Peptidsequenz entspricht dem C-Terminus der vier gewählten β -Cateninfragmente und enthält somit das Epitop der Antikörper. Vom Antikörper gebundenes Peptid wurde über ein Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat detektiert.

Tabelle 3.7 Immunaффinitätsanreicherung mit artifiziiellen Peptiden

Um zu testen, ob die Antikörper zur Anreicherung von Peptiden eingesetzt werden können, werden die aufgereinigten Antikörper auf Mikrosphären immobilisiert und mit Biotin konjugierten Peptiden inkubiert. Die Detektion erfolgt über die Bindung eines Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugats.

Peptidbezeichnung	Sequenz
Biot-LSGK	Biotin-TTAPSLSGK
Biot-AMTR	Biotin-DGGQYAMTR
Biot-QMLK	Biotin-LAEPSQMLK
Biot-LGYR	Biotin-AQGEPLGYR



Nachweisprinzip Mikrosphären-basierter Funktionalitätstest

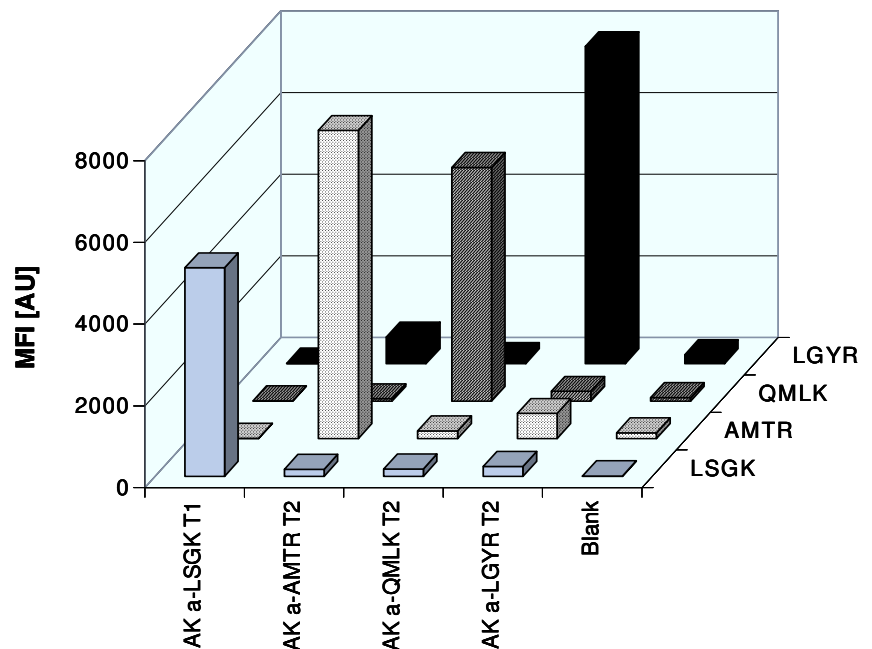


Abbildung 3.8 Funktionalitätstest von immobilisierten Antikörpern mittels Mikrosphären-basiertem Protein-Mikroarray

Links ist der Aufbau des Assays schematisch dargestellt. Es wird geprüft, ob die gereinigten Antikörper, gebunden an eine feste Phase, zur Affinitätsanreicherung eingesetzt werden können. Das Diagramm zeigt die Reaktivitäten der an eine feste Phase gekoppelten Antikörper nach der Inkubation mit 1 μ M biotinyliertem Peptid. Die Detektion erfolgt über ein Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat.

Wie Abbildung 3.8 zeigt, sind die Antikörper nach der Kopplung an eine feste Phase funktionsfähig und können zur Herstellung einer Affinitätsmatrix, welche das

entsprechende Peptid anreichert, verwendet werden. Zwischen den Peptidsequenzen AMTR und dem Antikörper anti-LGYR sowie dem Peptid LGYR T2 und dem Antikörper anti-AMTR T2 sind geringe Kreuzreaktivitäten zu erkennen.

3.5.2 Herstellung einer Affinitätsmatrix zur Anreicherung tryptischer Peptidfragmente

Zur Anreicherung tryptischer Proteinfragmente aus komplexer Probe werden die Antikörper auf mit Protein G überzogenen Mikrosphären immobilisiert. Der erfolgreiche Einsatz dieses Materials zur orientierten Immobilisierung von Antikörpern und die Verwendung in der Flüssigkeitschromatographie wurden in der Literatur (Govorukhina *et al.* 2003) bereits beschrieben. Eine große Oberfläche und die Fähigkeit hohe Drücke und Flussraten auszuhalten machen den Einsatz dieser Mikrosphären als feste Phase in Chromatographiesäulen möglich. Das auf den Mikrosphären vorhandene Protein G ist in der Lage Immunglobuline des Isotyps IgG an der Fc-Region zu binden. Um die stabile Kopplung der Antikörper auf der Matrix zu erreichen und dadurch eine mehrfach Verwendung des Materials zu ermöglichen, werden die Immunglobuline mit den Mikrosphären kovalent quervernetzt.

Zu der Mikrosphärensuspension wurde affinitätsgereinigte Antikörperlösung gegeben und inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Überprüfung der Kopplungseffizienz im Photometer gemessen. Es konnte eine Kopplungseffizienz zwischen 91% und 96% erreicht werden.

Zu Herstellung der Säulen wurde ein PEEK-Zylindergehäuse (4 mm x 10 mm) verwendet. Die gekoppelten Mikrosphären wurden mit einer Spritzenpumpe in das Zylindergehäuse überführt. Nach dem Befüllen wurde die Säule mit PEEK-Fritten verschlossen. Jede Säule enthielt ca. 0,5 mg immobilisierte Antikörper.

Da die tatsächliche Kapazität der Affinitätsmatrix über die Menge an gekoppeltem Antikörper nur unzureichend bestimmt werden kann, werden die Kapazitäten der hergestellten Antikörpersäulen mit synthetischen Peptiden an deren N-Terminus der Farbstoff Dinitrophenol (DNP) gekoppelt ist, getestet. Die Menge im Eluat befindlichen Peptid-Farbstoff-Konjugats wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 349 nm bestimmt. Die Kapazität der Säulen lässt sich durch Elution der gebundenen Peptide nach Beladung im Überschuss abschätzen. Die Menge an gebundenem Peptid wurde über eine mit dem jeweiligen Dinitrophenol-Peptid vermessene Standardreihe bestimmt.

Tabelle 3.8 Bestimmung der Säulenkapazität mit DNP-Peptid-Konjugat (LGYR)

Applizierte Peptidmenge [µg]	Peakfläche [mAU*Minuten]	Peptid [µg]
0,1	0,405	0,16
0,5	0,907	0,31
1,0	2,677	0,86
5,0	3,330	0,90
10,0	2,810	0,80

Wurde trotz höherer Menge an appliziertem Peptid keine Zunahme an gebundenem Peptid mehr verzeichnet, wurde dieser Wert zur Berechnung der Säulenkapazität herangezogen. Unter Einbeziehung der jeweiligen Standardreihen ergeben sich Säulenkapazitäten zwischen 0,14 und 0,68 nmol. Dies sind 3% -15% der theoretisch bestimmten Kapazität, welche über die auf der Säule immobilisierte Menge an Antikörper berechnet wurde. Als Grund für die niedrige tatsächliche Säulenkapazität wird die Quervernetzung der Antikörper vermutet.

3.5.3 Funktionalitätstest der Affinitätsmatrix mit Peptidgemisch

Der Aufbau des eingesetzten Systems erlaubt es, mehrere Säulen direkt hintereinander zu koppeln. Durchführbar wird dieses, da jeder immobilisierte Antikörper andere Analyten bindet. Um die Funktionalität dieses Aufbaus zu testen, wurden die vier hintereinander geschalteten Säulen mit Peptidgemisch (je 5 µM / Peptid) beladen. Ungebundene Peptide wurden durch Spülen mit Bindepuffer entfernt. Zur Elution wurden die Säulen voneinander getrennt und an eine Säule mit C18-Material gekoppelt. Die auf der hydrophoben Säule gebundenen Peptide wurden durch Spülen entsalzt und anschließend von der hydrophoben Säule eluiert, fraktioniert, auf eine Probenplatte pipettiert und mittels MALDI-MS analysiert. Die detektierten Peaks werden anschließend fragmentiert und per Datenbanksuche identifiziert.

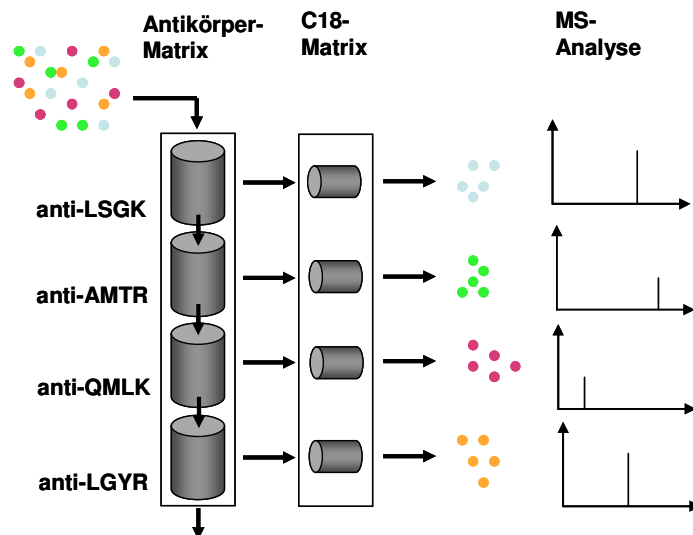


Abbildung 3.9 Schematische Darstellung der TXP Immunaffinitäts-MS

Schematische Darstellung der Anreicherung von tryptischen Proteinfragmenten mit hintereinander geschalteten Immunaffinitätssäulen und anschließenden Identifizierung über massenspektrometrische Analyse.

Für die Analyse wurden synthetische Peptide eingesetzt. LSGK-, QMLK- und LGYR-Peptid entsprechen den natürlichen tryptischen Spaltprodukten des humanen β -Catenins. Da das AMTR-Peptid mit 41 Aminosäuren zu lang für die Synthese ist, wurde ein Konstrukt eingesetzt. Es wurden 8 Aminosäuren des N-Terminus mit 10 Aminosäuren des C-Terminus über drei Abstandshalter-Moleküle verbunden. Dieses Konstrukt, in dem eine Deletion von 23 Aminosäuren vorliegt, kann nicht über einen Datenbankabgleich identifiziert werden. Es konnte jedoch aufgrund seines bekannten Molekulargewichtes zugeordnet werden. In Tabelle 3.9 sind die durch Fragmentierung und Datenbankabgleich identifizierten Peptide aufgeführt.

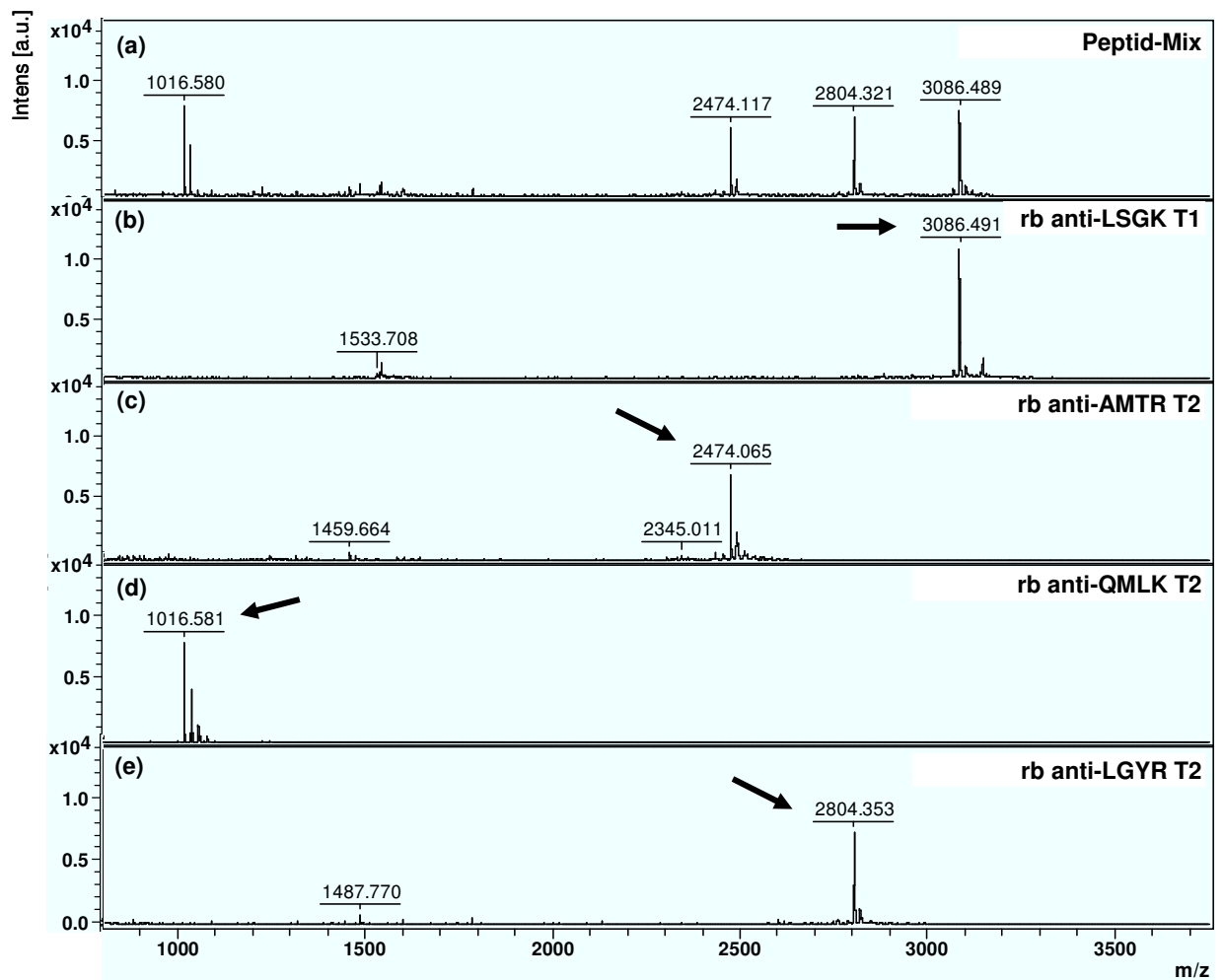


Abbildung 3.10 Anreicherung und Identifizierung synthetischer Peptide

Die vier Peptide wurden in einem Gemisch (a) vereinigt über vier hintereinander geschaltete Immunaффinitätsäulen chromatographisch angereichert. Nach der Adsorption wurden die Säulen voneinander getrennt und eluiert. Die Eluate wurden massenspektrometrisch analysiert ((b), (c), (d) und (e)). Die erwarteten Signale sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die detektierten Signale wurden fragmentiert und über einen Datenbankabgleich identifiziert. Ausnahme ist das AMTR-Fragment, da es sich hier um ein artifizielles Konstrukt handelt, welches nur über sein bekanntes Molekulargewicht zugeordnet werden kann.

Tabelle 3.9 Auflistung affinitätsangereicherter und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierter Peptidsequenzen

Die von den jeweiligen Antikörpern gebundenen Peptide wurden eluiert, massenspektrometrisch analysiert und nach der Fragmentierung mit der SwissProt Datenbank abgeglichen.

Antikörper	m/z	Sequenz	ID
	3086,491	AAVSHWQQQSYLD ^S GIHSGATTTAPSLSGK	CTNB1_HUMAN
α-LSGK T1	3101,480	AAVSHWQQQSYLD ^S GIHSGATTTAPSLSGK + Oxid. (HW)	CTNB1_HUMAN
	1533,708	nicht identifiziert	-
α-AMTR T2	2474,065	GNPEEEDV-AAA-DIDGQYAMTR	
	1016,581	LAEPSQMLK	CTNB1_HUMAN
α-QMLK T2	1038,567	LAEPSQMLK + Cation:Na (DE)	CTNB1_HUMAN
	1054,554	LAEPSQMLK + Cation:Na (DE); Oxid. (M)	CTNB1_HUMAN
	2804,353	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEPLGYR	CTNB1_HUMAN
α-LGYR T2	2820,348	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEPLGYR.Q + Oxid. (M)	CTNB1_HUMAN
	1487,708	nicht identifiziert	-

Dieser Versuch zeigt, dass die gegen kurze terminale Sequenzen generierten und auf einer festen Phase immobilisierten Antikörper in der Lage sind, das entsprechende Fragment aus einem Peptidgemisch spezifisch anzureichern. Die Probenfraktionierung über in Reihe geschaltete Immunaффinitätssäulen, die anschließende separate Elution auf eine Umkehrphasenmatrix und die folgende massenspektrometrische Identifizierung funktionieren gut und das System kann für die Analyse biologischer Proben eingesetzt werden. Weitere in den Eluaten enthaltene Peaks können in den meisten Fällen auf Natriumaddukte oder Oxidationsprodukte des jeweiligen Peptides zurückgeführt werden.

3.6 Immunaффinitäts-MS von enzymatisch verdauten biologischen Proben

Das mit synthetischen Peptiden etablierte Assaysystem wurde zur Analyse von verschiedenen biologischen Proben eingesetzt.

3.6.1 Anreicherung und Nachweis tryptischer β -Cateninfragmente aus überexprimierenden *E.coli*

Um zu testen, ob das Assaysystem in der Lage ist, Zielmoleküle spezifisch aus komplexem Gemisch anzureichern, wurde das Extrakt einer mit β -Catenin-Plasmid transformierten *E. coli*-Kultur verwendet. Dieser Probetyp enthält überexprimiertes β -Catenin und ist weniger komplex als Maus oder humane Proben. Dieses Material wurde gewählt, da es in ausreichender Menge verfügbar ist, um Lyse- und Verdauprotokolle zu etablieren. Die hier erzielten Ergebnisse lassen Abschätzungen für den Einsatz dieser Methode zur Analyse hochkomplexer Proben zu.

Um die Expression des Fusionsproteins GST- β -Catenin in *E. coli* zu überprüfen wurden vor und nach erfolgter Induktion Proben genommen, zusammen mit dem Lysat im Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Nach erfolgreicher Induktion und Kultivierung wurden die Zellen pelletiert und lysiert. Das Lysat wurde ebenfalls im Gel aufgetrennt und angefärbt. Das Fusionsprotein war deutlich sichtbar und stellte mit ca. 1% des Gesamtproteins eine der Hauptbanden im Lysat dar. Zum Vergleich wurde gereinigtes Fusionsprotein mit auf das Gel aufgetragen (Abbildung 3.11 a).

Um die Proteingemische in Lösungen mit definierten Peptidfragmenten zu überführen wurde die Endopeptidase Trypsin eingesetzt. Hierfür wurden bekannte Protokolle getestet und geringfügig modifiziert. Es wurde 1 mg Gesamtprotein eingesetzt. Um die Spaltstellen für das Enzym besser zugänglich zu machen wurden den Proteingemischen Reduktionsmittel und Alkylierungsreagenz zugesetzt. Um maximale Aktivität des Enzyms zu gewährleisten wurde der pH-Wert der Proteinlösung mit Verdünnungspuffer eingestellt. Das Enzym wurde in einem Substrat/Enzymverhältnis von 1/40 (w/w) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Der Verdau wurden durch elektrophoretische Auftrennung und Anfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau im Polyacrylamid-Gel kontrolliert.

Zum Vergleich wurde das Lysat und die verwendete Protease mit aufgetragen (Abbildung 3.11 b).

Die verdauten Proteinfragmente sind im Bereich unter 6 kDa zu sehen. Einige schwache Banden im Bereich bis 28 kDa sind auf das verwendete Trypsin zurückzuführen. Eine Bande um die 40 kDa konnte auch unter anderen Verdaubedingungen nicht gespalten werden (Daten nicht gezeigt). Das so generierte komplexe Peptidgemisch wurde zur Überprüfung des etablierten Assaysystems eingesetzt.

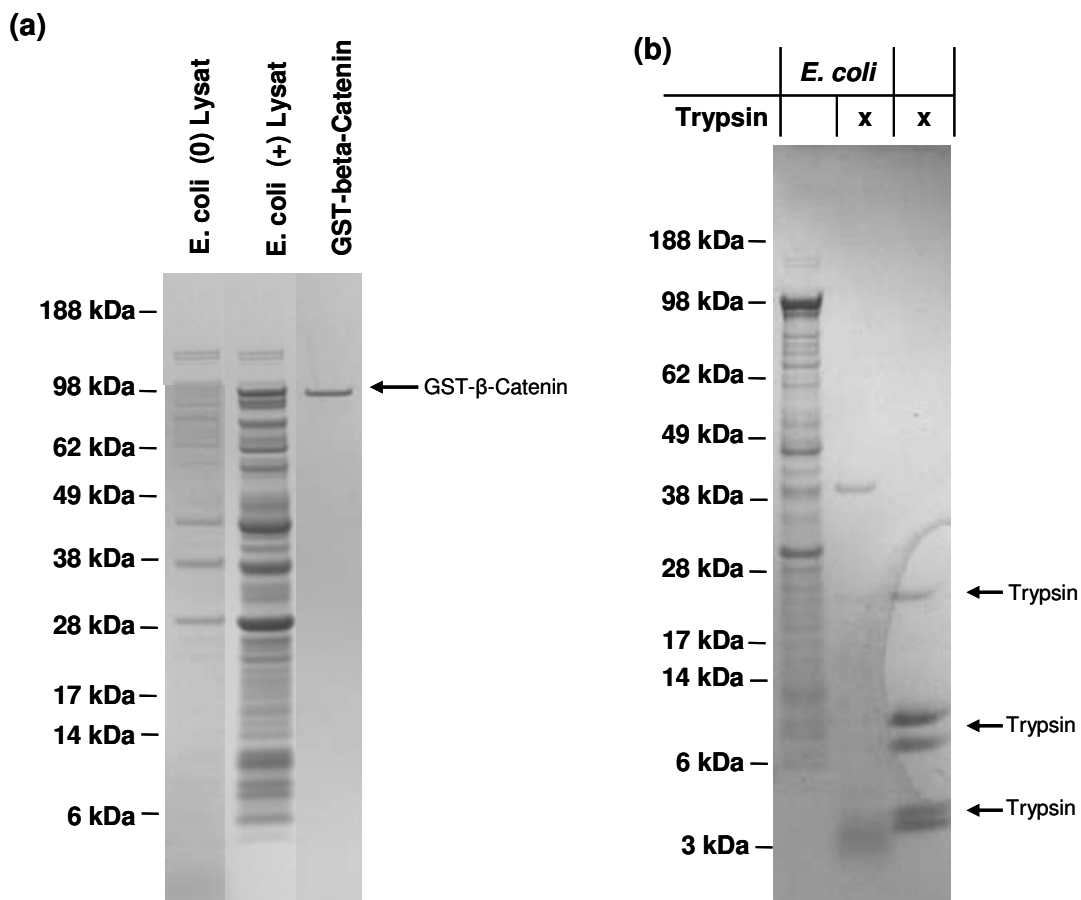


Abbildung 3.11 SDS-Gel zur Kontrolle von β -Catenin überexprimierenden *E. coli*

(a) Nach der Kultivierung wurden die Zellen lysiert und im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung angefärbt. Es wurden *E. coli*-Proben vor (0) und nach erfolgter Induktion (+) untersucht. Die Überexpression von GST- β -Catenin ist im (+)-Lysat gut zu erkennen. Zur Kontrolle wurde gereinigtes Fusionsprotein (Pfeil) aufgetragen. (b) Der Verdau wurde ebenfalls im SDS-Gel überprüft. Zur Kontrolle wurden Ausgangslysate und verwendete Protease mit aufgetragen. Autolytische Fragmente des Trypsins sind mit Pfeilen markiert.

Für die Affinitätsanreicherung wurden 50 µg verdautes Gesamtprotein unter Verwendung eines FPLC-Systems auf die vier hintereinander geschalteten Antikörpersäulen appliziert. Ungebundene Peptidfragmente wurden durch Waschen mit Bindungspuffer entfernt. Die vier Antikörpersäulen wurden von einander getrennt und nochmals kurz mit Bindepuffer gespült. Die gebundenen Peptidfragmente wurden durch Absenkung des pH-Werts eluiert und auf einer RP-Säule mit C18-Matrix aufkonzentriert. Die RP-Säulen wurden zur Entsalzung und Elution in ein Nano-LC-Gerät eingesetzt. Die Elution der auf der RP-Säule gebundenen Peptidfragmente erfolgte durch einen kontinuierlichen Gradienten. Das Eluat wurde in 10 µL-Fraktionen gesammelt. Von jeder Fraktion wurden sechs Probenpositionen auf eine vorpräparierte Probenplatte pipettiert. Pro Probenposition wurden 0,5 µl pipettiert und nach Antrocknung mit Acetonitrillösung rekristallisiert. Zum Vergleich wurden 5 µg des Gesamtverdaus in Citratpuffer aufgenommen, ohne Affinitätsanreicherung auf eine RP-Säule geladen und mit derselben Vorgehensweise entsalzt, eluiert und präpariert.

Abbildung 3.12 zeigt das Spektrum des verdauten *E. coli*-Lysats (a) vor der Affinitätsanreicherung. Es konnten 51 Signale detektiert werden, jedoch wurde keines der vier gesuchten β-Catenin-Fragmentpeaks detektiert. Nach der Affinitätsanreicherung sind alle vier gesuchten Fragmentensignale in den jeweiligen Eluaten (Abbildung 3.12 (b), (c) und (d)) zu finden. Sie konnten im MS/MS-Modus fragmentiert und mittels Datenbankabgleich identifiziert werden. Neben diesen erwarteten Fragmenten wurden weitere Signale detektiert und analysiert. In fünf Fällen handelt es sich um chemisch modifizierte Varianten der Zielfragmente und um ein Bruchstück des Zielfragmentes. Fünf weitere Peptiden konnten als β-Catenin-Fragmente identifiziert werden. Diese könnten aufgrund spezifischer Wechselwirkung mit dem jeweiligen vom Antikörper gebundenen Zielpeptid oder aufgrund unspezifischer Bindung an die Affinitätsmatrix im Eluat vorhanden sein. Sieben weitere identifizierte Fragmente stammen aus *E. coli*. Die Analyse der gebundenen *E. coli*-Fragmente zeigten terminale Sequenzen, die in mindestens drei der vier Positionen mit der Aminosäuresequenz des Antikörperepitops übereinstimmen. Drei Peptide besitzen weniger als drei Übereinstimmungen und können daher als unspezifisch gebunden betrachtet werden. Alle identifizierten Fragmente sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

So konnte mit diesem Versuch die Eignung der Lyse- und Verdaubedingungen und die grundsätzliche Anwendbarkeit des Systems für die Analyse definierter Zielfragmente aus komplexen Peptidgemischen gezeigt werden.

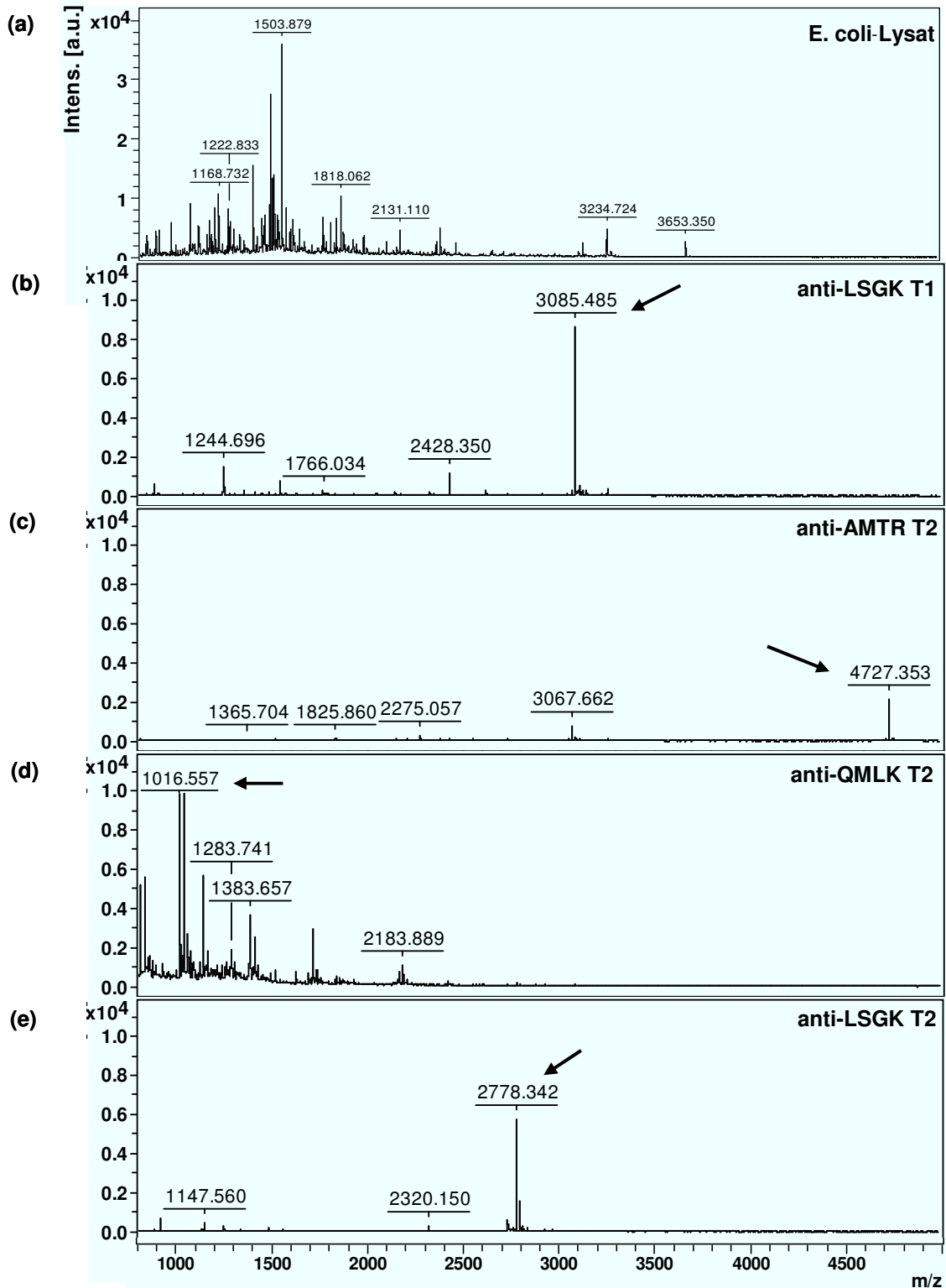


Abbildung 3.12 Immunaffinitätsanreicherung von β -Cateninfragmenten aus *E. coli*

Im Massenspektrum (a) ist das gemessene *E. coli*-Gesamtlysate dargestellt. Die Massenspektren (b), (c), (d) und (e) zeigen die nach erfolgter Immunaffinitätsanreicherung des Gesamtlysats erhaltenen Signale. Die jeweiligen Zielanalyten sind durch Pfeile markiert.

Tabelle 3.10 Identifizierte Proteinfragmente aus β -Catenin überexprimierendem *E. coli*

Aufistung der aus dem Lysat von β -Catenin überexprimierenden *E. coli* angereicherten und per Datenbanksuche identifizierten Proteinfragmente.

m/z	Sequenz	Protein	Spezies	Code
anti-LSGK T1				
1244,7	RDDEVIVLTGK	50S ribosomal protein L24	<i>E. coli</i>	RL24_ECOLI
1251,71	LSVELTSSLFR	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
1350,69	DLSDVTLGQFAGK	Thiol peroxidase	<i>E. coli</i>	TPX_ECOLI
1766,03	LILASGGPQALVNIMR	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
2428,35	GLNTIPLFVQLLYSPIENIQR	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
3101,42	AAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPSLSGK + Ox. (HW)	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
3085,49	AAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPSLSGK	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
3107,47	AAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPSLSGK + Cation:Na	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
3117,47	AAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPSLSGK + 2 Ox. (HW)	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
3253,6	MTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR	Actin, cytoplasmic 1	<i>Mus musculus</i>	ACTG_MOUSE
anti-AMTR T2				
1514,88	IDLPPFTLIGATTR	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase	<i>E. coli</i>	RUVB_ECOLI
1825,86	SDLAVIAAMNHIGVAMGR	HTH-type transcriptional regulator	<i>E. coli</i>	DSDC_ECOLI
2275,06	SQSFTQEQVADIDGQYAMTR	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
3067,66	MLGSPVDSVLFYAITTLHNLHLHQEGAK	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
4727,35	GNPEEEDVDTSQVLYEWEQGFQSFTQEQVADIDGQYAMTR	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
anti-QMLK T2				
1016,56	LAEPSQMLK	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
1038,52	LAEPSQMLK + Cation:Na	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
1383,66	HQEAEMAQNAVR	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
1711,81	WEPELNEAIPNDER	Beta-lactamase TEM	<i>E. coli</i>	BLAT_ECOLI
anti-LGYR T2				
913,59	ATLLGLGLR	50S ribosomal protein L30	<i>E. coli</i>	RL30_ECOLI
1147,56	EENPFLGWR	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	<i>E. coli</i>	PT1_ECOLI
2778,34	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEALGYR	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE
2794,33	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEALGYR + Ox. (M)	Catenin beta-1	<i>Mus musculus</i>	CTNB1_MOUSE

Im nächsten Schritt wurde die etablierte Methode für die Analyse von Zellkulturproben der Maus-Leberkarzinomzelllinie HepF1 sowie der humanen HEK 293 Zelllinie eingesetzt.

3.6.2 Nachweis von β -Cateninfragmenten aus Maus- und humanen Zelllinien

In der Tumorzelllinie HepF1 wird der Abbau des β -Catenins durch eine Punktmutation an einer Phosphorylierungsstelle im Protein verhindert. Das Protein akkumuliert im Zytosol und transloziert in den Kern, wo es als Coaktivator von Transkriptionsfaktoren wirkt.

Um die Möglichkeit zu zeigen, mit den generierten Antikörpern aus Verdaus von Proteomen verschiedener Spezies Peptide anzureichern, wurde die humane HEK 293 Zelllinie untersucht. Von großem Interesse war es, unterschiedliche Phosphorylierungszustände mit dieser Methode zu erfassen. In einem experimentellen Ansatz wurde daher der Abbau von zytosolischem β -Catenin durch Zugabe eines Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitors (Sigma-Aldrich) unterdrückt. Als Kontrolle wurde eine mit DMSO behandelte Kultur eingesetzt.

Da in den komplexen Maus- wie humanen Zelllinienproben das β -Catenin trotz Akkumulation im Lysat nicht durch Anfärbung des Gesamtproteins zu erkennen ist, wurden die generierten Proben nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und im Western Blot mit einem polyklonalen Kaninchen anti- β -Catenin Antikörper und einem Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper nachgewiesen. In beiden, der Maus- und humanen Proben ist jeweils der Abbau des β -Catenins durch eine Mutation bzw. die Gabe eines Kinaseinhibitors beeinträchtigt und somit sind deutliche Signale zu detektieren. Im unbehandelten Kontrolllysat ist ebenfalls eine schwache Bande, welche dem β -Catenin entspricht, zu sehen (Abbildung 3.13).

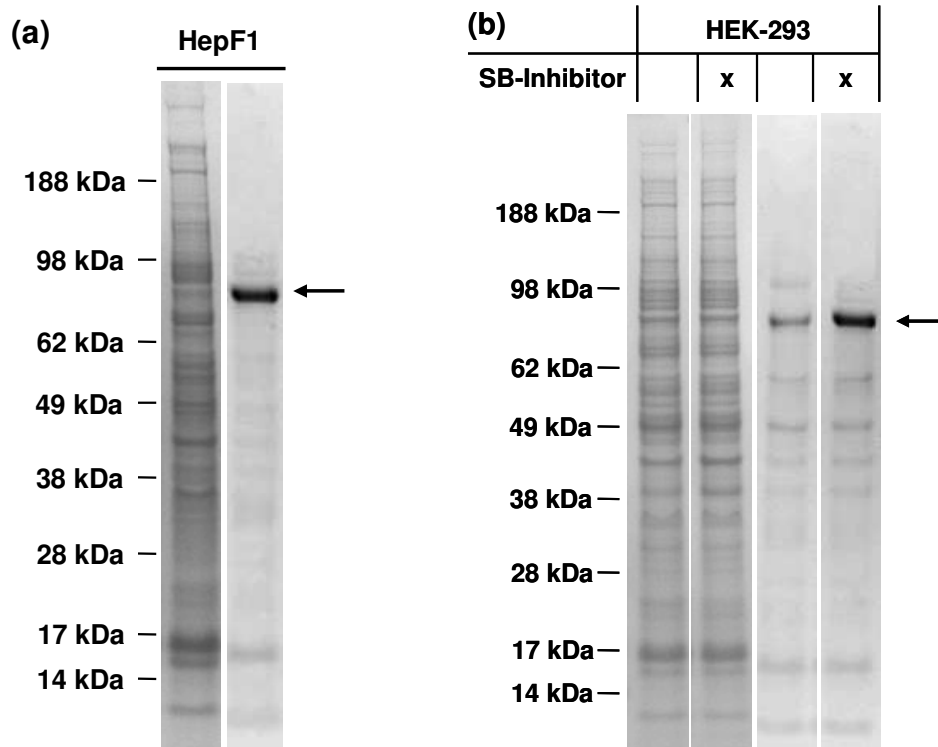


Abbildung 3.13 Coomassie-Gel und Western Blot zum Nachweis von β -Catenin

Es wurden 5 μ g der hergestellten Zellysate im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant Blau angefärbt (linke Spuren). Das Vorhandensein des Proteins β -Catenin in HepF1- und HEK 293 Zelllinien wurde durch eine Western Blot-Kontrolle nachgewiesen. Hierfür wurde das aufgetrennte Gesamtlisat elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. β -Catenin wurde indirekt durch die Bindung eines Kaninchen anti- β -Catenin Antikörpers (1:5000) und die anschließende Detektion mit einem Peroxidase-konjugierten antispeziesspezifischen Sekundärantikörper (1:4000) nachgewiesen (rechte Spuren).

Um die Proteingemische in Lösungen mit definierten Peptidfragmenten zu überführen wurde das bestehende Verdauprotokoll angewendet. Der Verdau wurden durch elektrophoretische Auftrennung und Anfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau im Polyacrylamid-Gel kontrolliert. Zum Vergleich wurde das jeweilige Lysat aufgetragen.

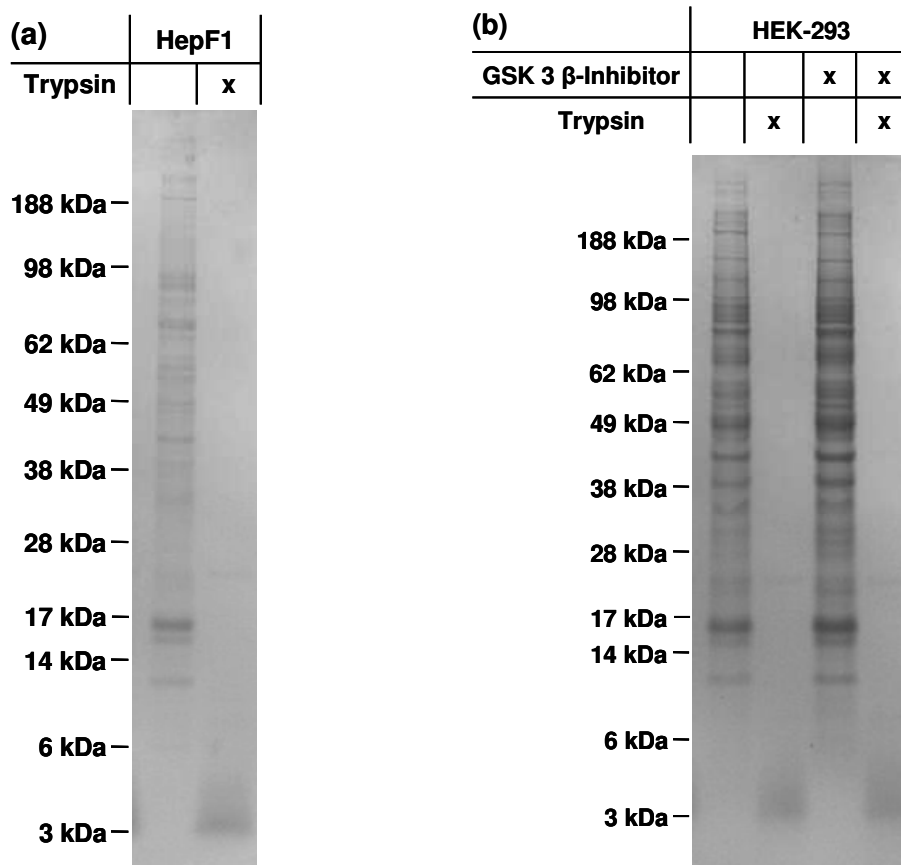


Abbildung 3.14 SDS-Gel zur Kontrolle des Lysatverdaus

Der Verdau der Zellysate wurde mittels Auftrennung und Anfärbung im Polyacrylamidgel überprüft. Hierfür wurden 5 μ g unverdautes (links) HepF1-Lysat (a) bzw. HEK 293-Lysat (b) und 5 μ g verdautes Zellysat (rechts) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Die entstandenen tryptischen Fragmente sind im untersten Bereich des Geles sichtbar.

3.6.3 Affinitätsanreicherung und Nachweis von tryptischen Fragmenten mit spezifischen Termini aus einer Maus-Zelllinie

Für die Affinitätsanreicherung wurden 100 μ g verdautes Gesamtprotein eingesetzt. Die Affinitätsanreicherung und Elution erfolgte wie im vorherigen Kapitel beschrieben. In einem Ansatz (H1) wurde das Eluat mittels MALDI-Spotter kontinuierlich auf eine vorpräparierte Probenplatte gedruckt. Da mit dieser Methode der Probenpräparation sehr viel Zeit und viele Spots benötigt werden, wurden im zweiten Ansatz vier Fraktionen mit je 10 μ l Volumen gesammelt. Von jeder Fraktion wurden sechs Probenpositionen präpariert. Dies verringerte die Anzahl von 80 auf 24 Spots und damit die benötigte Analysendauer. Diese Versuchsanordnung wurde zweimal durchgeführt (H2 und H3). Da in den ersten

10 µl in beiden Fällen keine Proteinfragmente gefunden wurden, wurden in einem weiteren Versuch (H4) die ersten 10 µL Eluat verworfen und eine Fraktion von 30 µL gesammelt. Mit dieser Fraktion wurden ebenfalls sechs Probenpositionen präpariert. Als Vergleichsansatz wurden 5 µg des Gesamtverdaus in Citratpuffer aufgenommen, direkt auf eine RP-Säule geladen und mit derselben Vorgehensweise eluiert und präpariert.

Die MALDI TOF/TOF-Analyse erfolgte mit den etablierten Bedingungen. Für die Datenbanksuche wurde die Taxonomie *Mus musculus* gewählt. Es wurden maximal 150 ppm Massentoleranz für die Fragmentspektren und 0,75 Da Massentoleranz für die Mutterionen zugelassen. Ausnahmen wurden für höhere Massen ab 3700 Da zugelassen, da sich diese außerhalb des kalibrierten Massenbereiches befinden und es hierdurch zu größeren Abweichungen kommen kann. Es wurden nur Ergebnisse mit einem P-Wert <0,05 akzeptiert.

In der Signalliste, die aus dem gemessenen Gesamtlysat resultiert, konnte keines der Zielfragmente detektiert werden. Beide Antikörpersäulen anti-LSGK T1 und anti-QMLK T2 lieferten nur eine geringe Anzahl an Signalen mit niedriger Intensität. Die detektierten Signale ließen sich nur schlecht fragmentieren und konnten nicht identifiziert werden. Da die vorangegangenen Versuche mit Peptid-Mix und verdautem *E. coli*-Lysat positive Ergebnisse zeigten, wurden diese Versuche mit den beiden Säulen mehrfach wiederholt, um die Funktionalität der auf der Säule immobilisierten Antikörper zu überprüfen. Die Versuche lieferten dieselben, positiven Ergebnisse. Ein erneuter Versuch mit verdautem Maus-Zelllysat bestätigte das oben beschriebene Resultat für beide Antikörpersäulen.

Die Gesamtpeakliste resultierend aus der Affinitätsanreicherung mit anti-LGYR T2 umfasst insgesamt 75 Signale. Von diesen konnten 48 fragmentiert und über einen Datenbankabgleich 38 Proteinen zugeordnet werden. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.11 dargestellt. Das Zielprotein konnte in allen vier Versuchen angereichert und detektiert werden.

In allen Proben konnte das Zielfragment mit verschiedenen Modifikationen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten 15 weitere Proteinfragmente angereichert und identifiziert werden, welche eine mit dem Zielfragment identische terminale Peptidsequenz aus vier Aminosäuren aufweisen.

In einer weiteren Gruppe angereicherter Fragmente wurden Peptide mit Sequenzen identifiziert, die einen Aminosäureaustausch an der dritten Position der vier terminalen Aminosäuren zeigten. Am häufigsten wurde der Austausch von Tyrosin (Y) gegen

Phenylalanin (F) beobachtet, was in der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Aminosäuren begründet sein könnte.

In drei Fällen ist die Anzahl an der mit der Zielsequenz übereinstimmende Aminosäuren an der entsprechenden Position kleiner als drei und muss unspezifischen Bindungen an die Affinitätsmatrix zugeschrieben werden. Die Probenpräparation, die in Versuch H3 und H4 angewendet wurde zeigt die meisten identifizierten Proteinfragmente. Die vier Experimente zeigen Wiederfindungsraten von 69% (H1), 95% (H2), 90% (H3) und 77% (H4)

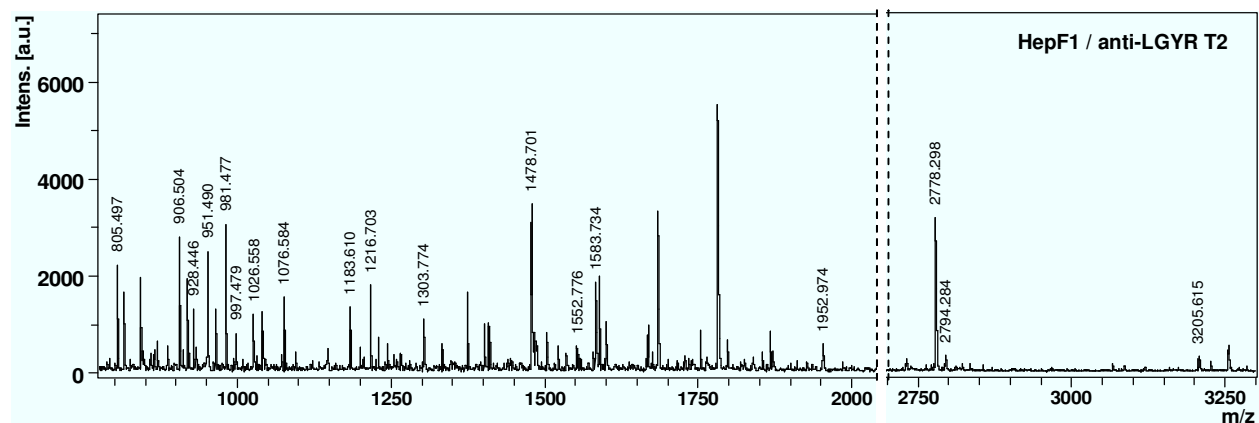


Abbildung 3.15 MALDI-TOF-Spektrum eines HepF1-Verdau nach Immunaffinitätsanreicherung mit anti-LGYR T2

Massenspektrum der verdauten HepF1-Zelllinie nach Immunaffinitätsbasierter Anreicherung mit anti-LGYR T2. Dargestellt ist die Fraktion aus Ansatz H4. Annotiert sind die später durch MALDI TOF/TOF-Analyse identifizierten Proteinfragmente mit der C-terminalen Zielsequenz LGYR. Der Bereich zwischen 2000 und 2750 Da, in welchem sich keine Zielfragmente befanden, wurde aus Darstellungsgründen ausgespart.

Die Gesamtpeakliste resultierend aus der Affinitätsanreicherung mit anti-AMTR T2 umfasst insgesamt 61 Peaks. Von diesen konnten 42 Peaks fragmentiert und über einen Datenbankabgleich 39 Proteinen zugeordnet werden. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.12 dargestellt. Das Zielprotein konnte in allen vier Versuchen erfolgreich angereichert und analysiert werden. Weitere Fragmente, die einen mit dem Zielfragment identischen Terminus besitzen, konnten nicht identifiziert werden.

Die zweite Gruppe angereicherter und identifizierter Fragmente zeigt einen Aminosäureaustausch an der zweiten Position der vier terminalen Aminosäuren. Besonders häufig wurde der Austausch vom Methionin durch Serin (S) und Threonin (T) beobachtet. Auch hier wurden einige an die Affinitätsmatrix unspezifisch bindende Proteinfragmente detektiert.

Die vier Experimente zeigen Wiederfindungsraten von 61% (H1), 76% (H2), 90% (H3) und 68% (H4).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass die etablierte Immunaффinitätsbasierte Probenfraktionierungsstrategie für die Anreicherung von Subproteomen aus komplexen Proben zur anschließenden MS/MS-Analyse eingesetzt werden kann.

Tabelle 3.11 Mit anti-LGYR angereicherte und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierte Peptide aus verdautem HepF1-Lysat

Aufistung der mit anti-LGYR T2 aus verdautem HepF1 Lysat angereicherten, massenspektrometrisch analysierten und per Datenbankuche identifizierten Proteinfragmente.

m/z	Tag	Sequenz	Protein	ID	H1	H2	H3	H4
Originalsequenz								
805.5	LGYR	IAILGYR	GTP-binding protein Rheb	RHEB_MOUSE	x	x	x	x
906.5	LGYR	VAIDLGYR	Aldose reductase	ALDR_MOUSE	x	x	x	x
928.4	LGYR	EQYLGYS	Nucleoporin p58/p45	NUPL1_MOUSE	x	x	x	x
951.5	LGYR	TLDNLGYR	Adducin 3	Q3UNK1_MOUSE		x	x	x
981.5	LGYR	MLDNLGYR	Beta-adducin	ADDB_MOUSE	x	x	x	x
997.5	LGYR	MLDNLGYR + Ox. (M)	Beta-adducin	ADDB_MOUSE	x	x	x	x
1026.6	LGYR	YLELLGYR	Protein transport protein Sec31A	SC31A_MOUSE	x	x	x	x
1076.6	LGYR	LNIGGGGLGYR	ATP-dependent RNA helicase	DDX42_MOUSE	x	x	x	x
1183.5	LGYR	VDVFTNLGYR	THO complex subunit 6 homolog	THOC6_MOUSE	x	x	x	x
1216.7	LGYR	VPLQGTLLGYR	Tyrosine-protein kinase receptor UFO	UFO_MOUSE	x	x	x	x
1303.7	LGYR	ALLLTLGNLGYR	Gag-pro-pol polyprotein	Q1KYM2_MOUSE	x	x	x	x
1478.7	LGYR	GLAVSDNGPCLGYR	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	ACSL5_MOUSE	x	x	x	x
1552.6	LGYR	VAAQQGFDDLGYR	Zinc finger MIZ domain-containing protein	ZMIZ1_MOUSE	x	x		x
1583.7	LGYR	ENAEISMDVSLGYR	Integral membrane protein GPR177	GP177_MOUSE		x		x
1953.0	LGYR	VIFTCQATANPEILGYR	Kin of IRRE-like protein	KIRR1_MOUSE	x	x	x	x
2778.3	LGYR	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEALGYR	Catenin beta-1	CTNB1_MOUSE	x	x	x	x
2794.3	LGYR	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEALGYR + Ox. (M)	Catenin beta-1	CTNB1_MOUSE		x	x	x
2810.5	LGYR	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEALGYR + Ox. (HW); (M)	Catenin beta-1	CTNB1_MOUSE		x	x	
2826.4	LGYR	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEALGYR + DiOx. (M); Ox. (HW)	Catenin beta-1	CTNB1_MOUSE	x		x	
3205.7	LGYR	VEDVPIPVHYPPEQQGLWGGEGLLILGYR	39S ribosomal protein L28, mitochondrial	RM28_MOUSE	x	x		x
Austausch AS Position 3 Y <-> F								
919.6	LGFR	NSLILGFR	Leucine-rich PPR motif-containing protein	LPPRC_MOUSE	x	x	x	x
1582.9	LGFR	QPELPEVIAMLGFR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q)	Catenin delta-1	CTND1_MOUSE	x	x	x	
1598.9	LGFR	QPELPEVIAMLGFR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q); Ox. (M)	Catenin delta-1	CTND1_MOUSE	x	x	x	
1599.9	LGFR	QPELPEVIAMLGFR	Catenin delta-1	CTND1_MOUSE	x	x	x	x
1615.9	LGFR	QPELPEVIAMLGFR.L + Ox. (M)	Catenin delta-1	CTND1_MOUSE	x	x	x	
1664.9	LGFR	LIAELGSTSITSLGFR	Protein FAM3C	FAM3C_MOUSE	x	x	x	
1871.9	LGFR	ALYDFEPENDGELGFR	Endophilin-A2	SH3G1_MOUSE	x	x	x	

m/z	Tag	Sequenz	Protein	ID	H1	H2	H3	H4
Austausch AS Position 3 Y <-> L								
870,5	LGLR	SLPDLGLR	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	PYC_MOUSE			x	x
1041,7	LGLR	ALQSLALGLR	Ras GTPase-activating-like protein	IQGA1_MOUSE		x	x	x
1199,8	LGLR	LEDILTGLGLR	Haloacid dehalogenase-like hydrol...	HDHD3_MOUSE			x	x
1401,7	LGLR	AGAVDWTDLGLR	182 kDa tankyrase 1-binding protein	TB182_MOUSE		x	x	x
3254,8	LGLR	AAVLVQQWVSYADTELIPAAACGATLPALGLR	Valyl-tRNA synthetase	SYVC_MOUSE	x	x	x	
Austausch AS Position 3 Y <-> E								
1486,7	LGER	QFEDFTVYLGER.T + Gln->pyro-Glu (N-term Q)	Ceruloplasmin	CERU_MOUSE				x
1503,7	LGER	QFEDFTVYLGER	Ceruloplasmin	CERU_MOUSE	x	x	x	x
1752,9	LGER	DAFQNAVLELGGGLGER	odium/potassium-transporting ATPase	AT1A1_MOUSE	x	x	x	
Austausch AS Position 3								
1046,6	LGKR	ELPSFLGKR	Protein S100-A4	S10A4_MOUSE		x	x	
1374,8	LGQR	NIYSLTPLLGQR	Epoxide hydrolase 1	HYEP_MOUSE	x	x	x	x
1409,8	LGGR	VLATTFDPYLGGR	Heat shock 70 kDa protein 4L	HS74L_MOUSE	x	x	x	x
1781,9	LGAR	LAEMPADSGYPAYLGAR	V-type proton ATPase catalytic subunit A	VATA_MOUSE	x	x	x	x
1783,9	LGNR	WGTDEAQFIYILGNR + Deamidated (NQ)	Annexin A6	ANXA6_MOUSE	x	x	x	x
1797,7	LGAR	LAEMPADSGYPAYLGAR.L + Ox. (M)	V-type proton ATPase catalytic subunit A	VATA_MOUSE	x	x	x	
2402,2	LGSR	AAASVLTTSMVTMEPGYLFGLSR	Cleavage and polyadenylation specificity factor	CPSF1_MOUSE		x		x
2576,3	LGMR	YTEHSTVGLAQWWDQLDQLGMR	Spectrin alpha chain, brain	SPTA2_MOUSE	x	x	x	
2592,2	LGMR	YTEHSTVGLAQWWDQLDQLGMR + Ox. (M)	Spectrin alpha chain, brain	SPTA2_MOUSE		x	x	
Sonstige								
965,5	IGYR	ALLCIGYR	Putative uncharacterized protein	Q8C9Y8_MOUSE		x	x	x
1521,8	FGER	TVSDLALQNAFGER.W + Deamidated (NQ)	Prickle-like protein 2	PRIC2_MOUSE		x	x	x
1927,1	IIYR	GLYQGFNVSVQGIYR	ADP/ATP translocase 2	ADT2_MOUSE		x	x	
2915,6	NAAR	VGAGAPVYLAADVLEYLTAEILELAGNAAR	Histone	H2AX_MOUSE		x	x	

Tabelle 3.12 Mit anti-AMTR angereicherte und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierte Peptide aus verdautem HepF1-Lysat

Auflistung der mit anti-AMTR T2 aus verdautem HepF1 Lysat angereicherten, massenspektrometrisch analysierten und per Datenbanksuche identifizierten Proteinfragmente.

m/z	Tag	Sequenz	Protein	ID	H1	H2	H3	H4
Originalsequenz								
4727.3	AMTR	GNPEEEDVDTSQVLYEWEQGFSQSFTQEQVADIDGQYAMTR	Catenin beta-1	CTNB1_MOUSE	x	x	x	x
Austausch AS Position 2 M <-> S								
1048.7	ASTR	GPILSFASTR	Replication factor C subunit 5	RFC5_MOUSE	x	x	x	x
1634.9	ASTR	TQMLDQEELLASTR	Kinesin-1 heavy chain	KINH_MOUSE		x		
1736.9	ASTR	ASDQLQVGVEFEASTR	Mitochondrial import receptor subunit	TOM40_MOUSE	x	x	x	x
2254.2	ASTR	SPSDPTHASAPAPPLLIPAASTR			x	x	x	
2408.3	ASTR	LEPHKQQIPIIDSTVSFGASTR	Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1	PP1R8_MOUSE	x	x	x	x
2545.4	ASTR	TQHHVEAFVEHLNGQVVVSASTR	39S ribosomal protein L18, mitochondrial	RM18_MOUSE		x		
2737.3	ASTR	GKEESCVPASQETSLGQDTS DPASTR	A kinase anchor protein 1, mitochondrial	AKAP1_MOUSE			x	
Austausch AS Position 2 M <-> T								
864.6	ATTR	GFVIATTR	Vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog	VPS18_MOUSE	x	x	x	x
1691.8	ATTR	VQGSDSDEEVVATTR	Valyl-tRNA synthetase	SYVC_MOUSE		x	x	x
1789.7	ATTR	AAVSEQPQTGGSQATTR	Ladinin-1	LAD1_MOUSE			x	x
2172.1	ATTR	SNGWILPTVYQGMYNATTR	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	ARK72_MOUSE	x	x	x	
2779.8	ATTR	FAAEHTIFASNTSSLQITNIANATTR	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial prec.	HCDH_MOUSE	x	x	x	x
3135.8	ATTR	LDFAAEHTIFASNTSSLQITNIANATTR	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial prec.	HCDH_MOUSE	x	x	x	x
Austausch AS Position 2 M <-> V								
840.8	AVTR	APIIATTR	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_MOUSE	x	x	x	x
850.8	AVTR	IFSGAVTR	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B	P2R3A_MOUSE	x	x	x	x
1422.6	AVTR	CGEMAQAASAAVTR	Valyl-tRNA synthetase	SYVC_MOUSE			x	
Austausch AS Position 2 M <-> A								
1191.8	AATR	LAPEYEAATTR	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_MOUSE	x	x	x	x
1198.7	AATR	VTAGAQPRAATTR	Protein FAM105B	F105B_MOUSE	x	x	x	x
1347.7	AATR	LAPEYEAATTR	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_MOUSE	x	x	x	x

m/z	Tag	Sequenz	Protein	ID	H1	H2	H3	H4
Austausch AS Position 2 M <-> Q								
2335.2	AQTR	MGYQCTFGVLQAGQYVQAQTR	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	DNMT1_MOUSE		x	x	
2380.6	AQTR	AQMEQLNGVLLHLESELAQTR	Keratin, type I cytoskeletal 18	K1C18_MOUSE	x	x		x
2381.2	AQTR	AQMEQLNGVLLHLESELAQTR + Deamidated (NQ)	Keratin, type I cytoskeletal 18	K1C18_MOUSE			x	
3043.7	AQTR	EAEESAVCAVEDMECSDTQVQEEAAQTR	Serine/threonine-protein kinase VRK1	VRK1_MOUSE	x	x	x	
Austausch AS Position 2								
846.4	AETR	QEIAETR	Neutrophil cytosol factor 4	NCF4_MOUSE			x	x
1170.6	ALTR	YSEPPHALTR	Ephrin type-A receptor 2	EPHA2_MOUSE			x	x
1247.7	ANTR	LFEVGGSPANTR	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta	PP2BB_MOUSE	x	x	x	x
1308.7	AGTR	ELQHVALGGAGTR	Secretory carrier-associated membrane protein 3	SCAM3_MOUSE		x	x	x
1460.8	AFTR	GNTAAYLLYAFTR	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	SYRC_MOUSE	x	x	x	x
1875.0	AWTR	GRPTSTNPIASIFAWTR	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor	IDHP_MOUSE	x	x	x	x
2210.2	AYTR	IHYVQNEPELLVAHAYTR	Heme oxygenase 2	HMOX2_MOUSE	x	x	x	x
2256.0	ACTR	EGICGSCAMNINGGNTLACTR	Succinate dehydrogenase	DHSB_MOUSE		x	x	
2320.1	AHTR	QFSLIETTAQACGEYAHTR	28S ribosomal protein S2, mitochondrial	RT02_MOUSE	x	x	x	
2735.3	AFTR	ENSLILAGGDCQLHSM DLETGAFTTR	THO complex subunit 6 homolog	THOC6_MOUSE			x	
2995.3	AGTR	SQSPSAQATAAMA AVASSCGEAAAAGAQAAGTR + Deam. (NQ); Ox. (M)	Transcription factor SOX-30	SOX30_MOUSE			x	
Sonstige								
807.6	PTIR	HLAPTIR	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	RGL1_MOUSE	x	x	x	x
1359.7	ELTR	EGLCRLELTR	Single Ig IL-1-related receptor	SIGIR_MOUSE			x	x
1532.7	ASST	HDTSASTQSTPASSR	Spectrin beta chain, brain 1	SPTB2_MOUSE			x	x
1672.1	ALSR	YSQTGNYELAVALS	Dolichyl-diphosphooligosaccharide	OST48_MOUSE	x	x		
1802.0	AISR	VYAILTHGIFSGPAISR	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	PRPS2_MOUSE	x	x	x	x
2267.4	ATSR	IIGVHQEDELLECLSPATSR	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	UBP7_MOUSE	x	x	x	x
2915.6	NAAR	VGAGAPVYLA AVLEYLTAEILELAGNAAR	Histone	H2AX_MOUSE			x	x

3.6.4 Affinitätsanreicherung und Nachweis von tryptischen Fragmenten mit spezifischen Termini aus humaner Zelllinie

Um den Einsatz der generierten Antikörper für die Analyse verschiedener Spezies zu demonstrieren, wurden humane HEK 293 Zellen eingesetzt. Um zu testen, ob unterschiedliche Zustände im Proteinstatus mit dieser Methode erfasst werden können, wurde der Abbau von zytosolischem β -Catenin durch Zugabe eines Glykogen Synthetase Kinase 3 β -Inhibitors unterdrückt. Als Kontrolle wurde eine mit DMSO behandelte Kultur eingesetzt.

Für die Affinitätsanreicherung wurden je 50 μ g des verdauten Gesamtproteins der unbehandelten und der mit Glykogen Synthetase Kinase 3 β -Inhibitor behandelten HEK-Zellen eingesetzt. Der Auftrag und die Elution erfolgten wie oben beschrieben. Es wurden vier Fraktionen mit je 10 μ l Volumen gesammelt. Mit jeder Fraktion wurden sechs Probenpositionen präpariert. Der Versuch wurde je zweimal mit verdautem Lysat aus unbehandeltem und mit Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitor Zellen durchgeführt. Die jeweiligen technischen Replikate wurden für die Auswertung zusammengefasst.

Die massenspektrometrische Analyse wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. In der Peakliste des direkt gemessenen Gesamtlysats konnte, wie bei den beiden anderen Gesamtlysaten, keines der Zielfragmente detektiert werden.

Aus der Analyse der HEK 293 Zelllinie nach der Affinitätsanreicherung mit anti-LGYR T2 resultieren insgesamt 124 Signale. Von diesen konnten 48 über Fragmentierung und über einen anschließenden Datenbankabgleich 42 Proteinen zugeordnet werden. Es konnten 13 Proteinfragmente mit der LGYR-Sequenz am C-Terminus identifiziert werden. Vier davon kommen in beiden Proben vor. Zwei konnten nur in der unbehandelten Probe nachgewiesen werden. Sieben dieser Proteinfragmente, darunter auch das Zielfragment aus β -Catenin, konnten nur in der mit Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitor behandelten Probe erfasst werden. Die zweite Gruppe angereicherter und identifizierter Fragmente zeigte den zuvor im Maus-Zelllysate detektierten Aminosäureaustausch an der dritten Position der vier terminalen Aminosäuren. Auch in dieser Gruppe wurden neben den 10 in beiden verschiedenen Proben vorkommende auch 10 differenziell vorkommende Proteine detektiert. 8 Proteine stimmten in weniger als drei Positionen mit dem Epitop überein und werden als unspezifisch gebunden betrachtet.

Beide Antikörpersäulen anti-LSGK T1 und anti-QMLK T2 lieferten nur eine geringe Anzahl an Signalen mit niedriger Intensität. In der Signalliste, die aus dem gemessenen Gesamtlysate resultiert, konnte keines der Zielfragmente detektiert werden. Die detektierten

Signale ließen sich, wie in den vorangegangenen Experimenten, nur schlecht fragmentieren und konnten nicht identifiziert werden.

Tabelle 3.13 Übersicht über die Anzahl massenspektrometrisch identifizierter Proteine aus HEK 293 nach der Affinitätsanreicherung mit anti-LGYR T2

Aufgelistet ist die Anzahl identifizierter Proteine aus der mit Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitor behandelten HEK 293 Zelllinienprobe (+) und unbehandelten HEK 293 Zelllinienprobe (-). In den Spalten HEK (-) und HEK (+) sind jeweils die differenziellen Proteine aufgeführt.

anti-LGYR T2	Gesamt	HEK (-)	HEK (+)	Überlappend
Ident. Proteine	42	8	15	19
Terminus				
LGYR	13	2	7	4
LGXR	20	4	6	10
XGYR	2	1	-	1
Sonstige	8	1	2	5

Aus der Affinitätsanreicherung mit anti-AMTR T2 konnten 142 Signale detektiert werden. Von diesen konnten 44 Proteinfragmente über die Fragmentierung und anschließenden Datenbankabgleich 41 Proteinen zugeordnet werden. Es konnten 3 Fragmente mit der AMTR-Sequenz am C-Terminus identifiziert werden. Eines davon kommt in beiden Proben vor. Zwei, darunter auch das Zielfragment aus β -Catenin, konnten nur in der behandelten Probe nachgewiesen werden. Die zweite Gruppe angereicherter und identifizierter Fragmente zeigte einen Aminosäureaustausch an der zweiten Position der vier terminalen Aminosäuren. Hier wurden neben den 17 in beiden Proben vorhandenen Proteinfragmenten 10 differentielle Proteinfragmente identifiziert. Bei 11 Fragmenten stimmten die Termini in weniger als drei Positionen mit dem Epitop überein und werden als unspezifisch gebunden angesehen.

Tabelle 3.14 Übersicht über die Anzahl massenspektrometrisch identifizierter Proteine aus HEK 293 nach der Affinitätsanreicherung mit anti-AMTR T2

Aufgelistet ist die Anzahl identifizierter Proteine aus der mit Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitor behandelten HEK 293 Zelllinienprobe (+) und unbehandelten HEK 293 Zelllinienprobe (-). In den Spalten HEK (-) und HEK (+) sind jeweils die differenziellen Proteine aufgeführt.

anti-AMTR T2	Gesamt	HEK (-)	HEK (+)	Überlappend
Ident. Proteine	41	2	15	24
Terminus				
AMTR	3	-	2	1
AXTR	27	1	9	17
Sonstige	11	1	4	6

Mit den durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung von bestimmten Subproteomen mittels Antikörpern gegen kurze terminale Sequenzen möglich ist. Neben den Zielanalyten mit den entsprechenden Termini konnten weitere Subproteome angereichert werden, bei welchen der jeweilige Terminus einen Aminosäureaustausch an einer bestimmten Position aufweist. Die Auflösung der Methode wird dadurch noch erhöht. Mit derselben Immunaффinitätssäule konnten Zielfragmente aus humanen sowie Maus-Proben und einige Fragmente aus *E. coli* angereichert und mittels Tandem-Massenspektrometrie über einen Datenbankabgleich identifiziert werden. Der Einsatz der generierten Antikörper für die Proteomanalyse in verschiedenen Spezies konnte somit ebenfalls demonstriert werden.

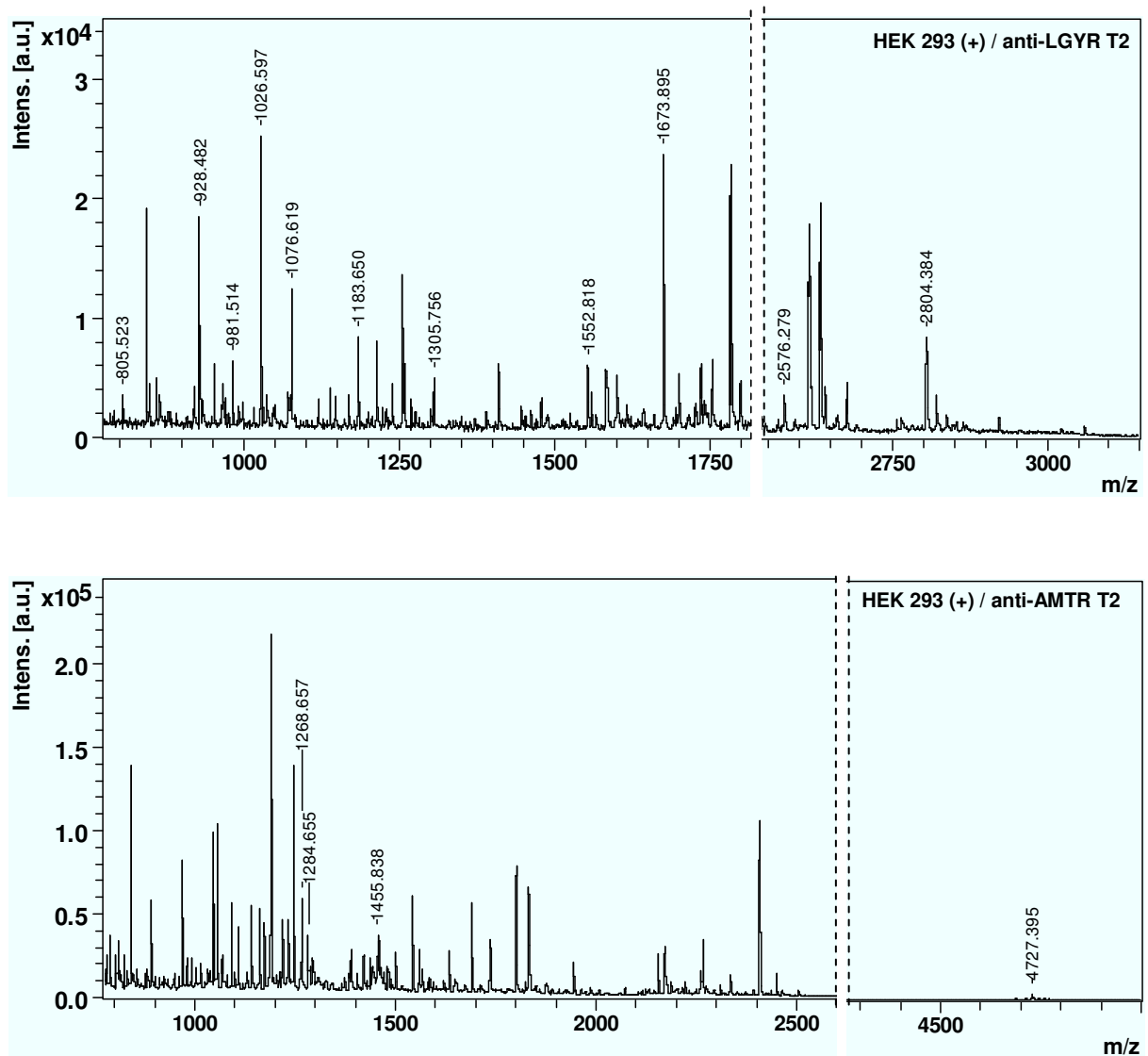


Abbildung 3.16 MALDI-TOF-Spektrum von verdautem und Immunaffinitätsangereichertem HEK 293-Lysat

Massenspektren von behandeltem und verdautem HepF1-Zellysat nach Immunaffinitätsbasierter Anreicherung mit anti-LGYR T2 und anti-AMTR T2. Annotiert sind die später durch MALDI TOF/TOF-Analyse identifizierte Proteinfragmente mit der C-terminalen Zielsequenz LGYR bzw. AMTR. Bereiche, in welchen sich keine Zielfragmente befanden, wurden aus Darstellungsgründen ausgespart.

Abbildung 3.17 Mit anti-LGYR angereicherte und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierte Proteinfragmente aus verdautem HEK 293-Lysat

Auflistung der mit anti-LGYR T2 aus verdautem HEK 293-Lysat angereicherten, massenspektrometrisch analysierten und per Datenbanksuche identifizierten Proteinfragmente.

m/z	Tag	Sequenz	Protein	ID	HEK -	HEK +
Originalsequenz						
805.6	LGYR	IAILGYR	GTP-binding protein Rheb	RHEB_HUMAN	x	
928.5	LGYR	EQYLGYSR	Nucleoporin p58/p45	NUPL1_HUMAN	x	x
951.6	LGYR	TLDNLGYSR	Gamma-adducin	ADDG_HUMAN	x	x
981.5	LGYR	MLDNLGYSR	Alpha-adducin	ADDA_HUMAN		x
999.5	LGYR	AYE QLGYR	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3	S38A3_HUMAN	x	
1026.6	LGYR	YLELLGYSR	Protein transport protein Sec31A	SC31A_HUMA	x	x
1076.6	LGYR	LNIGGGGLGYSR	ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42_HUMAN	x	x
1183.6	LGYR	VDVFTNLGYSR	THO complex subunit 6 homolog	THOC6_HUMAN		x
1305.7	LGYR	LGSELIQ GLGYSR	Transmembrane protein 2	TMEM2_HUMAN		x
1552.8	LGYR	VAAQQGFDLDLGYR	Retinoic acid induced 17	Q5JSH9_HUMAN		x
1674.9	LGYR	AEPIDIQTWILGYSR	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	LGAT1_HUMAN		x
2576.3	LGYR	ALIYYTFGSAGGNMMSQMLGYSR + 2 Oxidation (M)	Protein sel-1 homolog 2	SE1L2_HUMAN		x
2804.3	LGYR	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEPLGYSR	Catenin beta-1	CTNB1_HUMAN		x
2820.4	LGYR	TEPMAWNETADLGLDIGAQGEPLGYSR.Q + Oxidation (M)	Catenin beta-1	CTNB1_HUMAN		x
Austausch AS Position 3 Y <-> F						
892.6	LGFR	SSLLLGFR	Leucine-rich PPR motif-containing protein	LPPRC_HUMAN	x	
1582.9	LGFR	QPELPEVIAMLGFR + Gln->pyro-Glu (N-term Q)	Catenin delta-1	CTND1_HUMAN		x
1599.9	LGFR	QPELPEVIAMLGFR	Catenin delta-1	CTND1_HUMAN	x	x
1615.9	LGFR	QPELPEVIAMLGFR + Oxidation (M)	Catenin delta-1	CTND1_HUMAN	x	x
2616.2	LGFR	QVQHEESTEGEADHSGYAGELGFR + Gln->pyro-Glu (N-term Q)	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	UFD1_HUMAN	x	x
2633.2	LGFR	QVQHEESTEGEADHSGYAGELGFR	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	UFD1_HUMAN	x	x
3381.6	LGFR	DIEQVPQQPTYVQALFDFDPQEDGELGFR	Growth factor receptor-bound protein 2	GRB2_HUMAN	x	x
Austausch AS Position 3 Y <-> L						
932.6	LGLR	FVDILGLR	Beta-catenin-like protein 1	CTBL1_HUMAN	x	x
1551.9	LGLR	VLLPVWEAEGGLR	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3	HECD3_HUMAN		x
1558.8	LGLR	GSEQDVVIDTGLGLR	Beta-lactamase-like protein	YE006_HUMAN		x
1698.8	LGLR	AWDQEAEGAGPELGLR	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	A16A1_HUMAN		x
2096.1	LGLR	LYAPFYSSDILIASPLGLR	Digestive organ expansion factor homolog	DEF_HUMAN	x	

m/z	Tag	Sequenz	Protein	ID	HEK -	HEK +
Austausch AS Position 3 Y <-> A						
1742.0	LGAR	FGTVLTEHVAAAELGAR	c-Myc-responsive protein Rcl	RCL_HUMAN	x	x
1781.9	LGAR	LAEMPADSGYPAYLGAR	V-type proton ATPase catalytic subunit A	VATA_HUMAN	x	x
1797.9	LGAR	LAEMPADSGYPAYLGAR + Oxidation (M)	V-type proton ATPase catalytic subunit A	VATA_HUMAN	x	x
Austausch AS Position 3 Y <-> L						
858.5	LGSR	STTHLGSR	C-type lectin-like domain family 1	CLCL1_HUMAN	x	x
908.5	LGSR	FSELGSR	Protein FAM3A	FAM3A_HUMAN	x	x
1875.1	LGSR	GIFVFGNPQLSVIALGSR	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	SGPL1_HUMAN	x	x
Austausch AS Position 3 Y <-> G						
865.5	LGGR	YHYLGGR	Apolipoprotein A-I-binding protein	AIBP_HUMAN	x	
1409.8	LGGR	VLATTFDPYLGGR	Heat shock 70 kDa protein 4	HS74L_HUMAN		x
Austausch AS Position 3						
1237.7	LGQR	FLEVEFLGQR	Probable global transcription activator SNF2L1	SMCA1_HUMAN		x
1257.6	LGKR	DETEFYLGKR	60S ribosomal protein L35a	RL35A_HUMAN		x
1291.8	LGIR	TVHGGLRLLGIR	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	PYC_HUMAN	x	
1752.9	LGER	DAFQNAVLELGLGER	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	AT1A1_HUMAN	x	x
Austausch AS 1 L <-> I						
1029.6	IGYR	SGYITIGYR	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCD12_HUMAN	x	
2000.0	IGYR	FLYGENMPPQDAEIGYR	Dual specificity protein kinase TTK	TTK_HUMAN	x	x
Sonstige						
1525.9	LTGR	ASITPGTILIILTGR	60S ribosomal protein L6	RL6_HUMAN	x	
1673.9	LPGR	DLGQVSVGSFEILPGR	Peroxisomal proliferator-activated receptor A-interacting complex	PR285_HUMAN		x
1952.0	WGLR	VPNSNPPEYEFFWGLR	Melanoma antigen family D	MAGD2_HUMAN	x	x
1995.0	WGLR	VPNSRPPEYEFFWGLR + Deamidated (NQ)	Trophinin	TROP_HUMAN	x	x
882.6	LPIK	EAVILPIK	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	VPS4A_HUMAN	x	x
1588.9	DSGK	THINIVVIGHVDSGK	translation elongation factor eEF-1 alpha-1 chain	EFHU1	x	x
1802.0	AISR	VYAILTHGIFSGPAISR	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	PRPS1_HUMAN	x	
1927.1	IYR	GLYQGFNVSVQGIIYR	ADP/ATP translocase	ADT1_HUMAN	x	x

Abbildung 3.18 Mit anti-AMTR angereicherte und mittels Tandem-Massenspektrometrie identifizierte Proteinfragmente aus verdautem HEK 293-Lysat

Auflistung der mit anti-AMTR T2 aus verdautem HEK 293-Lysat angereicherten, massenspektrometrisch analysierten und per Datenbanksuche identifizierten Proteinfragmente.

m/z	Tag	Sequenz	Protein	ID	HEK -	HEK +
Originalsequenz						
1268.7	AMTR	HSHAVSTAAMTR	Host cell factor	HCFC1_HUMAN	x	x
1284.7	AMTR	HSHAVSTAAMTR + Ox. (M)	Host cell factor	HCFC1_HUMAN		x
1455.8	AMTR	LLLNLAE NPAMTR	Protocadherin gamma B1	ARMX3_HUMAN		x
4727.4	AMTR	GNPEEEDVDTSQVLYEWEQGFSQSFTQEQVADIDGQYAMTR	Catenin beta-1	CTNB1_HUMAN		x
4743.4	AMTR	GNPEEEDVDTSQVLYEWEQGFSQSFTQEQVADIDGQYAMTR + Ox. (M)	Catenin beta-1	CTNB1_HUMAN		x
Austausch AS Position 2 M <-> S						
894.5	ASTR	SFVIATTR	Vacuolar protein sorting-associated protein 18	VPS18_HUMAN		x
1048.6	ASTR	GPILSFASTR	Replication factor C subunit 5	RFC5_HUMAN	x	x
1480.7	ASTR	GTWTQPFDLASTR + Deamidated (NQ)	Corticosteroid-binding globulin	CBG_HUMAN		x
1559.8	ASTR	NSHPPANLPTPASTR	Uncharacterized protein C10orf12	CJ012_HUMAN	x	x
1634.8	ASTR	TQMLDQEELLASTR	Kinesin heavy chain	KINH_HUMAN		x
1736.9	ASTR	ASDQLQVGVEFASTR	Probable mitochondrial import receptor	TOM40_HUMAN	x	x
1944	ASTR	ANNSQEPSPQLASSVASTR	PDZ and LIM domain protein 5	PDLI5_HUMAN	x	x
2408.3	ASTR	LEPHKPKQIPIIDSTVSFGASTR	Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1	PP1R8_HUMAN	x	x
Austausch AS Position 2 M <-> T						
820.4	ATTR	TEAAATTR	Microtubule-associated protein 4	MAP4_HUMAN	x	
1390.7	ATTR	NGTWLQATAATTR	WD repeat protein 85	WDR85_HUMAN		x
1691.9	ATTR	VQGSDSDEEVVATTR	Valyl-tRNA synthetase	SYV_HUMAN	x	x
2172.1	ATTR	SNGWILPTVYQGMYNATTR	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	ARK72_HUMAN	x	x
2188.1	ATTR	SNGWILPTVYQGMYNATTR + Ox. (M)	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	ARK72_HUMAN		x
2336.3	ATTR	SPSDPSHVSPPPLLLPAATTR	Polyhomeotic-like protein 3	PHC3_HUMAN		x
Austausch AS Position 2 M <-> V						
809.4	AVTR	YAEAVTR	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN	x	x
840.5	AVTR	APIIAVTR	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	x	x
1422.7	AVTR	CGEMAQAASAAVTR	Valyl-tRNA synthetase	SYV_HUMAN		x

m/z	Tag	Sequenz	Protein	ID	HEK -	HEK +
Austausch AS Position 2						
1175.6	AATR	VHSDFTAAATR	Putative eukaryotic translation initiation factor 3	IF3X_HUMAN	x	x
1191.6	AATR	LAPEYEAAATR	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	PDIA3_HUMAN	x	x
1162.6	AQTR	NLCYHAQTR	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1_HUMAN	x	x
2261.2	AQTR	ADCYVQLWLPTASPSAQTR	Cytosolic phospholipase A2 zeta	PA24F_HUMAN		x
1108.5	AHTR	DCGEYAHTR	Mitochondrial 28S ribosomal protein S2	RT02_HUMAN	x	x
1221.6	APTR	CPQSAHPAPTR	Putative uncharacterized protein C22orf26	CV026_HUMAN		x
1247.7	ANTR	LFEVGGSPANTR	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic	PP2BA_HUMAN	x	x
1460.8	AFTR	GNTAAYLLYAFTR	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	SYRC_HUMAN	x	x
1499.8	AYTR	TEPELLVAHAYTR	Heme oxygenase 1	HMOX1_HUMAN	x	x
1832.9	AGTR	SQLGAHHTTPVGDGAAGTR	Transmembrane protein 41B	TM41B_HUMAN	x	x
2333.1	ALTR	SGGGGSSVSGGGGGGAGAGCGGPGGALTR	MPN domain-containing protein	MPND_HUMAN		x
Sonstige						
832.5	PATR	ATESPATR	N-acetylgalactosamine kinase	GALK2_HUMAN	x	
1141.6	LATR	AAINVNLATR	Toll-like receptor 10	TLR10_HUMAN		x
1439.7	MATR	EGVREVFEMATR + Ox. (M)	Rho-related GTP-binding protein RhoC	RHOC_HUMAN		x
970.6	ATSR	LLFYATSR	Zinc finger CCCH type antiviral protein 1	ZCC2_HUMAN	x	x
1544.8	ASSR	HEVSASTQSTPASSR	Spectrin beta chain, brain 1		x	x
1295.7	AISR	TYIQCIAISR	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	CAND1_HUMAN		x
1802	AISR	VYAILTHGIFSGPAISR	Ribose-phosphate pyrophosphokinase I	PRPS1_HUMAN	x	x
1055.7	VLTR	LQPGTAVLTR	Uncharacterized protein C13orf29	CM029_HUMAN	x	x
1187.6	FITR	CPHCPFITR	Zinc finger protein 142	ZN142_HUMAN	x	x
1193.7	VWTR	SPAYTLVWTR	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	PGBM_HUMAN		x
1234.7	LTER	NLSFIAALTER	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3E	PPR3E_HUMAN	x	x

4 Diskussion

Die Proteomik hat sich als Arbeitsgebiet die Analyse der Gesamtheit der in einer Zelle oder einem Organismus befindlichen Proteine zum Ziel gesetzt. Trotz großer methodischer Fortschritte steht die Proteomforschung noch vor gewaltigen Herausforderungen. Dies liegt an der hohen Komplexität biologischer Proben und am hohen dynamischen Konzentrationsbereich über den die Proteine vorkommen. Ihre Konzentration erstreckt sich über sechs bis acht Größenordnungen in humanen Zellen (Corthals *et al.* 2000) und über zehn bis zwölf Größenordnungen in humanem Plasma (Anderson *et al.* 2002). Besondere Schwierigkeiten stellen quantitative Analysen niedrig konzentrierter Moleküle in komplexen Matrices dar. Viele interessante Biomarker liegen mit ihren niedrigen Konzentrationen im unteren Teil dieses ausgedehnten dynamischen Proteinkonzentrationsbereiches und so ist anzunehmen, dass dieser Bereich auch die Mehrheit der bisher unentdeckten Biomarker beinhaltet.

Aus diesem Grund sind hoch auflösende und sensitive Analyseplattformen und Strategien zur Simplifizierung komplexer Proben und Anreicherung von Zielproteinen erforderlich. Da keine Amplifizierungsmethoden für Proteine existieren, die vergleichbar der Polymerasekettenreaktion in der DNS-Analyse sind, haben sich Vorbehandlungsstrategien der Proben zur Verbesserung der Sensitivität als unablässig erwiesen. Die meisten krankheitsspezifischen Biomarker werden bis heute routinemäßig mit Hilfe von Immunoassays wie dem Radioimmunoassay und dem Enzymgekoppelten Immunadsorptionsassay (ELISA) untersucht. Unter den Immunoassay-Techniken stellt der *Sandwich* ELISA die wichtigste Analysemethode dar. Hierfür werden zwei spezifische Antikörper benötigt, die an unterschiedliche Epitope desselben Zielanalyten binden. Ein gut etablierter Immunoassay kann mit ausreichender Spezifität und sehr guter Sensitivität für die direkte Quantifizierung von Zielanalyten aus komplexer Probe im niedrigen picomolaren Bereich eingesetzt werden (Ezan *et al.* 2009). Ihre Entwicklung ist mit 100.000 bis 4 Millionen Dollar und einer Entwicklungszeit von ein bis anderthalb Jahren pro Antikörperpaar jedoch sehr teuer und zeitintensiv. Aus diesem Grund existiert nur eine begrenzte Anzahl geeigneter Antikörperpaare in der benötigten Qualität für die Analyse potentieller Biomarkerkandidaten (Carr *et al.* 2008). Nachteilig sind lange Inkubationszeiten und die Anfälligkeiten für falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse. Zusätzliche oder fehlende co- oder posttranslationale Modifikationen sind oft nicht zu detektieren bzw. diskriminieren (Guzman *et al.* 2008).

4.1 Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse

Neben den immunologischen Analysemethoden hat sich die Massenspektrometrie in den vergangenen Jahren zunehmend zur Methode der Wahl für die Analyse komplexer Proteingemische entwickelt und ist heute eine unentbehrliche Technologie zur Interpretation der im Genom kodierten Informationen. Wie bei fast allen anderen zur Proteomanalyse eingesetzten Methoden und Instrumenten ist aber auch hier die direkte Identifizierung und Quantifizierung der Komponenten aus der komplexen Probe in einem einzigen Schritt nicht möglich (Aebersold *et al.* 2003). Vielmehr müssen verschiedene Methoden zur Separation, Identifizierung, Quantifizierung und Datenanalyse kombiniert werden.

Die klassischen Systeme der massenspektrometrischen Protein- und Peptidanalyse nutzen ein- oder zweidimensionale Gelelektrophorese, Ionenaustauschchromatographie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie oder Größenausschlusschromatographie als Separationsmethoden. Um dem Auflösungsvermögen und der Detektionssensitivität der MS-Geräte gerecht zu werden, werden jedoch leistungsstärkere Trennverfahren benötigt. Hierfür können zwei bis drei der aufgeführten Methoden für eine multidimensionale Trennung kombiniert (Aebersold *et al.* 2003) und durch affinitätsbasierte Methoden ergänzt werden. Mit einem Detektionslimit im mittleren nanomolaren Bereich (Ezan *et al.* 2009) können auch diese Strategie in vielen Fällen nicht die gewünschte Auflösung für die Analyse niedrig konzentrierter Analyten aus einer komplexen Probe leisten.

Aufgrund dieser Tatsachen ergab sich in den letzten Jahren die Idee, Immunaффinitäts-basierende Methoden mit chromatographischen Trennmethoden zu kombinieren. Hierzu werden Antikörper auf Chromatographiematerialien immobilisiert und zur Anreicherung der Zielanalyten bei gleichzeitiger Abreicherung unerwünschter Probeninhalte eingesetzt. Diese Kombination der beiden Methoden gewährleistet gute Sensitivität durch den eingesetzten Antikörper. Die Selektivität wird durch das Auslesen im Massenspektrometer erreicht. Durch den Einsatz von Immunaффinitätsmatrices kann eine Anreicherung in Minuten erfolgen. Die Immunaффinitätsbasierte Separation wird momentan als eine der effektivsten Herangehensweisen betrachtet, um komplexe Proteingemische zu untersuchen (Fang *et al.* 2008).

4.2 Immunaффinitätsbasierte Probenfraktionierung

Bei der Immunaффinitätsbasierten chromatographischen Trennung werden zwei Ansätze unterschieden. Im Ansatz der Immunaффinitätsbasierten Proteinsubtraktionschromatographie werden Antikörper gegen hoch konzentrierte Proteine einer Probe zur Dekomplexierung eingesetzt. Durch die Entfernung der 18 bis 22 am höchsten konzentrierten Serumproteine kann der Gesamtproteingehalt einer Probe um 98-99% reduziert werden. Die Repräsentativität der Probe bleibt weitgehend erhalten und in Kombination mit einer anschließenden Umkehrphasenchromatographie kann in bestimmten Fällen eine ausreichende Auflösung für die anschließende MS-Analyse erzielt werden. Es muss jedoch bedacht werden, dass diese Proteine als Trägermoleküle dienen, mit deren Entfernung eventuell auch die Zielanalyten entfernt werden (Callesen *et al.* 2009).

Beim Ansatz der Immunaффinitätsanreicherung werden für den Zielanalyten spezifische Antikörper eingesetzt, welche definierte Moleküle hoch selektiv aus einer Probe anreichern. Nicht an die Immunaффinitätsmatrix adsorbierte Bestandteile der Probe werden entfernt. Werden monospezifische Antikörper eingesetzt, befinden sich im zu analysierenden Eluat nur noch die angereicherten Zielmoleküle. Auf diese Weise können auch Komponenten die in der ursprünglichen Probe unter dem Detektionslimit vorliegen bis über die Bestimmungsgrenze angereichert werden (Guzman *et al.* 2008). Diese Art der Probenfraktionierung ist sehr sensitiv, es handelt es sich jedoch um eine gerichtete Methode, bei welcher die Entdeckung neuer Biomarker faktisch ausgeschlossen ist. Anstelle von zwei spezifischen Antikörpern wie beim ELISA wird zwar nur noch ein Antikörper benötigt, die Auflösung dieser Methode ist jedoch gering da sie direkt von der Verfügbarkeit geeigneter Antikörpers abhängt (Wingren *et al.* 2009).

Bei der Probenfraktionierung nach Immunaффinitätsanreicherung sind zwei Vorgehensweisen möglich. Im *Top-down*-Ansatz (Nedelkov *et al.* 2006) werden Antikörper gegen intakte Proteine zur Separation eingesetzt. Bei diesem Vorgehen wird die Komplexität der zu analysierende Probe gleich zu Beginn auf einen Analyten reduziert. Das angereicherte Protein wird anschließend enzymatisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Zur Identifikation können die entstandenen Proteinfragmente mit einer Datenbank abgeglichen werden. Vorteil dieses Ansatzes ist die Verfügbarkeit proteinspezifischer Antikörper aus anderen Immunaффinitätsbasierten Analysemethoden. Da diese Antikörper aber oft gegen die dreidimensionale Struktur der Zielproteine gerichtet ist, muss gewährleistet sein, dass das zu analysierende Protein in

nativer Form vorliegt, was im Kontrast zu vielen Probenpräparationsprotokollen steht, da es sonst nicht gebunden werden kann. Ebenfalls problematisch können sich diverse posttranslationale Modifikationen am Epitop auswirken. Eine robuste Alternative hierzu bildet die Vorgehensweise Peptide anstatt von Proteinen anzureichern.

4.2.1 MS-basierte Proteomanalyse mit peptidspezifischen Antikörpern

Im sogenannten *Bottom-up*-Ansatz (Nedelkov *et al.* 2006) wird die komplexe Probe zuerst enzymatisch verdaut. Das noch komplexere Peptidgemisch wird mit Hilfe peptidspezifischer Antikörper für die anschließende MS-Analyse aufbereitet. Da diese Antikörper gegen lineare Epitope gerichtet sind, spielt die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur des Antigens keine Rolle. Im Gegensatz zu Antikörpern gegen native Proteine, wo die Epitopbildung zufällig verläuft, können peptidspezifische Antikörper gegen zuvor streng definierte Epitope generiert werden (Anderson *et al.* 2004 (b)). Nachteil dieser Methode ist die geringe Zahl peptidspezifischer Antikörper, die erhältlich sind.

Die am meisten verbreiteten peptidspezifischen Antikörper sind so genannte anti-Tag Antikörper (anti-His, anti-FLAG, anti-HA und anti-myc), die gegen bestimmte Peptidsequenzen von 6 bis 10 Aminosäuren gerichtet sind. Ein kommerziell erhältlicher anti-His Antikörper wurde gegen ein Epitop bestehend aus sechs Histidinen generiert (Lindner *et al.* 1997). Aus Untersuchungen zur Charakterisierung des Epitops dieses Antikörpers mit Hilfe auf einem Mikroarray immobilisierter Peptidpositionsbibliotheken ist bekannt, dass für die Bindung des Antigens nur die drei am C-Terminus befindlichen Histidine und das Vorhandensein einer freien Carboxylgruppe von Bedeutung sind. Untersuchungen der Kristallstruktur eines aus diesem Antikörper abgeleiteten Bindemoleküls mit einem Peptid aus sechs Histidinen bestätigt dieses Ergebnis (Kaufmann *et al.* 2002).

Mit diesen Erkenntnissen lässt sich ein neues Konzept entwickeln, mit welchem die Limitierungen des Ein-Analyt-Ein-Antikörper-Ansatzes umgangen werden können. Die prinzipielle Möglichkeit der Generierung von Antikörpern gegen sehr kurze terminale Epitope aus 3-4 Aminosäuren zeigt den Vorteil, dass diese Antikörper nicht nur zur Anreicherung eines bestimmten Zielanalyten sondern einer definierten Gruppe von Peptiden eingesetzt werden könnten. Dieses Subproteom würde aus einigen Dutzend bis wenigen Hundert Proteinfragmenten mit demselben terminalen Epitop bestehen, was die Zahl der mit einem einzelnen Antikörper nachweisbaren Proteine deutlich erhöhen würde

und die Anzahl für eine globale Proteomanalyse benötigter Antikörper extrem reduzieren könnte.

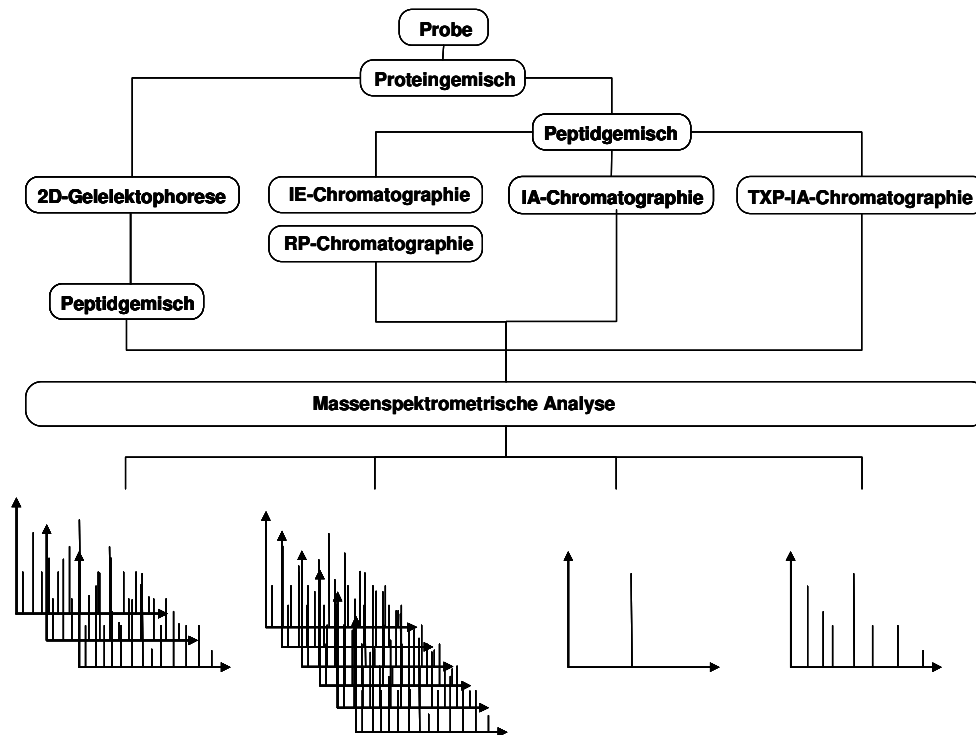


Abbildung 4.1 MS-basierte Proteomanalytik im Überblick

Schematische Darstellung von klassischen Systemen zur massenspektrometrischen Protein- und Peptidanalyse (links) mit Probenfraktionierung mittels elektrophoretischer Separation oder Ionenaustausch-(IE) und Umkehrphasenchromatographie (RP) und weiter entwickelte Methoden (rechts) basierend auf Immunaффinitätschromatographischer (IA) Probenpräfraktionierung.

4.3 Neuartige Antikörper gegen kurze terminale Peptidepitope

Um die Limitierungen des Ein-Analyt-Ein-Antikörper-Ansatzes zu umgehen wurde ein neues Konzept, basierend auf einem speziellen Typus von peptidspezifischen Antikörpern, entwickelt. Diese Antikörper erkennen kurze, aus vier Aminosäuren bestehende Epitope, die sich am C-Terminus eines enzymatisch generierten Proteinfragments befinden. Diese Antikörper binden nicht nur einen spezifischen Analyten. Sie sind in der Lage Gruppen von Peptiden mit demselben kurzen terminalen Motiv zu binden. Die Epitope können so gewählt werden, dass Sequenzen aus hochkonzentrierten Proteinen unberücksichtigt bleiben und mehrheitlich Peptidsequenzen aus mittleren bis niedrigen Konzentrationsbereichen bevorzugt werden. Je nach Wahl der Sequenz lässt sich die Größe des gewünschten Subproteoms steuern. Die Möglichkeit

zur Biomarkerentdeckung bleibt bestehen. Drei Aminosäuren des gewählten terminalen Epitops sind variabel, die vierte, terminale Aminosäure wird durch die Spaltstelle des verwendeten Enzyms bestimmt. Aus diesem Grund wurde das Konzept *Triple X Proteomics* (TXP) genannt. Mit dem hier beschriebenen neuartigen Ansatz können theoretisch mit wenigen hundert Antikörpern über 90% des in Datenbanken verzeichneten humanen Proteoms abgedeckt werden. Die benötigte Anzahl an Bindemolekülen kann somit um das zehnfache bis hundertfache reduziert werden (Poetz *et al.* 2009 und Wingren *et al.* 2009).

Diese speziellen Bindemoleküle sind das Herzstück des TXP-Ansatzes. Die gezielte Generierung polyklonaler Antikörper gegen sehr kurze terminale Epitope, bestehend aus nur vier Aminosäuren wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Mit dieser Arbeit soll die Möglichkeit der Generierung solcher Bindemoleküle, deren Charakterisierung und Eignung für den Einsatz als Immunaффinitätsmatrix zur Anreicherung definierter Subproteome aus komplexen Proben für die anschließende massenspektrometrische Analyse untersucht werden.

Zur Durchführung der Dissertation wurde β -Catenin als Modellprotein ausgewählt. Hierbei handelt es sich um ein zentrales Protein aus dem Wnt-Signalweg. Eine anormale Aktivierung dieses Signalweges sowie Mutationen, die den Abbau von β -Catenin behindern führen zu einer nukleären Akkumulation dieses Proteins. Im Zellkern aktiviert β -Catenin Transkriptionsfaktoren Gene, die die Zellproliferation anstoßen (Willert *et al.* 2006). β -Catenin stellt somit ein typisches Protoonkogen dar und hat eine große onkologische Relevanz.

Nach dem Konzept des TXP-Ansatzes wurden aus dem *in silico* verdauten Zielprotein vier Fragmente ausgewählt. Die vier C-terminalen Aminosäuren der vier Fragmente wurden zur Antikörpergenerierung eingesetzt. Kriterien für die Wahl der Fragmente waren die Fragmentgröße, das Vorhandensein von Phosphorylierungsstellen und Mutationsstellen und der speziesspezifische Unterschied zwischen Mensch und Maus. Die kurzen terminalen Epitope wurden synthetisiert und zur Immunisierung der Kaninchen an ein antigenitätsvermittelndes Trägerprotein gekoppelt.

Die Ansätze monoklonale TXP-Antikörper sowie Antikörper gegen N-terminale Aminosäuresequenzen zu generieren wurden in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

4.3.1 Charakterisierung der generierten Antiseren

Zwei Eigenschaften bestimmen die Qualität eines Antikörpers als analytisches Instrument. Neben der Affinität, welche die Sensitivität eines Assays bestimmt, spielt die Spezifität eine entscheidende Rolle. Sie definiert die Möglichkeiten der Anwendung eines Antikörpers. Je genauer ein Antikörper charakterisiert ist, desto besser und verlässlicher lassen sich mit diesem Antikörper generierte Versuchsergebnisse verifizieren. Für die Charakterisierung der erhaltenen Seren wurde ein Mikrosphären-basierender Peptid-Mikroarray verwendet. Mit den auf farbkodierten Mikrosphären immobilisierten Antigenen wurde ein multiplexes Assaysystem etabliert, das die simultane Bestimmung der Reaktivität von 22 Seren und zwei Assaykontrollen auf 16 verschiedene Peptidsequenzen ermöglicht.

Um die Detektion von Antikörpern gegen das zur Immunisierung verwendete Trägerprotein und Kopplungsreagenz auszuschließen, wurden diese durch analoge Strukturen ausgetauscht. Beim Immunisierungsprozess entstehen ebenfalls Antikörper gegen den, aus sterischen Gründen notwendigen, im Immunogen enthaltenen Abstandshalter. Um zwischen Reaktivitäten auf den Abstandshalter und Reaktivitäten gegen das gewünschte Epitop unterscheiden zu können, wurden zusätzlich Sequenzen verwendet, bei denen der Abstandshalter durch kurze Teilsequenzen aus dem Hämagglutinin und dem c-myc-Protein ersetzt wurde. Für die Überprüfung, ob es sich um terminusspezifische Antikörper handelt, wurden Sequenzen mit amidiertem Terminus verwendet. Die Amidierung stellt sicher, dass am C-terminalen Ende der Sequenz keine negative Ladung. Auf diese Weise wird eine intern vorkommende Sequenz simuliert.

Mit dem etablierten Multiplex-Assay war es möglich die erhaltenen Antiseren schnell und effektiv in einem einzigen Experiment auf gewünschte bzw. ungewünschte Reaktivitäten zu testen. Alle 11 Antiseren zeigen Reaktivitäten auf die zur Immunisierung eingesetzte Sequenz, was mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Bildung von Antikörpern gegen den in allen vier Immunisierungssequenzen enthaltenen Abstandshalter liegt. Wird dieser jedoch gegen einen andern Abstandshalter ausgetauscht, verschwinden diese Signale und es sind nur noch Reaktivitäten gegen das jeweilige zur Immunisierung eingesetzte kurze Epitop zu detektieren. Die Ausnahme bildete das anti-QMLK T1-Serum, welches beim Austausch des zur Immunisierung verwendeten Abstandshalters gegen einen HA-Abstandshalter Reaktivitäten mit der LSGK- und der LGYR-Peptidsequenz zeigte. Von den 11 generierten Seren zeigte nur das anti-AMTR T1-Serum Reaktivitäten mit dem amidierten Terminus, was auf die Erkennung von internen nicht terminalen Epitopen

hindeutet. Das erzielte Ergebnis zeigt, dass die Generierung von polyspezifischen Antikörpern gegen kurze terminale Epitope, bestehend aus nur vier Aminosäuren möglich ist. Von 11 generierten Antiseren zeigen 9 die geforderten Spezifitäten für den weiteren Einsatz als TXP-Bindemoleküle. Von diesen 9 Seren wurden für weitere Experimente die Antiseren gewählt, die jeweils die höchste spezifische Reaktivität auf das entsprechende Epitop zeigten.

Da naturgemäß nicht alle im Epitop enthaltenen Aminosäuren von gleicher Bedeutung für die Antikörperbindung sind, wurden in einem zweiten Schritt die Epitope der Antikörper näher charakterisiert. Hierzu wurden auf Mikrosphären immobilisierte Positionsbibliotheken mit alternierendem Aminosäureaustausch eingesetzt. Die Ergebnisse geben Hinweise auf die Erweiterung des zuvor definierten Subproteoms durch unspezifische Bindung an verwandte Epitope mit einem Aminosäureaustausch an einer bestimmten Position. Des Weiteren kann die gewonnene Information später bei der Datenbanksuche im sogenannten *sequence-tag* Modus (Mann *et al.* 1994) verwendet werden.

Die charakterisierten Antikörper sollten in einem nächsten Schritt als Matrix zur Festphasenextraktion eingesetzt werden. Um bei der späteren Immunitätsanreicherung nur das definierte Subproteom zu extrahieren, müssen die Antikörper spezifisch aufgereinigt werden. Antikörperaufreinigungsstrategien über Protein A- oder Protein G-Säulen können nicht angewendet werden, da die gewünschten Antikörper nur einen geringen Anteil aller im Serum enthaltenen Immunglobuline G ausmachen. Aus diesem Grund wurde eine auf Immunität basierende Aufreinigungsstrategie etabliert. Bei der Herstellung der Affinitätsmatrix ist es wichtig, dass Epitope, an welche unerwünschte kreuzreaktive Antikörper binden, nicht zum Einsatz kommen. So wurden zur Generierung der Affinitätsmatrix der Distanzhalter, das Trägerprotein sowie das Kopplungsreagenz gewechselt. Damit konnten Antikörper, die spezifisch für das TXP-Epitop sind, erhalten werden. Aus 10 ml Antiserum konnten zwischen 2,5 und 7,7 mg Antikörper aufgereinigt werden. Die Reinigungsprozedur wurde durch Kontrolle der Eluate sowie der Durchläufe im Mikrosphären-basierten Assay überprüft. Nur in einem Fall konnten noch Reaktivitäten im Durchlauf festgestellt werden, was auf eine geringe Affinität der Antikörper bzw. eine Überladung der Säule hinweist. Um die Eluate auf das Vorhandensein unerwünschter Serumproteine hin zu überprüfen, wurde es im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und angefärbt. Verunreinigungen wurden nicht festgestellt. Somit konnte gezeigt werden, dass die etablierte Aufreinigungsmethode eine effiziente Isolierung von TXP-spezifischen Antikörpern aus Serum ermöglicht. Mehrdimensionale

Strategien über eine Protein A-Aufreinigung mit anschließender Immunaффinitätsbasierter Extraktion (Johannesson *et al.* 2008) sind für die effektive Anreicherung von spezifischen Antikörpern aus Antiserum nicht notwendig.

4.3.2 Immunaффinitätschromatographie mit TXP-Antikörpern

Um zu überprüfen, ob die Antikörper nach den harschen Elutionsbedingungen noch funktionsfähig sind und immobilisiert an eine feste Phase für die Extraktion von Peptiden eingesetzt werden können, wurde ein vertrautes Assaysystem eingesetzt. Es wurden die polyspezifischen Antikörper auf Mikrosphären gekoppelt und mit einer Mischung aus biotinierten Peptiden beprobt. Die Detektion erfolgt über ein Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat. Die angewendete Kopplungschemie und die eingesetzten konjugierten Peptide entsprechen zwar nicht vollständig späteren realen Gegebenheiten, erlauben jedoch Rückschlüsse auf den Einsatz der Antikörper als Extraktionsmatrix. Die Ergebnisse zeigen, dass die Antikörper funktional sind und die Herstellung einer Immunaффinitätsmatrix mit diesen möglich ist. Für die Herstellung einer für chromatographische Verfahren geeigneten Immunaффinitätsmatrix wurde ein von Anderson und Kollegen (2004 (a)) beschriebenes Protokoll mit geringen Abwandlungen angewendet. Zur orientierten Bindung der Antikörper wurde HPLC-fähiges mit Protein G überzogenes Material verwendet, das eine effiziente Kopplung erlaubte. Für die vier Ansätze konnte eine Kopplungseffizienz zwischen 91,0% und 96,3 % bestimmt werden. Um zu verhindern, dass die Antikörper bei der Elution der gebundenen Proteinfragmente mit von der Matrix eluiert werden, werden diese auf dem Matrixmaterial kovalent quervernetzt. Diese Vorgehensweise macht die wiederholte Verwendung der Säule bei niedrigem Variationskoeffizient (Pieper *et al.* 2003) möglich. Die tatsächliche Kapazität der Immunaффinitätssäulen hängt von der Menge an funktionalen Antikörpern ab und kann daher nicht direkt über die Gesamtmenge immobilisierter Antikörper bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden die Kapazitäten der Immunaффinitätssäulen durch die Beprobung mit farbstoffgekoppelten Peptiden bestimmt. Das im Eluat enthaltene Peptid konnte über photometrische Messung des Farbstoffes quantifiziert und Kapazitäten zwischen 0,14 und 0,68 nmol bestimmt werden. Das sind 3-15% der theoretisch erreichbaren Kapazität. Erklärt werden kann der Funktionsverlust der Antikörper durch die harschen Elutionsbedingungen bei der Antikörperaufreinigung sowie bei der kovalenten Quervernetzung der Antikörper auf der Matrix. Um hier eine Verbesserung zu erzielen sollten weitere Kopplungsstrategien und Matrices getestet werden.

Zur Verringerung der Versuchsdauer und des benötigten Probenmaterials wurde eine Strategie entwickelt, bei der die vier Antikörpersäulen zur Anreicherung der Peptidpopulationen aus der komplexen Probe hintereinander geschaltet werden. Dies ist möglich, da jeder Antikörper eine andere Zielgruppe hat. Zur Elution werden die Säulen wieder getrennt, um bei der massenspektrometrischen Analyse mögliche Unterdrückungseffekte der einzelnen Subproteome aufeinander zu vermeiden. Die Eluate wurden auf einer Säule mit Umkehrphase aufkonzentriert und entsalzt, anschließend extrahiert und massenspektrometrisch analysiert. Um zu testen, ob mit dieser Strategie Proteinfragmente differenziell aus einem Gemisch angereichert werden können, wurden vier synthetisch hergestellte Fragmente in einem Gemisch vereint und auf die hintereinander geschalteten Affinitätssäulen appliziert. Nach der getrennten Elution wurden sie massenspektrometrisch analysiert. Diese Analyse zeigte, dass mit dieser Strategie die definierte Extraktion von Peptiden aus einem einfachen Gemisch möglich ist.

4.3.3 Analyse komplexer Proben mit TXP-Antikörpern

Um den Einsatz der etablierten Methode für die Analyse von hinreichend komplexem biologischen Probematerial zu testen, wurden transfizierte *E. coli*-Zellen verwendet, welche das Zielprotein β -Catenin überexprimieren. Das Probenmaterial besitzt zwar eine geringere Komplexität und enthält größere Mengen an rekombinantem β -Catenin als eukariontische Proben, lässt sich aber schnell und einfach generieren und liefert die für die Etablierung von geeigneten Lyse- und Verdauprotokollen und die Adaptierung der Analysemethoden benötigten Probenmengen. Zur Etablierung von Lyse und Verdau wurden verschiedene bestehende Protokolle ausprobiert und modifiziert. Zur Lyse wurde ein stark denaturierender Puffer mit anschließender Sonifizierung und Zugabe von starkem Detergenz eingesetzt. Für die Homogenisierung der Probe und bessere Zugänglichkeit der Spaltstellen wurden die Proben vor der Zugabe des Enzyms reduziert und alkyliert. Die Lysate und Verdau wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass sich die etablierten Protokolle mit gutem Ergebnis für die Lyse und den Verdau von *E. coli*-Zellen als auch für Maus- und humane Zellen anwenden lassen.

Das verdaute Lysat wurde auf die vier hintereinander geschalteten Immunaффinitätssäulen aufgebracht. Nach der Entfernung von ungebundenen Probenbestandteilen wurden die Säulen getrennt voneinander eluiert. Die Eluatfraktionen wurden auf einer Säule mit hydrophober Matrix aufkonzentriert und entsalzt. Die auf der hydrophoben Säule gebundenen Proteinfragmente werden mit einem Acetonitrilgradienten eluiert und für die

massenspektrometrische Analyse auf eine Probenplatte präpariert. Für Vergleichszwecke wurde Gesamtlysat ohne vorherige Affinitätsanreicherung auf eine hydrophobe Säule geladen, eluiert und analysiert. Trotz der im Polyacrylamidgel deutlich zu sehenden Überexpression des Zielproteins konnte bei der massenspektrometrischen Analyse im Gesamtlysat keines der vier Zielfragmente detektiert werden. Dies ist vermutlich auf Unterdrückungseffekte zurückzuführen. Nach erfolgter Affinitätsanreicherung und anschließender massenspektrometrischer Analyse konnten alle vier Zielfragmente durch einen Datenbankabgleich identifiziert werden. Neben den vier Zielfragmenten waren in den affinitätsangereicherten Fraktionen weitere Fragmente des Zielproteins enthalten. Dies kann aufgrund von unspezifischer Adsorption an die Affinitätsmatrix oder durch Bindung an die ihrerseits von den Antikörpern gebundene Zielfragmente geschehen sein. Da die Strukturaufklärung bezüglich interner Interaktionsbereiche im β -Catenin noch sehr unvollständig ist, können hierüber nur Spekulationen angestellt werden. Neben den Fragmenten, die aus dem überexprimierten β -Catenin stammen, konnten sieben weitere, aus dem Expressionssystem *E. coli* stammende Fragmente identifiziert werden. Fünf davon weichen von ihrem TXP-Epitop um eine Aminosäure ab. Die verbleibenden zwei Fragmente unterscheiden sich um mehr als zwei Aminosäuren vom Epitop und sind daher unspezifischer Adsorption an die Matrix zuzuschreiben. Dieses Ergebnis zeigt, dass mit diesen Antikörpern neben den Zielfragmenten weitere Fragmente, die ein dem Epitop sehr ähnliches Epitop aufweisen und aus einem anderen Organismus stammen, angereichert und identifiziert werden können.

In einem nächsten Schritt wurde getestet, ob das mit den generierten Antikörpern etablierte System für die Analyse von komplexem Zellkulturmaterial einsetzbar ist. Um die Möglichkeit mit den generierten Antikörpern in verschiedenen Spezies ähnliche, jedoch unterschiedliche Peptide anzureichern, wurde die Zelllinie HepF1 eingesetzt. In der Tumorzelllinie HepF1 wird der Abbau des β -Catenins durch eine Punktmutation an einer Phosphorylierungsstelle im Protein verhindert. Das Protein akkumuliert im Zytosol und transloziert in den Kern, wo es als Coaktivator von Transkriptionsfaktoren wirkt. Somit sind in der Maus-Probe zwei Fragmente (LSGK und LGYR) enthalten, die sich von der humanen Ausgangssequenz, auf deren Basis die Antikörpergenerierung erfolgte, unterscheiden. Aufgrund der Heterozygotie der Mutation ist vom LSGK-Fragment sowohl die mutierte Variante als auch die unmutierte Variante, die der humanen Sequenz entspricht, zu erwarten. Als Vergleichsansatz wurde das verdaute HepF1-Gesamtlysat ohne Affinitätsanreicherung massenspektrometrisch analysiert. Im Gesamtlysat konnte keines der vier gesuchten Zielfragmente identifiziert werden. Nach der Affinitätsanreicherung wurden die vier fraktionierten Eluate untersucht. Aus dem

anti-LGYR T2 Eluat konnte eine Population bestehend aus 16 Peptiden mit dem entsprechenden Terminus identifiziert werden. Das Zielfragment aus dem β -Catenin und ein weiteres Fragment konnte neben der unmodifizierten Form in verschiedenen Oxidationsvarianten nachgewiesen werden. Neben der erwarteten Population konnten 22 weitere Peptide angereichert und identifiziert werden. Davon weisen 18 Peptide einen Aminosäureaustausch an der dritten Position auf. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung aus der Charakterisierung des Epitops mit der entsprechenden Positionsbibliothek. Hierbei wurde diese Position, welche der Aminosäure Tyrosin (Y) entspricht, als für die Bindung am unbedeutendsten eingestuft. Besonders häufig wurde ein Austausch durch Phenylalanin (F), was an der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Aminosäuren liegen könnte, und der Aminosäure Leucin (L) beobachtet. Drei Fragmente weisen weniger als drei Übereinstimmungen mit dem Epitop auf. Sie sind wahrscheinlich aufgrund unspezifischer Bindung an die Matrix im Eluat enthalten. Im anti-AMTR T2 Eluat konnte nur das Zielfragment aus β -Catenin mit dem entsprechenden terminalen Epitop identifiziert werden. Weitere Peptide mit derselben terminalen Sequenz konnten nicht nachgewiesen werden. Ob dies durch Unterdrückungseffekte, hervorgerufen durch weitere angereicherte Peptide, Veränderung des Epitops durch Oxidation des enthaltenen Methionins oder dem Nichtvorhandensein weiterer Peptide mit der C-terminalen Sequenz AMTR zuzuschreiben ist, konnte nicht geklärt werden. Neben dem Zielfragment konnten 41 weitere Peptide identifiziert und 38 Proteine zugeordnet werden. Von diesen Peptiden weisen 31 Peptide einen Aminosäureaustausch an der zweiten Position, welche dem Methionin (M) entspricht, auf. Am häufigsten traten Peptide auf bei denen Methionin gegen Serin (S) oder Threonin (T) ausgetauscht vorlag. Die Übereinstimmung von sieben weiteren Peptiden ist kleiner als drei Aminosäuren und wird ebenfalls unspezifischer Bindung zugesprochen. Auch dieses Ergebnis stimmt mit der Epitopcharakterisierung mittels Positionsbibliothek überein. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Charakterisierung des Epitops mit synthetischen auf Mikrosphären immobilisierten Positionsbibliotheken im Antiserum detaillierte und verlässliche Ergebnisse liefert. Dies ermöglicht die Auswahl eines geeigneten Antiserums noch vor der Aufreinigung und lässt Aussagen bezüglich des später zu erwartenden Subproteoms zu. Die Analyse der LSGK- und QMLK-Eluate lieferte keine verwertbaren Ergebnisse. Die erhaltenen MS-Spektren wiesen eine sehr niedrige Intensität auf. Fragmentspektren konnten nur in sehr schlechter Qualität generiert werden und lieferten bei einem Datenbankabgleich keine Treffer. Die Ursache dieses Ergebnis konnte noch nicht abschließend geklärt werden und kann verschiedenen Gründe haben. Die Funktionalität der Säulen wurde mit synthetischem Peptidgemisch sowie mit *E. coli* – Lysat überprüft. Die Überprüfung lieferte mit den zuvor

durchgeführten Versuchen vergleichbare Ergebnisse. Unvollständiger Verdau sowie Unterschiede in der Enzymkinetik, die zu einer uneffizienteren Spaltung am Lysin führen könnten ebenfalls für das Ergebnis verantwortlich sein. Eine Veränderung des Verdauprotokolls lieferte jedoch keine Verbesserung. Ein weiter Grund könnte die schlechte Ionisierbarkeit von Peptiden mit C-terminalem Lysin (Krause *et al.* 1999) sein. Eine Verbesserung der Ionisierung durch Guanidinierung C-terminaler Lysine (Cockrill *et al.* 2005) wird derzeit geprüft.

Von großem Interesse war es, unterschiedliche Zustände in komplexen Proben mit dieser Methode zu erfassen. In einem experimentellen Ansatz wurde daher der Abbau von zytosolischem β -Catenin in humanen HEK 293 Zellen durch Zugabe eines Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitors unterdrückt (Coughlan *et al.* 2000). Als Kontrolle wurde eine mit DMSO behandelte Kultur eingesetzt. β -Catenin stellt ein zentrales Protein des Wnt-Signalweges dar, welcher wiederum mit vielen weiteren Signalwegen in enger Verbindung steht (Gordon *et al.* 2006). Eine Veränderung im Wnt-Signalweg sollte sich in einem differentiellen Proteom der beiden Proben niederschlagen. Lyse, Verdau, Affinitätsanreicherung und massenspektrometrische Analyse erfolgten wie oben beschrieben. Mit der behandelten und der unbehandelten Probe wurden technische Replikate erzeugt, die zusammengefasst wurden, um eine übersichtliche Gegenüberstellung der beiden Proben zu ermöglichen.

Aus der Analyse der HEK 293 Zelllinie mit anti-LGYR T2 resultieren insgesamt 124 Signale. Von diesen konnten 48 Peptide fragmentiert und über einen anschließenden Datenbankabgleich 43 Proteinen zugeordnet werden. Es konnten 13 Fragmente mit der richtigen Zielsequenz am C-Terminus identifiziert werden. Vier davon kommen in beiden Proben vor. Zwei konnten nur in der unbehandelten Probe nachgewiesen werden. Sieben dieser Fragmente, darunter auch das Zielfragment aus β -Catenin, konnten nur in der mit Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitor behandelten Probe erfasst werden. Die zweite Gruppe angereicherter und identifizierter Fragmente zeigt den zuvor im Maus-Zelllysate detektierten Aminosäureaustausch an der dritten Position der vier terminalen Aminosäuren. Auch in dieser Gruppe wurden neben den 10 in beiden verschiedenen Proben vorkommenden auch 10 differentiell vorkommende Proteine identifiziert. Aus der Affinitätsanreicherung mit anti-AMTR T2 konnten 142 Signale detektiert werden. Von diesen konnten 44 Proteinfragmente über die Fragmentierung und anschließenden Datenbankabgleich 41 Proteinen zugeordnet werden. Es konnten drei Fragmente mit der richtigen Zielsequenz am C-Terminus identifiziert werden. Eines davon kommt in beiden Proben vor. Zwei, darunter auch das Zielfragment aus β -Catenin, konnten nur in der

behandelten Probe nachgewiesen werden. Die zweite Gruppe angereicherter und identifizierter Fragmente zeigt einen Aminosäureaustausch an der zweiten Position der vier terminalen Aminosäuren. Hier wurden neben den 17 in beiden Proben vorhandenen Proteinfragmenten 10 differentielle Proteinfragmente identifiziert. Dieses Experiment zeigt, dass durch Immunaффinitätsanreicherung mit TXP-Antikörpern Zielfragmente mit dem entsprechenden Terminus und Fragmente mit ähnlichen Termini aus komplexem Material dem Status der Probe entsprechend differentiell dargestellt werden können. Dass die Zielfragmente nur in der mit Inhibitor behandelten Probe nachgewiesen werden konnten, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Menge applizierten Probenmaterials. Um diese Aussage belegen zu können muss die etablierte, zum jetzigen Zeitpunkt rein qualitative Methode um eine Quantifizierungsmöglichkeit erweitert werden. Dies kann zum Beispiel durch den Einsatz von Isotopen-markierten Standards (Anderson *et al.* 2004 (b) und Brun *et al.* 2007) realisiert werden.

Die Identifizierung isolierter Proteine kann über eine Methode, die Protein-Fingerabdruck genannt wird erfolgen. Hierbei werden die experimentell bestimmten Massen der Peptidfragmente mit den theoretischen Massen eines vorhergesagten *in silico*-Verdau der in einer Datenbank verzeichneten Proteine verglichen. Eine weitere Identifizierungsmethode wird Peptidfragment-Fingerabdruck genannt. Hierbei werden die Proteinfragmente noch weiter in sogenannte Fragmentationen zerlegt. Der Satz an entstandenen Fragmentationen dient als individueller Fingerabdruck für dieses Peptid. Das Fragmentspektrum wird mit den in einer Datenbank verzeichneten Fragmentationenspektren von Peptiden gleicher Masse abgeglichen. Der Grad der Richtigkeit des Abgleichs von experimentellen und theoretischen Spektren wird als wahrscheinlichkeitsbasierter Wert ausgegeben. In der Regel müssen mindesten zwei Fragmente eines Proteins mit dieser Methode identifiziert werden, da die Identifizierung eines Proteins über ein einzelnes resultierendes Fragment anfällig für falsch positive Ergebnisse ist (Wingren *et al.* 2009). Beim etablierten TXP-Ansatz kann jedoch das Wissen über das gut charakterisierte Epitop des verwendeten Antikörpers in die Datenbanksuche implementiert werden (Mann *et al.* 1994), so dass die Identifizierung eines Peptides pro Protein ausreichend ist, vorausgesetzt es handelt sich um ein für das Protein uniques Peptid. Wird das Ergebnis nach einem Datenbankabgleich mit einem P-Wert <0,05 ausgegeben und korreliert sein C-Terminus mit der Charakterisierung des Epitops des eingesetzten Antikörpers, kann das Peptid als eindeutig identifiziert angesehen werden. Ein Antikörper pro Subproteom ist bei diesem Ansatz somit für die eindeutige Identifizierung ausreichend.

Mit dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass dieses neuartige TXP-Konzept eine wichtige Erweiterung der bereits bestehenden affinitätsbasierten Anreicherungsstrategien für die anschließende massenspektrometrische Proteomanalyse darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass mit den beschriebenen neuartigen Antikörpern gegen kurze C-terminale Epitope aus vier Aminosäuren ein definiertes Subproteom, bestehend aus mehreren Dutzend Peptiden mit einem einzigen Antikörper speziesunabhängig angereichert werden kann. Dies verbessert deutlich die Auflösung der bisher entwickelten affinitätsbasierten Methoden und resultiert in guter analytischer Sensitivität und Spezifität. Der schnell durchzuführende Arbeitsablauf demonstriert das Potential der Methode zur Hochdurchsatzanalyse komplexer Proben. Im Gegensatz zu bestehenden immunaffinitätsbasierten Anreicherungsverfahren ermöglicht das entwickelte TXP-Konzept neben der differentiellen Expressionsanalyse auch die Biomarkerentdeckung in biologischen Proben. Gut charakterisierte Epitope der Antikörper erlauben die Identifizierung von Proteinen auf der Grundlage eines Peptides. Die Methode kann durch den Einsatz isotope-markierter Standards zu einer Methode für die absolute Quantifizierung erweitert werden. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse dieser Arbeit, wurden in einem weiterführenden Projekt bereits über 50 TXP-Antikörper zur Analyse von Serummarkern aus dem mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich generiert und zum Teil bereits erfolgreich eingesetzt.

5 Zusammenfassung

Die hohe Komplexität und der dynamische Konzentrationsunterschied der Proteine in biologischen Proben stellen die Analytik vor große Herausforderungen. Leistungsfähige analytische Plattformen, die für die Proteomanalyse geeignet sind, sind mit Massenspektrometrie-basierten Systemen entwickelt worden. Hierfür ist jedoch eine aufwändige Probenvorbereitung notwendig, im Besonderen um Zielproteine, die niedrig konzentriert vorliegen nachzuweisen. Meist werden elektrophoretische und chromatographische Prinzipien kombiniert und zur Probenfraktionierung eingesetzt. Neuentwicklungen im Bereich Immunaффinitäts-basierter Methoden besitzen die Potenz, den sensitiven Nachweis definierter Zielanalyten nach spezifischer Anreicherung deutlich zu verbessern. Limitierungen ergeben sich jedoch aus der geringen Zahl vorhandener Bindemoleküle und damit der geringen Anzahl nachweisbarer Proteine. Um diese Limitierungen zu umgehen wurde in dieser Arbeit ein Konzept entwickelt, das auf einer neuen speziellen Art von peptidspezifischen Antikörpern basiert. Diese peptidspezifischen Antikörper, die sehr kurze, aus nur vier Aminosäuren bestehende Epitope erkennen, die am Terminus eines Proteinfragments zu finden sind, werden genutzt, um speziesunabhängig Gruppen von Peptiden mit diesem terminalen Motiv aus komplexen Peptidgemischen zu extrahieren. Dutzende bis Hunderte proteotypischer Peptidfragmente werden von einem Antikörper definiert erkannt und so wird es möglich, mit einem spezifischen Antikörper nicht nur ein Protein für die massenspektrometrische Analyse anzureichern, sondern dutzende von Proteinen in einer Immunaффinitätsreaktion zu identifizieren. Durch *in silico* Verdau und bioinformatische Berechnungen kann die Identität des so detektierbaren Subproteoms durch die Wahl bestimmter Epitope gesteuert werden.

Die Überprüfung dieses Konzepts wurde anhand des Modellproteins β -Catenin geführt. Es wurden vier Peptide, die nach proteolytischem Abbau des Modellproteins mit Trypsin freigesetzt wurden ausgewählt, um polyklonale Terminus-spezifische Antikörper im Kaninchen zu generieren. Die gewonnenen Antiseren konnten mit Peptid-Mikroarrays auf Spezifität und Selektivität untersucht und die Bindungsepitope mit Hilfe von Peptidpositionsbibliotheken genau definiert werden. Methoden zur Antikörperaufreinigung wurden etabliert und verschiedene Terminus-spezifische Antikörper zur Herstellung von kleinen Immunaффinitätssäulen eingesetzt. Der Nachweis der Funktion der Methode wurde in der Maus-Zelllinie HepF1 geführt. Mit den eingesetzten Terminus-spezifischen

Antikörpern konnten neben den β -Cateninfragmenten 41 weitere Proteine detektiert werden. Das Prinzip mit einem Antikörper mehrere Peptide spezifisch anzureichern konnte somit gezeigt werden. Mit Hilfe von Glykogen Synthetase Kinase 3-Inhibitor behandelten und unbehandelten HEK-293 Zellen konnten unterschiedliche Zustände in den Proben dargestellt werden. Der spezieübergreifende Einsatz wurde durch den Einsatz humaner und Maus-Proben demonstriert. Damit konnte gezeigt werden, dass das hier evaluierte Konzept eine wichtige Erweiterung bereits bestehender affinitätsbasierter Anreicherungsstrategien darstellt und neue effiziente Wege zur Analyse komplexer biologischer Proben mit Hilfe der Massenspektrometrie ermöglicht.

6 Literaturverzeichnis

Aebersold, R., Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422, 198-207

Anderson, L., Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 1997, 18, 533-537

Anderson, N. L., Haines, L. R. and Pearson, T. W. An effective and rapid method for functional characterisation of immunoabsorbents using POROS beads and flow cytometry. *Journal of Proteome Research*, 2004 (a), 3, 228-234

Anderson, N.L., Anderson N.G., Haines, L.R., Hardie, D.B., Olafson, R. W. and Pearson, T.W. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies (SISCAPA). *Journal of Proteome research*, 2004 (b), 3, 235-344

Anderson, N.L., Anderson, N.G. The human plasma proteome: history, character and diagnostic prospects. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2002, 1, 845-867

Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F. and Garin, J. Isotope-labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* 2007, 6, 12, 2139–2149

Callesen, A.K., Madsen, J.S., Vach, W., Kruse, T.A., Morgensen, O. and Jensen, O.N. Serum protein profiling by solid phase extraction and mass spectrometry: A future diagnostic tool? *Proteomics*, 2009, 9, 6, 1428-1441

Carr, S.A., and Anderson, L. Protein Quantitation through Targeted Mass Spectrometry: The Way Out of Biomarker Purgatory? *Clinical Chemistry*, 2008, 54, 1749-1752.

Cockrill, S.L., Foster, K.L., Wildsmith, J., Goodrich, A.R., Dapron, J.G., Hassell, T.C., Kappel, W.K., Scott, G.B.I. Efficient micro-recovery and guanidination of peptides directly from MALDI target spots. *Biotechniques*, 2005, 38, 301-304

Corthals, C.L., Wasinger, V.C., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.-C. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. *Electrophoresis*, 2000, 21, 6, 1104-1115

Coughlan, M.P. *et al.* Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chemistry and Biology*, 2000, 10, 793-803

Echan, L. A., Tang, H., Ali-Khan, N., Lee, K. and Speicher, D. W. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacity of human serum and plasma. *Proteomics*, 2005, 5, 3292-3303

- Edman, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Archives of Biochemistry*, 1949, 22, 3, 475
- Ezan, E., Dubois, M. and Becher, F. Bioanalysis of recombinant proteins and antibodies by mass spectrometry. *The Analyst*, 2009, 134, 825-834
- Fang, X., Zhang, W-W. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, 2008, 71, 3, 284-303
- Feng, S., Ye, M., Zhou, H. and Jiang, X. et al. Immobilized zirconium ion affinity chromatography für specific enrichment phosphopeptides in phosphoproteome analysis. *Cellular Proteomics*, 2007, 6, 1656-1665
- Gordon M.D., Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281,32 , 22429-22433
- Govorukhina N.I., Keizer-Gunnink A., van der Zee A.G., de Jong S., de Bruijn H.W., and Bischoff R. Sample preparation of human serum for the analysis of tumor markers. Comparison of different approaches for albumin and gamma-globulin depletion. *Journal of chromatography. A*, 2003, 1009, 171-8
- Guzman, N.A., Blanc, T., Phillips, T.M. Immunoaffinity capillary electrophoresis as a powerful strategy for the quantification of low-abundance biomarkers, drugs, and metabolites in biological matrices. *Electrophoresis*, 2008, 29, 3259-3278
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, R., and Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Bioogy*, 1999, 1720-1730
- International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, 2004, 431, 931-945
- James, P. Protein identification in the post-genom era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1997, 30, 279-331
- Jiang, X., Ye, M. and Zou, H. Technologies and methods for sample pretreatment in efficient proteom and peptidome analysis. *Proteomics*, 2008, 8, 686-705
- Johannesson, G.A., Kristiansson, M.H., Jönsson, B.A.G. and Lindh, C.H. Evaluation of an immunoaffinity extraction column for enrichment of aducts between human serum albumin and hexahydrophthalic anhydride in plasma. *Biomedical Chromatography*, 2008, 22, 327-332
- Karas, M. et al. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*, 1985, 57, 2935-2939
- Karas, M.; Gluckmann, M. und Schafer, J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors, *Journal of Mass Spectrometry* 2000, 35, 1-12.
- Kaufmann, M., Lindner, P., Honegger, A., Blank, K., Tschopp, M., Capitani, G., Plückthun, A., Grütter, M. G. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 318, 1, 135-147

Kobata, A., Amano, J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunology and cell biology*, 2005, 83, 429-439

Krause, E., Wenschuh, H., and Jungblut, P.R. The Dominance of Arginine-Containing Peptides in MALDI-Derived Tryptic Mass Fingerprints of Proteins. *Analytical Chemistry*, 1999, 71, 19, 4160-4165

Lander, E. S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genom. *Nature*, 2001, 409, 860-921

Liang, P., and A. B. Pardee. Differential display of eukaryontic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257, 967-971

Lindner, P., Bauer, K., Krebber, A., Nieba, L., Kremmer, E., Krebber, C., Honegger, A., Klinger, B., Mocikat, R. and Pluckthun, A. Specific Detection of His-Tagged Proteins With Recombinant Anti-his Tag scFv-Phosphatase or scFv-Phage Fusions. *BioTechniques*, 1997, 22, 140-149

Link, A.J. et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 676-682

Lottspeich, F., Zorbas, H. *Bioanalytik; Spektrum, Akademischer Verlag*, 1998

Machida, M. et al. Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis. *FEBS Journal*, 2007, 274, 6, 1576-87

Mann, M. and Wilm, M. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Analytical Chemistry*, 1994, 66, 4390-4399

Morley, M., Molony, C. M., Weber, T. M., Devlin, J. L., Ewens, K. G., Spielman, R. S., and Cheung, V. G. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression, *Nature*, 2004, 430, 743-747

Nedelkov, D., Kiernan, U. A., Niederkofler, E. E., Tubbs, K. A., Nelson, R. W. Population Proteomics: The concept, attributes and potential for cancer biomarker research. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2006, 5, 1811-1818

Nedelkov, D., Phillips, D. A., Tubbs, K. A., Nelson, R. W. Investigation of human protein variants and their frequency in the general populatio. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2007, 7, 1183-1187

Nicol, G.R., Han, M., Kim, J., Birse, C.E., Brand, E., Nguyen, A., Mesri, M., Fitzhugh, W., Kaminker, P., Moore, PA., Ruben, S.M., He, T. Use of an immunoaffinity-mass spectrometry based approach for the quantification of protein biomarkers from serum samples of lung cancer patients. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2008, 7, 1974-1982

Pernemalm, M., Lewensohn, R., Lehtioe, J. Affinity prefractionation for MS-based plasma proteomics. *Proteomics*, 2009, 9, 1420-1427

- Pernemalm, M., Orre, L.M., Lenggqvist, J., Wikström, P., Lewensohn, R., Lehtio, J. Evaluation of three principally different protein prefractionation methods for plasma biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7, 7, 2712–2722
- Pieper, R., Su, Q., Gatlin, C. L., Huang, S.-T., Anderson, L. N., Steiner, S. Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: An innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics*, 2003, 3, 4, 422-432
- Poetz, O., Hoeppe, S., Templin, M.F., Stoll, D., Joos, T.O. Proteome wide screening using peptide affinity capture. *Proteomics*, 2009, 9, 1518-1523
- Price, M. A. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signalling. *Genes & Development*, 2006, 20, 399-410.
- Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2002, 2, 3-10
- Rush, J., Moritz, A., Lee, K. A., Guo, A. et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nature Biotechnology* 2005, 23, 94-101
- Shalon, D., S. J. Smith, and P.O. Brown. A DNA microarray system for analysing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genom Research*, 1996, 6, 639-645
- Sparbier, K. et al. Immuno-MALDI-TOF MS: new perspectives for clinical applications of mass spectrometry. *Proteomics*, 2009, 9, 6, 1442-1450
- Stevanovic, S. Identification of tumor-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2, 514-520
- Thulasiraman, V., Lin, S., Gheorghiu, L., Lathrop, J. et al. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis*, 2005, 26, 3651-3571
- Townsley, F. M., Cliffe, A., Bienz, M. Pygopus and Legless target Armadillo/ β -catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nature Cell Biology*, 2004, 6 626-633
- Whiteaker, J. R *et al.* Integrated pipeline for mass spectrometry-based discovery and confirmation of biomarkers demonstrated in a mouse model of breast cancer. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6, 3962-3975
- Wingren, C. James, P. and Borrebaeck, C.A. Strategy for surveying the proteome using affinity proteomics and mass spectrometry. *Proteomics*, 2009; 9, 6, 1511-1517
- Wilkins, M., R., et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1996, 13, 19-50
- Willert, K., Jones, K.A. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & Development*, 2006, 20, 1394-1404.

Wolters, D. A., Washburn, M. P., Yates III, J.R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical Chemistry*, 2001, 73, 5683-5690

Yang, Z., Hancock, W. S. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1053, 79-88

Zhang, H., Yan, W., Aebersold, R. Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteoms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, 8, 66-75

Zhou, M. et al. An investigation into the human serum "interactome". *Electrophoresis* 2004, 25, 9,1289-98.

7 Publikationsliste

Poetz, O., Hoeppe, S., Templin, M.F., Stoll, D., Joos, T.O.
Proteom wide screening using peptide affinity capture.
Proteomics, (2009), 9, 1518-1523

8 Lebenslauf

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit, sowie Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herzlicher Dank gilt Dr. Markus F. Templin, Dr. Oliver Pötz und Prof. Dr. Dieter Stoll für die fruchtbaren Diskussionen, die vielfältige Unterstützung und hervorragende Betreuung und Hilfestellungen bei der Anfertigung dieser Arbeit. Dr. Thomas O. Joos und Dr. Michael Pawlak danke ich für Gespräche und gute Denkanstöße.

Nicht versäumen will ich, mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Protein Profiling und Assayentwicklung und Biochemie für guten Atmosphäre und das angenehme Arbeitsklima zu bedanken. Sie alle ließen mir jederzeit Hilfe aller Art zuteil werden und waren für gute Diskussionen und regen fachlichen Austausch stets bereit. Besonderer Dank gilt Sonja Volk und Thomas Schreiber für die unermüdliche, stets gut gelaunte Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche und auch effektive Zusammenarbeit in alle Bereichen der MS-Analytik. Auch Thomas Knorpp sei hier erwähnt, der nicht nur einmal Feuerwehrmann in Sachen Textverarbeitung spielte.

Bei Dr. Albert Braeuning aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen bedanke ich mich für die Bereitstellung der Maus-Zelllinien. Hannes Planatscher vom Zentrum für Bioinformatik des Wilhelm-Schickard-Instituts Tübingen sei der Dank für alle bioinformatischen Berechnungen ausgesprochen.

Meiner Familie und allen Freunden, die in dieser Zeit oft zu kurz kamen, sei für die vielen Aufmunterungen und die dringend benötigte Ablenkung aufs herzlichste gedankt. Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern die mich all die Jahre bei allem unterstützt und mich durch mein Studium begleitet haben – ohne euch wäre ich nie soweit gekommen.

Lieber Björn, wie ich dir danken soll weiß ich nicht. Du hast mich immer wieder aufgerichtet und in dieser Zeit alle meine Launen immer mit viel Humor, Geduld, Verständnis und großer Nachsicht ertragen. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft – und deshalb ist diese Arbeit dir gewidmet.