

Dissertation

Entwicklung von immunoaffinitäts- und
massenspektrometriebasierten Assays

-

Quantitative Expressionsanalyse von G Protein-
gekoppelten Rezeptoren

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

David Eisen
aus Ravensburg

Tübingen 2013

Tag der mündlichen Qualifikation: 27.Mai.2013

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

Betreuer an der Universität Eberhard Karls Universität Tübingen

Prof. Dr. Stefan Stevanović

**Betreuer am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen
Institut an der Universität Tübingen**

Dr. Oliver Pötz und Dr. Thomas O. Joos,

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde in Reutlingen am „Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen“, in der Abteilung Biochemie, unter der Betreuung von Dr. Oliver Pötz und Dr. Thomas Joos angefertigt. Ein Teil der Arbeit wurde zudem am „Proteomics Centre, Genome British Columbia“ an der Universität von Victoria in Victoria BC, Kanada, unter der Betreuung von Prof. Dr. Christoph Borchers durchgeführt.

Ich danke besonders **Dr. Thomas O. Joos** und **Dr. Oliver Pötz** für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am NMI zu absolvieren. Zudem bin ich sehr dankbar für die professionellen Hilfestellungen, Denkanstöße, Ideen und vor allem auch für die persönliche Unterstützung in allen Situationen.

Ich danke **Prof. Dr. Stefan Stevanović** für die Annahme als Doktorand und seine Unterstützung.

Ebenso danke ich **Prof. Dr. Christoph Borchers** des Proteomics Centres, Genome BC für die Ermöglichung des Forschungsaufenthalts in seiner Arbeitsgruppe, welcher mich in meiner Arbeit stark vorangebracht hat.

Dr. Christopher Pynn gilt mein ganz besonderer Dank für die Unterstützung im Bereich der Massenspektrometrie und der Flüssigchromatographie für die Hilfe und Korrekturen in der englischen Sprache und für intensive Diskussionen und Ratschläge.

Bei **Hannes Planatscher** bedanke ich mich sehr für die bioinformatische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten.

Conny Sommersdorf danke ich für ihre vielen kleinen und großen Hilfestellungen im Labor, für das Einlernen in verschiedenste Technologien und die professionelle Begleitung durch die Zeit meines Praktikums, meiner Diplomarbeit und meiner Doktorarbeit am NMI.

Frederik Weiß, Dr. Sonja Schneider & Dr. Thomas Schreiber danke ich für die immer interessanten Diskussionen, Hilfestellungen im Labor und für die tolle gemeinsame Zeit in der Arbeitsgruppe.

Des Weiteren danke ich der gesamten Abteilung Biochemie und allen anderen Kollegen am NMI, mit denen ich eine tolle Zeit hatte und die mich in vieler Weise unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner **gesamten Familie, meinen Freunden und meiner bezaubernden Freundin Elvira** bedanken, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben, mich vorangetrieben und inspiriert haben und die jederzeit für mich da waren.

~ Vielen Dank! ~

I Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	V
I INHALTSVERZEICHNIS	VII
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
III TABELLENVERZEICHNIS	XI
IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
1.EINLEITUNG UND THEORIE:	2
1.1 PROTEOMIK	2
1.2 QUALITATIVE UND QUANTITATIVE MASSENSPEKTROMETRIE-METHODEN	6
1.3 IMMUNOAFFINITÄTS-MASSENSPEKTROMETRIE ANSÄTZE	13
1.4 TRIPLE X PROTEOMICS	16
1.5 G PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN	18
1.5.1 UNTERFAMILIEN UND DEREN PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG	19
1.5.2 STRUKTUR UND ANALYTISCHE HERAUSFORDERUNGEN	22
2 ZIELE DER ARBEIT	25
QUANTIFIZIERUNG VON G PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN	25
3 MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 CHEMIKALIEN	29
3.2 PUFFER	31
3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	33
3.4 GERÄTE UND SOFTWARE	34
3.5 HERSTELLUNG VON POLYKLONALEN TXP-ANTIKÖRPERN	35
3.5.1 PEPTIDSELEKTION FÜR DIE IMMUNISIERUNG UND FÜR STANDARD-PEPTIDE	35
3.6 PEPTIDSYNTHESE	36
3.7 CHARAKTERISIERUNG POLYKLONALER KANINCHEN-ANTISEREN AUF SEQUENZSPEZIFITÄT MITTELS BEADBASIERTER PEPTIDARRAYS	36
3.7.1 MIKROSPHÄRENBASIERTE PEPTIDARRAYS	37
3.7.2 KOMPETITIONS-ASSAY ZUR BESTIMMUNG DER ANTIKÖRPER-AFFINITÄT ZU IHREN ZIELSTRUKTUREN	38
3.8 CHARAKTERISIERUNG POLYKLONALER KANINCHENANTIKÖRPER AUF SEQUENZSPEZIFITÄT MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE	40
3.8.1 CHARAKTERISIERUNG POLYKLONALER KANINCHENANTIKÖRPER AUF SEQUENZSPEZIFITÄT MITTELS PEPTIDBIBLIOTHEKEN	40

3.8.2 CHARAKTERISIERUNG DER SPEZIFITÄT POLYKLONALER KANINCHENANTIKÖRPER MIT KURZEM C-TERMINALEM EPITOP MITTELS IMMUNPRÄZIPITATION AUS KOMPLEXEN BIOLOGISCHEN PROBEN UND AUSWERTESOFTWARE (MATERICS)	42
3.9 GEWINNUNG VON GEWEBEPROBEN	43
3.10 GEWEBELYSE	44
3.11 PROTEINBESTIMMUNG	44
3.12 TRYPTISCHER VERDAU VON GEWEBELYSATEN UND ZELLINIEN	44
3.13 LDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE UND COOMASSIE FÄRBUNG	45
3.14 WESTERN BLOTTING	45
3.15 AUTOMATISIERTE PEPTID-IMMUNPRÄZIPITATION	46
3.16 MASSENSPEKTROMETRISCHE METHODEN	47
3.16.1 MS-ANALYSEN: MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION/IONISATION – TIME OF FLIGHT (MALDI-TOF) UND TANDEM MS (MALDI TOF/TOF)	47
3.16.2 LC-MS-ANALYSE: ELECTROSPRAY IONISATION – TIME OF FLIGHT (ESI-TOF)	48
3.16.3 DATENVERWALTUNG UND IDENTIFIKATION MITTELS PROTEINSCAPE 2.0 UND MASCOT	50
3.17 ITRAQ QUANTIFIZIERUNG	51
3.17.1 ITRAQ-MARKIERUNGSMETHODE	51
3.17.2 QUANTIFIZIERUNG MITTELS INTERNER KALIBRIERUNGSKURVE	51
4. ERGEBNISSE	55
<hr/>	
4.1 OPTIMALE TXP-EPITOPE FÜR PROTEOTYPISCHE PEPTIDE VON GPCRS	55
4.2 CHARAKTERISIERUNG VON TXP-ANTIKÖRPERN	56
4.2.1 EPITOPSPEZIFITÄT DER TXP-ANTIKÖRPER	57
4.2.2 AFFINITÄTSBESTIMMUNG DER TXP-ANTIKÖRPER	64
4.2.3 IMMUNPRÄZIPITATION UND MALDI MS ANALYSE AUS GEWEBELYSATEN	66
4.2.4 PEPTID-BIBLIOTHEKEN	68
4.2.5 MATERICS FÜR DIE ANTIKÖRPERCHARAKTERISIERUNG	73
4.3 GPCR-QUANTIFIZIERUNG MITTELS IMMUNOAFFINITÄTSANREICHERUNG UND MASSENSPEKTROMETRISCHER ANALYSE	77
4.3.1 MALDI-ANALYSE ZUR ÜBERPRÜFUNG DER MARKIERUNGSEFFIZIENZ ZEIGT VOLLSTÄNDIG MARKIERTE PEPTIDE	78
4.3.2 OPTIMIERUNG DER FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIEPARAMETER	80
4.3.3 OPTIMIERUNG DER MASSENSPEKTROMETRIEPARAMETER	80
4.3.4 LINEARITÄT DER REPORTERIONENSIGNALE DER MARKIERTEN STANDARDPEPTIDE	81
4.3.5 LDS-PAGE ZEIGT EINEN VOLLSTÄNDIGEN PROTEINVERDAU	83
4.3.6 EFFEKTIVE AFFINITÄTSANREICHERUNG ALS VORBEREITUNG FÜR MS-ANALYSEN	85
4.3.7 REZEPTORQUANTIFIZIERUNG DURCH OPTIMIERTE VERSUCHSBEDINGUNGEN	89
4. 4 GPCR-WESTERN BLOT ANALYSEN	96
5. DISKUSSION	99
<hr/>	
5.1 TXP-KONZEPT	100
5.1.1 ANWENDUNGEN	102
5.1.2 CHARAKTERISIERUNG DER TXP-ANTIKÖRPER	102
5.2 WESTERN BLOTS	105
5.3 IMMUNOAFFINITÄTS-MS VON TRANSMEMBRAN-PROTEINEN	106

5.4 QUANTIFIZIERUNGSMETHODE	107
5.5 QUANTIFIZIERUNGSERGEBNISSE	109
6. ZUSAMMENFASSUNG	114
7. ANHANG	116
8. REFERENZEN	127
9. LEBENSLAUF	136

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Quantifizierung mit iTRAQ.	12
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines G Protein-gekoppelten Rezeptors.	23
Abbildung 3: Übersicht über den Arbeitsablauf zur Quantifizierung von Membranproteinen.....	27
Abbildung 4: Mikrosphärenbasierter Peptidarray zur Antikörpercharakterisierung.....	38
Abbildung 5: Aufbau des Kompetitionstests zur Bestimmung einer apparenten Affinität.....	39
Abbildung 6: MATERICS Benutzeroberfläche.....	43
Abbildung 7: Darstellung des verwendeten Laufmittelgradienten der LC-Methode.	49
Abbildung 8: Probenvorbereitung zur Quantifizierung.....	52
Abbildung 9: Mikrosphärenbasierte Assays zur Charakterisierung von TXP-Antikörpern.....	63
Abbildung 10: Kompetitionsassays für die Antikörper anti-C(Cam)QYR (Tier 1 und 2).	65
Abbildung 11: Immunpräzipitation aus einer komplexen biologischen Probe.....	67
Abbildung 12: Antikörpercharakterisierung mittels Peptidbibliotheken.....	69
Abbildung 13: Peptidbibliothekbasierte Antikörpercharakterisierung.....	71
Abbildung 14: Epitopcharakterisierung des anti-LGYR-Antikörpers.....	73
Abbildung 15: Antikörpercharakterisierung durch komplexe Proben und MATERICS.....	75
Abbildung 16: Überprüfung der iTRAQ-Markierungsreaktion von Standardpeptiden mittels MALDI MS.....	79
Abbildung 17: Linearitätstest der internen Peptidstandardkurven.....	82
Abbildung 18: Verdaukontrolle.....	84
Abbildung 19: Wiederfindungsrate von Antikörpern in den Immunoaffinitäts Assays.....	86
Abbildung 20 A: ESI-Quad-TOF MS Spektren der iTRAQ-markierten Gewebelysate vor IP.....	87
Abbildung 21: Fragmentspektren von GPCR-spezifischen tryptischen Peptiden.....	92
Abbildung 22: Ermittelte Konzentrationen von G Protein-gekoppelten Rezeptoren in Gewebeproben.	94
Abbildung 23: Western Blot Analyse für verschiedene G Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	97
Abbildung 24: Beadbasierte Assays zur Charakterisierung weiterer TXP-Antikörper.....	126

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen	XII
Tabelle 2: Übersicht verschreibungspflichtiger Medikamente mit Wirkung auf GPCRs	21
Tabelle 3: Chemikalien	29
Tabelle 4: Verwendete Puffer in alphabetischer Reihenfolge.....	31
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	33
Tabelle 6. Geräte und Software	34
Tabelle 7: Peptidbibliotheken.....	41
Tabelle 8: Antikörper für Western Blot Analysen	45
Tabelle 9: Übersicht über die Arbeitsschritte „TXP Assay PCR Plates“-Protokolls	46
Tabelle 10: Parameter der MALDI-MS Methoden.....	48
Tabelle 11: Angepasste Kollisionsenergien zur Peptidfragmentierung der ESI-MS/MS Messungen	50
Tabelle 12: Übersicht über die ausgewählten TXP-Sequenzen und Analyten.....	56
Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse des Kompetitionsassays	65
Tabelle 14: Ergebnis des anti-LGYR-Antikörpers durch Peptidbibliotheken.....	72
Tabelle 15: Proteotypische Standardpeptide zur Quantifizierung.....	78
Tabelle 16: Angepasste Kollisionsenergien für die Precursor-Ionen Fragmentierung.....	81
Tabelle 17: Regressionsgeraden der internen Kalibrierungskurven der Standardpeptide	83
Tabelle 18: Übersicht über die Molekulargewichte der untersuchten G Protein-gekoppelten Rezeptoren	97

IV Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
7-TM	7 Transmembran
AS*	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ABC	Ammonium-Bicarbonat Puffer
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
AQUA	Absolute Quantifizierung von Proteinen
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Unit (relative Einheit)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
dk	Esel
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescent
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray Ionisation
et al.	et alii
FA	Ameisensäure
FBS	Foetal Bovine Serum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FT	Flow-Through
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosin Austausch Faktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GTP	Guanosintriphosphat
gt	Ziege
HA	Hemagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)- Ethansulfon-Säure
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
HR	Histamin Rezeptor
HRP	Meerrettich Peroxidase
IAA	Iodacetamid
IPA	Isopropanol
iTRAQ	Isobare Tags für Relative und Absolute

	Quantifizierung
kDa	Kilodalton
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LDS	Lithium Dodecyl-Sulfat
LLOD	Lower Limit of Detection
LLOQ	Lower Limit of Quantification
mAChR	Muscarinischer Acetylcholin Rezeptor
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MATERICS	Mass-Spectrometric Analysis of Terminal Epitope Enrichment in Complex Samples
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
mgf	MASCOT generic format
MISA	Massenspektrometrischer Immunoassay
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
MRM	Mutiple Reaction Monitoring
ms	Maus
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MudPIT	Multi-Dimensionale Protein Identifikations-Technologie
MV	Mittelwert
n.a.	Not Available
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NOG	<i>n</i>-Octyl-β-D-Glucopyranosid
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
OXYR	Oxytozin Rezeptor
PAC	Prespotted Anchor Chip
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSN	PBS + NOG
PP	Polypropylen
R-PE	R-Phycoerythrin
PIPES	1,4-Piperazine-Bis-(Ethansulfonic Acid)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
ppm	Parts Per Million
PSA	Prostataspezifisches Antigen
rbt	Kaninchen
rpm	Rounds Per Minute
RT	Raumtemperatur
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture
SISCAPA	Stable Isotope Standards with Capture by Anti-Peptide Antibodies
SN	Überstand
SOP	Standard Operating Procedure
SRM	Single Reaction Monitoring
std	Standard
Sulfo-SMPB	Sulfo-Succinimidyl-4-(p-Maleimidophenyl)-Butyrat

TAE	Triethanolamin
TBS	Tris-Puffered Saline
TBST	Tris-Puffered Saline + Tween-20
TCEP	Tris-(2-Carboxyethyl)Phosphat Hydrochlorid
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time Of Flight
TPCK	L-1-Tosylamido-2-Phenylethyl Chloromethyl Keton
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat
w/v	Weight Per Volume
w/w	Weight Per Weight
ZNS	Zentrales Nervensystem

* Aminosäuren im IUPAC ein-Buchstaben Code

1. Einleitung und Theorie:

1.1 Proteomik

Als Proteom bezeichnet man die Gesamtheit aller vorhandenen Proteine unter definierten Bedingungen, zu einem definierten Zeitpunkt und in einem definierten Organismus (Zelle, Gewebe oder Lebewesen). Handelt es sich bei der untersuchten Probe um eine bestimmte Gruppe von Proteinen (z.B. Membranproteine, lösliche Proteine) oder eine untergeordnete räumliche Einheit (z.B. ein Zellkompartiment), spricht man auch häufig von einem „Sub-Proteom“.

Im weiteren Sinne schließt die Proteom-Forschung neben der Analyse von Expression aller Proteine eines Organismus auch die Bereiche der strukturellen Proteomik und der funktionellen Proteomik mit ein [1].

Das Hauptziel der Proteomik ist die detaillierte Charakterisierung des Proteoms [2]. Der Begriff „Proteom“ wurde vor allem durch Marc Wilkins geprägt [3]. Die Proteomforschung soll die Lücke zwischen der relativ statischen genombasierten Information und der hochdynamischen Veränderung von Proteinexpression, posttranslationalen Modifikationen, lokalen Veränderungen und Interaktionen schließen. Die verschiedenen Felder Genom-, Transkriptom- und Proteomforschung können dabei nicht separat betrachtet werden. Vielmehr greifen sie ineinander und ergänzen sich. Umfangreiche Entwicklungen und Fortschritte im Bereich der Proteomforschung wurden in den letzten Jahren vorangetrieben. Große Proteomprojekte zur Darstellung von Protein-Protein Netzwerken, Zusammensetzung von Zellorganellen oder zur Beschreibung von Krankheitszuständen (insbesondere im Bereich der Krebsforschung) wurden generiert [4].

Prominente Beispiele solcher Großprojekte sind die „Human Proteome“ Projekte, wie das „Plasma Proteome Project“, das „Human Liver Proteome Project“ oder das „Human Brain Proteome Project“ und viele weitere Projekte, die von der „Human Proteome Organisation“ initiiert wurden.

Nationale und internationale Organisationen (z.B. HUPO, Human Proteome Organisation; DGPF, Deutsche Gesellschaft für Proteomforschung) haben sich zu diesem Zweck gebildet, um die Zusammenarbeit in der Proteomforschung zu fördern und die Entwicklung neuer Technologien und Ansätze voranzutreiben.

In der Proteomforschung bieten hochkomplexe Analyseverfahren die Grundlage von neuen Konzepten für systembiologische Modelle, für die Entwicklung neuer wirtschaftlicher Prozesse im Bereich der Biotechnologie, sowie für die Entdeckung von Biomarkern oder neuer Therapiekonzepte und Wirkstoffe. Die klinische Proteomik beschäftigt sich vor allem mit der Suche nach neuen Biomarkern, die nach Validierung beispielsweise für die Diagnostik, zum Monitoren von Patienten oder für die Vorhersage eines Krankheitsverlaufes verwendet werden können [5]. Diese Biomarker können sowohl zell- oder gewebespezifisch sein und können in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden.

Hochsensitive und genaue Methoden der Proteinanalytik sind von größter Wichtigkeit, um verlässliche qualitative, sowie quantitative Daten von Proteinen, einschließlich deren posttranslationalen Modifikationen zu erhalten [6]. Viele verschiedene methodische Ansätze für die unterschiedlichen Bereiche, wie arraybasierte Proteomik, strukturelle Proteomik oder die klinische Proteomik stehen heute zur Verfügung.

Als eines der wichtigsten Werkzeuge in der Proteomforschung gilt beispielsweise die zweidimensionale Gelelektrophorese, die 1975 von O'Farrell und Klose entwickelt wurde [7, 8] und trotz einiger Limitierungen noch immer in vielen Bereichen Anwendung findet [9]. Bei dieser Methode werden die Proteine zunächst in einer isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch nach der Masse separiert. Einige Proteine können aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften allerdings nicht durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Insbesondere für die Analyse von sehr hydrophoben Membranproteinen ist diese Methode ungeeignet.

Einige Antikörper- und Protein-Arrays bieten die Möglichkeit von sehr schnellen Proteom-weiten Analysen. Der Vorteil dieser arraybasierten Proteomikmethoden ist, dass auch Interaktionen zwischen Proteinen oder Modifikationen festgestellt werden können, was unter anderem auch die Analyse von niedrig abundanten Proteinen ermöglicht [4, 10]. Die „Two-Hybrid“-Technologie in *Saccharomyces cerevisiae* wurde 1989 von Fields et al. beschrieben und dient als Nachweismethode für Protein-Protein Interaktionen [10]. Fluoreszenzmikroskopische Methoden, werden beispielsweise durch die Förster-Resonanzenergietransfer-Technologie (FRET) oder durch den Einsatz des „Grün Fluoreszierenden Proteins“ (GFP) ermöglicht.

Zur Identifikation, Quantifizierung und Charakterisierung von Proteinen in komplexen Proben, wie beispielsweise Blutplasma, Gewebeproben oder Zelllysaten, gilt die Massenspektrometrie als eine sehr spezifische und verlässliche Detektionsmethode. Die Massenspektrometrie ist derzeit die einzige Methode, die universell eingesetzt werden kann, um spezifisch Struktur und Modifikationen eines Proteins ohne Vorwissen zu bestimmen [11]. Durch die klassischen Immunoassays ist eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Isoformen oder modifizierten Proteinen zumeist nicht möglich, da diese im Normalfall nur ein aufsummiertes Signal aller Isoformen ermöglichen. Sowohl in sogenannten „Bottom-up“-, als auch in „Top-down“ Ansätzen ist die Massenspektrometrie ein unverzichtbares Werkzeug. Bei der „Bottom-up“-Strategie werden Proteine, die aus einer Probe extrahiert wurden, für die Analyse zunächst enzymatisch zu Peptiden verdaut. Anschließend können diese Peptide massenspektrometrisch nachgewiesen, identifiziert und gegebenenfalls quantifiziert werden. Peptide sind aufgrund einer besseren Ionisierbarkeit im Massenspektrometer häufig einfacher zu analysieren als ganze Proteine. Allerdings wird durch die Proteolyse zu Peptiden auch die Komplexität der Probe stark erhöht, was in manchen Fällen einen Nachteil dieser Methode darstellen kann, da durch die erhöhte Komplexität einzelne Analyte in der Probe maskiert werden können.

In „Top-down“-Analysen werden die intakten Proteine isoliert und anschließend wird mit Tandem-Massenspektrometrie die Sequenzinformation der Proteine gewonnen. Außerdem können auch beide Methoden miteinander kombiniert werden [12].

Durch Flüssigchromatographie werden Proteine oder Peptide in solchen Ansätzen (LC-MS-basierte Proteomik) aufgetrennt und ins Massenspektrometer transferiert [2]. Verschiedenste Strategien wurden hierzu in den letzten Jahrzehnten entwickelt und auf die unterschiedlichsten biologischen Fragestellungen angepasst.

Qualitative Ansätze werden dabei häufig durch quantitative ergänzt. Eine Übersicht über die wichtigsten quantitativen Massenspektrometriemethoden ist in Kapitel 1.2 zu finden. Technische Fortschritte in den Messmethoden ermöglichen eine immer bessere Sensitivität und einen erweiterten dynamischen Detektionsbereich von Analyten. Heutige Elektrospray-Massenspektrometer mit einem dynamischen Detektionsbereich von 4-5 Größenordnungen, zeigen eine Nachweisgrenze (abhängig vom Analyten) von wenigen Attomol. Analyte, die in geringerer Menge vorhanden sind, können nur nach einer Anreicherung aus einem größeren Probenvolumen nachgewiesen werden. Weit verbreitete Methoden für die Anreicherung von Analyten sind hierbei immunologische Assays, bei denen Antikörper zur Anreicherung der Zielstrukturen verwendet werden, bevor die Analyten massenspektrometrisch detektiert werden können. In Kapitel 1.3 und 1.4 werden solche Immunoaffinitäts-MS-Ansätze vorgestellt.

Die Proteomforschung stellt nicht zuletzt eine wichtige Grundlage für systembiologische Ansätze dar, deren großes Ziel die Beschreibung von Zellen oder Organismen als Ganzes zu ermöglichen, um somit das Verhalten eines Gesamtsystems erklären und verstehen zu können [4, 13].

1.2 Qualitative und quantitative Massenspektrometrie-Methoden

In der Proteomik stellt die Massenspektrometrie eine der wichtigsten Methoden zur Protein-Analyse dar. Sie steht dabei in Konkurrenz zu anderen Methoden, wie Immunoassays (Western Blot oder ELISA). Allerdings sind für diese Methoden spezifische Antikörper notwendig, welche häufig nicht zur Verfügung stehen. Insbesondere bei hoher Homologie in der Aminosäuresequenz der Zielproteine versagen diese Methoden aufgrund unzureichender Spezifität und hoher Kreuzreaktivität [14]. Ein großer Vorteil der Massenspektrometrie zeigt sich darin, dass durch „Peptide Mass Fingerprint“ oder Peptid-Sequenzinformationen nach MS/MS-Messungen eine eindeutige Proteinidentifikation durch einen anschließenden Datenbankabgleich möglich ist. Diese Information erlaubt die eindeutige Identifikation eines Analyten und ermöglicht so die Unterscheidung von spezifischen Signalen und solchen, die durch andere Bestandteile der Probe entstehen. In vielen anderen biochemischen Analytik-Verfahren ist dies nicht der Fall, sondern es wird nur ein Signal generiert, welches keine eindeutige Zuordnung zu einem Analyten zulässt. Zusätzliche Informationen über die detektierten Analyten können dabei durch die Verwendung eines zweiten Antikörpers, beispielsweise in Sandwichimmunoassays oder durch die vorhergehende Auftrennung der Analyte nach Molekulargewicht, in Western Blot Analysen erreicht werden. Die Generierung spezifischer Antikörper, mit ausreichender Affinität und ohne Kreuzreaktivität, die zum eindeutigen Nachweis eines Analyten geeignet sind, ist jedoch sehr aufwändig.

„Elektrospray Ionisation“ (ESI) und „Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization“ (MALDI) sind die in der Protein- und Peptidanalyse am häufigsten eingesetzten Methoden der Massenspektrometrie. Aufgrund von hoher Auflösung, ausgezeichneter Präzision und ihrer Einfachheit, werden sie für die Identifikations- und Quantifizierungsansätze eingesetzt. Die Sensitivität, Qualität und Reproduzierbarkeit dieser Methoden nimmt stetig zu [15-18]. Zahlreiche massenspektrometrische Methoden zur qualitativen und quantitativen Proteinanalytik wurden in den letzten Jahren etabliert und führten zu neuen Einblicken in

Signaltransduktionswege, Proteinentdeckung/-charakterisierung, Interaktionen sowie in der Biomarkersuche und –quantifizierung [15].

Das Spektrum an massenspektrometrie-basierten Quantifizierungsmethoden ist sehr breit und reicht von „markierungsfreien“ Methoden, über interne isotope-markierte Peptidstandards bis hin zu metabolischen-, enzymatischen- oder chemischen Markierungsreaktionen. Je nach Anwendungsgebiet haben die verschiedenen Quantifizierungsmethoden Vor- und Nachteile, welche in zahlreichen Übersichtsartikeln, wie beispielsweise von Bantscheff et al. zusammengefasst sind [17]. Weitgehend können die bekanntesten Quantifizierungsansätze in markierungsfreie Methoden und solche, bei denen ein Label verwendet wird, unterschieden werden. Bei den **markierungsfreien Methoden** sind vor allem der „Vergleich von Signalintensität“ und das „Zählen von Spektren“ bekannt [19]. Beide Methoden beruhen auf LC-MS und LC-MS/MS Messungen. Die Tatsache, dass die Konzentration eines Analyten mit der Ionenmenge korreliert [20], ermöglicht eine markierungsfreie Quantifizierung. Dazu werden die Signalintensitäten der identifizierten Peptide aus LC-MS-Messungen extrahiert und miteinander verglichen. Die zweite markierungsfreie Methode basiert auf der Anzahl der identifizierten MS/MS Spektren eines Analyten ausgehend von LC-MS/MS Messungen. Dies wird durch die lineare Korrelation zwischen Proteinabundanz und der Anzahl an generierten MS/MS Spektren ermöglicht [21]. Diese beiden Quantifizierungsmethoden haben im Vergleich zu Quantifizierungsmethoden, bei denen eine Markierung eingebracht wird, einige Vorteile, aber auch deutliche Nachteile. Die Vorteile liegen weitgehend auf der Hand: Es werden keine teuren Standards, Markierungsreagenzien oder Markierungsschritte im Arbeitsablauf benötigt. Neben einem finanziellen und zeitlichen Vorteil werden so auch Artefakte, die durch zusätzliche Prozessierung der Probe eingebracht werden könnten, vermieden. Des Weiteren wird die Komplexität der Spektren nicht durch das Einführen von Modifikationen erhöht, die Anzahl der Experimente ist nicht beschränkt und ein hoher dynamischer Bereich dieser Quantifizierungsmethode wurde beschrieben [17]. Auf der anderen Seite werden markierungsfreie Quantifizierungsmethoden sehr kontrovers diskutiert, da sie als zu ungenau gelten. Es wird zudem eine Vielzahl an Spektren für die robuste

Quantifizierung eines Protein benötigt [22] und experimentelle Variationen können die Ergebnisse der Quantifizierung stark beeinflussen [17]. Zuletzt gibt es große Unterschiede zwischen verschiedenen Proteinen/Peptiden in der Art, wie sie sich im Flüssigchromatographiesystem und dem Massenspektrometer verhalten, was einen Vergleich verschiedener Proteine erschwert. Die physikochemischen Eigenschaften (Masse, Ladung, Hydrophobizität, Modifikationen und weitere) beeinflussen sowohl die Signalintensität stark, als auch die Anzahl der generierten Fragmentspektren.

Diese Probleme werden weitgehend vermieden, wenn für die Quantifizierung beispielsweise **isotopenmarkierte Peptide** in die Probe eingebracht werden, die als Referenz dienen. Die am weitesten verbreitete Methode dabei ist die sogenannte AQUA (absolute quantification of proteins) Methode [23], welche häufig in Kombination mit SRM/MRM (single-/multiple reaction monitoring) Messungen [24, 25] angewendet wird. Durch schwere isotopenmarkierte Standardpeptide mit bekannter Konzentration wird eine absolute Quantifizierung ermöglicht.

Limitierungen der klassischen AQUA-Methode sind beispielsweise die Kosten für die „schweren Peptide“, welche für jedes zu quantifizierende Peptid hergestellt werden müssen. Werden die AQUA-Peptide nicht mit einer MRM-Analyse kombiniert, wird nur ein niedriger dynamischer Bereich erreicht und Überlagerungen der endogenen oder zugesetzten Peptide im Massenspektrometer durch isobare Ionen stellen ein großes Problem dar [17].

In MRM Messungen werden Peptide zunächst über ein flüssigchromatographisches System getrennt. Aufgrund identischer physikochemischer Eigenschaften eluieren die isotopenmarkierten Peptide gleichzeitig mit den endogenen. Üblicherweise werden für die anschließende massenspektrometrische Analyse Triple-Quadrupol-Geräte verwendet. Die Peptide werden im ersten Quadrupol des Massenspektrometers selektiert und gefiltert, sodass nur Ionen eines festgelegten Masse-zu-Ladungs-Fensters in den zweiten Quadrupol gelangen. In dem zweiten Quadrupol, der sogenannten Kollisionszelle, werden diese Peptide zu Sekundärionen fragmentiert. In einem dritten Quadrupol werden die dabei entstandenen Fragmente erneut gefiltert, sodass nur ausgewählte Ionen der fragmentierten Peptide zum Detektor gelangen. Die Peakflächen der dabei gemessenen Sekundärfragmente (die häufig als

„Übergänge“ bezeichnet werden) des zugesetzten, isoto­penmarkierten Peptids mit bekannter Konzentration können anschließend mit denen des endogenen Peptids verglichen werden. Durch diesen Vorgang wird eine sehr hohe Spezifität erreicht und zudem bietet diese Quantifizierungsmethode einen dynamischen Messbereich über 4-5 Konzentrationsgrößenordnungen [25, 26]. Neben den zuvor genannten Limitierungen von AQUA-Peptiden, weisen Quantifizierungsansätze mit zugesetzten, isoto­penmarkierten Peptiden weitere Nachteile auf. Diese entstehen, wenn die Standards, auf die referenziert wird, erst nach einigen Probenvorbereitungsschritten (wie z.B. enzymatischem Verdau) zugegeben werden. Effekte, die eventuell bei diesen Arbeitsschritten in die Proben eingebracht werden, werden bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt und können das Ergebnis verfälschen. Beispielsweise kann ein unvollständiger Proteinverdau, unspezifische Proteolyse von Proteinen oder Peptiden durch endogene Proteasen oder die Agglutination der Analyte während der Probenvorbereitung einen starken Einfluss auf die vorliegende Protein oder Peptidmenge haben. **Isoto­penmarkierte Proteine** können schon früher im Arbeitsablauf in die Probe eingebracht werden. Als Referenzproteine werden sie anschließend zusammen mit der Probe verdaut und weiter prozessiert, sodass die genannten Fehlerquellen ausgeglichen werden. Zudem kann die Sequenzabdeckung und damit auch die statistische Verlässlichkeit der Quantifizierung eines Proteins erhöht werden, da nicht nur ein Peptid pro Protein quantifiziert wird, sondern mehrere Peptide, die von einem Protein stammen, für eine Quantifizierung zur Verfügung stehen [27].

Auch bei dieser Quantifizierungsmethode werden zelluläre Prozesse wie post-translato­nale Modifikationen, Proteolyse vor dem gezielten enzymatischen Verdau oder andere Proteinmodifikationen nur bedingt mitberücksichtigt. Wird ein Protein nach oder während der Biosynthese in der Zelle modifiziert, so können sich dadurch die die Masse und auch die Ladung des Moleküls ändern. Diese Veränderungen können das Verhalten im Flüssigchromatographiesystem, oder auch die Ionisierbarkeit im Massenspektrometer drastisch verändern, sodass die Ergebnisse einer Quantifizierung verfälscht werden. Um diese Effekte zu berücksichtigen, kann

stattdessen eine Methode mit **metabolischer Markierung** von biologischen Proben verwendet werden.

Bei der sogenannten SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture) Methode, werden Zellen mit Medium inkubiert, das Aminosäuren mit „schweren Isotopen“ enthält [28, 29]. Für gewöhnlich handelt es sich dabei um die Aminosäuren Arginin oder Lysin, in die ^{13}C oder ^{15}N eingebaut ist. Dadurch wird sichergestellt, dass pro tryptischem Peptid nur eine „schwere Aminosäure“ eingebaut ist, da Trypsin spezifisch Proteine nach diesen beiden Aminosäuren hydrolysiert. Mit dieser relativen Quantifizierungsmethode kann beispielsweise die Proteinexpression „markierter Zellen“ nach unterschiedlicher Behandlung mit dem Proteom einer Referenzprobe von „unmarkierten Zellen“ verglichen werden. Der größte Vorteil ist dabei, dass das Label direkt in die intakte Zelle eingebaut wird und die Referenzprobe noch vor dem Proteinverdau oder anderen experimentellen Schritten zusammengeführt werden. Fortan sind alle präparativen Schritte für beide Proben identisch, wodurch die Zahl der Fehlerquellen minimiert werden kann. Allerdings sind auch bei diesem Ansatz einige Probleme bekannt, wie beispielsweise sehr hohe Kosten für „isotopenmarkiertes Medium“, ein hoher Zeitaufwand, der unvollständige Einbau der isotopenmarkierten Aminosäuren oder die metabolische Umwandlung von Arginin zu Prolin in der Zelle [17]. Dieser Aminosäureumbau kann dazu führen, dass in einem Peptid nach dem tryptischen Verdau nicht nur eine, sondern mehrere schwere Aminosäuren vorliegen.

Zudem ist eine Anwendung dieser Methode eher ungeeignet für höhere Organismen. Die Organismen müssen für eine sehr lange Zeit mit der teuren markierten Nahrung ernährt werden, um eine nahezu vollständige Proteinmarkierung zu erreichen. Dass dennoch eine metabolische Markierung auch bei Organismen möglich ist, wurde bisher für Pflanzen, *C.elegans*, *Drosophila melanogaster*, sowie in Maus- und Rattenmodellen gezeigt [29-32].

Bei der **enzymatischen Markierung** von Proteinen/Peptiden findet die Markierung einige Schritte später im Analyseprozess statt. Im Prozess der enzymatischen Spaltung wird durch die Proteasen ^{18}O aus „schwerem Wasser“ eingebaut [33]. Alternativ kann dieser Schritt allerdings auch in einem zweiten Inkubationsschritt

nach der Peptidspaltung stattfinden. Da diese Methode jedoch in vielen Fällen zu einer unvollständigen Markierung der Peptide führt [34], wird häufig alternativ eine **chemische Markierung** von Proteinen oder Peptiden durchgeführt. Diese Methode der chemischen Markierung mit stabilen Isotopen bietet eine hohe Präzision über den Arbeitsablauf, eine gute Wiederfindungsrate der Analyte und einen linearen dynamischen Bereich von ungefähr zwei Größenordnungen [17]. Zudem ermöglicht der Einsatz von isobaren Markierungsreagenzien, wie TMT („tandem mass tags“) oder iTRAQ („isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification“), die Möglichkeit von multiplexen Analysen über die Reporterionen der MS/MS-Spektren [16, 35]. Die Methode zur Quantifizierung mittels isobaren Tags wurde 2003 zum ersten Mal von Thompson et al. beschrieben [36]. Proben können dabei mit isobaren Reagenzien markiert werden, die sich erst im MS/MS unterscheiden lassen. Ein Vorteil dabei ist, dass zwei identische Analyte, welche mit zwei unterschiedlichen isobaren Tags markiert wurden, identische physikochemischen Eigenschaften aufweisen.

Bei den iTRAQ-Reagenzien werden unterschiedliche Kombinationen von schweren Kohlenstoff- und Stickstoffisotopen verwendet. Durch die unterschiedliche Verteilung der Isotopen, innerhalb des Reagenzes kann anhand von Reporterionen nach Fragmentierung unterschieden werden. Abbildung 1 zeigt das dabei verwendete iTRAQ-Reagenz und das Prinzip der beschriebenen Quantifizierungsmethode.

Quantitative Proteinmessungen werden immer bedeutender für die Charakterisierung von komplexen biologischen Systemen. Dabei ist auch ein Trend zur multiplexen Quantifizierung zu erkennen. Dies stellt vor allem die Probenvorbereitung vor neue Aufgaben und fordert multidimensionale Trenn- und Aufreinigungsmethoden [16, 37].

Isobarer Tag
(Masse 145)

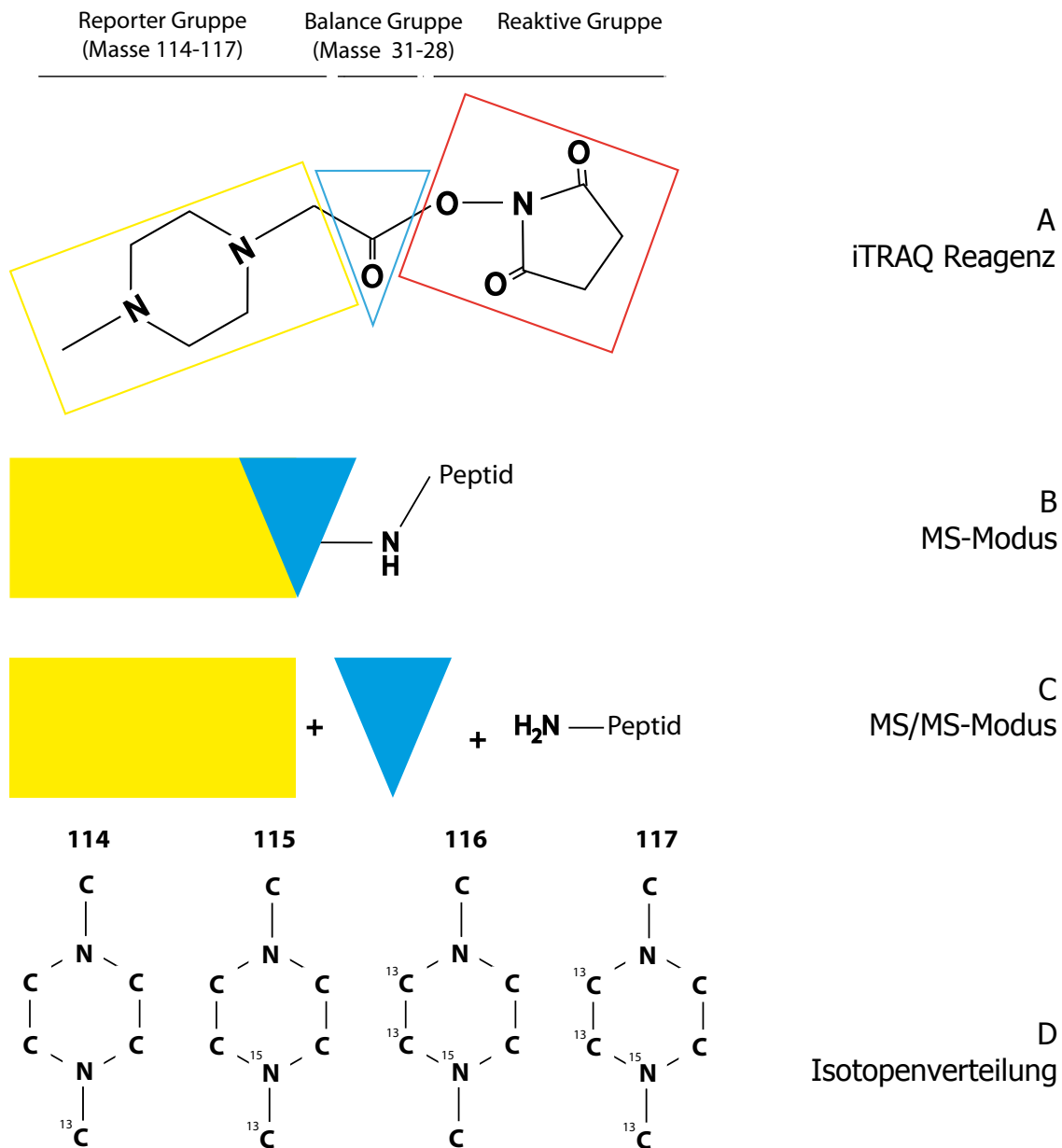


Abbildung 1: Quantifizierung mit iTRAQ.

Das iTRAQ Reagenz besteht aus einem reaktiven Aktivester (rot), einer Balance Gruppe (blau) und einer Reporter Gruppe (gelb). Reporter- und Balance Gruppe haben zusammen eine Masse von 145 Da. Durch unterschiedliche Isotopenverteilung kann die Reporter Gruppe eine Masse von 114-117 Da aufweisen. Entsprechend hat die zugehörige Balance Gruppe eine Masse von 145 abzüglich der Masse der Reporter Gruppe (A). Durch Umsetzung des Reagenz kann ein Peptid am N-Terminus markiert werden (B). Im MS/MS Modus wird die Balance Gruppe in einer „Neutral Loss Reaktion“ abgespalten und die Reportergruppen können unterschieden werden (C). Im iTRAQ 4plex Kit sind durch die Kombination schwerer Kohlenstoff- und Stickstoffisotopen vier verschiedene Reportergruppen unterscheidbar (D).

1.3 Immunoaffinitäts-Massenspektrometrie Ansätze

Für den sensitiven Nachweis von Proteinen, und somit auch für die massenspektrometrische Quantifizierung, müssen komplexe Peptidmischungen zeitaufwendig aufgetrennt werden und die zu analysierenden Proteine in ausreichender Menge angereichert werden, um den Sensitivitätsbereich des Massenspektrometers auszunutzen. Vor allem im Feld der quantitativen Proteomik, insbesondere bei sehr proteinreichen Matrices, wie sie bei Zelllysaten, Gewebeproben oder Blutplasma gegeben sind, ist eine deutliche Entwicklung in Richtung gerichtete Massenspektrometrie („targeted MS“) und Immunoaffinitäts-Massenspektrometrie zu erkennen [38]. Während bei ungerichteten Massenspektrometriemethoden („nontargeted MS“), wie in der klassischen Bottom-up Proteomik, das untere Detektionslimit in etwa bei 1-10 µg/ml liegt, kann dies durch gerichtete Methoden, wie in SRM/MRM-basierten Methoden, deutlich verbessert werden, sodass ein Detektionslimit von 100-500 ng/ml erreicht werden kann. Dies liegt daran, dass durch die erhöhte Selektivität mehr Fragmentierungszyklen der ausgewählten Analyte ermöglicht wird, was zu einer verbesserten Sensitivität führt.

Beispielweise zeigten Muddiman et al. eine LC-MS/MS-basierte Analyse des „Prostata-spezifischen Antigens“ (PSA), einem Biomarker für die Diagnose von Prostatakarzinomen, in menschlichem Plasma in einem Bereich zwischen 2 und 184 µg/ml [39]. Ein weiteres Beispiel zeigt die Arbeit von Kuhn et al., die durch eine LC-MS/MS-Methode in Plasmaproben von Patienten mit rheumatoider Arthritis nach Depletion der hoch abundanten Proteine Serumalbumin, Immunglobulin G und Haptoglobin, den Biomarker „C-reaktives Protein“ (CRP) quantifizieren konnten [40]. Im Vergleich zu diesen Massenspektrometriemethoden sind klassische Immunoassays, wie beispielsweise ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), deren Quantifizierungsgrenze im Picogramm pro Milliliter-Bereich liegt, etwa um einen Faktor von bis zu 10^6 empfindlicher.

Eines der größten Probleme stellen die sehr häufig vorkommenden (hoch abundanten) Proteine dar, die zu einer hohen Komplexität der Probe führen und zudem auch die Signale von weniger stark vertretenen Proteinen maskieren. Vor

allem in Plasmaproben stellt dies große Schwierigkeiten dar. Die Depletion der sechs am stärksten im Plasma vertretenen Proteine, die zusammen etwa 85% der Proteinmenge ausmachen, wird daher als methodischer Ansatz verfolgt [41, 42]. Trotz dieser Reduzierung der Proteinmenge der Probe bleibt die Komplexität noch sehr hoch und es liegen weiterhin viele tausend verschiedene Proteine vor [11], sodass der Nachweis von niedrig konzentrierten Proteinen nach wie vor stark erschwert bleibt. Zudem besteht die Gefahr, dass durch den Prozess auch andere Analyte, die spezifisch oder unspezifisch an die zu entfernenden Proteine oder dem Affinitätsmaterial binden, mit aus der Probe entfernt werden.

Durch die Kombination von Immunpräzipitation der Analyte mit massenspektrometrischen Analyseverfahren werden diese Probleme umgangen und ein Sensitivitätsbereich von 0,1-1 ng/ml kann erreicht werden [38, 43]. Die Anreicherung von Analyten mittels antikörperbasierten Methoden wurde bereits in den frühen Neunzigerjahren beschrieben und ist weitgehend gut etabliert [11, 44]. Dadurch kann der Nachweis von Analyten gezielt durchgeführt werden und Probendurchsatz sowie Sensitivität werden gleichzeitig erhöht.

Der sogenannte „Massenspektrometrische Immunoassay“ (MISA) war einer der ersten Immunoaffinitäts-Ansätze [44]. In dieser Methode werden Proteine spezifisch durch polyklonale Antikörper, die in Pipettenspitzen immobilisiert sind, angereichert, eluiert und mithilfe vom MALDI MS analysiert. Dadurch ist eine sehr einfache und schnelle Anreicherung des Analyten möglich.

Neben einer antikörperbasierten Anreicherung von Proteinen werden auch Ansätze verfolgt, bei denen zuerst die Probe fragmentiert wird, und anschließend die Peptidfragmente mittels peptidspezifischer Antikörper angereichert und im MS nachgewiesen werden. Wenn die angereicherten Peptide von einem enzymatischen Proteinverdau stammen und man sie spezifisch einem einzelnen Protein zuordnen kann, so werden diese Peptide als „proteotypisch“ bezeichnet. Diese Peptide können in Quantifizierungsansätzen als Surrogat für ihre entsprechenden Proteine stehen, da sie nach vollständigem enzymatischen Verdau in derselben Molarität vorliegen. Diese Methode ermöglicht durch die Verwendung mehrerer peptidspezifischer Antikörper den Nachweis einer Vielzahl von proteotypischen Peptiden aus einer Probe.

Zur Quantifizierung können vor der Immunpräzipitation stabile Isotopenstandards zugesetzt werden. Ein solcher peptidbasierter Ansatz (SISCAPA, Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies) wurde 2009 von Leigh Anderson et al. beschrieben [37]. Proteotypische Peptide und zugegebene isotopenmarkierte Peptide wurden mithilfe von peptidspezifischen Antikörpern angereichert und anschließend im Massenspektrometer nachgewiesen. Das isotopenmarkierte Referenzpeptid ermöglicht hierbei eine akkurate Quantifizierung.

Automatisierte, parallelisierte und multiplexe Methoden erweitern und verbessern Immunoaffinitäts-Methoden [45, 46]. Ein Beispiel eines multiplexen Quantifizierungsansatzes wurde von Schoenherr et al. gezeigt [33]. In einem multiplexen immuno-„Single Reaction Monitoring“ (SRM)-Ansatz wurden aus Zelllinien und humanen Proben der Östrogen Rezeptor (ER) und der Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) erfolgreich quantifiziert. Dabei wurden vier Konzentrations-Größenordnungen bis in den niedrigen fmol/mg Bereich abgedeckt. Dieser Ansatz war der erste peptidbasierte immuno-SRM-Assay in Zelllysaten und menschlichen Gewebeproben. Zudem wurde damit ein Ansatz einer MS-basierten, quantitativen Membranrezeptor-Quantifizierung gezeigt.

1.4 Triple X Proteomics

Die Voraussetzung für Immunoaffinitätsansätze ist die Verfügbarkeit von Antikörpern zur Anreicherung der Analyten. Erst dadurch können Analyte im niedrigen Konzentrationsbereich aus komplexen Proben (wie beispielsweise einzelne Peptide nach einem enzymatischen Verdau einer Zelllinie, einer Plasma- oder einer Gewebeprobe) detektiert werden. Jedoch stellt die Verfügbarkeit von Antikörpern eine Engstelle in der antikörperbasierten Proteomik dar. Je nach Zielsetzung ist der Einsatz von hunderten bis tausenden Antikörpern notwendig, um eine bestimmte Gruppe von Proteinen oder ein Sub-Proteom abzudecken, da für jeden einzelnen Analyten ein Antikörper gebraucht wird. Dieses Problem wird durch den „Triple X Proteomics“ (kurz TXP) Ansatz adressiert. Dabei kommen für die Anreicherung von Zielstrukturen spezielle Antikörper zum Einsatz, welche gegen kurze Aminosäuresequenzen am C- oder N-Terminus von Peptiden gerichtet sind. Die Zielepitope sind lineare Aminosäurefolgen von 3-4 variablen Aminosäuren und, bei C-terminalen Sequenzen, eine der beiden Aminosäuren Arginin (R) oder Lysin (K). Diese Spezifität erlaubt es mit einem Antikörper mehrere Peptide gleichzeitig zu binden und anzureichern, sofern diese die entsprechende Sequenz terminal aufweisen [45, 47-49]. Auf dieser Grundlage basierend ergibt sich die Möglichkeit, effizient eine große Gruppe von Peptiden mit einer geringen Anzahl von Antikörpern anzureichern. Solange die Peptide, die von sehr häufig vorkommenden Proteinen stammen nicht dasselbe Epitop aufweisen, können diese effizient aus der Probe entfernt werden, was zu einer verbesserten Detektierbarkeit von niedrig konzentrierten Peptiden führt.

Durch diese Art von gruppenspezifischer Anreicherung kann bei einer umfassenden Proteomanalyse die Anzahl der benötigten Antikörper von vielen hunderten auf einige wenige Antikörper reduziert werden. Die deutlich verringerte Anzahl von Antikörpern zeigt den wirtschaftlichen Vorteil dieses Ansatzes auf. Es müssen deutlich weniger Antikörper generiert werden. Zudem können mit einem einzigen Antikörper mehrere Analyte gleichzeitig in einem Assay angereichert werden. Mit wenigen hundert derartigen Antikörpern können tausende von proteotypischen Peptiden aus

komplexen Proben angereichert und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden, sodass große Teile des Proteoms eindeutig nachgewiesen werden können [45]. Vor allem bei stark konservierten Primärstrukturen in Proteinen sollte es auf diese Weise möglich sein, eine Vielzahl proteotypischer Peptide durch einen Antikörper anzureichern [50]. Es können TXP Epitope identifiziert werden, die bei über 100 proteotypischen Peptiden vorkommen, und somit von einem einzigen AK gebunden werden können.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich dadurch, dass diese Antikörper speziesübergreifend eingesetzt werden können, sofern die terminale Aminosäuresequenz identisch ist. Somit können die Antikörper bei verschiedensten Fragestellungen in unterschiedlichen Organismen eingesetzt werden. Zudem können sie beispielsweise in Maus oder Ratte getestet/etabliert werden, um später in der Analyse humaner Proben zum Einsatz zu kommen. Jedes Proteom, das aufgrund der genomischen Information *in silico* definiert werden kann, kann mit einem entsprechenden Satz von TXP-Antikörpern erfasst werden.

1.5 G Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Familie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) stellt die größte Gruppe von Membranrezeptoren in Eukaryoten dar. Es handelt sich um Transmembranrezeptoren, die alle sieben alpha-helikalen Transmembrandomänen aufweisen. Daher werden sie auch als „7-TM“ oder „heptahelikale“ Rezeptoren bezeichnet [48]. Sie dienen als „molekulare Schalter“, die Signale von außerhalb nach innen in die Zelle weitergeben. Dort sind diese Rezeptoren an G-Proteine gebunden, über die zahlreiche Signalwege reguliert werden. Die Art der Liganden-Bindung sowie die Weitergabe des Signals ist vielfältig, zum Teil noch nicht vollständig bekannt und daher Gegenstand aktueller Forschung.

Die Signalweitergabe über Rezeptoren findet in Wechselwirkung mit den sogenannten G-Proteinen statt. G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die aus einer α -, einer β -, und einer γ -Untereinheit aufgebaut sind. Im inaktiven Zustand ist dieser Komplex über die α -Untereinheit an zwei der intrazellulären Loops des Rezeptors gebunden und bindet in der Regel zudem Guanosindiphosphat (GDP). Durch Ligandenbindung eines Signalmoleküls von außerhalb der Zelle an den Rezeptor kommt es zu einer konformationellen Änderung der Rezeptorstruktur, sodass dieser als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF, guanine nucleotide exchange factor) fungieren kann. Der GEF ermöglicht durch eine allosterische Aktivierung den Austausch von GDP zu Guanosintriphosphat (GTP) am G-Protein. Die Aktivierung des G-Proteins durch Bindung des GTPs veranlasst die Dissotiation der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins. Die dissoziierten Untereinheiten können in diesem Zustand, abhängig von dem Liganden, dem GPCR und dem G-Protein selbst, zur weiteren Signalweitergabe führen, welche sehr vielfältig ist. Durch eine schwache hydrolytische Aktivität der α -Untereinheit wird GTP wieder in GDP und eine Phosphatgruppe gespalten, sodass sich der Grundzustand des G-Proteins und des Rezeptors wieder einstellen kann.

Im aktivierten Zustand kann die α -Untereinheit des G-Proteins sehr vielseitige Funktionen haben. Die wichtigsten bekannten Funktionen sind für $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$, sowie für $G_{\beta\gamma}$ beschrieben.

$G_{\alpha s}$ aktiviert die Adenylatcyclase, die die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat, einem sogenannten „second messenger“, katalysiert. Eine $G_{\alpha i}$ Untereinheit inhibiert die Adenylatcyclase hingegen und verhindert damit die Bildung von cAMP. Unabhängig von der Adenylatcyclase ist $G_{\alpha q}$ ein Effektor für die Phospholipase C β und somit involviert bei der Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat zu Inositol 1,4,5 Trisphosphat und Diacylglycerol. Auch bei diesen beiden Stoffen handelt es sich um „second messenger“-Moleküle die wiederum die Aktivierung weiterer Signalketten modulieren. $G_{\alpha 12/13}$ moduliert verschiedene RhoGEFs und nimmt dadurch auch Einfluss auf weitere Signalwege. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit ist ebenfalls an der Modulierung der Adenylatcyclase und der Phospholipase C beteiligt und nimmt zudem Einfluss auf verschiedene Ionenkanäle und Kinasen. Der enorme Umfang an möglichen Einflüssen in verschiedensten Signalkaskaden der Zelle zeigt die Vielseitigkeit der G-Proteine. Nicht zuletzt spiegelt sich die physiologische und wissenschaftliche Bedeutung der G Protein-gekoppelten Rezeptoren in der Vergabe des Chemie Nobelpreises 2012 an die beiden Amerikaner Prof. Robert Lefkowitz und Prof. Brian Kobilka für die Entdeckung und Charakterisierung dieser Rezeptoren wieder.

1.5.1 Unterfamilien und deren physiologische Bedeutung

Eine enorme Vielzahl an physiologischen Prozessen, die durch G Protein-gekoppelte Rezeptoren gesteuert werden, ist bekannt. Sehr bedeutsame Beispiele sind der Sehprozess, welcher durch Rhodopsin gesteuert wird [51] oder der Geruchssinn, bei dem olfaktorische- und vomeronasale Rezeptoren die Hauptrolle spielen [52]. Weitere wichtige, GPCR-gesteuerte Prozesse sind die Regulation des Immunsystems, des sympathischen und parasympathischen Nervensystems, der Zell-Zell-Kommunikation, des Verhaltens und viele weitere [53].

Basierend auf den Genominformationen des Internationalen Human Genom Projekts [54], das über 99% des humanen Genoms abdeckt, wird eine Anzahl von mehr als 800 verschiedenen GPCRs vermutet. Diese werden in 3 Hauptklassen eingeteilt [55]:

Klasse 1: Rhodopsin-like receptor family, Klasse 2: Secretin receptor family, Klasse 3: Metabotropic glutamate/pheromone receptor family.

Sowohl physiologisch, als auch pharmakologisch wichtige Vertreter aus der Klasse der „Rhodopsin-like“ Rezeptoren sind die Subfamilien der Serotonin Rezeptoren (5-Hydroxytryptamin Rezeptoren; 5-HT R), die muskarinischen Acetylcholin Rezeptoren oder der Oxytozin Rezeptor.

Histologische und mRNA-basierte Analysen [56] zeigen, dass Serotonin Rezeptoren vorwiegend in Blutplättchen, dem Darm und dem zentralen Nervensystem exprimiert werden. Im ZNS sind sie vor allem an der Verhaltensregulation beteiligt und haben einen starken Einfluss auf zentrale Prozesse wie Schlaf, Appetit, Abhängigkeit und dem Angstgefühl [56-58]. In den Blutplättchen und im Darmsystem beeinflussen sie kardiovaskuläre Funktionen bzw. die Darmmotilität [58-61].

Einen bedeutenden Vertreter der Familie der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren stellt die Isoform M2 dar. Diese ist vor allem im Herzgewebe exprimiert und dort unter anderem an der Steuerung der Schlagleistung und -rate beteiligt. Aus diesem Grund sind die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren ein präferiertes Ziel für blutdruckregulierende Pharmazeutika [62, 63]. In geringeren Mengen kann diese Isoform außerdem in der Lunge, dem Uterus und viele Bereichen des Gehirns gefunden werden.

Oxitozin Rezeptoren liegen vor allem im ZNS, den Brustdrüsen, dem Uterus, der Niere und im Herzgewebe vor. Dort übermitteln die Signale des Hormons und Neurotransmitters Oxitozin und tragen damit unter anderem zur Verhaltenssteuerung bei [64, 65].

Aufgrund ihrer Vielfältigkeit in verschiedensten Signalkaskaden und ihrer Funktion als „molekulare Schalter“ werden GPCRs auch als die wichtigste Zielgruppe von Pharmaka angesehen. Bei einigen der wichtigsten Signalwege stehen GPCR am Anfang oder stehen durch „cross-talk“ mit ihnen in Verbindung. Beispiele für wichtige Signalwege, bei denen GPCRs eine Hauptrolle spielen, sind cAMP/PKA, Ca²⁺/PKC, MAPK/ERK1, Ca²⁺/NFAT, PLC, Pi3K, NO-cGMP, NFκB, Rho, JAK/Stat und viele andere [66].

Es wird angenommen, dass bis zu 80% aller bekannten Pharmaka eine Wirkung auf Membranproteine haben [67] und dass bis zu 50% aller derzeit auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe die Modulierung von GPCRs zum Ziel haben [68]. Eine Vielzahl der Medikamente, die GPCRs modulieren, beeinflussen das zentrale Nervensystem (ZNS), was nicht verwunderlich ist, da über 90% aller GPCRs im Gehirn exprimiert werden [69]. In den Top 100 der verschreibungspflichtigen Medikamenten (Med Ad News 1999) waren beispielsweise folgende Medikamente gelistet, welche alle auf GPCRs wirken [70].

Tabelle 2: Übersicht verschreibungspflichtiger Medikamente mit Wirkung auf GPCRs

Medikament	Indikation
Allegra®	Allergien
Claritin®	Allergien
Diprivan®	Anästhesie
Tenormin®	Angina
BuSpar®	Angstzustände
Serevent®	Asthma
Singulair®	Asthma
Atrovent®	Bronchospasmus
Ventolin®	Bronchospasmus
Effexor®	Depression
Paxil®	Depression
Prozac®	Depression
Wellbutrin®	Depression
Zoloft®	Depression
Depakote®	Epilepsie
Xalatan®	Glaucoma
Cozaar®	Hypertension
Diovan®	Hypertension
Hytrin®	Hypertension
Toprol-XL®	Hypertension
Vasotec®	Hypertension

Imitrex®	Migräne
Cardura®	Prostata-Hypertrophie
Lupron®	Prostatakrebs
Zoladex®	Prostatakrebs
Hamal®	Prostatic-Hyperplasia
Zyprexa®	Psychotische Störungen
Pepcid®	Reflux
Propulsid®	Reflux
Zantac®	Reflux
Zyrtec®	Rhinitis
Risperdal®	Schizophrenie
Plavix®	Schlaganfall
Gaster®	Ulceritis

Aus diesen Gründen ergibt sich eine große Bedeutung und damit auch ein großer Informationsbedarf über Struktur, Funktion und Expressionslevel dieser Rezeptorgruppe in Geweben oder auch Modellorganismen.

1.5.2 Struktur und analytische Herausforderungen

G Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören zur Superfamilie der heptahelikalen Proteine. Die sieben alpha-helikalen Transmembrandomänen sind unter den Mitgliedern der GPCR-Familien weitgehend stark konserviert. Sie sind dabei so in der Plasmamembran angeordnet, dass sie je vier intra- und drei extrazelluläre Domänen aufweisen. Bei den meisten GPCRs sind die intra- und extrazellulären Domänen verhältnismäßig kurz und ein Großteil des Rezeptors befindet sich eingelagert in der Plasmamembran, wodurch sie von außen schwer zugänglich sind. Der prinzipielle Aufbau von GPCRs ist in Abbildung 2 dargestellt.

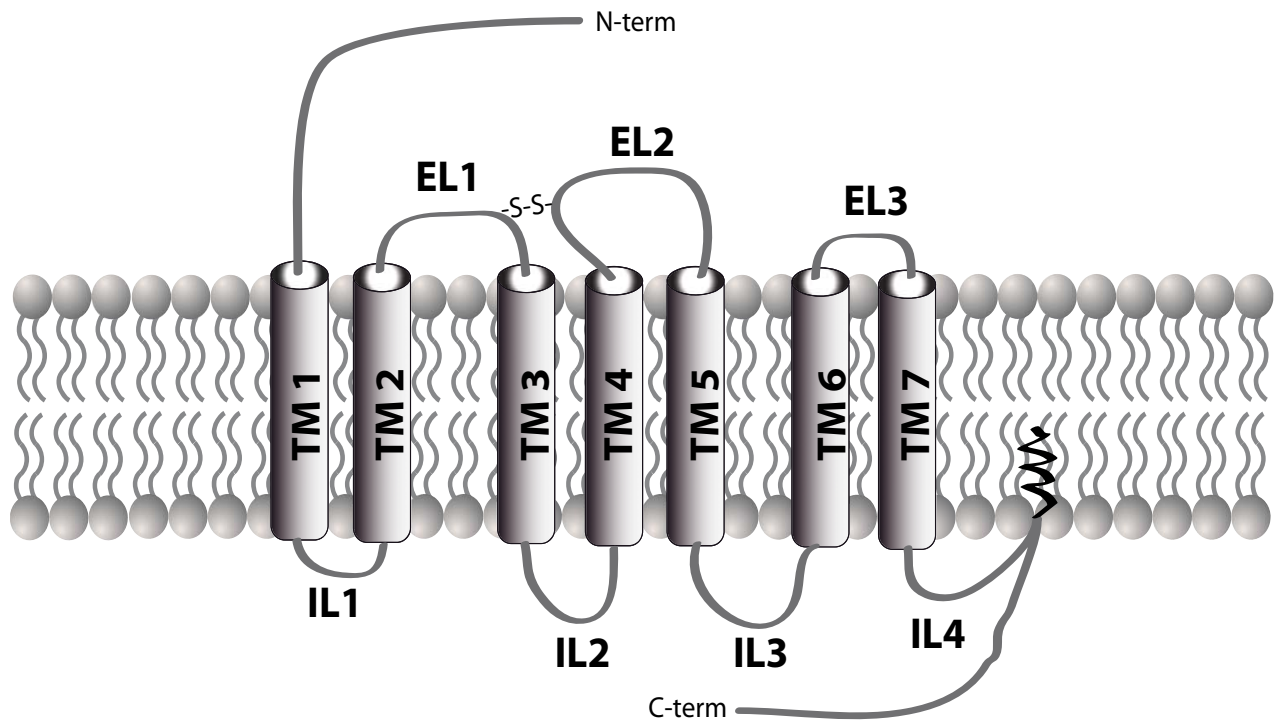


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines G Protein-gekoppelten Rezeptors.

Der Rezeptor besteht aus 7 transmembran-Domänen (TM 1-7), drei extrazellulären Loops (EL 1-3) und vier intrazellulären Loops (IL 1-4). Der N-Terminus liegt außerhalb der Zelle und der C-Terminus ist intrazellulär. Abbildung modifiziert nach Ji et al [53].

Der organo-, gewebe- oder zellspezifische Nachweis dieser Proteine stellt eine essentielle Voraussetzung für die Vorhersage von Wirkung und potentiellen toxischen Nebeneffekten von Medikamenten dar. Die Detektion und insbesondere auch die Quantifizierung von GPCRs ist jedoch eine besondere Herausforderung, da sie aufgrund ihrer sieben Transmembrandomänen sehr hydrophob und zudem für Antikörper schwer zugänglich sind. Mit klassischen Methoden der Proteinanalytik, wie beispielsweise 2D-Gelelektrophorese oder Western Blot, lassen sich diese Proteine daher nur schwer nachweisen. Weiterhin gibt es nur wenige kommerziell erhältliche, GPCR-spezifische Antikörper, welche beispielsweise für Western Blots oder ELISA-Methoden notwendig sind.

2 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, mit der Membranproteine einfach und zuverlässig quantifiziert werden können. Hierzu sollten immunoaffinitätsbasierte Ansätze mit anschließender massenspektrometrischer Analyse eingesetzt werden.

Diese Methode sollte für G Protein-gekoppelte Rezeptoren entwickelt werden, da es bislang noch keine geeigneten Methoden zur Quantifizierung von Membranproteinen mit mehreren Transmembrandomänen gibt.

Zuerst galt es, die für den Nachweis von GPCRs notwendigen Antikörper zu generieren. Hierbei sollten TXP-Epitope definiert werden, die in proteotypischen Peptiden verschiedener GPCRs vorkommen und zur Generierung von TXP-Antikörpern eingesetzt werden können. Es sollten funktionelle Methoden zur effizienten TXP-Antikörpercharakterisierung entwickelt werden, die eindeutig zeigen, welche Kreuzreaktivitäten im späteren Assay zu erwarten sind. Mit den so charakterisierten TXP-Antikörpern sollte gezeigt werden, dass proteotypische Peptiden der G Protein-gekoppelten Rezeptoren gezielt angereichert werden können und mittels Massenspektrometrie quantifiziert werden können. Mit den oben beschriebenen Assays sollten GPCR-Expressionsprofile aus Herz-, Cerebellum- und Cortexgewebe erstellt werden.

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden und Datensätze sollten als Grundlage dienen, um in weiteren Experimenten die GPCR-Familien mit systembiologischen Methoden zu analysieren und somit die Entwicklung neuer Pharmazeutika zu erleichtern.

Quantifizierung von G Protein-gekoppelten Rezeptoren

Der Ablauf der zu etablierenden Methode ist in Abbildung 3 dargestellt. Die einzelnen Arbeitsschritte des Ansatzes sollten so optimiert werden, dass sie generell für eine quantitative Analyse von Membranproteinen eingesetzt werden können.

In dieser Arbeit werden zum Nachweis von GPCR-Proteinen gruppenspezifische Antikörper verwendet, die an kurze terminale Sequenzen, dem TXP-Epitop von

proteotypischen Peptiden binden. Somit können mit einem einzigen Antikörper aus einer tryptisch verdauten Probe Gruppen von Signaturpeptiden mit identischen terminalen Aminosäuresequenzen angereichert werden.

Derartige Antikörper galt es mittels bioinformatischer Analyse zu identifizieren, generieren und in funktionellen Tests zu charakterisieren. Für die quantitative Analyse sollten mehrere GPCRs aus drei GPCR-Subfamilien (muskarinische Acetylcholin-, Serotonin und Oxitozin Rezeptoren) ausgewählt werden, für die entsprechende Referenzpeptide bereitgestellt werden sollten.

Proteotypische Signaturpeptide dieser Rezeptoren sollten durch die terminusspezifischen Antikörper angereichert werden und anschließend mittels MALDI MS und MS/MS nachgewiesen bzw. mittels LC-ESI-MS/MS quantifiziert werden. Damit sollte gezeigt werden, dass mit wenigen Antikörpern ein vergleichsweise einfacher und schneller Nachweis einer ansonsten schwer nachweisbaren Klasse an Proteinen möglich ist.

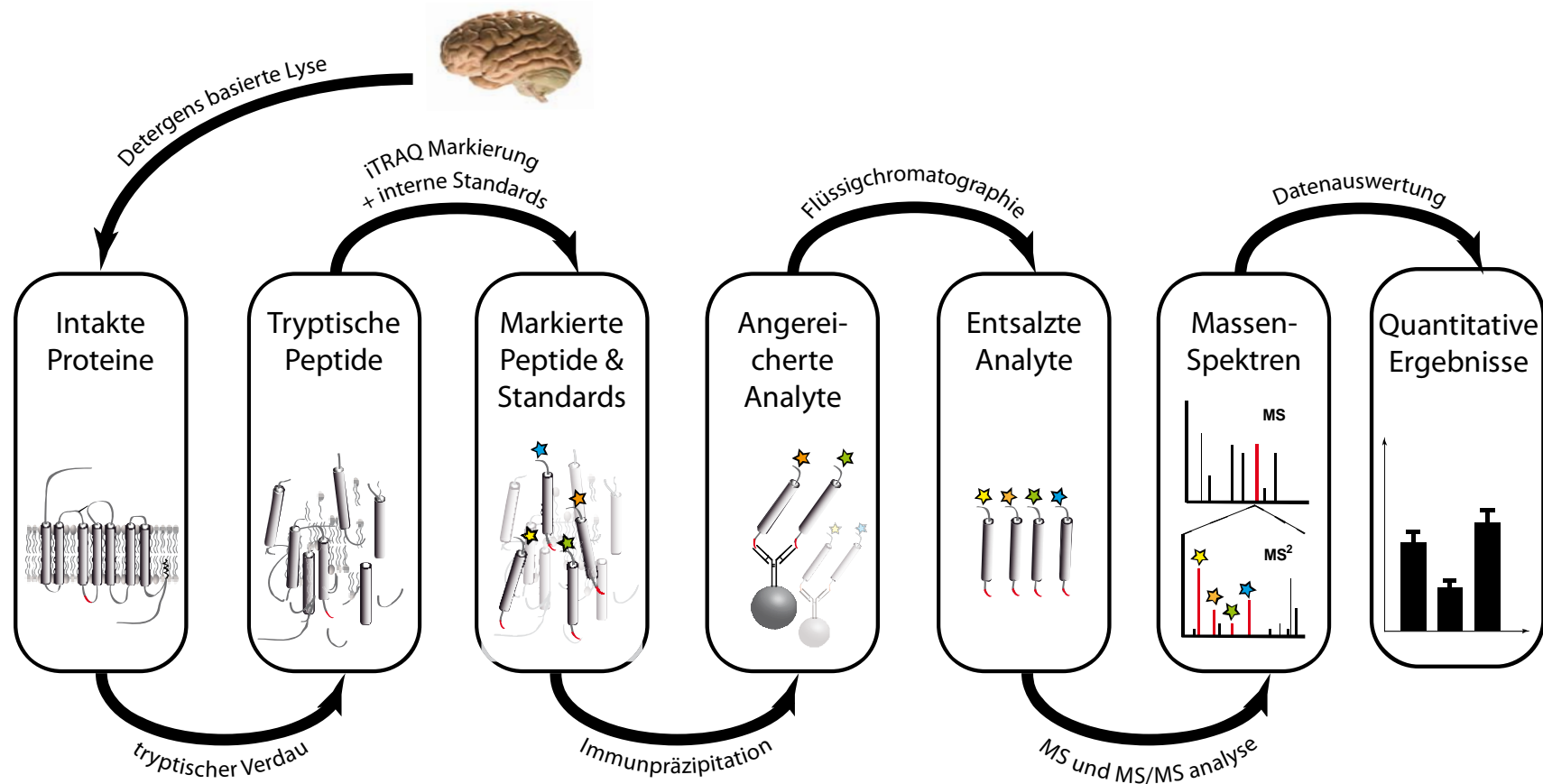


Abbildung 3: Übersicht über den Arbeitsablauf zur Quantifizierung von Membranproteinen

Gewebeproben werden zerkleinert und die Proteine über eine detergensbasierte Lyse solubilisiert. Anschließend werden die Proteine enzymatisch verdaut und chemisch markiert. Zusätzlich werden ebenfalls chemisch markierte Standardpeptide zugegeben. Die proteotypischen Peptide werden mithilfe von Terminus-spezifischen Antikörpern angereichert, in einem Flüssigchromatographiesystem entsalzt und aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Durch datenbankbasierte Identifikation und Datenprozessierung können zuletzt quantitative Daten erhalten werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

In Tabelle 3 sind alle verwendeten Chemikalien aufgeführt

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie:	Hersteller:
Essigsäure	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
CaCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Complete Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
L-Cystein	ACROS (Fisher Scientific), Nidderau, Germany
Digitonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
DMSO	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
DTT	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
ECL plus WB Detection System	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
EDC	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Ethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Ameisensäure	Biosolve, Valkenswaard, NL
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IAA	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
LDS	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
mgf	MASCOT generic file
MOPS	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NaCitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na ₂ HPO ₄	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaN ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
NaOH	Riedel-de Haën GmbH, Seelze
Na Acetat	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA

NOG	AppliChem Inc., St.Louis, MO, USA
PBS (autoklaviert)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
PIPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PMSF	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
SeeBluePlus2 Marker	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Sulfo-NHS	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Sulfo-SMPB	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
TBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TCEP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton X100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin TPCK (behandelt)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Germany

3.2 Puffer

Tabelle 4: Verwendete Puffer in alphabetischer Reihenfolge

Puffer	Komponenten	Konzentration
ABC-Puffer pH 7.4	NH ₄ HCO ₃	50 mM
	NH ₃	zur pH-Einstellung
Aktivierungspuffer pH 6.2	Na ₂ HPO ₄	100 mM
Blocking Reagent (Roche, Indianapolis, USA)	Tris/HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	Gelatine	1 % (w/v)
Cell Culture Medium	DMEM	
	L-Glutamin	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
	Foetal Bovine Serum	10 %
Citrat Puffer pH 2.5	Na Citrat	100 mM
	NH ₃	zur pH-Einstellung
Coomassie Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250	0.20 %
	Methanol	50 %
Kopplungspuffer pH 5.0	Essigsäure	10 %
	MES	50 mM
Entfärber I	Ethanol	50 %
	Essigsäure	10 %
Entfärber II	Ethanol	10 %
	Essigsäure	5 %
Lysepuffer pH 7.2	Triton X-100	0, 5 %
	SDS	0.01%
	NaCl	1,5 M
	Na ₂ HPO ₄	0.01M
	EDTA	2 mM
	Protease Inhibitor	1x
Verdauungspuffer pH 8.5	TRIS	50 mM
	CaCl ₂	1 mM

Glycin-Elutions Puffer pH 10	Glycin	100 mM
	NaOH	Zur pH-Einstellung
HiTrap Puffer A pH 8.3	Ethanolamin	0,5 M
	NaCl	0,5 M
HiTrap Puffer B pH 4.0	NaAcetat	0,1 M
	NaCl	0,5 M
HiTrap Standard Kopplungspuffer	NaHCO ₃	0,2 M
	NaCl	0,5 M
PBS pH 7.4	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	H ₃ PO ₄	12 mM
Ponceau Färbelösung	Ponceau-S	0.1 % (w/v)
	Essigsäure	1 % (v/v)
Wasch- und Bindepuffer pH 8.2	NaPO ₄	0.1 M
	Tween-20	0.01 %
Waschpuffer pH 7.4	PBS	1 x
	Tween-20	0,05 %
Western blot Transfer Puffer	NuPAGE Transfer Puffer	1 x
	Antioxidant	0.10 %
	Methanol	10 %

3.3 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 5 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial:	Hersteller:
1 ml HiTrap Säure (NHS-activated HP)	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
10 ml Spritze	neoLab, Heidelberg, Germany
1.5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, Germany
15 ml PP Reaktionsgefäß	Greiner, Frickenhausen, Germany
1.5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, Germany
4-12% Bis Tris NuPAGE LDS Gele	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
5 ml Entsalzungssäule	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
50 ml PP Reaktionsgefäß	Greiner, Frickenhausen, Germany
96-well PCR Platte	Brand GmbH Wertheim, Germany
96-well Platte, klar, runder Boden	Nunc (Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Dynalbeads ProteinG	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Luminex-XMap-Mikrosphären	Luminex, Austin, TX, USA
Nitrozellulose Transfermembran	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany
PACII-Chip	BrukerDaltonics, Bremen, Germany
Peptide Calibration Standard II	BrukerDaltonics, Bremen, Germany
Pipettenspitzen (1-10, 10-100, 100-1000)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Spritzenfilter 0.22 µm PES	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Microcentrifuge Tubes 1,5 ml	Starlab, Ahrensburg, Germany
Ultrafree-MC filterunits	Millipore, Billerica, MA, USA
Whatman Gel Blotting Paper	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany

3.4 Geräte und Software

In Tabelle 6 sind alle verwendeten Geräte, sowie deren Steuer- und Auswertesoftware aufgelistet.

Tabelle 6. Geräte und Software

Gerät	Software	Hersteller/Firma
ÄktaXpress	Unicorn 5.11	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Eppendorf Zentrifuge 5415D	-	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Thermo Mixer Comfort	-	Eppendorf, Hamburg, Germany
ESI-Quad-TOF (Maxis 3G)	micrOTOFControl	BrukerDaltonik, Bremen, Deutschland
FLUOstar Optima	FLUOstar Optima Software 1.32 R2	BMG Labtechnologies
GeneAmp PCR System 2400	-	Applied Biosystems®
KingFisher 96	BindItsoftware 3.0	Fisher Scientific
Light-optical microscope-Eclipse TE 300	-	Nikon
Luminex XMap	X-Ponent Software Solutions IS 2.2	Luminex
MALDI TOF/TOF Ultraflex III	Flex Control Flex Analysis/BioTools	BrukerDaltonik, Bremen, Deutschland
Mikro-Dismembrator U		Satorius, Germany
Photometer Lambda Bio +	-	PerkinElmer
Protein Graphic Tool	PyMol 0.98	DeLano Scientific LLC.
Feinwaage	-	Startorius AG
Syringe Pump, pump 22	-	Harvard Apparatus
Ultraschallbad Sonotex RK 31	-	Bandelin electronics
UHPLC UltiMate 3000	Chromelion	Thermo Scientific, USA
Vortex Genie 2	-	Scientific Industries
XCellSureLock Mini-Cell	-	Invitrogen, USA
Datenbanken und Suchmaschinen		
Datenbanken	SwissProt	Swiss Institute of Bioinformatics, Basle, Swiss
	MSDB	Proteomics Department, Hammersmith Campus of Imperial College London, UK
	UniProt	The Universal Protein Resource
Suchmaschine	MASCOT Version 2.2,	Matrix Science Ltd., London, UK

3.5 Herstellung von polyklonalen TXP-Antikörpern

Die Immunisierung der polyklonalen Kaninchen-Antikörper und die Gewinnung der Kaninchenserum wurden von "Pineda-Antikörper-Service" (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Herstellung der Antigene und Immunisierung erfolgte wie bereits in der Veröffentlichung Hoeppe et al. [45] beschrieben.

3.5.1 Peptidselektion für die Immunisierung und für Standard-Peptide

Die zu untersuchenden Rezeptoren, Zielepitope und Standardpeptide wurden in Zusammenarbeit mit Hannes Planatscher, NMI Reutlingen, ausgewählt. Grundlage hierfür waren vorangegangene Arbeiten [71], ein kombinatorischer Bioinformatik-Ansatz, sowie die physiologische und pharmakologische Relevanz der Zielstrukturen. Als Daten-Grundlage für die Auswahl der TXP-Epitope diente die Uniprot-Datenbank. Der gesamte Datensatz der darin enthaltenen humanen Proteine wurde in einem *in silico* Verdau auf tryptische Fragmente umgerechnet. Diese theoretischen Peptide wurden im Anschluss nach folgenden Kriterien sortiert. Durch die Auswahl sollte pro TXP-Sequenz eine möglichst große Zahl an relevanten GPCRs durch proteotypische Peptide abgedeckt werden. Die Massen der Peptide, deren Anreicherung theoretisch durch die TXP-Antikörper möglich ist, sollten zwischen 800 und 5000 Dalton liegen. Zudem sollten die ausgewählten Epitope möglichst kein Methionin in der Sequenz enthalten, da dieses sehr leicht oxidiert, wodurch die Antikörperbindung beeinflusst werden kann bzw. die Datenauswertung von Massenspektren komplexer werden kann. Die Liste der ausgewählten TXP-Sequenzen ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

3.5.2 Antikörperaufreinigung

Die generierten TXP-Antikörper wurden aus 20 ml Kaninchenserum über ihr jeweiliges Antigen affinitätsgereinigt. Anschließend wurden die Antikörper durch Gelfiltration entsalzt und in PBS + 0.05% Azid gelagert. Der gesamte Vorgang wurde bereits in vorhergegangenen Arbeiten beschrieben [45]. Die Seren wurden dabei

zunächst mit 0.22 µm PES-Spritzenfiltern steril-filtriert und anschließend mithilfe eines FPLC-Systems (ÄktaXpress) aufgereinigt. Dazu wurden 1 ml HiTrap Affinitäts - Säulen (NHS-activated HP) eingesetzt, an die die entsprechenden immunogenen Peptide gekoppelt waren. An diese Säulen wurden die TXP-Antikörper aus den Kaninchenseren zunächst gebunden, mittels Citratpuffer (pH 2,5) sauer eluiert und über eine 5 ml Gelfiltrationssäule entsalzt. Die gereinigten Antikörper wurden anschließend mit 0.05% Azid versetzt und bei 4°C gelagert.

3.6 Peptidsynthese

Die in dieser Arbeit eingesetzten Peptide wurden von Intavis (Köln, Deutschland) synthetisiert. Für jeden Rezeptor wurde mindestens ein Standardpeptid verwendet. Diese Peptide sind identisch zu tryptischen Fragmenten der endogenen Rezeptoren. Anstelle der Aminosäure Cystein wurde Carbamidocystein als Baustein verwendet, um die Bildung von Disulfidbrücken und weitere Nebenreaktionen zu verhindern. Zudem müssen durch diesen Einbau von alkyliertem Cystein in die Standardpeptide die Standards nicht zusätzlich vor ihrem Einsatz reduziert und alkyliert werden. Alle Peptide wurden vor der Verwendung mittels HPLC und MALDI-MS analysiert, um den Reinheitsgrad zu bestimmen oder eventuelle Nebenprodukte zu detektieren.

3.7 Charakterisierung polyklonaler Kaninchen-Antiseren auf Sequenzspezifität mittels beadbasierter Peptidarrays

Die Seren der immunisierten Kaninchen wurden vor der Antikörperaufreinigung mittels Affinitätssäulen in mikrosphärenbasierten Arrays getestet. Zum einen wurde die Reaktivität gegenüber ihrer Zielpeptide überprüft und zum anderen wurde getestet, ob die Antikörper Kreuzreaktivität gegenüber anderen Peptiden oder Peptid-internen Sequenzen aufweisen. Dabei wurden die Kaninchenseren mit synthetischen Peptiden, welche an farbkodierte Polystyrol Mikrosphären gekoppelt wurden, inkubiert. Ein speziesspezifischer PE-markierter Nachweisantikörper wurde als

Reportersystem eingesetzt. Die relativen Signale der gebundenem Antikörper wurde in einem Durchflusszytometers (FlexMap 3D, Luminex™) erfasst und als MFI Werte angegeben.

3.7.1 Mikrosphärenbasierte Peptidarrays

Der Aufbau eines mikrosphärenbasierten Assays zur Bestimmung der Spezifität und der Bindeeigenschaften der verwendeten Antikörper ist in Abbildung 4 dargestellt. Zunächst wurden hierzu verschiedene farbkodierte Mikrosphären über aktivierte Carboxylgruppen mit BSA beladen. Die BSA Moleküle wurden nach der Kopplung an die Beads durch Inkubation mit sulpho-SMPB aktiviert und in einem darauffolgenden Schritt wurden verschiedene reduzierte Cysteinylopeptide daran gekoppelt. Eine detaillierte Beschreibung der Beladung der Mikrosphären ist bei Hoeppe et al. [45] zu finden. Diese Peptid-gekoppelten, farbcodierten Mikrosphären wurden im weiteren Verlauf für die Antikörpercharakterisierung verwendet.

Antikörperseren wurden im Verhältnis 1:5000 und 1:20000 in ELISA-Blockierungsreagenz (Roche) +0.05% Tween20 verdünnt. 96-well Filterplatten wurden mit Roche-Puffer 10 min lang inkubiert, um unspezifische Bindungen von Peptiden oder Antikörpern an das Plattenmaterial zu verhindern.

Pro Assay wurden 500 Mikrosphären/Well eingesetzt und zunächst mit 30 µl Serumverdünnung 60 min bei 23°C und 650 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und zweimal mit PBS + 0.05% Tween20 gewaschen. In einem zweiten Inkubationsschritt wurden PE-markierte anti-Kaninchen Antikörper zugegeben (2.5 µg/ml in Assay Puffer + 0.05% Tween20). Nach 45 min Inkubation bei 23 °C und 650 rpm wurde zweimal gewaschen, 100 µl Assay Puffer zugegeben und mit einem Durchflusszytometer (FlexMap3D, Luminex) gemessen (Sample size: 80 µl, Time out: 60 sec).

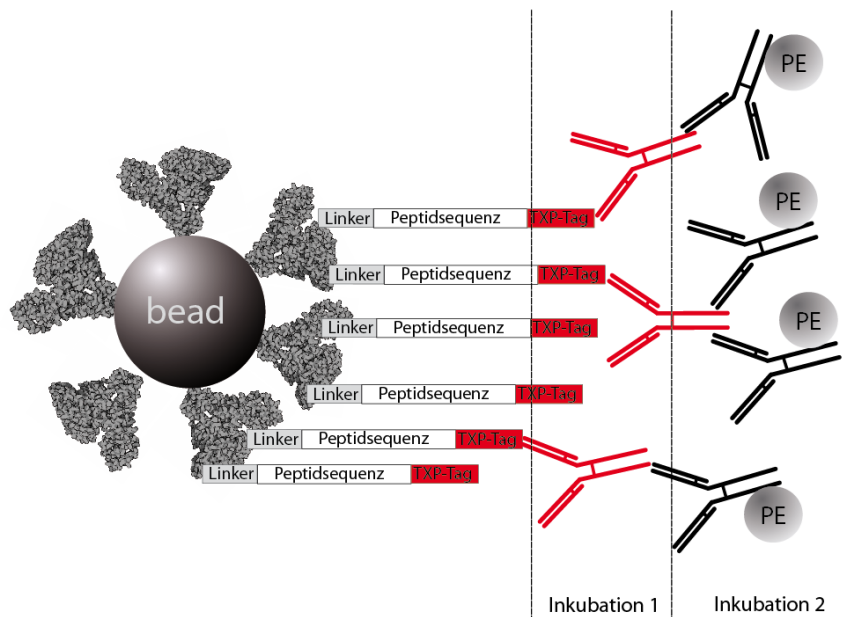


Abbildung 4: Mikrospärenbasierter Peptidarray zur Antikörpercharakterisierung

Auf farbcodierte Mikrospären ist über aktivierte Carboxylgruppen BSA gebunden. Mithilfe eines sulfo-NHS-Linkers wurden Cysteinylpeptide an die BSA-Moleküle gekoppelt. In einem ersten Inkubationsschritt werden Seren der immunisierten Kaninchen bzw. aufgereinigte TXP-Antikörper (rot) mit den Mikrospären inkubiert. In einem zweiten Schritt werden PE-markierte anti-Kaninchen-Antikörper (schwarz) mit dem Komplex inkubiert. Dieser Komplex kann im Durchflusszytometer ausgelesen werden.

3.7.2 Kompetitions-Assay zur Bestimmung der Antikörper-Affinität zu ihren Zielstrukturen

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der polyklonalen Kaninchenantikörper wurde ein mikrospärenbasierter Kompetitions-Assay durchgeführt. Hierzu wurden TXP-Antikörper auf eine Konzentration von 10 ng/ml verdünnt und anschließend 1h lang mit ihren korrespondierenden Antigenen (CGSG-„TXP-Sequenz“) inkubiert. Diese Standardpeptide wurden in definierten Konzentrationen zwischen 5 μ M und 28 pM (in Verdünnungsschritten von 1:3) vorgelegt. Nach diesem Vorinkubationsschritt wurden die korrespondierenden Peptid-gekoppelten Mikrospären zugegeben und es wurde, wie in den zuvor beschriebenen mikrospärenbasierten Peptidarrays (3.7.1) weiter verfahren. Die Ergebnisse der Messungen konnten anschließend verwendet werden, um die Bindungseigenschaften der Antikörper zu bestimmen. Der gesamte Aufbau des Ansatzes ist in Abbildung 5 beschrieben.

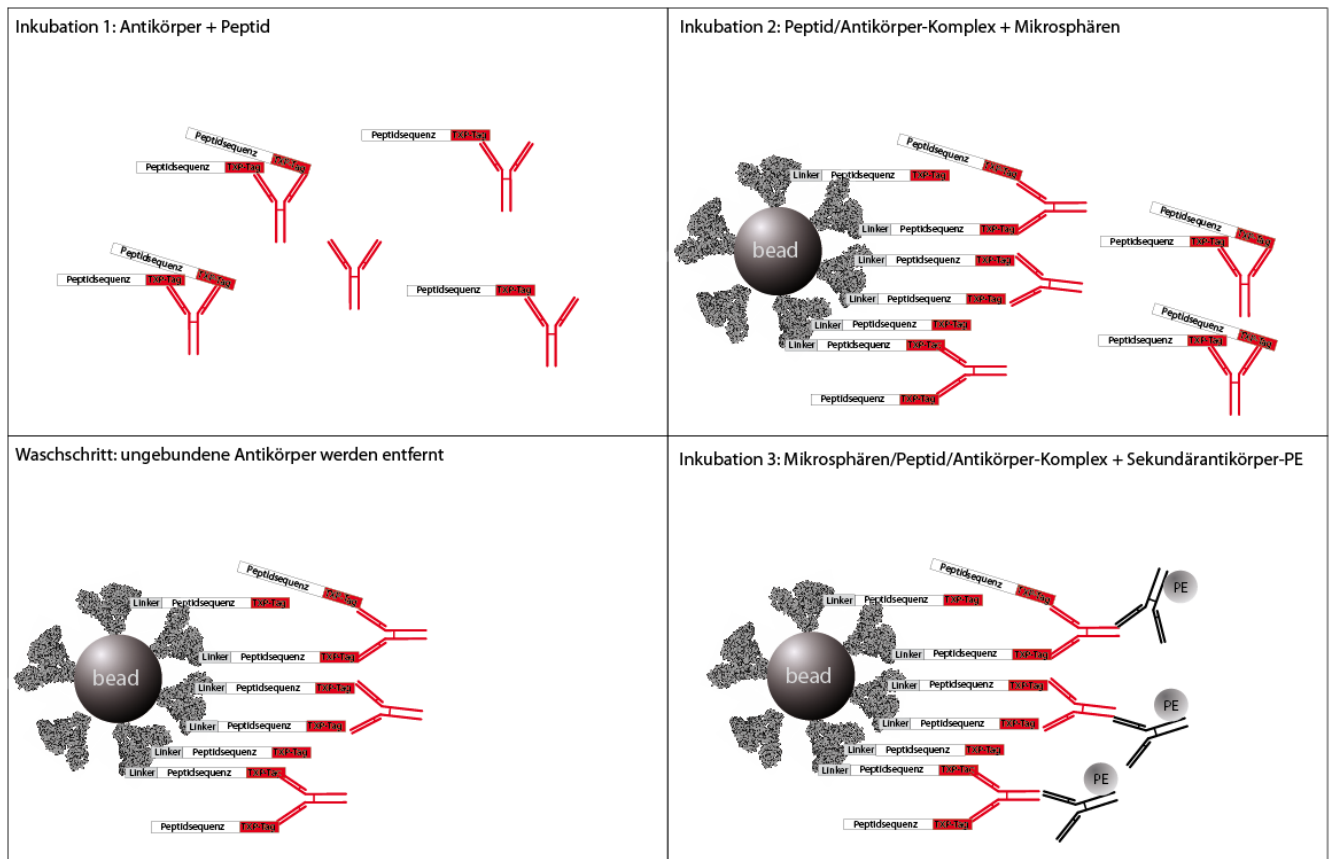


Abbildung 5: Aufbau des Konkurrenztests zur Bestimmung einer apparenten Affinität

In einem ersten Schritt werden Antikörper mit definierter Menge an Peptidantigen inkubiert. In Schritt zwei werden Mikrosphären mit daran gekoppeltem Peptidantigenen zugegeben. Freie Antikörperbindestellen können daran binden. In einem dritten Schritt werden die nicht an die Mikrosphären gebundenen Antikörper gewaschen. Zuletzt werden die gebundenen Antikörper mit einem PE-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Dieser Komplex kann im Durchflusszytometer ausgelesen werden.

3.8 Charakterisierung polyklonaler Kaninchenantikörper auf Sequenzspezifität mittels Massenspektrometrie

Die Bindeeigenschaften der verwendeten TXP-Antikörper wurden mithilfe verschiedener massenspektrometriebasierter Methoden getestet. Zum einen wurden Peptidmischungen aus synthetischen Peptiden hergestellt und mit den TXP-Antikörpern inkubiert. Nach Immunpräzipitation wurden angereicherte Peptide mittels MALDI-MS analysiert. Des Weiteren wurden Versuche mit Peptidbibliotheken und komplexen biologischen Proben durchgeführt.

3.8.1 Charakterisierung polyklonaler Kaninchenantikörper auf Sequenzspezifität mittels Peptidbibliotheken

Bibliotheken von synthetischen Peptiden wurden verwendet, um vier unterschiedliche TXP-Antikörper detailliert zu charakterisieren und die Sequenzspezifität zu prüfen. Wie bereits in Hoeppe et al. [45] beschrieben, wurden hierbei Bibliotheken eingesetzt, bei denen je eine definierte Aminosäure variiert wurde. Ausgehend von der Zielsequenz, die als Antigen bei der Antikörperherstellung eingesetzt wurde, wurde an dieser Position die Aminosäure durch eine zufällig gewählte Aminosäure der 20 proteinogenen Aminosäuren ersetzt. Die getesteten terminalen Sequenzen waren AMTR, EIER, LGYR und LSGK. Dabei wurden folgende Bibliotheken verwendet, wobei "X" für jede der 20 Aminosäuren steht. Die verwendeten Bibliotheken sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Peptidbibliotheken

Antikörper Zielsequenz	TXP-Bibliothek
AMTR	CHSG-XMTR
	CHSG-AXTR
	CHSG-AMXR
	CHSG-AMTX
EIER	CHSG-XIER
	CHSG-EXER
	CHSG-EIXR
	CHSG-EIEX
LGYR	CHSG-XGYR
	CHSG-LXYR
	CHSG-LGXR
	CHSG-LGYX
LSGK	CHSG-XSGK
	CHSG-LXGK
	CHSG-LSXK
	CHSG-LSGX

Die Bibliotheken waren alle mit einer konservierten, 4-Aminosäure langen Sequenz versehen (C(Cam)HSG), welche eine Spacer-Funktion hat, um eine bessere Interaktion des Antikörpers mit dem Zielepitop zu ermöglichen. Die vier verschiedenen Peptidbibliotheken pro Antikörper wurden mit jeweils 10 pmol eingesetzt und einzeln getestet. Die Bibliotheken wurden vor und nach Immunpräzipitation untersucht, um die spezifische Anreicherung durch die TXP-Antikörper zu untersuchen. Je 1 µl wurde hierzu auf ein PACII Target aufgebracht und in einer automatisierten MALDI-MS Analyse vermessen. Die Ergebnisse von Prä- und Post-IP Spektren wurden mithilfe eines Excel-Skripts verglichen, um den Anreicherungsfaktor zu bestimmen.

3.8.2 Charakterisierung der Spezifität polyklonaler Kaninchenantikörper mit kurzem C-terminalem Epitop mittels Immunpräzipitation aus komplexen biologischen Proben und Auswertesoftware (MATERICS)

Ein neuartiger Ansatz wurde entwickelt, der es erlaubt die Spezifität der verwendeten TXP-Antikörper allein auf der Grundlage von MS-Spektren nach Immunpräzipitation von komplexen Proben, wie beispielsweise eine Trypsin verdaute Plasmaprobe, vorherzusagen. Bei MATERICS (mass-spectrometric analysis of terminal epitope enrichment in complex samples) handelt es sich um einen Algorithmus, der auf einer terminalen Epitop-Analyse basiert. Dieser Algorithmus identifiziert die terminalen Sequenzen, welche am wahrscheinlichsten durch die verwendeten Antikörper angereichert wurden. Davon werden die 10 besten Ergebnisse verwendet und Sequenzen, die eine hohe Ähnlichkeit zu diesen Epitopen haben, hinzugezogen. Epitopmuster werden anschließend aus diesen Sequenzen kombiniert.

Nach einer Immunpräzipitation und anschließender MS Analyse kann mit dem MATERICS Tool analysiert werden, welche Peptide bzw. Epitope durch den Antikörper aus einer Probe angereichert wurden. Für erste Tests mit diesem Werkzeug wurden drei verschiedene Zelllinien (HELA, HEK293 und Panc1) kultiviert, lysiert, tryptisch verdaut und eine automatisierte Präzipitation mit vier verschiedenen TXP-Antikörpern auf magnetischen Partikeln durchgeführt. Für die Immunpräzipitation wurden je 50 µg Zelllysate und 5 µg Antikörper (Kaninchen-anti-AMTR, Kaninchen-anti-EIER, Kaninchen-anti-LGYR und Kaninchen-anti-LSGK) eingesetzt. Jede Immunpräzipitation wurde in Triplikaten durchgeführt und nach der Elution wurden je 1 µl mit MALDI-MS ebenfalls in Triplikaten vermessen. Die Signale in den Spektren wurden in flexAnalysis nach externer Kalibrierung annotiert und in die Benutzeroberfläche der MATERICS Software geladen.

Peaklist:	Stoplist:	
757,2304136	515.33001	Mass error tolerance (PPM): 30 ppm (5-50)
764,0303473	515.35785	Database: CONSENSUSDBHUMAN
768,3653889	515.41286	Terminus: c-terminal
777,1707086	519.13882	Terminus length: 4 (3-5)
779,9849096	521.30864	Search depth (max. complexity): normal (should work)
785,4470281	522.59723	
789,4417107	525.28815	
815,4634585	529.37350	
819,4352035	531.40777	
829,464235	531.47717	
833,1082093	536.16537	

Abbildung 6: MATERICS Benutzeroberfläche

Nach einer Immunpräzipitation können Peaklisten aus Massenspektren extrahiert und in die Suchmaske eingegeben werden. Verschiedene Parameter wie Massentoleranz, Datenbank und Angaben zum Ziel-Epitop können ausgewählt werden, bevor eine bioinformatische Prozessierung und Epitop-Vorhersage durchgeführt wird. Zudem kann eine Liste an bekannten und zu erwartenden Hintergrundsignalen („Stoplist“) erstellt werden, um die Methode zu optimieren.

In der Maske wurde zudem eine Massentoleranz von 40 ppm angegeben. Als Datenbank wurde eine Consensus Datenbank verwendet, die Terminus-Spezifität auf „C-terminal“ eingestellt und die Epitoplänge von 4 Aminosäuren angegeben. Anschließend wurden Epitop-Vorhersagen durchgeführt.

3.9 Gewinnung von Gewebeproben

Die Gewinnung von Gewebeproben erfolgte aus erwachsenen, weiblichen „Sprague Dawley“ Ratten (190-350 g) entsprechend den nationalen und institutionellen Richtlinien. Die Ratten wurden durch CO₂-Behandlung getötet und anschließend ausgeblutet. Für die Gewinnung von Herzgewebe wurde der Thorax ventral geöffnet und beide Herzventrikel wurden zügig entfernt. Für Gewebeproben aus verschiedenen Gehirnregionen wurde der Hirnschädel von posterior dorsal geöffnet, sodass Cortex und Cerebellum von den übrigen Regionen separiert werden konnten. Die Proben wurden nach der Präparation umgehend in Reaktionsgefäße gefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.10 Gewebelyse

Tiefgefrorene Gewebeproben wurden im Mörser unter flüssigem Stickstoff in kleine Bruchstücke zerteilt, in Cyro-Röhrchen transferiert und mithilfe des Mikro-Dismembrator U (Sartorius, Deutschland) zu Pulver zerkleinert. Zu jeder Probe wurden 300 µl Lysepuffer zugegeben. Anschließend wurden die Proben zur Lyse für 1 h bei RT auf einem horizontalen Taumelroller inkubiert. Nach der Gewebelyse wurden die Proben in einer Tischzentrifuge bei 13.000 x g zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstands durch eine Proteinbestimmung (BCA-Assay) ermittelt.

3.11 Proteinbestimmung

Nach jeder Gewebelyse bzw. vor einem tryptischen Proteinverdau wurde eine BCA Protein-Bestimmung (Thermo Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.12 Tryptischer Verdau von Gewebelysaten und Zelllinien

Es wurden zwei verschiedene Verdauprotokolle verwendet, welche für die jeweiligen Proben optimiert waren. Für den tryptischen Verdau wurden die lysierten Gewebeproben zunächst mit 5 mM DTT für 1 h bei 650 rpm und 60°C reduziert und anschließend mit 10 mM IAA für 30 min bei 25°C im Dunkeln alkyliert. Entsprechend den Ergebnissen des BCA Assays wurde Trypsin im Verhältnis von 1:40 zur Gesamt-Proteinmenge eingesetzt. Der Verdau wurde über 16h bei 650 rpm und 37°C durchgeführt. Um die Vollständigkeit des Verdaus zu überprüfen, wurde anschließend stets eine LDS-PAGE durchgeführt, um bei einem unvollständigen Verdau Proteinbanden nachzuweisen. Nach dem Verdau wurde 200 mM PMSF zu der Probe zugegeben.

3.13 LDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Coomassie Färbung

Die Proben wurden durch Zugabe von 5 µl LDS-Probenpuffer, 2 µl Reduktionsreagenz und ddH₂O vorbereitet. Anschließend wurden sie denaturiert, indem sie über 10 min auf 95°C erhitzt und danach wieder auf 4°C abgekühlt wurden (GeneAmp PCR System 2400). Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden 4-12% NuPAGE BIS-TRIS LSD-Gele verwendet. Alle Proben wurden in MOPS Puffer getrennt. SeeBlue® Plus2 (LifeTechnologies, USA) diente als Proteinmarker.

Spannung: 200 V / 100-125 mA / Gel (anfangs); 60-80 mA / Gel (am Ende)

Laufzeit: 50 min

3.14 Western Blotting

Für die Western Blot Analysen wurden folgende Antikörper (Tabelle 8) verwendet:

Tabelle 8: Antikörper für Western Blot Analysen

Antigen	Reaktivität gegen	Wirtsspezies	Name und Konzentration
mAChR M2 (31-1D1)	Maus, Ratte, Mensch, Schwein	Maus (mAB)	Abcam (ab2805) Verdünnung 1:1000
5-HT 4 (Seitenketten um D47)	Maus, Ratte, Mensch	Kaninchen (pAB)	Acris (NBP1-19627) Verdünnung 1:500
5-HT 1B (CAPPMPAGSETWVPQANLS & STSSVTSINSRVPDVP)	Maus, Ratte, Mensch	Kaninchen (pAB)	Abcam (ab13896) 1 µg/ml Verdünnung 1:500
5-HT 1F (Seitenketten um T126)	Maus, Ratte, Mensch	Kaninchen (pAB)	Acris (NBP1-12625) Verdünnung 1:500
OxyR (C-RRLGETSASKKSN)	Affe, Ratte, Mensch	Ziege (pAB)	Abcam (ab87312) 1 µg/ml Verdünnung 1:500

Pro Antikörper wurden jeweils 20 µg Gewebelysat reduziert, denaturiert und auf ein 4-12% NuPAGE BisTris Gel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen in 1 x MOPS Puffer für 3 h bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine 0.2 µm Nitrozellulose-Membran transferriert. Die Membran wurde mit 3% BSA

blockiert und für 16 h bei 4°C mit dem Primärantikörper (gelöst in 1% BSA/TBST) inkubiert. Als Detektionsantikörper dienten die IR-Dye 800CW-gekoppelten Antikörper anti-Kaninchen, anti-Ziege und anti-Maus (1:5000 verdünnt in 5% Milchpulver/TBST). Die Membranen wurden 1h mit dem Sekundärantikörper inkubiert und 3 x 10 min gewaschen in TBST. Ausgelesen wurden die Blots an einem Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) bei 800 nm und einer Intensität zwischen 1 und 2.

3.15 Automatisierte Peptid-Immunpräzipitation

Die Durchführung des Immunoaffinitäts-Assays ist in vorangegangenen Arbeiten beschrieben [72]. Alle Schritte wurden dabei in einer 96-well PCR-Platte und in einem automatisierten Magnet-Partikel Prozessor System (KingFisher Flex, Thermo Scientific) durchgeführt.

Hierbei wurden in einem ersten Schritt 1-10 µg Antikörper mit der Probe inkubiert. Während dieser einstündigen Inkubation fanden regelmäßige Mischintervalle statt. Anschließend wurden magnetische, Protein G-gekoppelte Partikel (DynaBeads® Protein G, LifeTechnologies) zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation mit Mischschritten wurden die Beads zusammen mit dem gebundenen Antikörper-Analytkomplex durch 5 Waschplatten transferiert und zuletzt unter starkem Mischen in 20 µl 1% FA eluiert. Tabelle 9 fasst die Einzelschritt-Parameter des verwendeten Protokolls „TXP Assay PCR Plates“ zusammen.

Tabelle 9: Übersicht über die Arbeitsschritte „TXP Assay PCR Plates“-Protokolls

Schritt	Plattenname	Platteninhalt	Mischen	Zeit [min]
Inkubation von Probe & Antikörper	Sample Plate	Probe + 1-10 µg AK In PBSN	Alle 10 min für 2 min	60
Zugabe der magnetischen Partikel	Source Plate	5 µl magnetische Partikel In 95 µl PBSN	Alle 10 min für 2 min	60
Waschschritt 1-2	Wash Plate (1-2)	100 µl PBSN	2 min	2.30
Waschschritt 3-5	Wash Plate (3-5)	100 µl ABCN	2 min	2.30
Elution	Elution Plate	20 µl 1%FA	2 x 1.5 min	5

3.16 Massenspektrometrische Methoden

Je nach Anwendung wurde auf zwei unterschiedliche massenspektrometrische Methoden zurückgegriffen, um die jeweiligen Vorteile der Methoden zu nutzen. Zum einen wurde ein MALDI TOF/TOF für verschiedene Qualitätskontrollen und einfache Analysen verwendet. Zum anderen wurde insbesondere bei komplexen Proben und zur Quantifizierung ein LC-ESI Quadrupol TOF MS -System eingesetzt.

3.16.1 MS-Analysen: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight (MALDI-TOF) und Tandem MS (MALDI TOF/TOF)

Alle MALDI-MS Messungen wurden an einem Ultraflex III (BrukerDaltonik, Bremen, Deutschland) unter Zuhilfenahme der Messsoftware FlexControl 3.0 durchgeführt.

Zur Qualitätsanalyse von Standardpeptiden, sowie zur Überprüfung der Markierungseffizienz und für einfache massenspektrometrische Analysen, wurde MALDI-MS verwendet. Die Proben wurden hierzu mit 0.1% TFA angesäuert und auf Probenteller von Prespotted AnchorChips II (Bruker Daltonics, Germany) aufgetragen (0.25-1 µl). Alle Messungen wurden durchgeführt im Positiv-/Reflektor-Modus.

Der Messbereich wurde generell festgelegt auf $m/z = 500-5000$ und im Einzelfall angepasst. Eine Signalunterdrückung für $m/z < 500$ wurde eingestellt. Sofern möglich, wurden die Messungen automatisiert durchgeführt. Dabei wurde mithilfe des Peptidkalibrierungsstandards II, welcher von Herstellerseite bereits auf dem PACII-Target aufgebracht ist, extern kalibriert. Die Standard-Geräteparameter der verwendeten Messmethode sind in Tabelle 10 aufgelistet. Dabei wurden je 200 Schuss mit einer Frequenz von 100 Hz aufgenommen und zu einem Gesamtspektrum aufsummiert.

Tabelle 10: Parameter der MALDI-MS Methoden

	MS-Methode (RP_Proteomics_HPC-PACII)	MS/MS-Methode (LIFT)
Ionenquelle I	25.0 kV	8.0 kV
Ionenquelle II	21.1 kV	7.15 kV
Linsenspannung I	9.4 kV	3.6 kV
Reflektorspannung I	26.3 kV	29.5 kV
Reflektorspannung II	13.8 kV	13.85 kV
LIFT I	-	19.0 kV
LIFT II	-	4.1 kV
Laser-Abschwächung Offset	75%	

3.16.2 LC-MS-Analyse: Electrospray Ionisation – Time of Flight (ESI-TOF)

Allen ESI-MS Experimenten war eine Probenvorbereitung mittels Flüssigchromatographie vorangestellt. Hierbei wurde ein Ultimate 3000 Nano HPLC System (Thermo Scientific), gekoppelt an ein Maxis 3G Quadrupol TOF MS/MS Massenspektrometer (Bruker Daltonics), verwendet. Zur Entsalzung und Probenkonzentration wurde eine 20 mm Vorsäule (Vydac, C8, 300Å-3 nm) eingesetzt. Als analytische Säule diente eine 150 mm x 75 µm (Vydac, C8, 300Å-3 nm) Säule (Grace, USA).

Die nachfolgende analytische Trennung wurde bei einer Flussrate von 300 nl/min durchgeführt. Zur Trennung der Analyten wurde der folgende, mehrschrittige HPLC-Lauf durchgeführt: 5 min 98% Laufmittel A (H₂O, 0.1% FA) und 2% Laufmittel B (75% ACN, 25% v/v IPA , 0.1% FA), 3 min mit linearem Gradient von 2-40% Laufmittel B, 4 min mit linearem Gradient von 40-80% Laufmittel B, 5 mit linearem Gradient von 80-95% Laufmittel B, 6 min mit linearem Gradient von 95-99% Laufmittel B, 99% Laufmittel B über 10 min und 2 min bei 80% Laufmittel B.

Der Gradient wurde anschließend über 0.5 min auf 2% Laufmittel B abgesenkt und wieder auf 99% Laufmittel B erhöht. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und zuletzt wurden die Säulen vor der nächsten Injektion mit 98% Laufmittel A re-equilibriert.

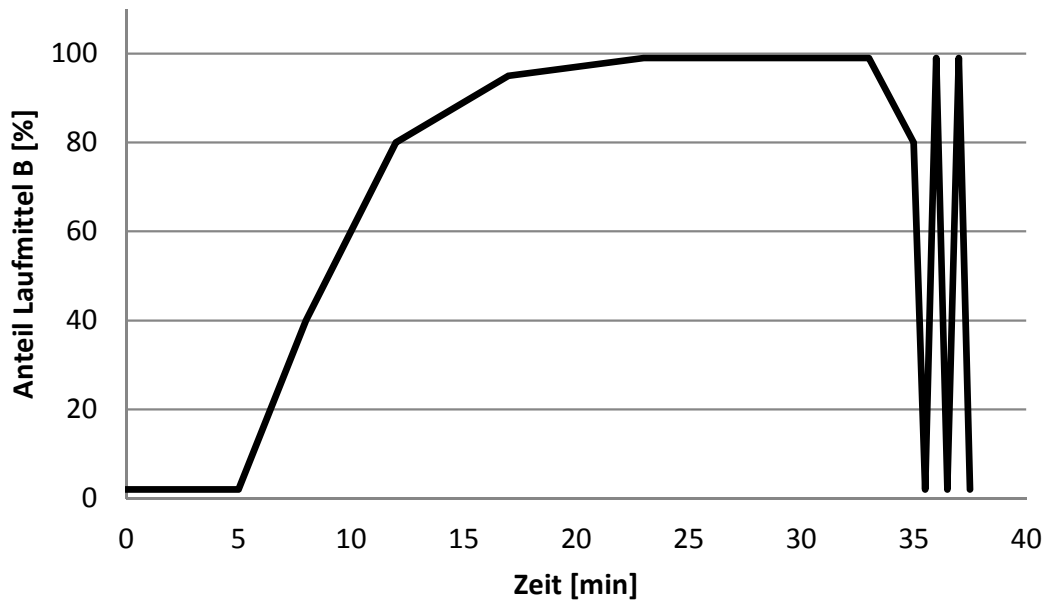


Abbildung 7: Darstellung des verwendeten Laufmittelgradienten der LC-Methode.

Der Anteil des Laufmittels B ist gegen die Laufzeit aufgetragen. Ein steiler Anstieg der Laufmittel B Konzentration in den ersten 12 min wird gefolgt von einem sehr flachen Anstieg, und einer Plateauphase bei 99% Laufmittel B. Vor der Re-equilibrierung der Säule dienen schnelle Konzentrationswechsel als Spülschritte.

Eine „simple proteomics“ Methode (microTOFcontrol) wurde für massenspektrometrische Analysen modifiziert und verwendet. Zunächst wurde ein 1 sec MS-TOF „survey scan“ über einen Messbereich von m/z 400-2000 durchgeführt. Eine Auto MS/MS Methode mit einem Fragmentierungs-Threshold von 1000 Counts wurde als Standardmethode verwendet. Für die iTRAQ Quantifizierung wurde zusätzlich eine „Inclusion List“ erstellt, welche die Massen aller iTRAQ-markierten Peptide im Ladungszustand 2+ und 3+ enthielt. Zudem wurde die Kollisionsenergie abschnittsweise erhöht, um eine verbesserte Fragmentierungseffizienz und eine verbesserte Ionisierung der Reporter-Ionen zu erhalten. Diese sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Eine „Lock mass“-Kalibrierung fand während den Messungen mittels Hexakis(1H,1H,4H-hexafluorobutyloxy) Phosphazin Standard (m/z 1222) statt. Zudem wurde vor jedem LC-ESI MS Experiment eine externe Kalibrierung mit dem „ESI low concentration tuning mix“ (Agilent Technologies, USA) durchgeführt.

Tabelle 11: Angepasste Kollisionsenergien zur Peptidfragmentierung der ESI-MS/MS Messungen

Ladung	Isolations Masse	Kollisionsenergie [eV]
2+	300	36
	500	44
	1000	50
	2000	55
3+	300	31
	500	38
	1000	46
	2000	50

3.16.3 Datenverwaltung und Identifikation mittels ProteinScape 2.0 und MASCOT

Zur Verwaltung, weiteren Prozessierung der Massenspektren und zur Datenbanksuche wurde ProteinScape 2.0 (Bruker Daltonics) verwendet. Die Ergebnisse der MALDI-MS Messungen wurden direkt in ProteinScape importiert. ESI-MS Spektren wurden nach Dekonvolurierung und externer Kalibrierung durch DataAnalysis (Bruker Daltonics) als „mgf-Dateien“ importiert.

Verschiedene Suchparameter wurden für die Proteinidentifikation verwendet. Folgende Suchparameter sind gültig für **alle Suchanfragen**:

Suchmaschine: Mascot
Verdauenzym: Trypsin
Globale Modifikation: Carbamidomethyl (C)

Für **ESI-MS-basierte Daten** galten im Allgemeinen folgende Suchparameter:

Peptidtoleranz: 30 ppm
MS/MS Toleranz: 0.1 Da
Ladungszustand: 1+, 2+ und 3+

Für **MALDI-MS-basierte Daten** galten folgende Suchparameter:

Peptidtoleranz: 70 ppm
MS/MS Toleranz: 0.7 Da
Ladungszustand: 1+

3.17 iTRAQ Quantifizierung

Zur Quantifizierung von G Protein-gekoppelten Rezeptoren auf Peptidebene wurde eine Messmethode nach Dayon et al. [35] modifiziert und verwendet. Dabei kamen GPCR-spezifische Signaturpeptide zum Einsatz, welche mit iTRAQ Reagenz markiert und in unterschiedlichen Konzentrationen zur Probe zugegeben wurden.

3.17.1 iTRAQ-Markierungsmethode

Es wurde das iTRAQ 4plex Kit (AB Sciex) für die Quantifizierung auf Peptidebene verwendet. Hierbei erfolgte die Reaktion nach den Vorgaben des Herstellers. Die Labels 114, 115, und 116 wurden zur Erstellung einer internen Standardkurve verwendet. Das Label 117 wurde zur Markierung der biologischen Probe eingesetzt.

Proteotypische Signaturpeptide wurden zunächst einzeln gelöst, in äquimolarem Verhältnis gemischt und bei einer Konzentration von 0.1 mM in 30 µl Dissolution-Buffer (AB Sciex) markiert. Gewebeproben wurden nach dem enzymatischen Verdau mit Dissolution-Buffer (AB Sciex) verdünnt. Pro Markierungsreaktion wurden 100 µg Gewebeverdau und ein Aliquot des Markierungsreagenzes eingesetzt.

3.17.2 Quantifizierung mittels interner Kalibrierungskurve

Ausgewählte proteotypische Signaturpeptide wurden in H₂O + 10-50 % ACN vollständig gelöst und auf eine Konzentration von 0,1 mM eingestellt. Die gelösten Peptide wurden anschließend zu einem Peptidmix kombiniert, in drei Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit den iTRAQ Reagenzien 114, 115 und 116 markiert. Die markierten Peptide wurden wiederum verdünnt und danach wieder zu einer Gesamtmischung vereinigt. Diese markierten Peptidmischungen wurden zuletzt 1 zu 1 mit den (iTRAQ 117 markierten) Gewebeproben kombiniert.

Die resultierenden finalen Konzentrationen waren 20, 6,67 und 2,22 nM für die Rezeptoren 5-HT R4 und 5-HT R1B. Die Konzentrationen der 5-HT R1F und mAChR

M2 Signaturpeptide waren 10, 3,33 und 1,11 nM. Die OXYR Standardpeptide wurden auf die Konzentrationen 5, 1,67 und 0,56 nM eingestellt.

Nach der Kombination von Standardpeptiden mit Gewebeproben im Verhältnis 1:2 wurden die Analyten, die mittels TXP-Antikörpern angereichert waren und die Eluate mit LC-ESI-MS analysiert. Die ermittelten Mengen der verschiedenen G Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden für 100 µg Proteinverdau bestimmt und anschließend zurückgerechnet. Abbildung 8 zeigt vereinfacht den Ablauf der Probenvorbereitung zur Quantifizierung.

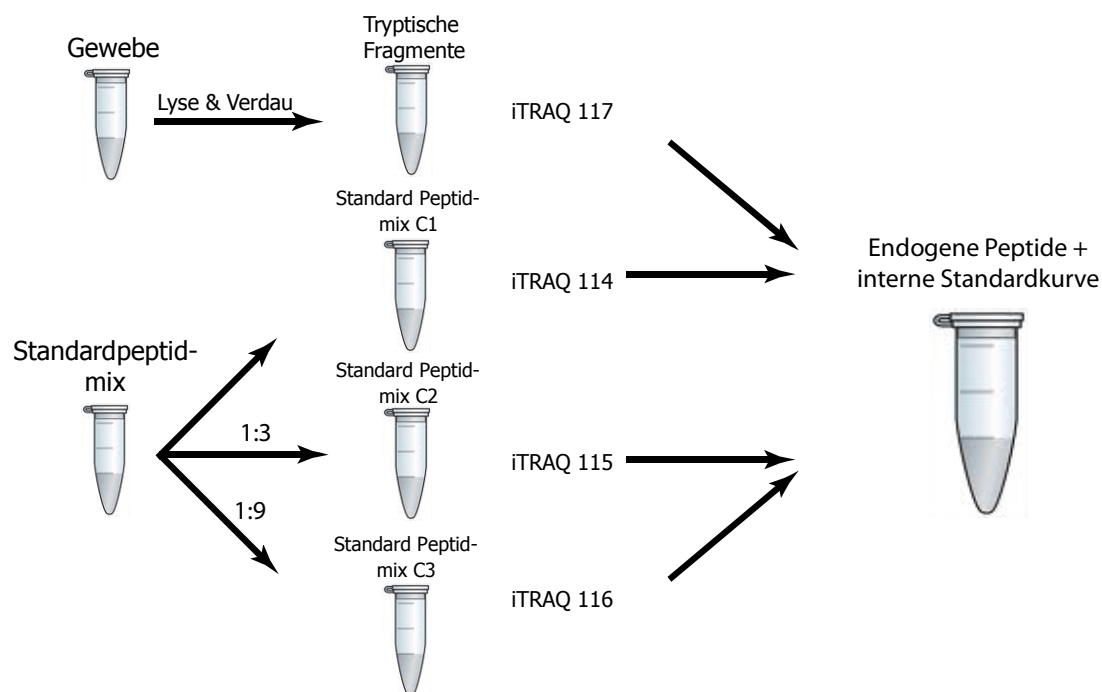


Abbildung 8: Probenvorbereitung zur Quantifizierung

Quantifizierung durch eine interne Standardreihe von iTRAQ-markierten Signaturpeptiden. Nach der Gewebelyse und einem enzymatischen Verdau werden endogene Peptide mit dem iTRAQ Reagenz 117 markiert. Proteotypische Standardpeptide werden gemischt (C1), im Verhältnis 1:3 (C2) und 1:9 (C3) verdünnt und mit iTRAQ 114 (C1), 115 (C2) und 116 (C3) markiert. Anschließend werden die Standards mit der biologischen Probe vereinigt und weiter prozessiert.

Für die Identifikation und Quantifizierung der Peptide wurde Proteinscape und DataAnalysis (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) verwendet. Die iTRAQ-

Reporterionen wurden aus den MS/MS-Spektren extrahiert. Der iTRAQ-Reporter $m/z = 114$ wurde bei der Berechnung als Denominator verwendet. Die Daten wurden in DataAnalysis 4.0.2 (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) in ein „Mascot Generic Format“ (mgf) konvertiert und die Proteine wurden mithilfe der Swiss Prot Datenbank (03/2011: 526.969 Sequenzen und 186.402.391 Reste) und der MASCOT Suchmaschine (Matrix Science Ltd, London) identifiziert.

Für die Quantifizierung wurden je die Ladungszustände der Peptide verwendet, welche die intensivsten MS-Signale aufwiesen. Die Signale wurden über die gesamte Retentionszeit der entsprechenden Peptide gemittelt. Für den mAChR M2 wurden die (2+)-Ionen verwendet. Für die restlichen Peptide wurden je die (3+)-Ladungszustände für die Fragmentierung und die anschließende Quantifizierung verwendet. Ausgehend von den extrahierten Signalen der iTRAQ-Reporterionen der internen Standardpeptide (114, 115, und 116) wurde eine Standardkurve berechnet. Ausgehend von diesen Signalen wurde eine lineare Regression durchgeführt, die als Grundlage für die Quantifizierung diente. Die Signale der Reporterionen $m/z = 117$ der endogenen Peptide wurden auf die interne Standardkurve referenziert und somit die Peptidkonzentrationen ermittelt.

Die Werte von jeweils drei unabhängigen Replikaten, ausgehend von drei tryptischen Gewebeverdaus einer Gewebeprobe wurden verwendet, um jeweils den Mittelwert und die relative Standardabweichung der Quantifizierungsdaten zu bestimmen.

Die untere Grenze der Detektion (LLOD, lower limit of detection) und die untere Grenze für die Quantifizierung (LLOQ, lower limit of quantification) wurden anhand der ICH-Richtlinien für die bioanalytische Methodvalidierung (Food and Drug Administration, A Guidance for Industry - Bioanalytical method validation, 2001) festgelegt. Als LLOD wurde das dreifache Signal über dem Hintergrund verwendet und als LLOQ das fünffache Signal über dem Hintergrund. Die Intensität des Hintergrundsignals wurde von jedem generierten gemittelten Massenspektrum unabhängig ermittelt. Dazu wurden die höchsten unspezifischen Signale aus den MS-Spektren im Massenbereich zwischen $m/z = 1500$ bis 2500 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Optimale TXP-Epitope für proteotypische Peptide von GPCRs

Mittels bioinformatischer Analyse wurden proteotypische Peptide der G Protein-gekoppelten Rezeptoren identifiziert, deren C--terminale Enden optimale Antigene, TXP-Epitope, für die TXP-Antikörpergenerierung darstellten. Dabei sollte mit einer minimalen Anzahl an TXP-Epitopen eine möglichst große Anzahl an proteotypischen Peptiden der fünf wichtigsten GPCR-Familien abgedeckt werden. Aus diesem Ansatz wurden die TXP-Epitope „ISLDR“, „TYPVK“, „PLFWR“, „SYDR“ und „APGK“ für die Antikörpergenerierung ausgesucht. Eine Vielzahl GPCR-spezifischer proteotypischer Peptide enthalten eines dieser Epitope und sollte durch TXP-Antikörper, die diese Sequenzen binden, angereichert werden können. Diese fünf TXP-Epitope decken in der Theorie 424 humane Proteine (davon 125 GPCRs) ab. Ebenso können 137 Proteine aus der Ratte oder 364 Proteine der Maus abgedeckt werden.

In einem weiteren Ansatz wurden weitere TXP-Epitope identifiziert, bei dem auch N-terminale TXP-Epitope aufgeführt sind. Je nach TXP-Epitop werden zwischen 2 „TYPVK“ und 238 „APGK“ humane Proteine abgedeckt.

Tabelle 12 zeigt die ausgewählten TXP Epitope, ausgehend von der Uniprot-Datenbank. Dabei wurde zum einen die Swiss-Prot-Datenbank und zum anderen TrEMBL verwendet. C- und N-terminale Sequenzen beziehen sich auf Neoepitope, welche durch einen Proteinverdau mittels Trypsin entstehen. Es handelt sich dabei um kurze terminale Aminosäuresequenzen (TXP-Epitope) in tryptischen Peptiden, welche im weiteren Verlauf quantifiziert werden sollten.

Tabelle 12: Übersicht über die ausgewählten TXP-Sequenzen und Analyten

TXP-Epitop	Vorkommen des TXP-Epitops in Proteinen Swiss-Prot / TrEMBL			GPCRs			Terminus
	Mensch	Ratte	Maus	Mensch	Ratte	Maus	
Ansatz 1							
ISLDR	23/15	22/40	26/35	37	48	44	C-Terminal
TYPVK	2/0	1/1	1/1	2	2	2	C-Terminal
SYDR	87/66	17/225	37/221	71	176	227	C-Terminal
PLFWR	5/3	2/1	2/1	4	3	3	C-Terminal
LYGR	107/110	42/119	101/130	6	8	7	C-Terminal
APGK	238/195	53/231	197/143	5	1	4	C-Terminal
Ansatz 2							
	Mensch*	Ratte	Maus	Mensch*	Ratte	Maus	
IYCR	32/23	12/29	25/39	5	7	8	C-Terminal
CQYR	21/17	5/21	18/25	5	5	5	C-Terminal
YNLK	66/53	27/59	52/65	7	3	3	C-Terminal
TSLD	26/44	11/35	24/22	9	7	1	N-Terminal
YFCV	2/0	2/1	2/1	4	3	5	N-Terminal

Weiterhin wurde geprüft, ob für die zu untersuchenden Rezeptoren bereits proteotypische Peptide in empirischen Datenbanken vorlagen. Dazu wurde in den Datenbanken "Global Proteome Machine", "Peptide Atlas" und der "MRM Atlas" nach entsprechenden Peptiden gesucht. Allerdings wurden in keiner der genannten Datenbanken entsprechende proteotypische Peptide gefunden.

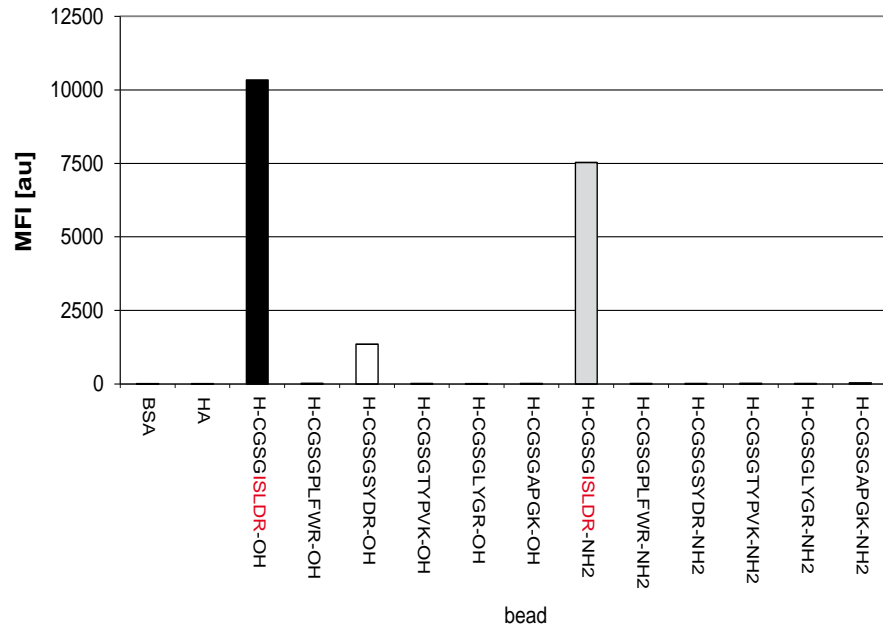
4.2 Charakterisierung von TXP-Antikörpern

Für den Einsatz in mikrosphärenbasierten Immunoassays oder in Immunpräzipitationen mit nachfolgender MS-Analyse war es wichtig, die entsprechenden TXP-Antikörper gut zu charakterisieren. Mit verschiedenen Methoden wurde die Spezifität und die Affinität der TXP-Antikörper ermittelt.

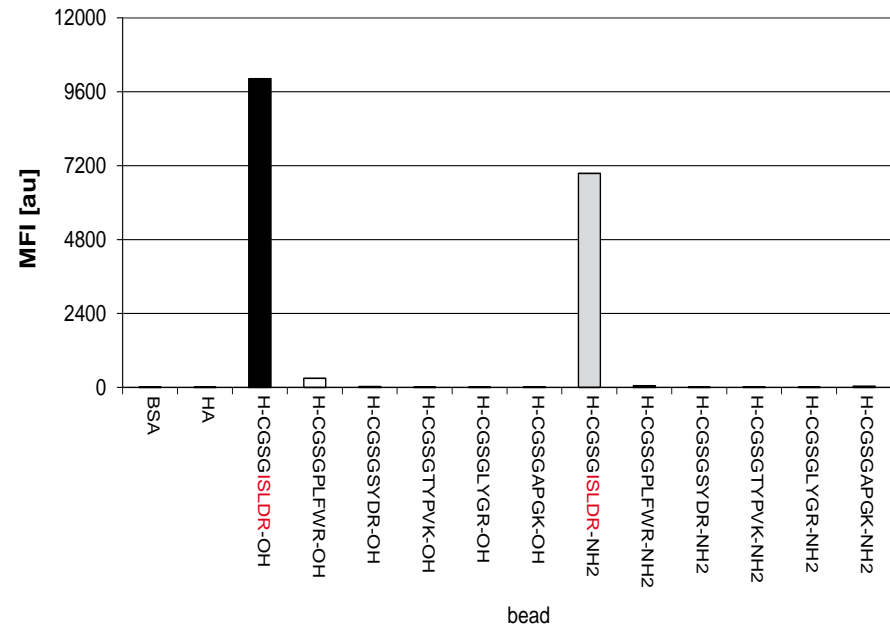
4.2.1 Epitopspezifität der TXP-Antikörper

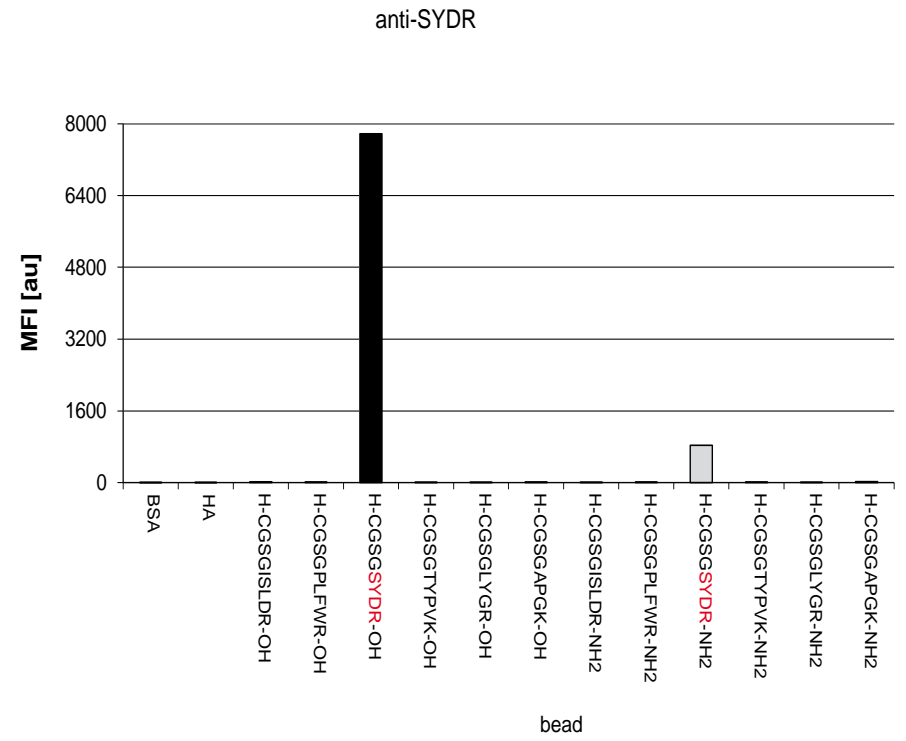
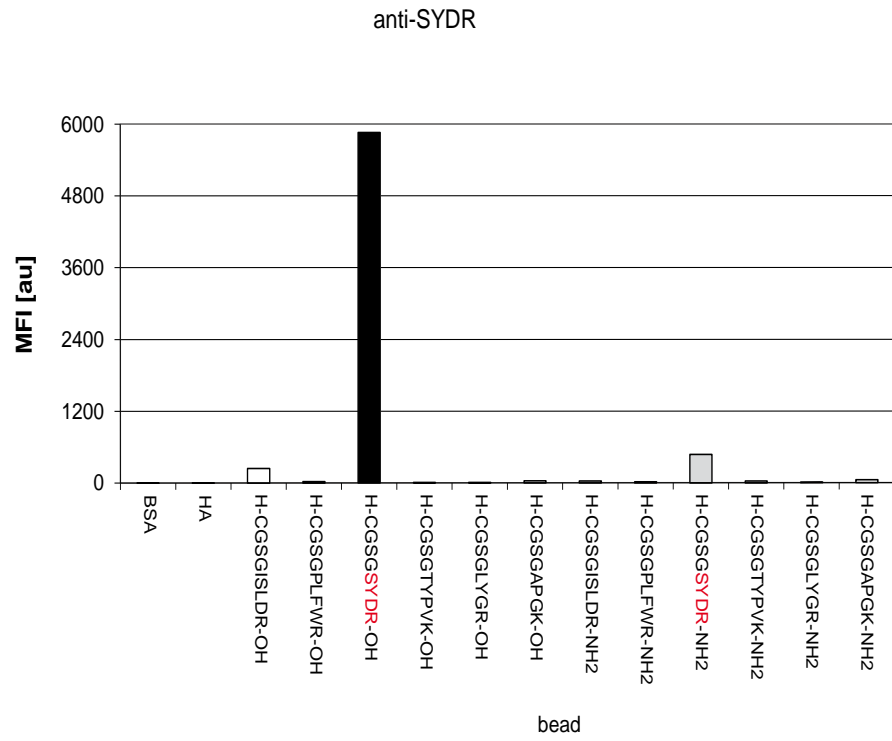
Mit mikrosphärenbasierten Antigen-Antikörper-Assays wurden die Seren der immunisierten Kaninchen nach Immunisierungstag 61 analysiert und die Antikörper auf Sequenzspezifität getestet. Hierzu wurden Peptide generiert und über Spacer auf Mikrosphären kovalent immobilisiert. Die TXP-Epitope mit freiem und mit blockiertem Terminus, sowie die zur Immunisierung eingesetzten Trägerproteine wurden in einem multiplexen, mikrosphärenbasierten Array eingesetzt. Mit diesem Array wurden die Seren bzw. die gereinigten Antikörper inkubiert und nach mehrfachen Waschschritten mit einem PE-markierten Sekundärantikörper detektiert. Für jedes TXP-Epitop wurden zwei Kaninchen immunisiert und getestet. Kaninchenserum aus zwei verschiedenen Immunisierungen wurden so getestet. Als Targets wurden den Antikörpern je die Peptidsequenzen des jeweiligen Immunisierungsansatzes mit freier Carboxygruppe am C-Terminus bzw. mit amidiertem C-Terminus angeboten. Als Negativkontrollen dienten Mikrosphären, die mit HA belegt waren. Zudem wurden BSA- bzw. OVA-belegte Mikrosphären eingesetzt. Diese Kontrollproben waren notwendig, um Signale, die durch die Antikörperbindung an die Trägerproteine, die bei der Immunisierung, Antikörperreinigung oder Mikrosphärenbeladung eingesetzt wurden, von spezifischen Signalen unterscheiden zu können.

anti-ISLDR

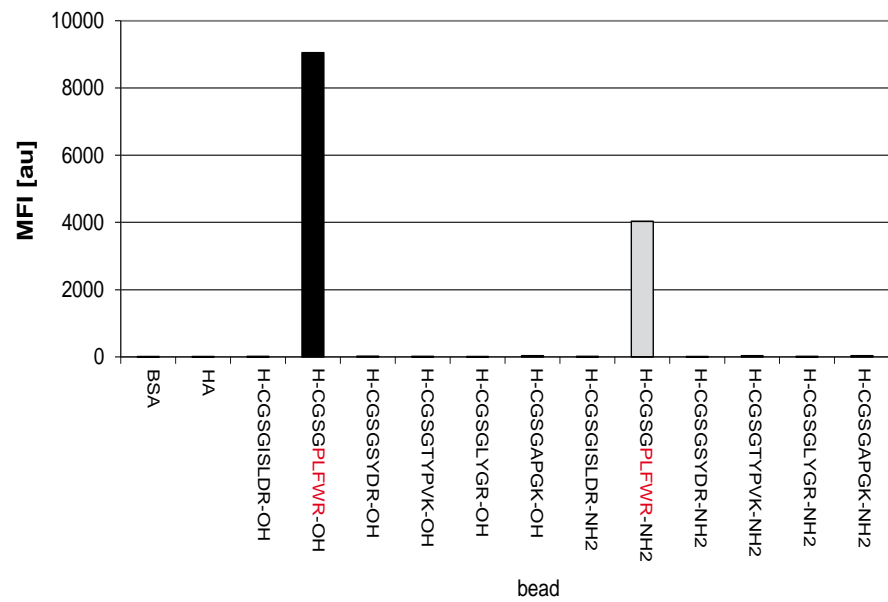


anti-ISLDR

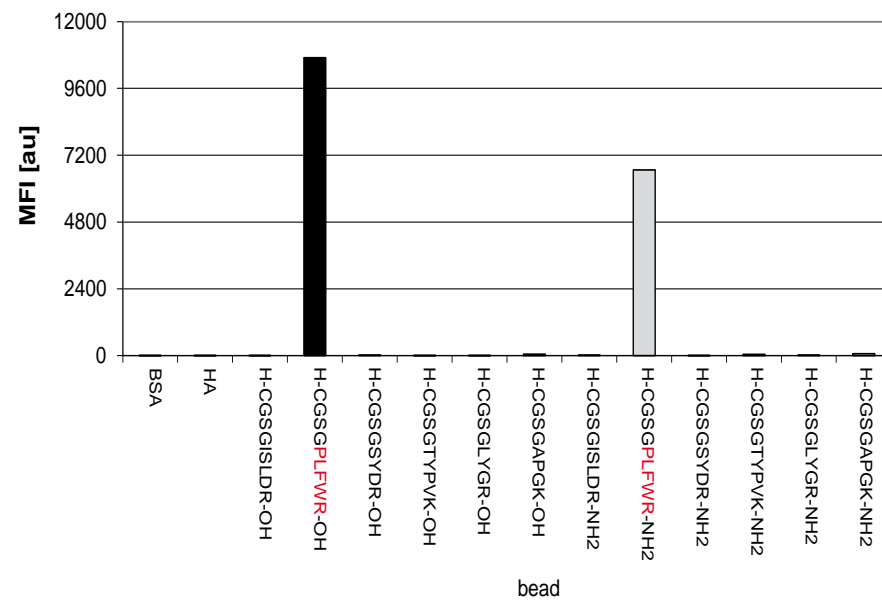




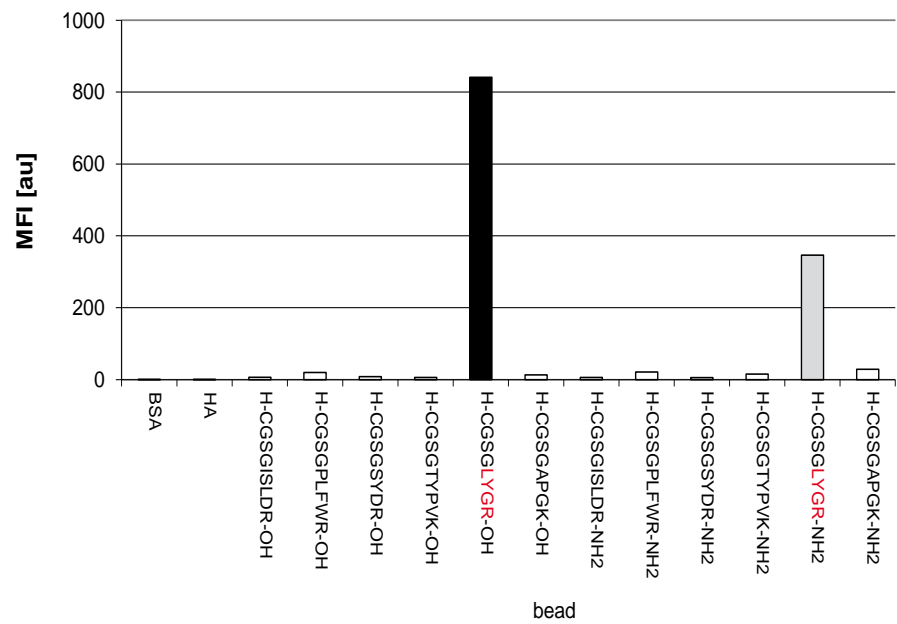
anti-PLFWR



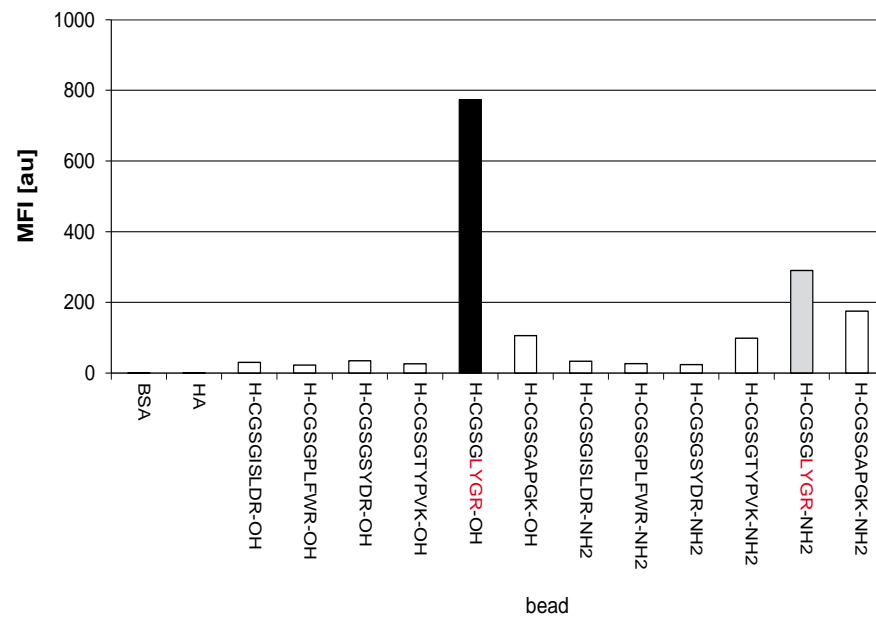
anti-PLFWR



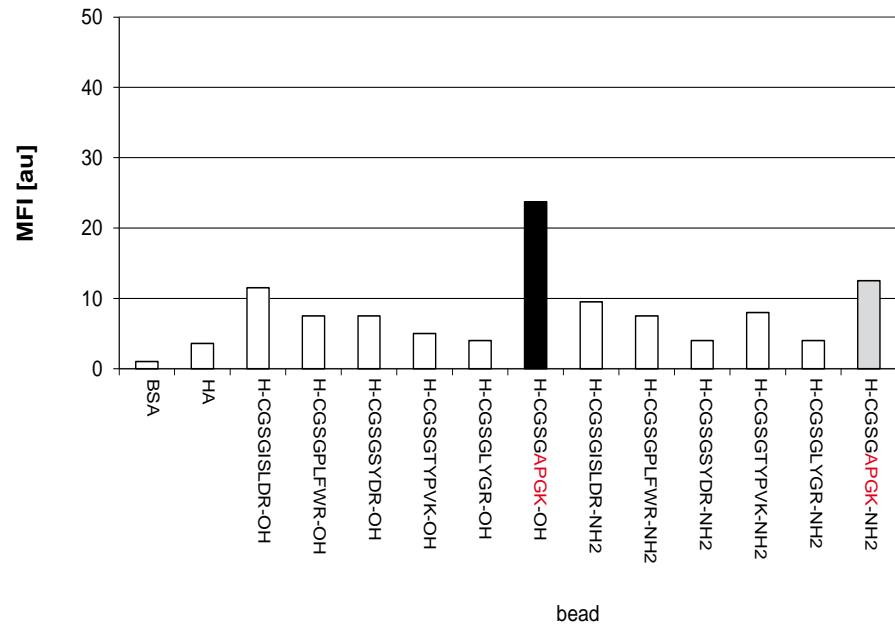
anti-LYGR



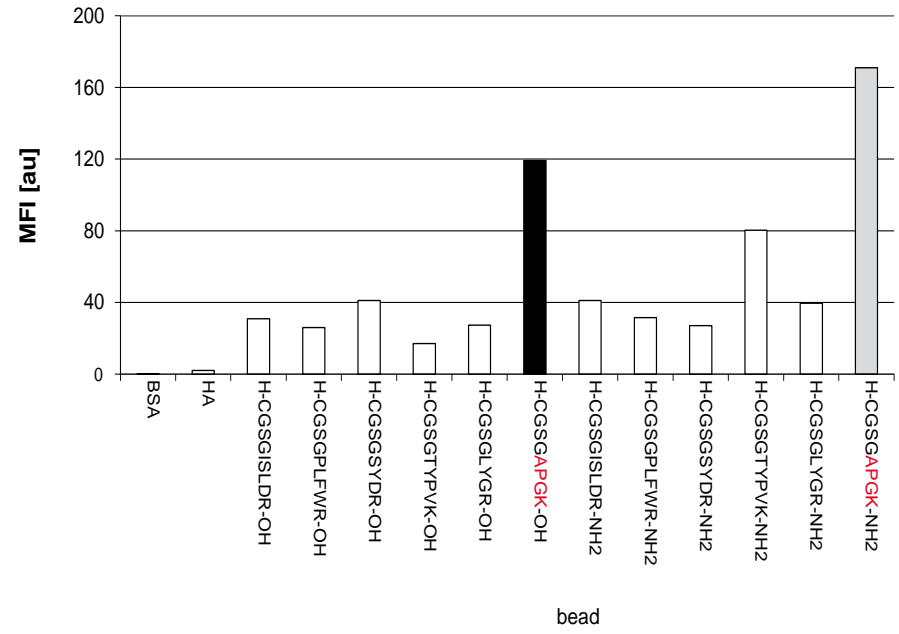
anti-LYGR



anti-APGK



anti-APGK



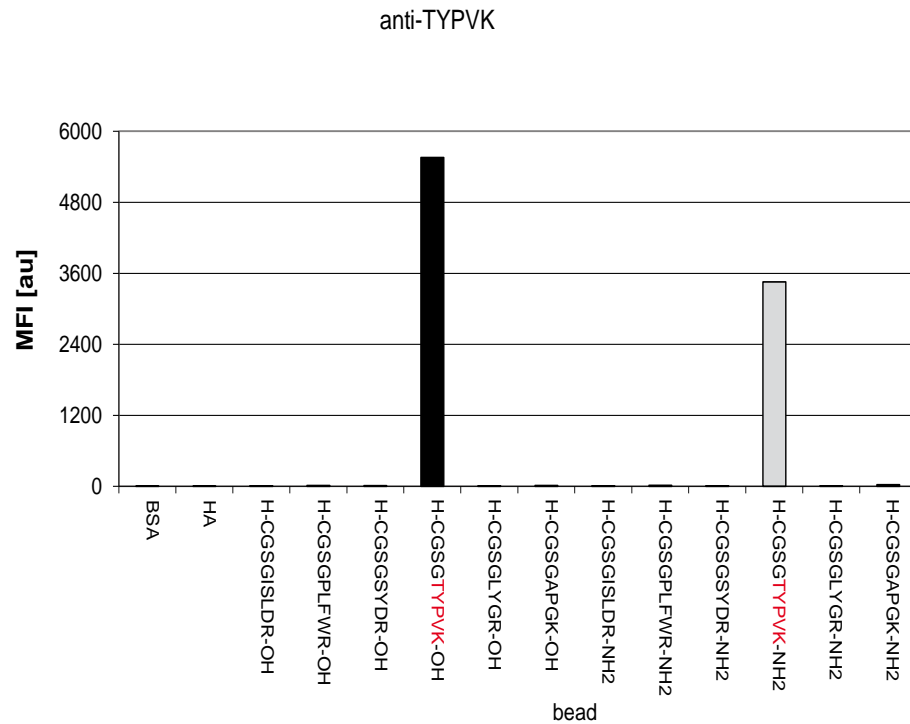


Abbildung 9: Mikrosphärenbasierte Assays zur Charakterisierung von TXP-Antikörpern

Polyklonale Kaninchenantikörper wurden auf einer mikrosphärenbasierten Plattform auf ihre Spezifität überprüft. Dazu wurden kurze Aminosäuresequenzen auf farbcodierte Polystyren-Mikrosphären gekoppelt und diese den Antikörpern als Zielstrukturen angeboten. Gebundene Antikörper wurden durch einen PE-markierten Sekundärantikörper in einem Durchfluscytometer (Luminex™ LX100-System) detektiert. Die Signale sind angegeben in Mittlerer Fluoreszenz Intensität (MFI).

Die Daten der mikrosphärenbasierten Analyse (Abbildung 9 und Abbildung 24) zeigen die Bindungsspezifität der Kaninchenantisera am 53. Immunisierungstag zu verschiedenen TXP-Epitopen. Fluoreszenzintensitäten zwischen 5500 und 10700 wurden für die untersuchten Antikörper-Antigen Interaktionen gemessen. Das Hintergrundsignal der Messungen lag bei weniger als 0.1% (3 bis 4 MFI). Es wurden nur sehr niedrige unspezifische Interaktionen zwischen Antikörper und anderen Sequenzen (>1%, bei 5-54 MFI) als dem immunisierten Peptid beobachtet. Die stärkste Antikörper-Antigen Kreuzreaktion lag bei >5% (303 MFI) für den anti-ISLDR-Antikörper und das PFLWR-Peptid.

Stärkere unspezifische Interaktionen wurden bei den Antikörpern anti-LYGR und anti-APGK beobachtet. Zwar wiesen diese Antikörper ebenfalls die höchsten messbaren Interaktionen zu ihren spezifischen Zielpeptiden auf, allerdings waren auch Interaktionen zu den anderen Peptidsequenzen ebenfalls deutlich zu erkennen, sodass diese Antikörper später nicht für den Quantifizierungsansatz verwendet wurden.

Zusätzliche Antikörper-Charakterisierungen für TXP-Antikörper, die ebenfalls für die Anreicherung GPCR-spezifischer Peptide eingesetzt werden sollten, sind im Anhang (Abbildung 24) zu finden. Zudem ist die Interaktion zwischen Antikörpern und Peptiden mit blockierten Enden im Vergleich zu den Peptiden mit freien Termini für alle Antikörper deutlich verringert.

4.2.2 Affinitätsbestimmung der TXP-Antikörper

Zur Bestimmung der Affinität der Antikörper wurde eine mikrosphärenbasierte Variante eines Kompetitionsassays nach Friguet verwendet [73]. Nach Vorinkubation der Antikörper mit synthetischen Peptiden in verschiedenen Konzentrationen wurde der freie, nicht-komplexierte, Antikörper mit Hilfe eines mikrosphärenbasierten Bindungsassays bestimmt. Hierzu wurde zu jeder Kompetitionsreihe eine Verdünnungsreihe des Antikörpers vermessen.

Beispielhaft, sind für die Antikörper anti-C(Cam)QYR (Tier 1 und 2) die Ergebnisse des Kompetitionsassays in Abbildung 10 dargestellt. Anhand dieser Ergebnisse

wurden die apparenten Bindungskonstanten (Kd-Werte) der polyclonalen Antikörper mit Hilfe einer bivalenten Regression nach Niebe et al. [74] bestimmt. Die Affinitäten sind in Tabelle 13 aufgelistet.

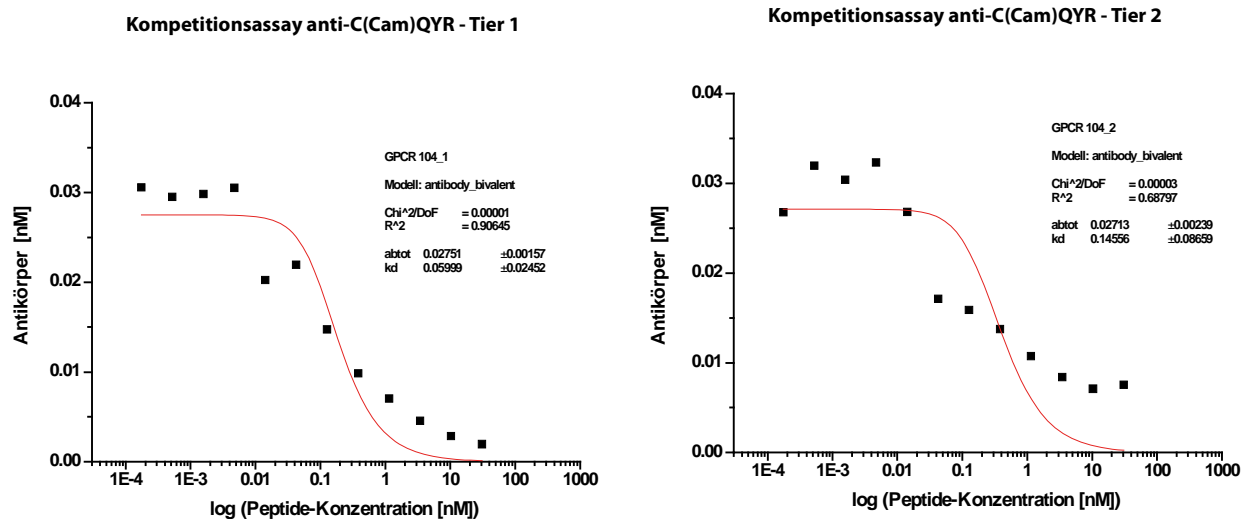


Abbildung 10: Wettbewerbsassays für die Antikörper anti-C(Cam)QYR (Tier 1 und 2).

Die Affinität von polyclonalen Kaninchenantikörpern zu ihren Antigenen wurde mit Hilfe eines Wettbewerbsassays bestimmt. Dazu wurden die Antikörper zunächst mit den Antigenen in Lösung vorinkubiert. Anschließend wurden sie mit Mikrosphären inkubiert, auf denen das Antigen gekoppelt war. Gebundene Antikörper wurden durch einen PE-markierten Sekundärantikörper im Durchflussscytometer (Luminex™ LX100-System) detektiert. Die Signale sind als Mittlere Fluoreszenz Intensitäten (MFI) angegeben.

Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse des Wettbewerbsassays

Antikörperbezeichnung	Peptid	R ²	Kd [nM]
Anti-IYC(Cam)R_Tier 1		n.A.	n.A.
Anti-IYC(Cam)R_Tier 2	CGSG- <u>IYC(Cam)R</u>	0.869	0.622 ± 0.252
Anti-C(Cam)QYR_Tier 1		0.906	0.060 ± 0.025
Anti-C(Cam)QYR_Tier 2	CGSGC- <u>(Cam)QYR</u>	0.688	0.146 ± 0.087
Anti-YNLK_Tier 1		0.790	15.662 ± 6.928
Anti-YNLK_Tier 2	CGSG- <u>YNLK</u>	0.850	18.790 ± 6.967
Anti-TLSD_Tier 1		n.A.	n.A.
Anti-TLSD_Tier 2	<u>TLSD</u> -GSGC	n.A.	n.A.
Anti-YFC(Cam)V_Tier 1		n.A.	n.A.
Anti-YFC(Cam)V_Tier 2	<u>YFC(Cam)V</u> -GSGC	n.A.	n.A.

Kd Werte zwischen 0.06 und 18.8 nM wurden mithilfe dieses Wettbewerbsassays bestimmt. Für zwei der untersuchten Antikörper konnte kein Kd-Wert bestimmt

werden. Hierbei handelte es sich in beiden Fällen um Antikörper, die gegen N-terminale Aminosäuresequenzen generiert wurden.

4.2.3 Immunpräzipitation und MALDI MS Analyse aus Gewebelysaten

Mikrosphärenbasierte Assays bieten eine schnelle und sensitive Möglichkeit zur Bestimmung der Antikörperspezifität und apparenten Affinität. Zur weiteren Charakterisierung der Antikörper wurden die Antikörper in einem funktionellen Assay eingesetzt. Hierzu wurden mit den TXP-Antikörpern Immunpräzipitationen durchgeführt und die Präzipitate mit Hilfe von MALDI MS analysiert. Gewebelysate von einer weiblichen adulten Ratte wurden mit Trypsin verdaut und in Immunpräzipitationsversuchen verwendet. Damit sollte gezeigt werden, welche Bindeeigenschaften die Antikörper zu endogenen Peptiden aufweisen und welche Peptide tatsächlich aus einer biologischen Probe angereichert werden können.

1-5 µg der aufgereinigten TXP-Antikörper wurden eingesetzt, um aus je 75 µg Gewebelysate spezifisch Peptide anzureichern, welche die entsprechenden terminalen TXP-Sequenzen aufwiesen. Nach Elution wurden die Proben mittels MALDI MS analysiert. Die Massenspektren wurden mithilfe eines bioinformatischen „Terminus Enrichment Analysis –Tools“ (entwickelt mit Hannes Planatscher, NMI Reutlingen) analysiert. Ausgehend von dieser Peptid-Auswahl konnten die Peptide im MS/MS-Modus gezielt fragmentiert werden. Anschließend wurden die fragmentierten Peptide durch Datenbanksuche, ausgehend von den MS/MS Spektren, identifiziert.

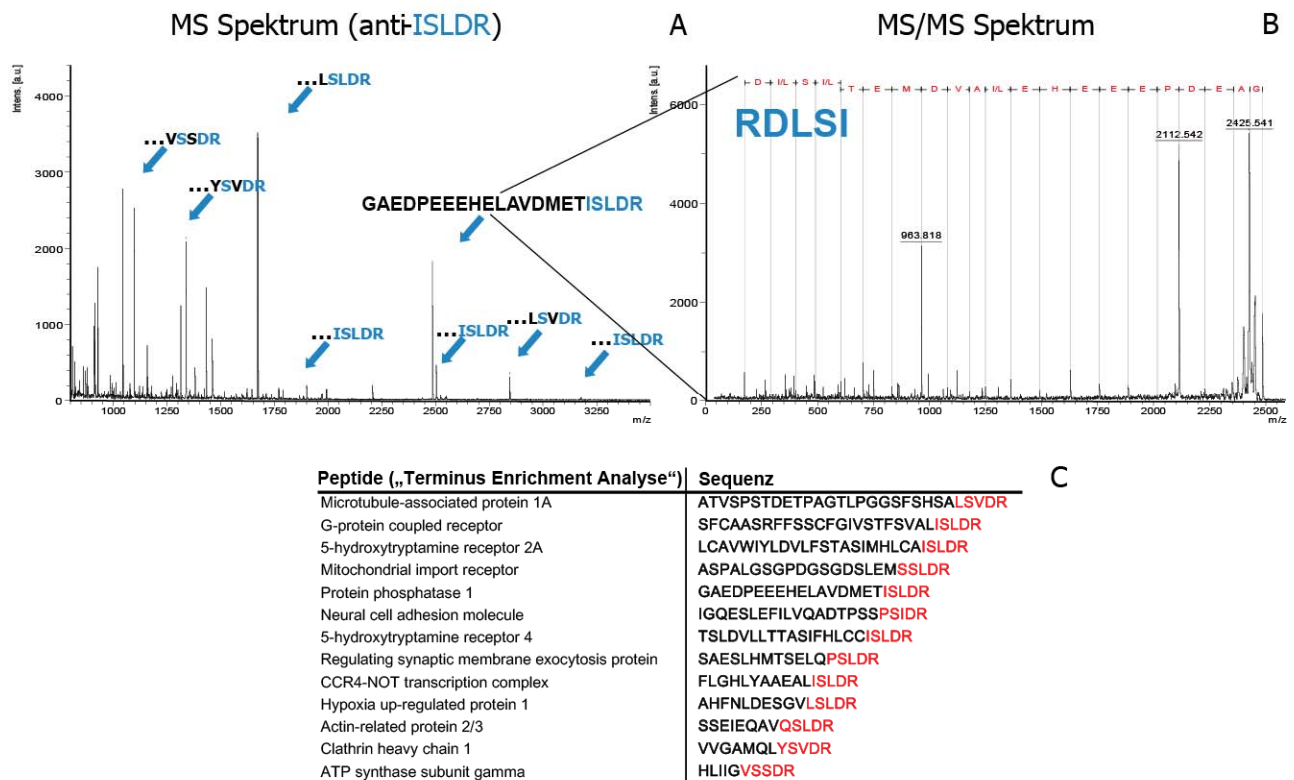


Abbildung 11: Immunpräzipitation aus einer komplexen biologischen Probe

Es wurde eine Immunpräzipitation mit einem Kaninchen-anti-ISLDR Antikörper aus 75 µg Cerebellum einer weiblichen adulten Ratte durchgeführt. Die Gewebeprobe wurde zuvor lysiert und tryptisch verdaut. Nach Elution wurde je 1 µl auf ein PACII-Target gespottet. In einer automatisierten Messung wurden pro Spektrum 1000 Schuss aufsummiert. Für die Darstellung wurden in flexAnalysis die Spektren geglättet, der Hintergrund abgezogen und die Massen annotiert. Alle angereicherten und infizierten Peptide sind im MS Spektrum durch einen Pfeil markiert (A). Zudem ist in einem Fragmentspektrum eines der angereicherten Peptide die Aminosäuresequenz der γ -Ionenreihe durchgängig annotiert (B). Die Sequenz der angereicherten Peptide und deren Ursprungsprotein sind aufgelistet (C). Die Peptide wurden durch das im Haus entwickelte, bioinformatische „Terminus Enrichment Analyse“-Tool auf Grundlage der MS-Signale und der Antikörperinformation zugeordnet.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch ein MALDI-MS Spektrum einer Cerebellum-Gewebeprobe nach Zellyse, tryptischem Proteinverdau, und automatisierter Immunpräzipitation durch einen TXP-Antikörper (Kaninchen-anti-ISLDR). In der Probe wurden mithilfe der „Terminus Enrichment Analyse“ 13 verschiedene Peptide ermittelt, die den „ISLDR-Terminus“ (die Abweichung einer Aminosäure im Epitop wurde bei der Suche akzeptiert) aufwiesen. Unter diesen 13 detektierten Peptiden waren drei Peptide, die spezifisch G Protein-gekoppelten Rezeptoren zugeordnet werden konnten. Die 13 ausgewählten Peptide konnten mit Peptidfragmentierung

und Datenbank-gestützter Suche eindeutig identifiziert werden. Eines der dabei generierten Fragmentspektren ist ebenso in Abbildung 11 dargestellt. Die Qualität der erzeugten Fragmentspektren ermöglichte in den meisten Fällen eine eindeutige Identifikation der angereicherten Peptide. Es ist zu erkennen, dass die komplette y-Ionen Reihe des fragmentierten Peptids in dem Spektrum vertreten ist, was eine gute Grundlage für die zuverlässige Peptid-Identifikation darstellt.

Dies zeigt, dass die Immunpräzipitation durch TXP-Antikörper zu einer effizienten Anreicherung von Peptiden mit der entsprechenden terminalen TXP-Sequenz führt. Ebenso wurden die restlichen Antikörper in den verschiedenen Gewebeproben und Zellysaten verschiedener Organismen getestet. Für jede TXP-Sequenz wurden die Seren von zwei immunisierten Kaninchen getestet und verglichen. In weiteren Experimenten wurde jeweils der TXP-Antikörper verwendet, der eine höhere Sequenzspezifität hatte und zu einer besseren Anreicherung der Peptide führte.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse von Immunpräzipitationen mit den getesteten TXP-Antikörpern aus Peptidmischungen und biologischen Proben ist zudem in vorangegangenen Arbeiten zu finden [71]. Dort wurde gezeigt, dass alle eingesetzten Antikörper spezifisch Peptide mit der terminalen Sequenz anreichern, gegen die sie generiert wurden.

4.2.4 Peptid-Bibliotheken

Für eine genauere Charakterisierung der TXP-Antikörper wurden Peptid-Bibliotheken für Bindungsstudien eingesetzt. Dabei handelt es sich um Peptidmischungen, bei denen im TXP-Epitop jeweils eine Aminosäure ausgetauscht wurde. Anstelle dieser Aminosäure steht je eine der 20 proteinogenen Aminosäuren. Dazu wurden pro Antikörper vier verschiedene Positionsbibliotheken verwendet, sodass an jeder Aminosäure-Position die Sequenz variiert wurde. Mit diesen Bibliotheken wurde die Sequenzspezifität der TXP-Antikörper genauer untersucht.

In einem ersten Ansatz wurden vier gereinigte TXP-Antikörper, anti-LGYR, anti-EIER, anti-AMTR und anti-LSGK, hinsichtlich ihrer Fähigkeit, definierte Zielsequenzen aus den Peptidbibliotheken anzureichern, getestet. 10 pmol der Peptidbibliotheken und

1 µg TXP-Antikörper wurden hierzu für die Immunpräzipitation eingesetzt. Gebundene Zielpeptide wurden nach der Immunpräzipitation mittels MALDI-TOF MS analysiert. Ebenso wurden je 1 µl der Bibliotheken vor der Immunpräzipitation mittels MALDI-TOF MS analysiert. Anhand der Unterschiede konnten die Bindegenschaften der getesteten Antikörper charakterisiert werden. Anhand der MS-Signalintensitäten der unterschiedlichen Peptide aus den Bibliotheken vor und nach Immunpräzipitation konnte die Bindung an die eigentlichen Antigensequenz und an ähnliche Sequenzen mit den Bibliotheken bestimmt werden. Exemplarisch sind in Abbildung 12 die MALDI-MS Spektren einer Bibliothek dargestellt, um die Unterschiede der Komplexität der Bibliothek vor Immunpräzipitation und, im Vergleich dazu, die drastisch reduzierte Komplexität des Eluats nach der Immunpräzipitation aufzuzeigen.

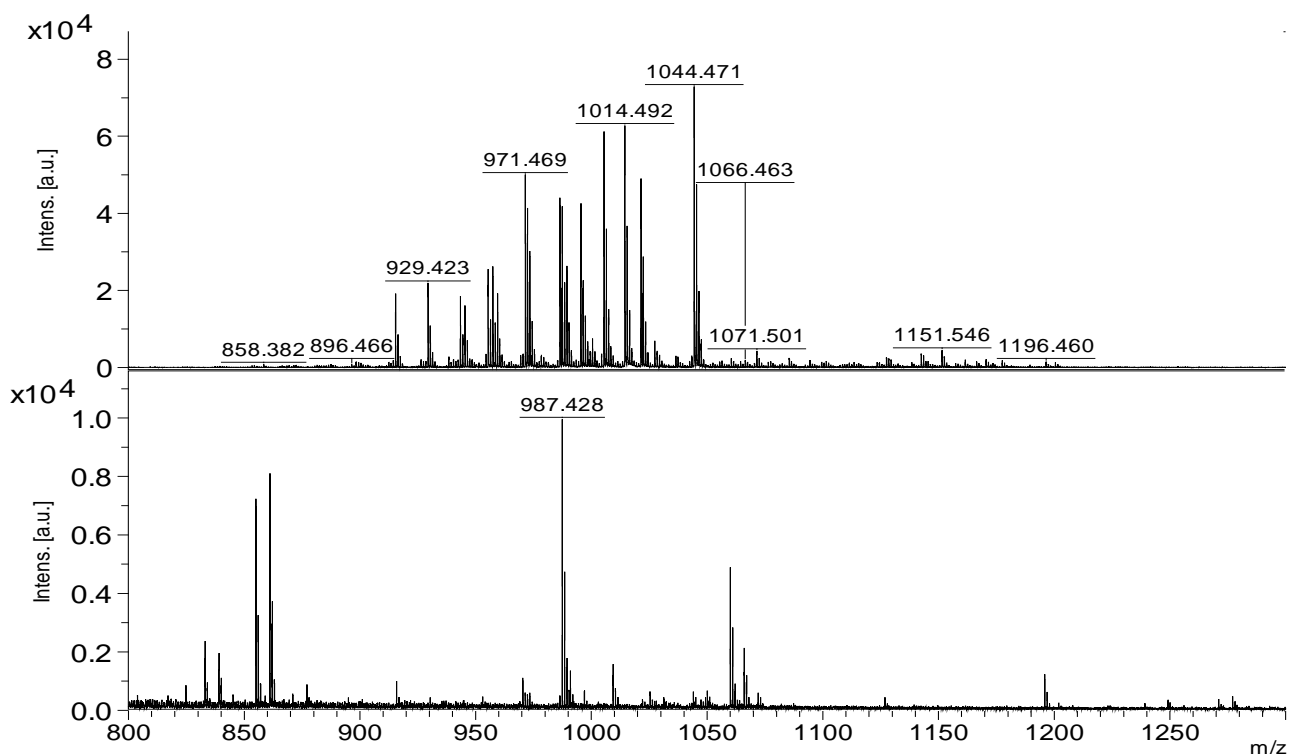


Abbildung 12: Antikörpercharakterisierung mittels Peptidbibliotheken

MALDI-Spektren der „LGXR-Bibliothek“ vor (oben) und nach (unten) IP mittels anti-LGYR Antikörper. Für beide Proben wurde je 1 µl auf ein PAC-Target gespottet und vor der Messung gewaschen. In einer automatisierten Messung wurden pro Spektrum 1000 Schuss aufsummiert. Für die Darstellung wurden die Spektren in flexAnalysis geglättet, der Hintergrund abgezogen und die Massen annotiert.

Die Messungen vor der Immunpräzipitation waren notwendig, um Faktoren wie Konzentrationsunterschiede der einzelnen Peptide vor der Immunpräzipitation und deren Ionisierbarkeit auszugleichen. Diese unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften wurden durch eine Berechnung, basierend auf den Spektren vor der Präzipitation, folgendermaßen normalisiert. Die Flugeigenschaften der Peptide werden durch ihre physikochemischen Eigenschaften bestimmt. Daher kann der Austausch einer einzelnen Aminosäure dazu führen, dass sich das Signal dieses Peptides im Massenspektrometer deutlich verändert oder sogar nicht mehr detektierbar ist. Um die individuelle Eignung der verschiedenen Peptide in der Bibliothek zu berücksichtigen, wird das Signal des einzelnen Peptides relativ zu den anderen gesetzt. Die verwendete Formel dazu ist:

$$f(a) = \frac{A(M_a)}{\sum_{a \in D} A(M_a)} |D|$$

Dabei ist M die Masse, A die Peakfläche (Area) und D die Anzahl der detektierten Peptide aus der Bibliothek (≤ 20). Das bedeutet, dass das Signal für ein Peptid mit der Masse M_a in Relation zum Signal gesetzt wird, das für alle Peptide im Durchschnitt bestimmt wurde. Ist beispielsweise das Signal eines Peptides im Massenspektrum bei gleicher Konzentration nur halb so hoch wie der Durchschnitt der Signale, ergibt sich ein Normalisierungsfaktor von 2.

Nach Normalisierung der Signale ergibt sich daraus eine korrigierte Peptidprävalenz $P(a)$ nach der Präzipitation mit der Formel:

$$P(a) = \frac{A(M_a)f(a)}{\sum_{a \in D} A(M_a)f(a)}$$

Diese Peptidprävalenz gibt die spezifische Anreicherung für jedes einzelne Peptid aus der Bibliothek wieder. Durch die Einbeziehung dieser Faktoren konnte festgestellt werden, welche Antikörperspezifität bezogen auf einzelne Aminosäure-Positionen in der Peptidzielsequenz besteht.

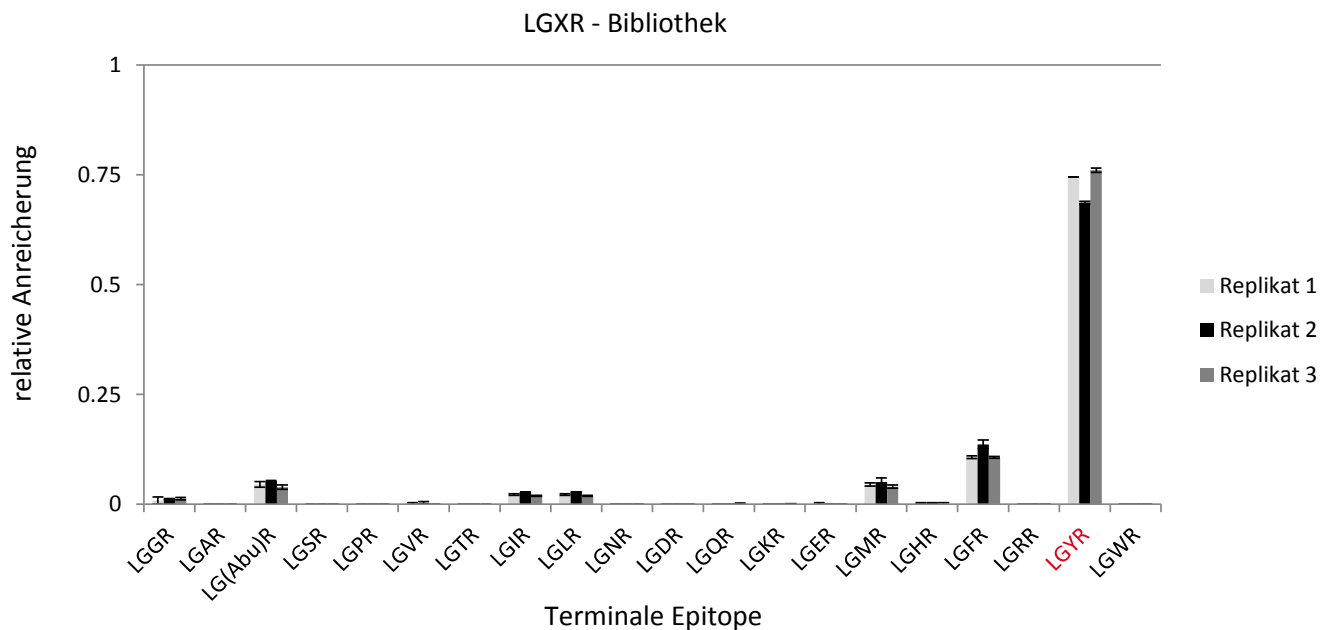


Abbildung 13: Peptidbibliothekbasierte Antikörpercharakterisierung

Aus der „LGXR“-Peptidbibliothek wurden mit einem Kaninchen-anti-LGYR Antikörper Peptide angereichert. Die spezifische Anreicherung wurde anhand von MALDI-MS Daten berechnet. Der maximale Anreicherungsfaktor von 1 ist unter den 20 möglichen Epitopen aufgeteilt. Die Präzipitation aus den Bibliotheken wurde in drei Replikaten durchgeführt und die Eluate aus jeder Präzipitation wurden in Triplikaten gespottet und gemessen (Fehlerindikatoren).

Aus den normalisierten Massenspektren nach Immunpräzipitation durch die TXP-Antikörper konnte die spezifische Anreicherung der Peptide durch die Antikörper ermittelt werden. In Abbildung 13 ist beispielhaft die Peptidanreicherung aus der Bibliothek „LGXR durch den TXP-Antikörper „Anti-LGYR“ in Triplikaten dargestellt. In diesem Beispiel wurde die dritte Aminosäure des Epitops variiert. Entsprechend wurden Bibliotheken eingesetzt, bei denen die erste, die zweite oder die letzte Aminosäure der Sequenz ausgetauscht wurde.

Aus den resultierenden Daten konnte dann die Spezifität der jeweiligen Antikörper bestimmt werden. In Tabelle 14 sind für den anti-LGYR-Antikörper die Ergebnisse der bibliothekbasierten Analyse zusammengefasst. Für jede Position ist den 20 verschiedenen Aminosäuren ein Wert zwischen 0 und 1 zugeteilt, welcher der Anreicherung durch den Antikörper entspricht. Die Summe dieser Werte ergibt für jede Position den Wert 1.

Tabelle 14: Ergebnis des anti-LGYR-Antikörpers durch Peptidbibliotheken

Aminosäure	Position 1	Position 2	Position 3	Position 4
G	0,00	0,78	0,01	0,00
A	0,01	0,05	0,00	0,00
C	0,10	0,01	0,05	0,00
S	0,00	0,01	0,00	0,00
P	0,01	0,07	0,00	0,00
V	0,04	0,00	0,00	0,00
T	0,00	0,02	0,00	0,00
I	0,31	0,01	0,02	0,01
L	0,31	0,01	0,02	0,01
N	0,00	0,00	0,00	0,00
D	0,00	0,02	0,00	0,00
Q	0,00	0,01	0,00	0,00
K	0,00	0,00	0,00	0,00
E	0,00	0,00	0,00	0,00
M	0,10	0,00	0,05	0,17
H	0,00	0,00	0,00	0,00
F	0,12	0,00	0,12	0,01
R	0,00	0,01	0,00	0,79
Y	0,00	0,00	0,73	0,01
W	0,00	0,00	0,00	0,00

Ausgehend von dieser Analyse lässt sich ein Epitop für den untersuchten Antikörper darstellen. Da Leucin und Isoleucin isobar und daher nicht unterscheidbar sind, wurden die Werte dieser beiden Aminosäuren je durch 2 dividiert und auf beide Aminosäuren aufgeteilt. Das resultierende Epitop ist in Abbildung 14 graphisch dargestellt.

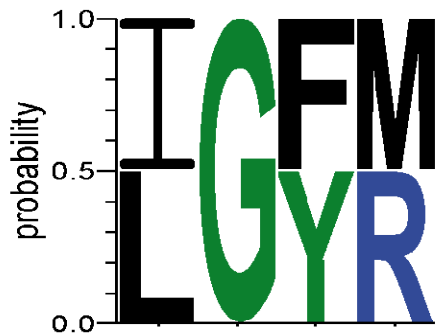


Abbildung 14: Epitopcharakterisierung des anti-LGYR-Antikörpers

Aus verschiedenen Peptidbibliotheken wurden mit einem Kaninchen-anti-LGYR Antikörper Peptide präzipitiert und durch MALDI-MS Messungen vermessen. Die spezifische Anreicherung wurde anhand dieser-MS Daten berechnet. Der maximale Anreicherungsfaktor von 1 ist unter den 20 möglichen Epitopen aufgeteilt. Die Präzipitation aus den Bibliotheken wurde in drei Replikaten durchgeführt und die Eluate aus jeder Präzipitation wurden dreimal gespottet und gemessen. Die Ergebnisse von vier Ansätzen, bei denen je eine Aminosäureposition variiert wurde, sind in ein gemeinsames Epitop zusammengefasst.

4.2.5 MATERICS für die Antikörpercharakterisierung

Neben der Bestimmung des Epitops mithilfe der Peptidbibliotheken wurde eine zweite Methode verwendet, um zu bestimmen, welche Sequenzspezifität die Antikörper aufweisen bzw. welche Peptide (mit welcher terminalen Sequenz) bevorzugt angereichert werden. Dazu wurde zusammen mit Hannes Planatscher (NMI Reutlingen) das bioinformatische Werkzeug MATERICS (mass-spectrometric analysis of terminal epitope enrichment in complex samples) entwickelt, welches es ermöglicht, die Antikörperspezifität der TXP-Antikörper anhand von massenspektrometrischen Daten nach einer Immunpräzipitation aus einer enzymatisch verdauten biologischen Probe zu bestimmen.

Die vier TXP-Antikörper (anti-LGYR, anti-EIER, anti-AMTR und anti-LSGK), die zuvor mit dem Bibliotheksansatz charakterisiert wurden, wurden mit dem MATERICS-Ansatz untersucht. Dazu wurden Immunpräzipitationen aus lysierten und enzymatisch verdauten Zelllinien HeLa, Hek293 und Panc1 durchgeführt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Mit diesen Experimenten wurde zum einen das bevorzugte TXP-Epitop der jeweiligen TXP-Antikörper genauer charakterisiert, zum anderen wurde das neu entwickelte

bioinformatische Werkzeug getestet. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, nach Immunpräzipitation aus einer komplexen Probe anhand der MS-Daten die bevorzugt angereicherten Peptide zu bestimmen, mit denen ein Epitop definiert werden konnte. Die Experimente wurden in verschiedenen Zelllinien und in Triplikaten durchgeführt.

Zur Optimierung der Ergebnisse wurde zudem eine sogenannte „Stoppliste“ eingeführt. Diese ist eine Kombination aus den Signalen, die in allen Negativkontrollen detektiert wurden und der „MALDI background“ Liste aus flexAnalysis (Version 3.0, Bruker Daltonik GmbH). Die Liste beinhaltet v.a. Ionen der MALDI-Kalibrierstandards, der MALDI-Matrix, der Protease Trypsin und der häufig detektierten Verunreinigung durch Kreatin. Signale dieser Stoppliste wurden aus den Signallisten entfernt und nicht bei der Berechnung berücksichtigt. Dadurch konnte eine verbesserte Epitopbestimmung erreicht werden. Die extrahierten Peaklisten aus den MALDI-MS Spektren wurden mit dem MATERICS Algorithmus analysiert und ausgewertet. Exemplarisch ist in Abbildung 15 das Ergebnis einer solchen Analyse für einen Antikörper (Kaninchen anti-LGYR) und drei Zelllinien dargestellt.

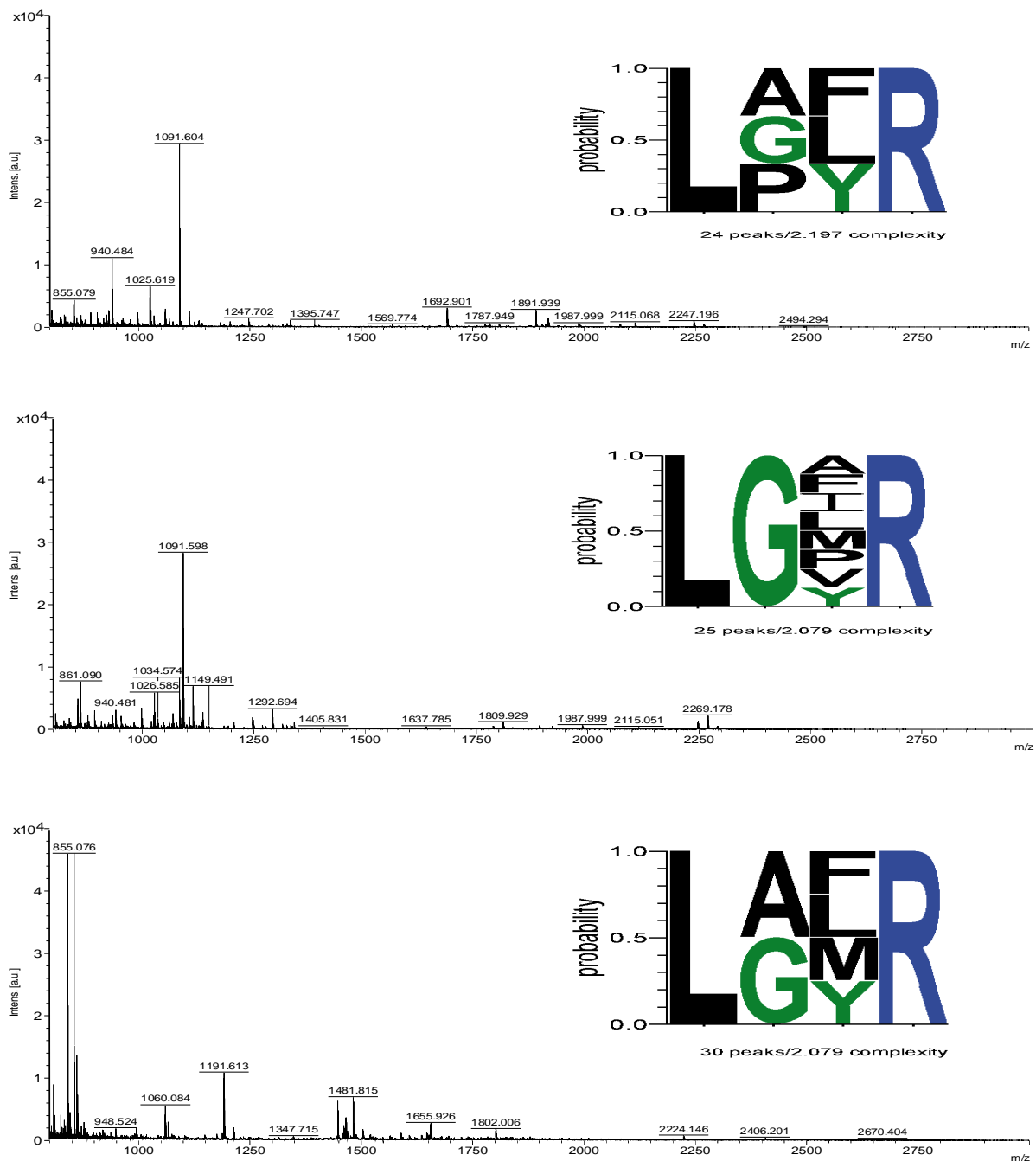


Abbildung 15: Antikörpercharakterisierung durch komplexe Proben und MATERICS

Aus drei lysierten und enzymatisch verdauten Zelllinien (Hela Hek293 und Pank1) wurden mit einem TXP-anti-LGYR Antikörper Peptide präzipitiert und durch MALDI-MS Messungen vermessen. Die spezifische Anreicherung wurde anhand dieser-MS Daten durch den Einsatz des MATERICS-Tools bestimmt. Der maximale Anreicherungsfaktor von 1 ist unter den 20 möglichen Epitopen aufgeteilt. Die Präzipitation wurde in drei Replikaten durchgeführt und die Eluate aus jeder Präzipitation wurden dreimal gespottet und gemessen. Pro Probe wurde je 1 μ l auf ein PAC-Target gespottet und vor der Messung gewaschen. In einer automatisierten Messung wurden pro Spektrum 1000 Schuss aufsummiert. Für die Darstellung wurden in flexAnalysis die Spektren geglättet, der Hintergrund abgezogen und die Massen annotiert.

Die Ergebnisse der Analyse mit MATERICS zeigen, dass es in den Epitopen der Zielpeptide bei den untersuchten Antikörpern Positionen gibt, die für die Antikörper-Antigen-Erkennung sehr wichtig sind und kaum Variabilität aufweisen. Andere Positionen in den Epitopen weisen eine höhere Austauschbarkeit der Aminosäuren auf. In dem dargestellten Beispiel des TXP-anti-LGYR-Antikörpers, werden vor allem Peptide präzipitiert, bei denen die erste und die letzte Aminosäureposition mit der Immunisierungssequenz identisch sind. Ebenso wurden nur wenige Peptide gebunden, in denen kein Glycin an der zweiten Position vorhanden war. Allerdings wurden auch einige Peptide identifiziert, in deren Sequenz in der dritten Position kein Tyrosin vorhanden war. Ebenso wie der Kaninchen-anti-LGYR Antikörper wurden auch die anderen Antikörper untersucht.

Die Analyse mit MATERICS zeigte nach IP mit dem Kaninchen-anti-EIER Antikörper, dass dieser vorzugsweise Peptide mit der terminalen Sequenz EXER anreichert. Es wurden nur wenige Peptide angereichert, bei denen die erste, dritte oder letzte Position des Epitopes variiert. Es wurden neben Peptiden mit der terminalen Sequenz EIER bevorzugt Peptide gebunden, bei denen die anstelle des Isoleucins an der zweiten Position ein Leucin vorhanden war.

Immunpräzipitationen mit dem Kaninchen-anti-AMTR-Antikörper zeigen, dass dieser Antikörper bevorzugt Peptide bindet, die genau die C-terminale Aminosäuresequenz tragen, gegen die immunisiert wurde. Zudem bindet der Antikörper Peptide, bei denen anstatt des Methionins an der zweiten Position in der Terminussequenz ein Alanin vorhanden ist.

Bei den bisher durchgeführten Analysen, die nach IP mit dem Kaninchen-anti-LSGK-Antikörper durchgeführt wurden, konnte mithilfe des MATERICS Tools keine spezifische Anreicherung eines bevorzugten Epitopes gezeigt werden.

Eine Publikation zur weitgehenden Beschreibung des MATERICS Algorithmus mit Vergleichsanalysen zur Antikörpercharakterisierung mithilfe von Peptidbibliotheken ist derzeit in Arbeit.

4.3 GPCR-Quantifizierung mittels Immunoaffinitätsanreicherung und massenspektrometrischer Analyse

Nachdem die TXP-Antikörper auf Spezifität und Affinität getestet wurden und in verschiedenen biologischen Assays genauer charakterisiert waren, konnten sie in einem Quantifizierungsassay eingesetzt werden. Hierzu wurde eine Quantifizierungsmethode nach Dayon et al. [35] verwendet und modifiziert. Diese Quantifizierungsmethode, die auf der chemischen Markierung der Probe und der Standards mit isobaren Markierungsreagenzien basiert, wurde mit der beschriebenen Immunoaffinitätsanreicherung mit TXP-Antikörpern kombiniert. Durch Kombination dieser beiden Methoden war es möglich, fünf G Protein-gekoppelte Rezeptoren in drei verschiedenen Rattengeweben anhand von proteotypischen Signaturpeptiden zu quantifizieren. Zur akkuraten Quantifizierung wurden synthetische Peptide in drei verschiedenen Konzentrationen mit den isobaren Reagenzien markiert und als interne Standardkurven zu einer enzymatisch verdauten Probe zugegeben. Diese Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Von jedem Gewebelysat wurden drei unabhängige Verdaureaktionen durchgeführt, welche anschließend parallel behandelt wurden. Für die absolute Quantifizierung wurden die synthetischen Standardpeptide auf definierte Konzentrationen eingestellt. Zudem wurde, ausgehend von diesen Konzentrationen (C1), eine 1:3 (C2) und eine 1:9 (C3) Verdünnung hergestellt. Die daraus resultierenden Peptidverdünnungen wurden mit iTRAQ Reagenzien 114 (C1), 115 (C2) und 116 (C3) markiert und gemischt. Nach Immunpräzipitation wurden die angereicherten Analyte flüssigchromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Zunächst wurden die generierten Peptidverdünnungsreihen nach der chemischen Markierung mittels MALDI-MS auf Vollständigkeit der Markierungsreaktion getestet und anschließend mit Hilfe von LC-ESI MS/MS die Linearität der Standardkurven überprüft. Die für die Quantifizierung ausgewählten Rezeptorproteine sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Proteotypische Standardpeptide zur Quantifizierung

Epitop	GPCR	Proteotypisches Peptid	Masse [Da]	Retentions-zeit [min]
ISLDR	5HT R4	TSLDVLLTTASIFHLC*C*ISLDR	2534,29	19,2-20,3
	OXY R	YLQVVGMPFASTYLLLLMSLDR	2432,28	22,5-23,7
PLFWR	5HT R1B	AAIMIVLVWVFSISISLPPPLFWR	2691,50	18,4-19,4
	5HT R1F	HAGIMITIVWIISVFISMPPLFWR	2826,55	18,7-19,8
TYPVK	mAChR M2	YFC*VTKPLTYPVK	1614,83	17,7-18,3

* In den endogenen Peptiden wurden die Cysteine vor enzymatischem Verdau reduziert und durch IAA alkyliert. In synthetischen Standardpeptiden wurde für die Synthese bereits alkyliertes Cystein eingesetzt.

4.3.1 MALDI-Analyse zur Überprüfung der Markierungseffizienz zeigt vollständig markierte Peptide

Um eine solide Quantifizierung gewährleisten zu können, musste zunächst die Effizienz der iTRAQ-Markierung der Standardpeptide mit dem iTRAQ Reagenz überprüft werden. Dies wurde mittels MALDI MS festgestellt. Ein Aliquot einer Peptidmischung aus den Standardpeptiden wurde hierzu vor und nach Markierungsreaktion in 50% ACN und 0.1% TFA verdünnt und 1 µl massenspektrometrisch analysiert. Durch die Markierung der Proben mit dem iTRAQ Reagenz wird das Molekulargewicht der Analyten um die Masse des Labels (oder bei mehrfacher Markierung um ein Vielfaches davon) erhöht. Diese Massenverschiebung ist in Abbildung 16 dargestellt.

In den Massenspektren ist zu erkennen, dass nach der Markierungsreaktion die Signale der unmarkierten Peptide nicht mehr zu sehen sind. Zudem ist zu erkennen, dass die chemische Modifikation vor allem bei den zwei langen hydrophoben Peptiden (m/z 2536.1 und 2827.3) zu einer deutlich verbesserten Ionisierbarkeit führte.

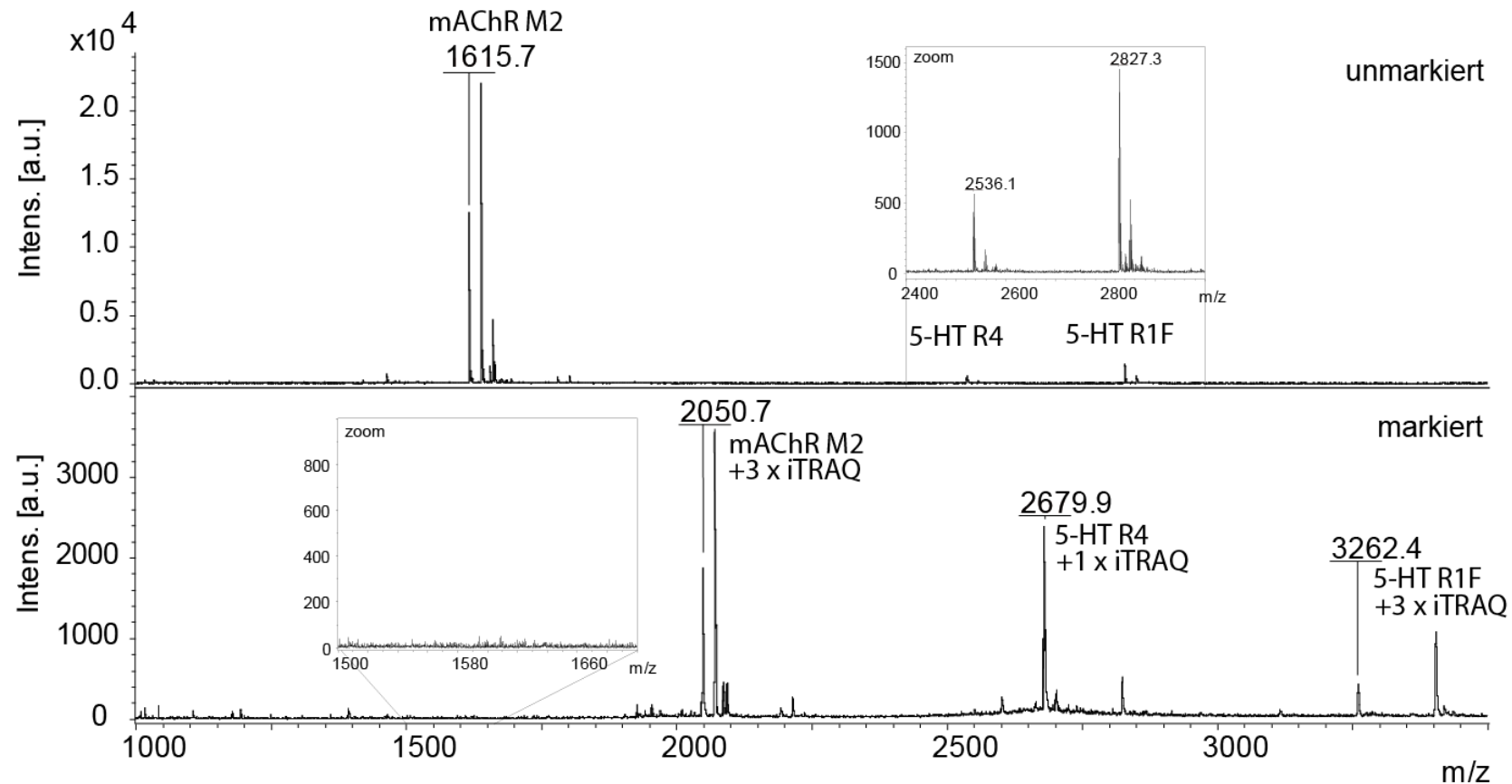


Abbildung 16: Überprüfung der iTRAQ-Markierungsreaktion von Standardpeptiden mittels MALDI MS

Eine Mischung aus drei Standardpeptiden (mACHR M2, 5-HT R4 und 5-HT R1F) wurde vor und nach Markierung mit iTRAQ Reagenzien gemessen. Die Massenverschiebung der Signale nach der Markierung zeigt, dass eine vollständige Markierung stattgefunden hat und keine unmarkierten Peptide mehr vorhanden sind. Der Zoombereich im oberen Spektrum zeigt die Signale von zwei unmarkierten Standardpeptiden (5-HT R4 und 5-HT R1F). Der Zoombereich im unteren Spektrum zeigt den Massenbereich des unmarkierten proteotypischen Standardpeptids des mACHR M2 (um m/z 1615.8). Neben den markierten Peptiden sind nach der Markierungsreaktion zusätzliche Peaks von Addukten zu erkennen.

4.3.2 Optimierung der Flüssigchromatographieparameter

Die markierten synthetischen Peptide wurden zur Optimierung der Flüssigchromatographieparameter und der Analysemethoden der massenspektrometrischen Detektion verwendet.

Standard-Chromatographiemethoden, wie sie in klassischen proteomischen Ansätzen verwendet werden, sowie eine C-18 Säule konnten aus folgenden Gründen nicht verwendet werden. Mit klassischen, für tryptische Proteinverdau eingesetzten Methoden konnten keine fokussierte Trennung der Peptide erreicht werden. Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen GPCR-spezifischen Peptiden und dem langkettigen Säulenmaterial waren zu stark und vier der fünf Peptide eluierten lediglich teilweise bzw. unvollständig bei 100% Laufmittel B (ACN +0.1% FA). Daher mussten die Parameter der Flüssigchromatographiemethode deutlich verändert werden.

In Tabelle 15 sind die Retentionszeiten der Standardpeptide, unter Verwendung der finalen Flüssigchromatographiemethode und bei Verwendung einer C-8, 300 Å-3 nm Säule, aufgelistet. Die Zeitfenster der Retentionszeiten lagen unter diesen Bedingungen zwischen $\pm 0,3-0,6$ min.

4.3.3 Optimierung der Massenspektrometrieparameter

In ersten massenspektrometrischen Messungen der reinen Standardpeptide zur Optimierung der Geräteparameter wurde festgestellt, dass die generierten MS/MS Spektren eine sehr geringe Sequenzabdeckung lieferten. Des Weiteren waren vor allem die iTRAQ-Reporterionen nicht oder nur schlecht in den Spektren zu erkennen, wodurch eine robuste und reproduzierbare Quantifizierung zunächst nicht möglich war.

Aus diesem Grund wurden die Kollisionsenergien entsprechend für die langen, hydrophoben und iTRAQ-markierten Peptide erhöht, um eine bessere Fragmentierung der Peptide zu ermöglichen. Die optimierten Kollisionsenergien der Fragmentierungsmethode sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Angepasste Kollisionsenergien für die Precursor-Ionen Fragmentierung

Die Kollisionsenergien sind für GPCR-spezifische proteotypische Peptide und die entsprechenden iTRAQ-markierten Standardpeptide angepasst. Die Energien sind abhängig von der isolierten Masse und dem Ladungszustand des Peptides.

Ladungszustand	Massenbereich	Kollisionsenergie [eV]
2+	300	36
	500	44
	1000	50
	2000	55
3+	300	31
	500	38
	1000	46
	2000	50

Zudem wurde eine „Inclusion-List“ für die markierten Zielpeptide erstellt. Dies führt dazu, dass die Ionen der Liste bevorzugt fragmentiert werden, was zu mehr Fragmentierungen pro Analyt führt. Durch diese Optimierung der Fragmentierungsmethode, konnten Fragmentspektren generiert werden, bei denen die Signalabdeckung der Peptide deutlich verbessert war. Abbildung 21 zeigt für jedes rezeptorspezifische Peptid ein Fragmentspektrum mit annotierten Ionenreihen. Insbesondere die Signale der iTRAQ Reporterionen konnten dadurch um ein Vielfaches erhöht werden.

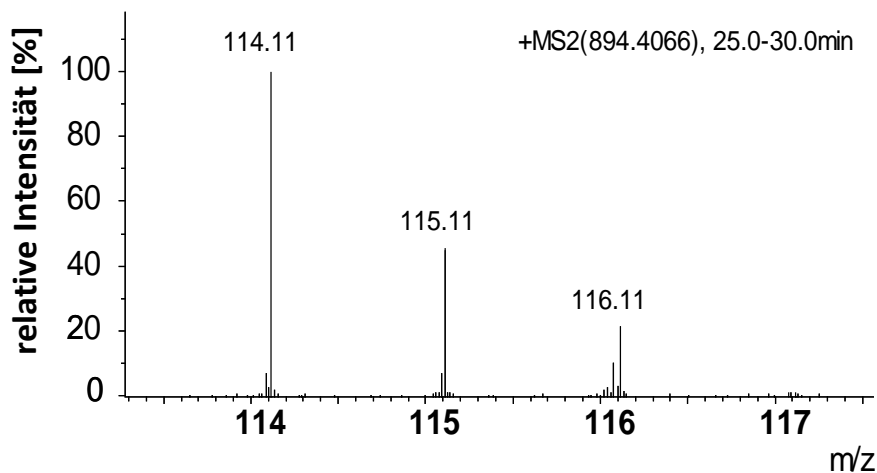
4.3.4 Linearität der Reporterionensignale der markierten Standardpeptide

Nachdem die verschiedenen Parameter der Peptidanalyse optimiert waren, wurden die Verdünnungsreihen der chemisch markierten Standardpeptide analysiert. Beispielhaft sind die Signale der iTRAQ Reporterionen nach der Fragmentierung der markierten Peptidstandards eines Serotoninrezeptors in Abbildung 17 dargestellt.

Aus den extrahierten Ionen Chromatogrammen der LC-ESI-MS Messung der reinen Peptid-Standardreihe (ohne endogene Peptide aus einer biologischen Probe) wurden über die gesamte Retentionszeit der Analyten die Signale der iTRAQ-Reporterionen gemittelt. Die gemittelten Intensitäten konnten anschließend gegen die bekannten Konzentrationen der Verdünnungsreihe aufgetragen werden. Aus diesen Datenpunkten der gemittelten Messwerte wurden Regressionsgeraden erstellt.

Abbildung 17 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt eines gemittelten Massenspektrums (A) des Serotoninrezeptors 4 und die daraus berechnete Regressionsgerade(B).

A Massenspektrum der Standardreihe (5-HT 4R)



B Reporterionensignale (5-HT 4R)

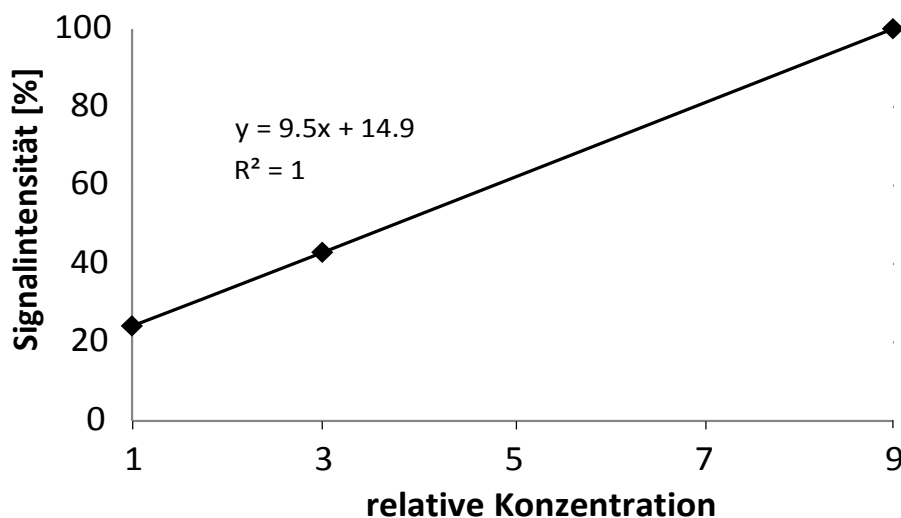


Abbildung 17: Linearitätstest der internen Peptidstandardkurven

Exemplarisch ist die Standardkurve des Serotoninrezeptors 4 (5-HT R4) dargestellt. Gemittelte Reporterionen-Signale von iTRAQ markierten Standardpeptiden über eine Retentionszeit von 5 Minuten sind dargestellt (A). Diese wurden im MS/MS-Modus einer LC-ESI-QUAD-TOF –Analyse aufgenommen. Die Signalintensitäten wurden gegen die relativen Konzentrationen der Standardpeptide aufgetragen und eine lineare Regression wurde durchgeführt (B).

Die relativen Signalintensitäten der Reporterionen, sowie die Steigungen der Regressionsgeraden und deren Regressionskoeffizienten (R^2) sind in Tabelle 17 für alle Standardreihen zusammengefasst.

Tabelle 17: Regressionsgeraden der internen Kalibrierungskurven der Standardpeptide

	Relative Intensitäten [%]			Steigung	Regressions- Koeffizient
	C1 (114)	C2 (115)	C3 (116)		
5-HT4	100	43	24	9.5	1
OXYR	100	33	16	10.6	0,998
5-HT R1B	100	61	31	8.1	0,956
5-HT R1F	100	34	16	10.6	0,998
mAChR M2	100	41	22	9.8	1

Die Steigungen der Standardkurven lagen zwischen 8.1-10.6 mit Regressionskoeffizienten zwischen 0.96 und 1. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Messwerte der iTRAQ Reporterionen der Standardreihen im linearen dynamischen Bereich befinden und so eine wichtige Grundvoraussetzung für eine solide Quantifizierung erfüllen.

4.3.5 LDS-PAGE zeigt einen vollständigen Proteinverdau

Bevor Quantifizierungsversuche mit den tryptisch verdauten Gewebeproben durchgeführt wurden, wurde sichergestellt, dass der enzymatische Verdau vollständig war und keine unverdauten Proteine vorlagen. Diese Voraussetzung für eine valide und zuverlässige Quantifizierung wurde primär durch eine LDS-PAGE geprüft. Die behandelten Proben wurden dazu auf einem 4-12% NuPage-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt.

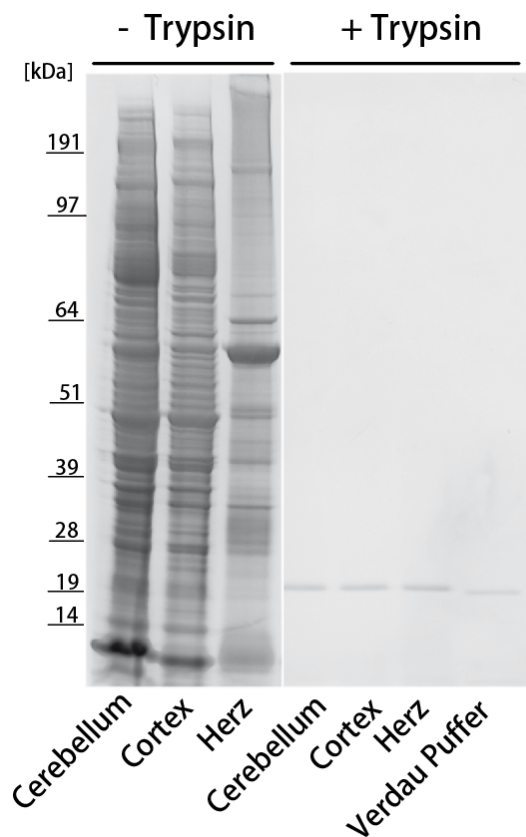


Abbildung 18: Verdaukontrolle

Je 10 μ l Gewebelysat wurden vor und nach tryptischem Verdau aufgetragen und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Zudem wurde eine Kontrollprobe des Verdaupuffers mit aufgetragen, die Trypsin enthält.

Die LDS-PAGE in Abbildung 18 zeigt vor dem enzymatischen Verdau eine Vielzahl von Proteinbanden über den gesamten Größenbereich. Nach dem Verdau sind diese Banden nicht mehr zu erkennen, bis auf eine Proteinbande, mit dem Molekulargewicht von 24 kDa, die vermutlich das zugegebene Trypsin repräsentiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Suchergebnissen nach ESI-MS Analysen aus den verdauten Proben, bei denen keine „übersprungenen“ Spaltstellen der detektierten Peptide festgestellt wurden.

4.3.6 Effektive Affinitätsanreicherung als Vorbereitung für MS-Analysen

Die tryptisch verdauten Gewebeproben wurden nach Verdaukontrolle mit dem iTRAQ-Reagenz 117 markiert und mit den ebenso markierten Standardkurven im Verhältnis 1 zu 1 vereinigt. In einem automatisierten Immunoaffinitätsansatz wurden Analyten spezifisch mithilfe von Antikörpern, die über Protein G auf magnetische Partikel gekoppelt waren, angereichert, gewaschen und eluiert. Dieser Immunoaffinitätsschritt dient neben der Anreicherung der Zielstrukturen auch der „Abreicherung von Hintergrund“.

Um zu überprüfen, dass während der Prozessierung der Proben im automatischen Mikrosphären-Prozessiersystem kein Verlust der Analyte auftritt, welcher beispielsweise durch Antikörperverlust bedingt sein kann, wurde die Antikörperwiederfindungsrate in dem System bestimmt. Um dies zu bestimmen, wurden 5 µg eines polyklonalen Kaninchenantikörpers in 95 µl „Elisa Blockierungsreagenz“ verdünnt und die beschriebene automatisierte Standard-Prozessierung mit 25 µg „DynaBeads Protein G“ durchgeführt. Aus jeder 96-Well PCR Platte wurden anschließend Aliquots genommen und in einem mikrosphärenbasierten Immunoassay die Antikörpermenge bestimmt.

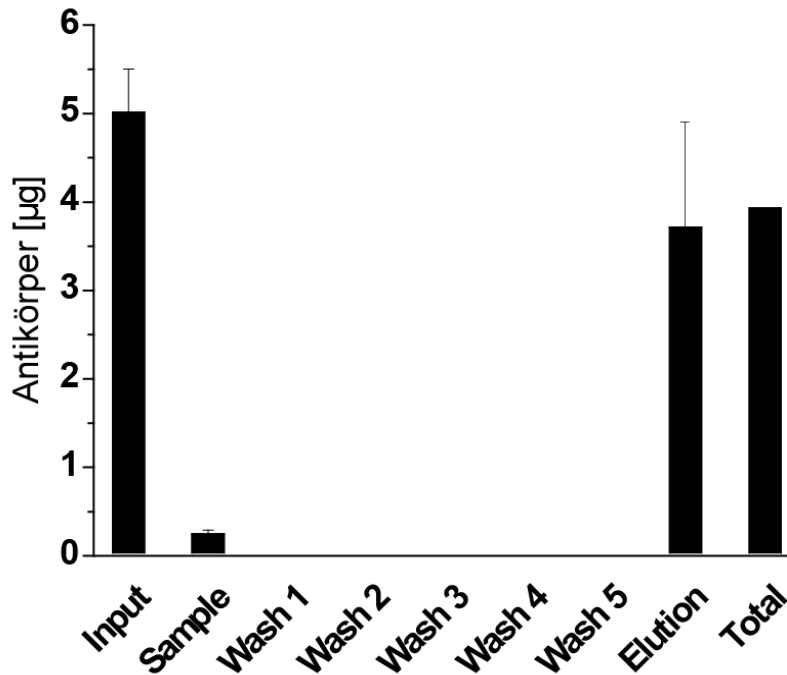


Abbildung 19: Wiederfindungsrate von Antikörpern in den Immunoaffinitäts Assays

5 µg eines polyklonalen Kaninchenantikörpers wurden im Immunoassay eingesetzt. Nach Durchführung des Prozesses wurden die Überstände auf zurückgebliebene Antikörpermengen überprüft. Die Antikörperbestimmung fand in einem mikrosphärenbasierten Assay statt und wurde mit dem Luminex®-System gemessen. Der Prozess wurde in Triplikaten durchgeführt.

Der Assay in Abbildung 19 zeigt, dass es keine nachweisbaren Verluste des Antikörpers über die Waschschrte hinweg gibt. Des Weiteren bleibt nur ein sehr geringer Prozentsatz (> 5%) des Antikörpers in der Sample-Platte zurück, sodass keine großen Verluste durch den Prozess der Immunpräzipitation zu befürchten sind .

Hoch abundante Proteine, Salze und Detergentien können vor der IP in den Proben vorliegen und eine erfolgreiche, massenspektrometrische Analyse erschweren oder komplett verhindern. Abbildung 20A zeigt drei Spektren von iTRAQ markierten Gewebelysaten, vor einer Immunoaffinitätsanreicherung. Die Proben wurden nach der Markierungsreaktion über eine Flüssigchromatographie-Anlage mittels Reverse-Phase-Chromatographie gereinigt und anschließend die Spektren nach ESI-MS aufgenommen.

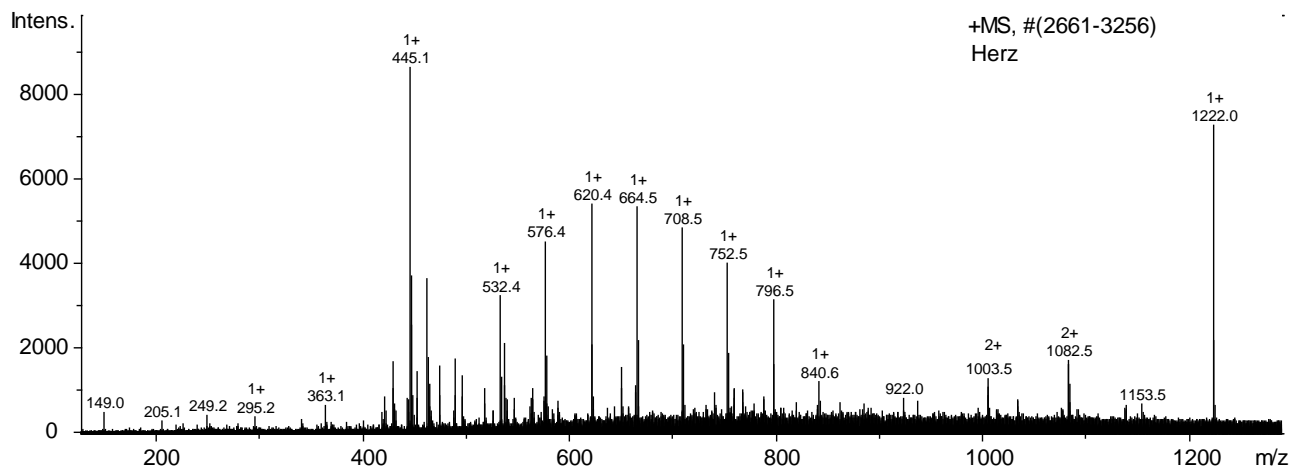
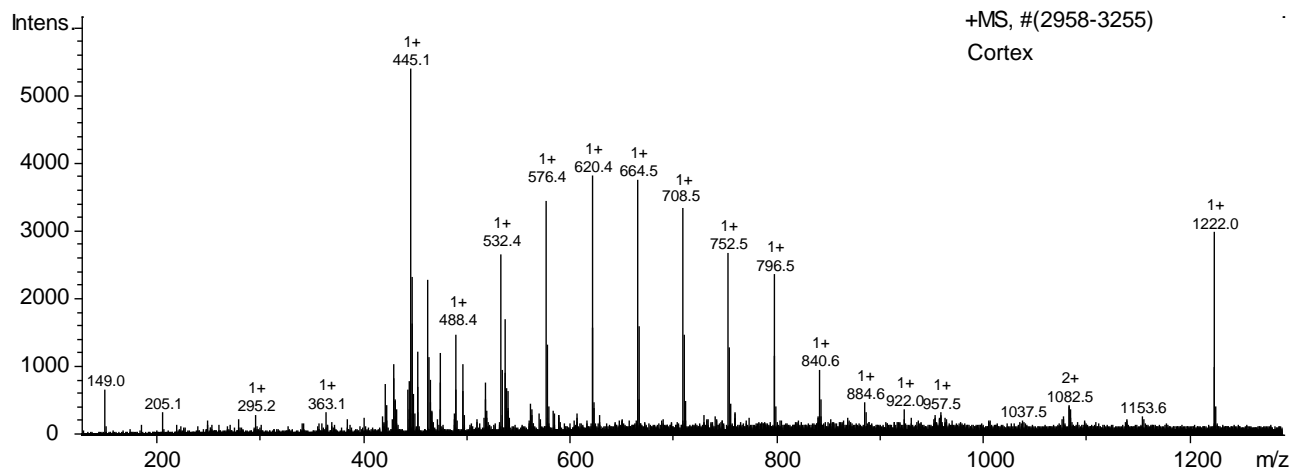
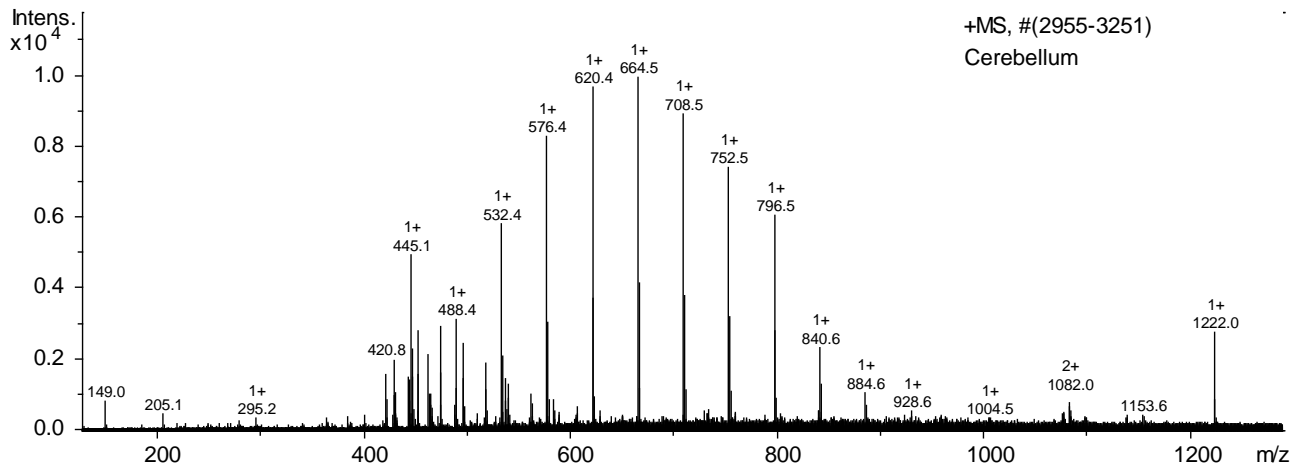


Abbildung 20 A: ESI-Quad-TOF MS Spektren der iTRAQ-markierten Gewebelysate vor IP

MS-Spektren wurden über einen Zeitraum von 10 Minuten integriert. Je 0.1 µg (in 5 µl) Gewebelysate von Cerebellum (oben), Cortex (mitte) und Herz (unten) wurden nach iTRAQ Markierung auf eine C8 Vydac RP Säule (75 µm) geladen, chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert.

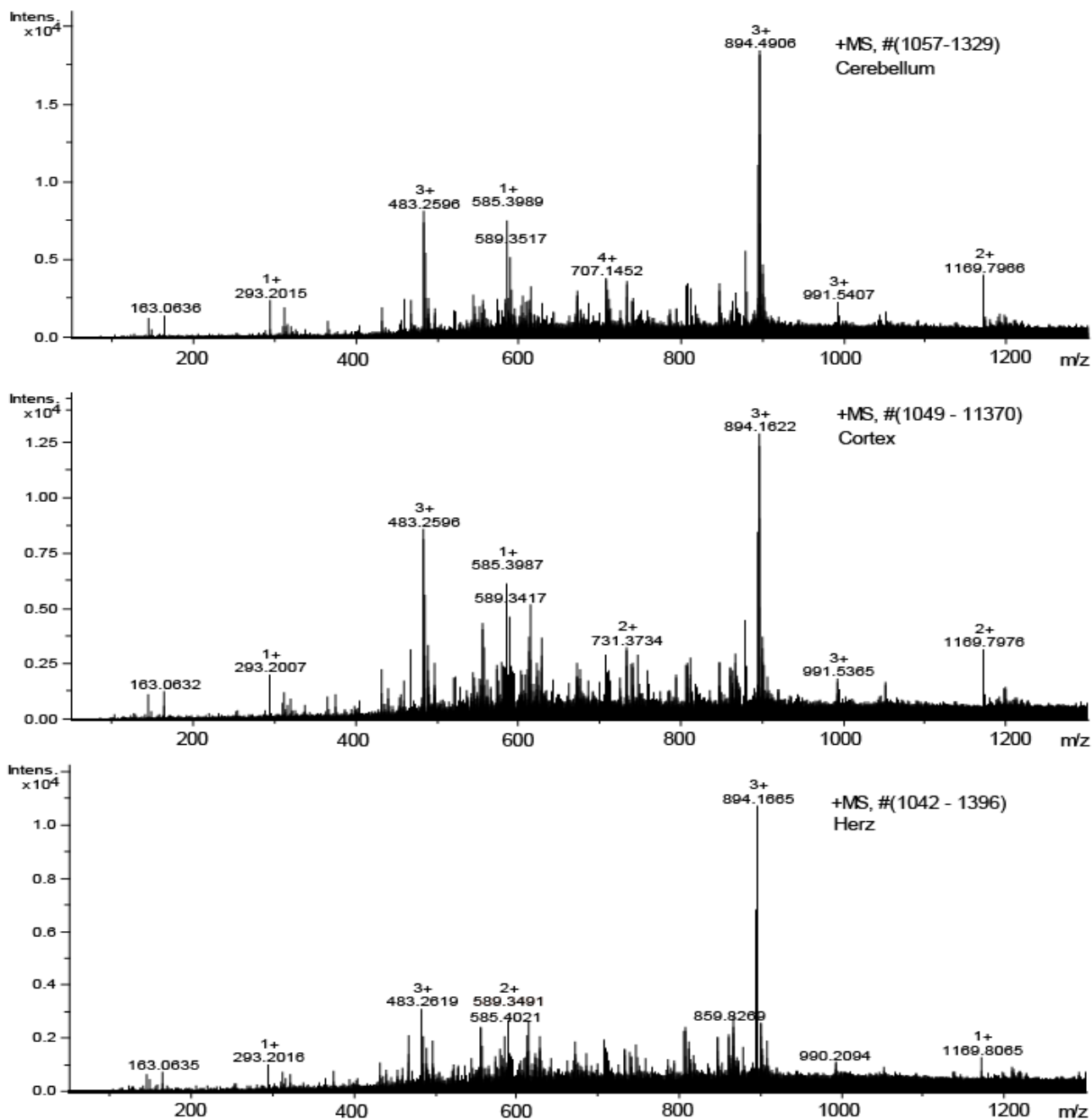


Abbildung 20B: ESI-Quad-TOF MS Spektren der iTRAQ-markierten Gewebelysate nach IP

MS-Spektren wurden über einen Zeitraum von 10 Minuten integriert. Je 5 µl Elution der Gewebelysate von Cerebellum (oben), Cortex (mitte) und Herz (unten) wurden nach iTRAQ-Markierung und Immunpräzipitation mit dem anti-ISLDR-Antikörper auf eine C8 Vydac RP Säule (75 µm) geladen, chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert.

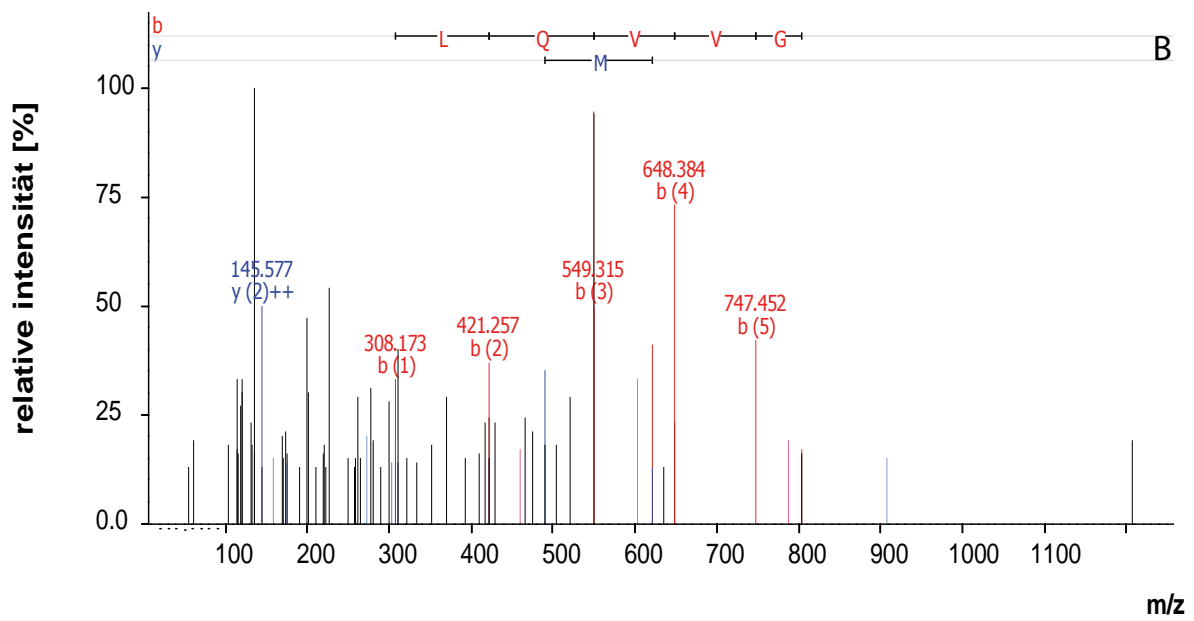
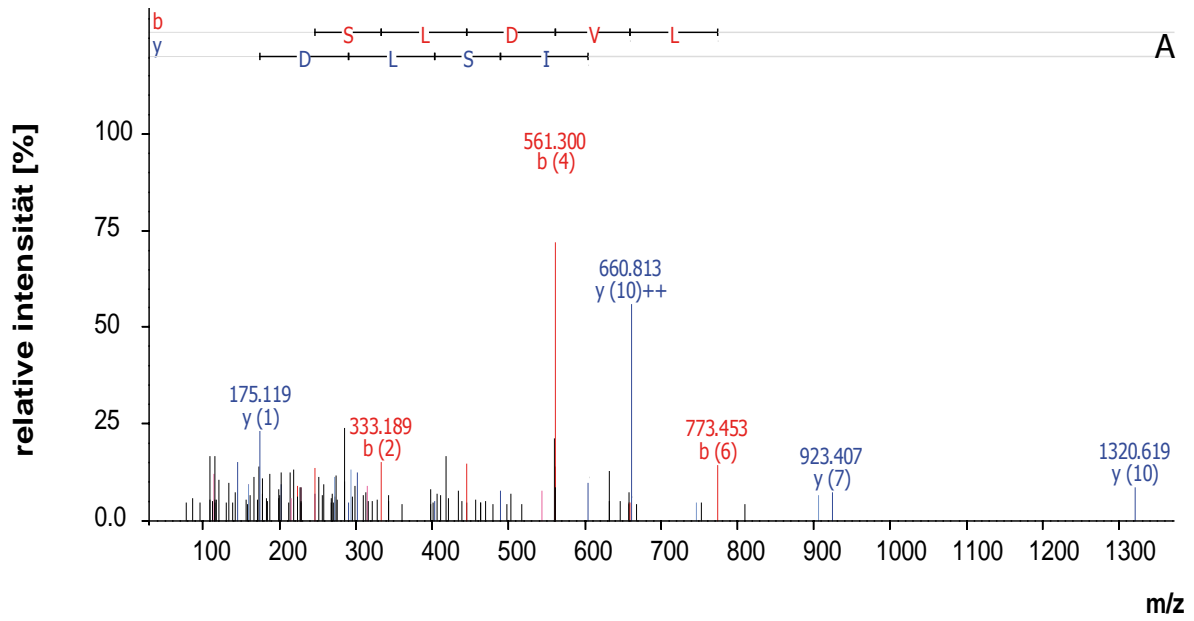
Es ist in Abbildung 20A deutlich zu erkennen, dass das Polymermuster der Detergentien einen sehr großen Massenbereich (400-1000 Da) abdeckt und in diesem Bereich über eine Retentionszeit von über 10 Minuten alle anderen Signale überlagert und maskiert. Signale von Triton X-100 sind sehr stark in diesen Spektren vertreten. Die Massenabstände von 44 Da zwischen den einfach geladenen Ionen im MS-Spektrum deuten auf $[C_2H_4O]_n$ Polymer-Bausteine hin.

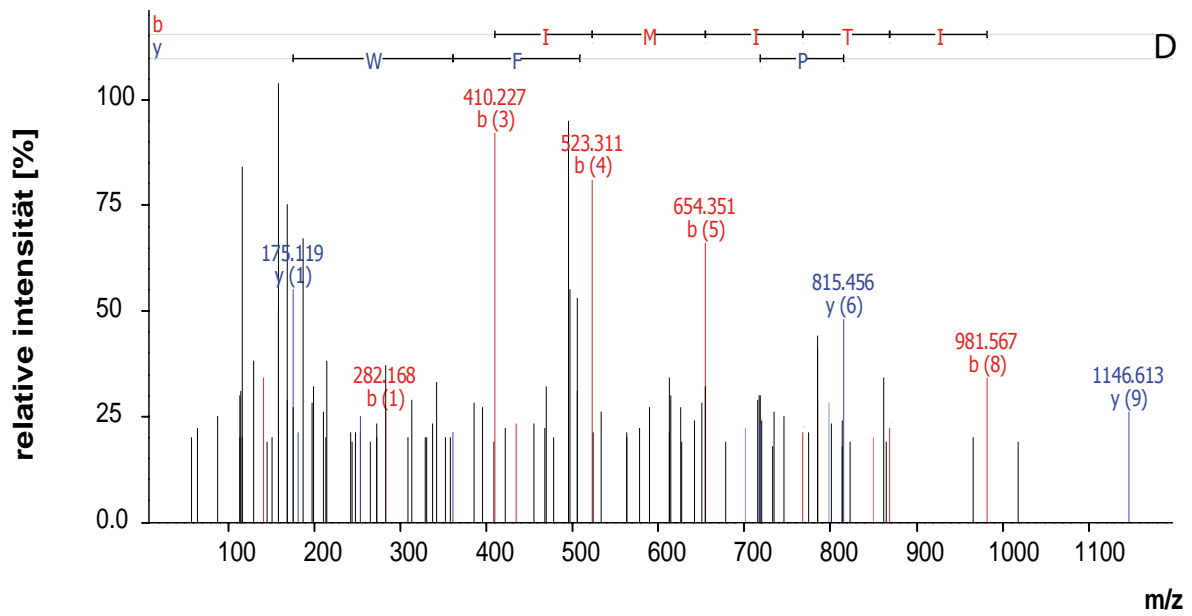
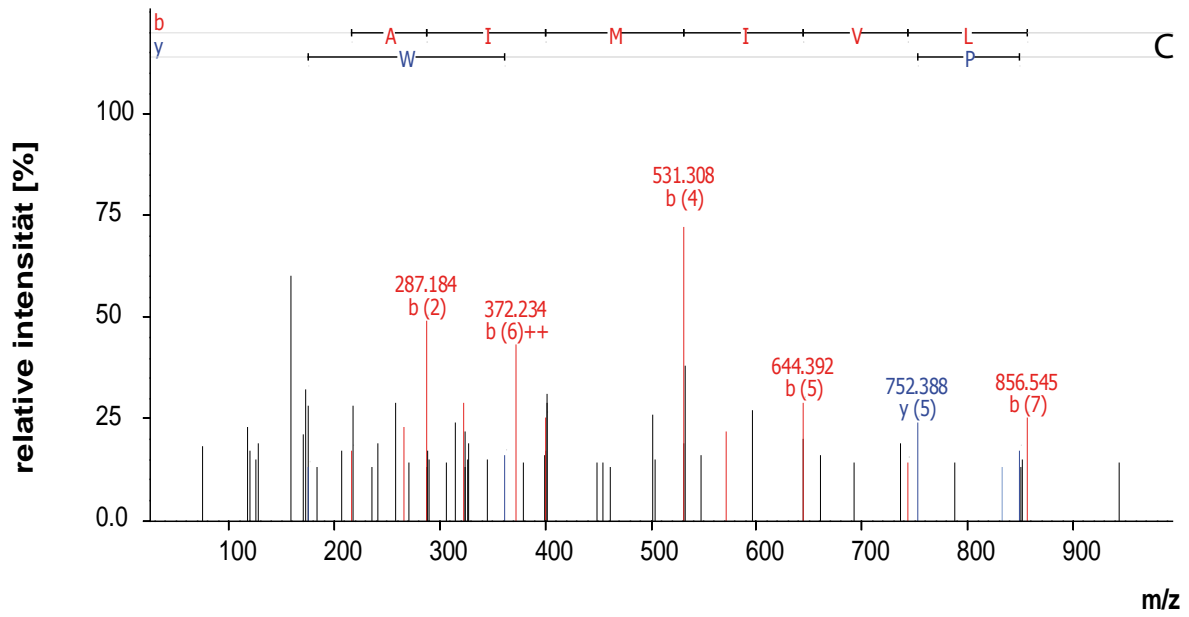
Diese Störsignale wurden effektiv durch Immunoaffinitätsanreicherung mit TXP-Antikörpern entfernt. Abbildung 20B zeigt ESI-QTOF-MS Spektren nach Anreicherung aus Cerebellum-, Cortex- und Herzgewebe durch einen Antikörper (TXP-anti-ISLDR) und anschließender Flüssigchromatographie-Trennung der eluierten Peptide. Der zuvor maskierte Retentionsbereich zeigte nach der Immunpräzipitation eine Vielzahl an spezifisch angereicherten Peptiden, die in der nachfolgenden MS/MS-Analyse fragmentiert werden konnten und eine anschließende Identifikation und Quantifizierung zuließen.

4.3.7 Rezeptorquantifizierung durch optimierte Versuchsbedingungen

Nach Anreicherung der Zielpeptide durch die Immunpräzipitation, sowie deren Entsalzung im Flüssigchromatographiesystem und durch die Optimierung der Geräteeinstellungen zur Peptidfragmentierung, war es möglich die Peptide massenspektrometrisch zu detektieren und MS/MS Spektren zu generieren.

Durch eine hohe Signalabdeckung der b- und y-Ionenreihen in den Fragmentspektren (Abbildung 21) war es möglich, die GPCR-spezifischen Peptide eindeutig zu identifizieren (MASCOT® Scores > 30). Durch geeignete Wahl des Konzentrationsbereiches der Standardpeptide wurde eine anschließende Quantifizierung der Peptide möglich.





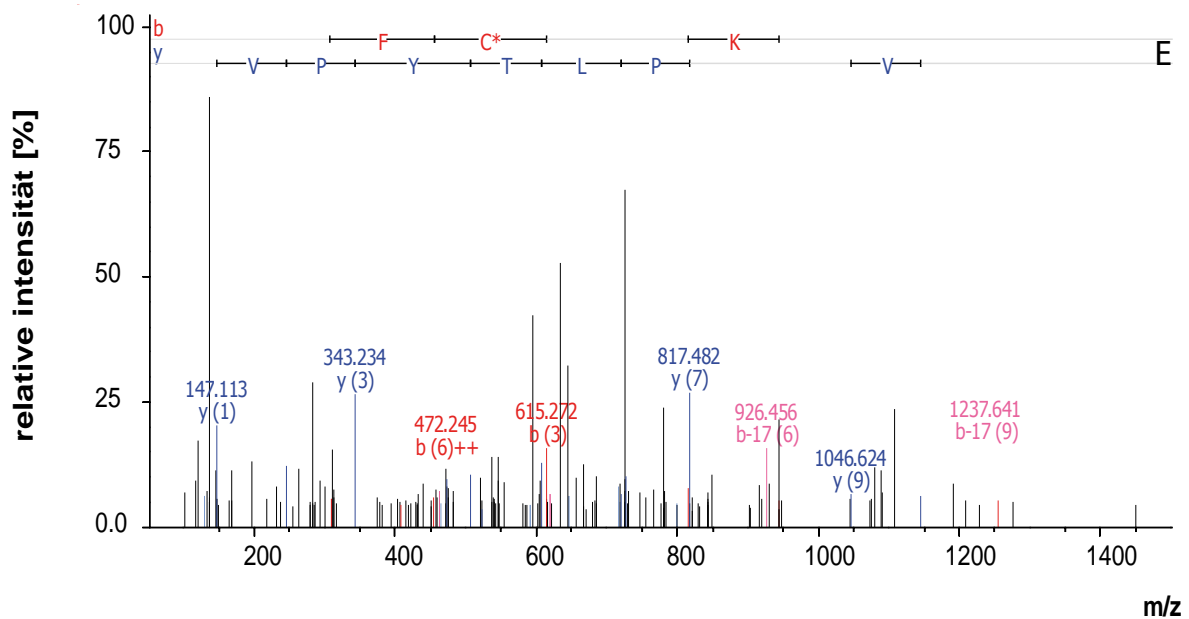
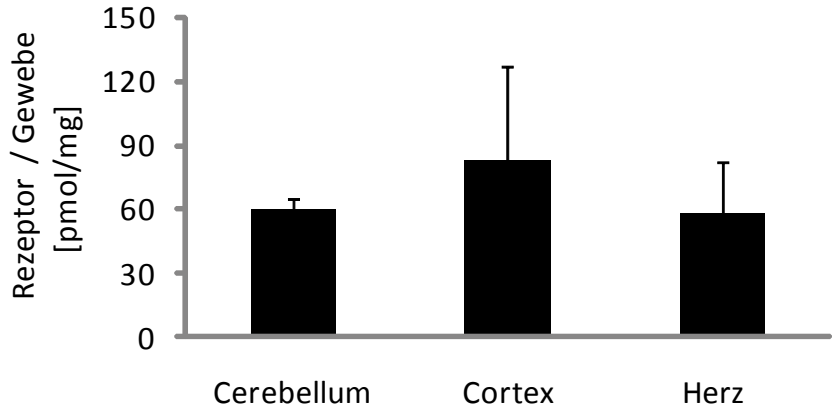


Abbildung 21: Fragmentspektren von GPCR-spezifischen tryptischen Peptiden

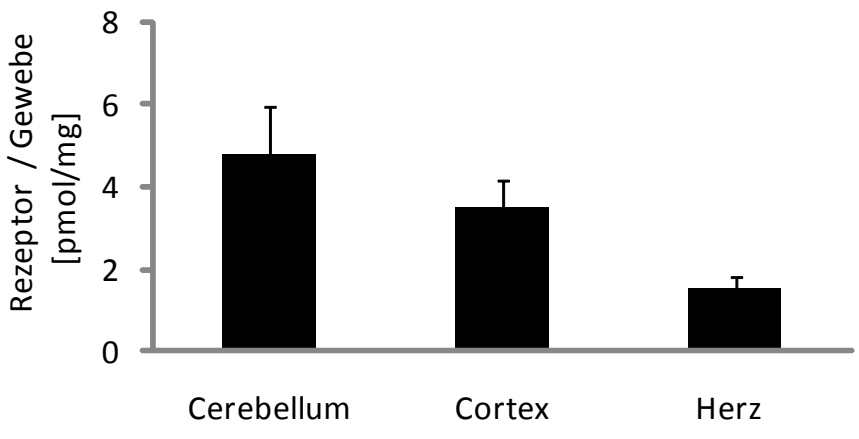
Die Fragmentspektren von (A) 5-HT R4, (B) Oxy R, (C) 5-HT R1B, (D) 5-HT R1F und (E) mACh R M2 wurden im MS/MS-Modus einer LC-ESI-QUAD-TOF –Analyse nach Immunoaffinitäts-Anreicherung und flüssigchromatographischer Trennung aufgenommen. Peptidfragmente der b- (rot) und y- (blau) Ionenreihe sind in den Spektren annotiert.

Tryptisch verdaute Proben wurden mit dem iTRAQ Reagenz 117 markiert und die ebenfalls iTRAQ-markierten Standardpeptide wurden als interne Standardkurve zugegeben. Nach Immunpräzipitation mit TXP-Antikörpern konnten proteotypische Peptide mittels LC-ESI-MS und MS/MS identifiziert und quantifiziert werden. Hierzu wurden die integrierten Intensitäten der Reporterionen (117) der biologischen Proben mithilfe der Drei-Punkt-Standardkurven berechnet (Abbildung 8). Die Intensitäten der Reporterionen der Standardpeptide wurden dazu über die gesamte Zeit der Retention des jeweiligen Peptids (Tabelle 15) gemittelt. Die Intensität dieser Reporterionen (114-116) wurde gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und daraus für jedes Peptid in jedem Gewebe eine Regressionsgerade erstellt. Mithilfe dieser erstellten Regressionsgerade konnten durch die extrahierten Intensitäten der Reporterionen der endogenen Peptide (117) die Konzentrationen der Rezeptoren berechnet werden. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung sind in Abbildung 22 dargestellt.

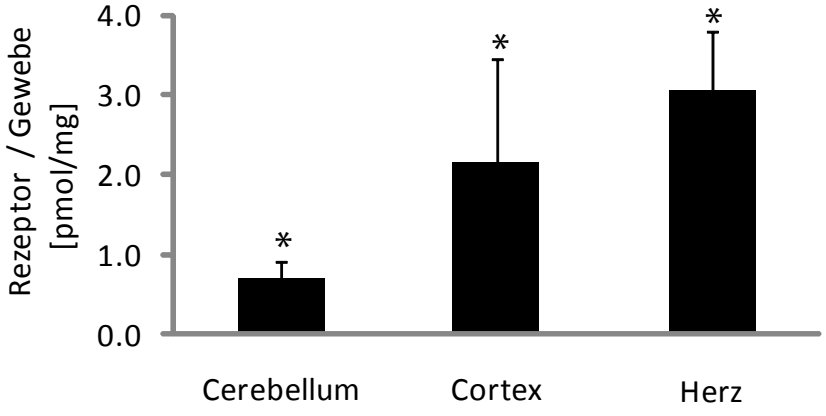
5-HT R1B



5-HT R4



Oxy R



* unter dem Detektionslimit

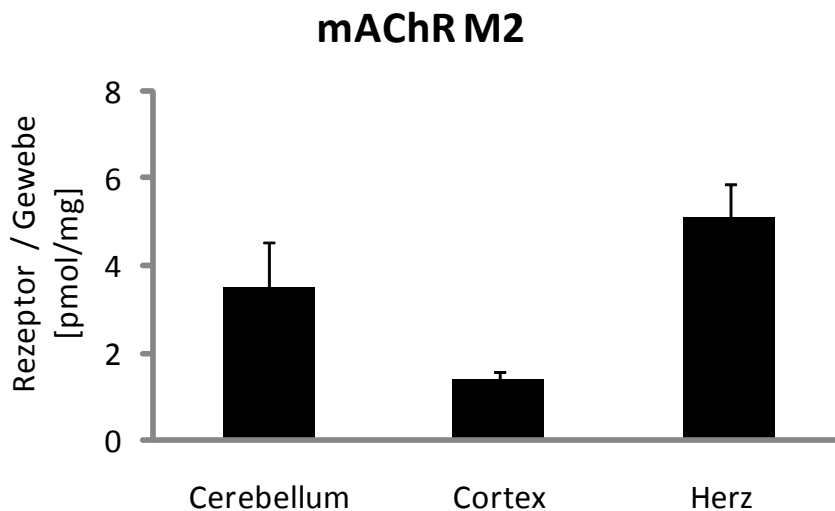
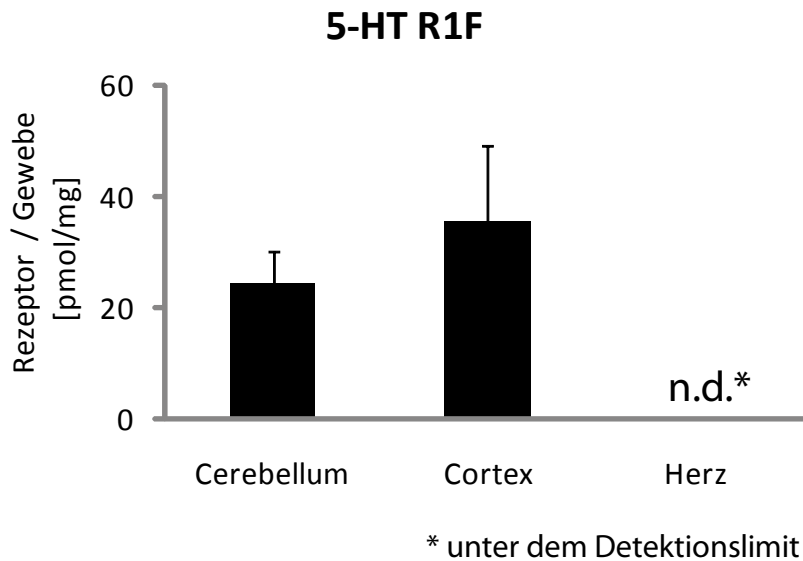


Abbildung 22: Ermittelte Konzentrationen von G Protein-gekoppelten Rezeptoren in Gewebeproben.

In den Graphen sind die Rezeptorquantitäten von fünf G Protein-gekoppelten Rezeptoren (5-HT 1B, 5-HT 4, OxyR, 5-HT 1F und mAChR M2) in Cerebellum, Cortex und Herzgewebe dargestellt. Die Quantifizierungsergebnisse stammen von einer MS Analyse nach Immunoaffinitätsanreicherung aus Gewebeproben einer erwachsenen, weiblichen Ratte. Die angegebenen Konzentrationen wurden in je 100 µg Gewebelysat anhand der Konzentrationen von proteotypischen Peptiden bestimmt. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt.

Mittelwerte der berechneten Peptidkonzentrationen konnten in allen Fällen über drei Replikate bestimmt werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 1,4 und 83,6 pmol Peptid pro Milligramm Gewebelysat. Die relativen Standardabweichungen der Messungen beziehen sich auf biologische Triplikate, ausgehend von drei unabhängigen Gewebeverdauer-Ansätzen und liegen zwischen 7,6 % und 52,6 %. Für den Fall, dass die Signale der endogenen Peptide außerhalb der Standardkurve lagen, wurden die Konzentrationen ausgehend von der Standardkurve extrapoliert. Dabei wurde maximal ein Faktor von 2,5 über dem höchsten Reportersignal der Standardkurve akzeptiert, um den linearen dynamischen Bereich nicht zu überschreiten.

Hohe Serotoninkonzentrationen wurden vor allem in neuronalen Proben beobachtet. Die Konzentrationen der Peptide vom 5-HT R Subtyp 1B lagen zwischen 57,9 pmol/mg im Herzgewebe, 60,4 pmol/mg im Cerebellum und 83,6 pmol/mg Cortexgewebe.

Rezeptorquantitäten des Subtyps 4 waren etwa um den Faktor 20 niedriger, als die des Subtyps 1B in den untersuchten Geweben und lagen zwischen 1,5 - 4,8 pmol/mg Gewebe. Insbesondere beim Serotoninrezeptor Subtyp 1F war ein starker Unterschied zwischen den beiden Gehirnproben und dem Herzgewebe zu erkennen. In kardialem Gewebe lag die Rezeptormenge des 5-HT R1F unter dem LOD, in den neuronalen Proben lagen Konzentrationen zwischen 24,5 pmol (Cerebellum) und 35,6 pmol (Cortex) pro mg Gewebelysat vor.

In Vergleich dazu wurden vergleichsweise erhöhte Konzentrationen des muskarinischen Acetylcholin Rezeptors M2 in Herzgewebe von 5,1 pmol/mg festgestellt. Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit der bekannten regulatorischen Funktion dieses Rezeptors in Herzgewebe. Die Konzentrationen des mAChR M2 lagen bei 3,5 pmol/mg im Cerebellum bzw. bei 1,4 pmol/mg in Cortexgewebe.

Der Oxytozin-Rezeptor lag in sehr geringen Konzentrationen vor. Die iTRAQ Reportersignale der Standardkurve und des endogenen Peptids befanden sich in allen untersuchten Geweben unter dem LLOQ und teilweise unter dem LLOD. Dies führte zu erhöhten Schwankungen der Reportersignale in den MS/MS-Spektren und

damit auch zu höheren relativen Standardabweichungen in diesen Messungen (Abbildung 22). Daher können die ermittelten Rezeptormengen (0,7-3,1 pmol/mg Gewebe) nur als grobe Richtwerte betrachtet werden.

Nach allen Messungen wurden die Daten in ProteinScape geladen und zur Identifikation mit der MASCOT Datenbank abgeglichen. Die „MASCOT-Scores“ der einzelnen Messungen lagen bei 30 oder höher, alle Fragmente konnten eindeutig identifiziert werden.

4. 4 GPCR-Western Blot Analysen

Western Blot Analysen wurden durchgeführt, um die Ergebnisse der MS-Analyse mit einem unabhängigen Ansatz zu validieren. Dazu wurden kommerziell erhältliche Antikörper verschiedener Hersteller verwendet. Im Allgemeinen wurde beobachtet, dass diese Antikörper in allen Analysen sehr starke Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zeigten, während spezifische Signale auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts meistens nur schwach bis gar nicht erkennbar waren.

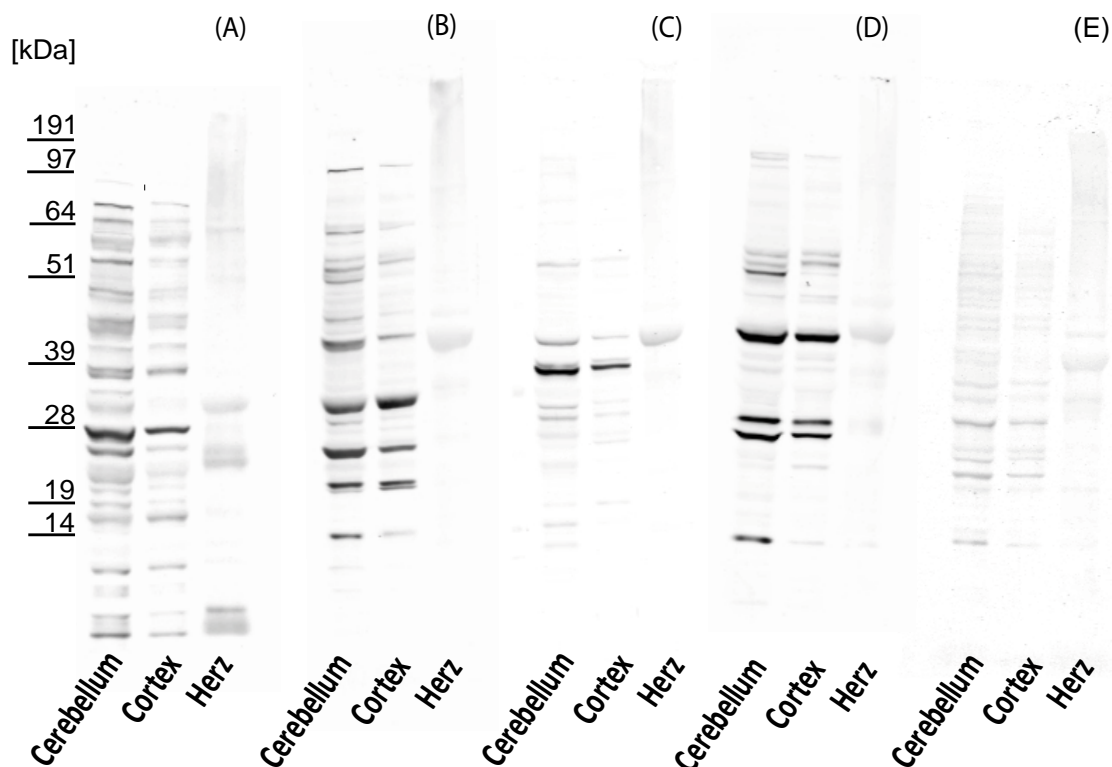


Abbildung 23: Western Blot Analyse für verschiedene G Protein-gekoppelte Rezeptoren

G Protein-gekoppelte Rezeptoren wurden in drei unterschiedlichen Gewebelysaten (Ratte, weiblich, adult) mit kommerziell erhältlichen Antikörpern im Western Blot untersucht: mAChR M2 (A), 5-HT R4 (B), 5-HT R1F (C), 5-HT R1B (D) und Oxy R (E). Je 20 µg Cerebellum, Cortex und Herz wurden über LDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose geblottet.

Die Ergebnisse (Abbildung 23) zeigen deutlich, dass die Interaktionen der kommerziellen Antikörper sehr unspezifisch sind. Besonders im Gehirngewebe sind sehr viele Signale zu erkennen, die nicht auf der erwarteten Laufhöhe des Zielproteins liegen. Tabelle 18 fasst die Molekulargewichte der untersuchten GPCRs zusammen, bei denen ein spezifisches Signal erwartet wurde.

Tabelle 18: Übersicht über die Molekulargewichte der untersuchten G Protein-gekoppelten Rezeptoren

	Rezeptor	Molekulargewicht [kDA]
A	Muskarinischer Acetylcholin Rezeptor	52
B	Serotonin Rezeptor 4	47
C	Serotonin Rezeptor 1F	42
D	Serotonin Rezeptor 1B	43
E	Oxytozin Rezeptor	43

Nur der Western Blot für den Serotonin Rezeptor 1B zeigt Signale auf der erwarteten Laufhöhe des Rezeptors. Neben diesem Signal sind jedoch auch bei diesem Antikörper noch zusätzliche Banden zu erkennen, welche die Spezifität des Antikörpers in Frage stellen.

5. Diskussion

Nicht nur für systembiologische Modelle in der Grundlagenforschung, sondern auch im Bereich der Medikamentenentwicklung und Sicherheits-Pharmakologie besteht ein großer Bedarf für quantitative Informationen von G Protein-gekoppelten Rezeptoren und anderen Membranrezeptoren [14].

Ihnen kommt eine große Bedeutung in der Medikamentenentwicklung als Zielstrukturen für Pharmazeutika zu. Zur Regulation vieler physiologischer Prozesse werden diese Rezeptoren gezielt beeinflusst. Dies ist von besonderer Bedeutung, da GPCRs am Anfang vieler Signalkaskaden stehen und daher einen hohen regulatorischen Einfluss innehaben. Unter anderem wirken Antidepressiva, Antihistaminika oder auch Betablocker über die Modulation von G Protein-gekoppelten Rezeptoren. Aufgrund dieser hohen regulatorischen Bedeutung ergibt sich allerdings auch, dass bei Dysregulierung, beispielsweise durch ungewollte Bindung von Medikamenten oder Überexpression solcher Rezeptoren, mit starken Nebenwirkungen und pathologischen Erscheinungen zu rechnen ist. Die Bindung eines pharmazeutischen Wirkstoffs an einen GPCR-Subtyp kann beispielsweise im Herz-Kreislaufsystem zur gewünschten Regulation des Blutdrucks führen, aber bei ZNS-Gängigkeit im Gehirn ebenfalls über GPCRs starke Einflüsse auf die Psyche haben. Von einigen G Protein-gekoppelten Rezeptoren ist zudem bekannt, dass sie, im Falle einer Überexpression, bei der Entstehung von Tumoren beteiligt sind [75, 76].

In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, die auf jedes Membranprotein angewandt werden kann und es erstmals ermöglicht, solche 7-transmembran Rezeptoren in verschiedenen Geweben zu quantifizieren. Trotz ihrer starken Hydrophobizität, der daraus resultierenden schlechten Löslichkeit, niedrigen Expressionsniveaus, einer Vielzahl von Isoformen und einer breiten Streuung der Rezeptoren über verschiedene Zelltypen und Gewebe hinweg [77], war es möglich eine massenspektroskopiebasierte Methode für die quantitative Analyse von GPCRs zu entwickeln. Dies wurde durch die Kombination von gezielter Anreicherung

proteotypischer Peptide, internen Kalibrierstandards und massenspektrometrischen Methoden ermöglicht. Die angewandten analytischen Methoden wurden dafür an die Besonderheiten der Membranrezeptoren angepasst, optimiert und, um reproduzierbar gute Ergebnisse zu gewährleisten, durch verschiedene Qualitätskontrollen abgesichert. Durch den Einsatz einer automatisierten Immunpräzipitation auf magnetischen Partikeln konnte eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden. In diesem Schritt konnten störende Peptide, Detergentien, Salze, Lipide und andere Komponenten effizient entfernt werden, welche die Messungen negativ beeinflussen können.

Replikate wurden ab einem möglichst frühen Zeitpunkt (Gewebeverdau) parallel behandelt. Dadurch sollte eine zuverlässige Proteinidentifikation und eine solide Quantifizierung abgesichert werden. Dies war vor allem wichtig, da bei dem eingesetzten TXP-Ansatz pro Zielprotein jeweils nur ein ausgewähltes Peptid gezielt angereichert und untersucht wird, wodurch eine Statistik über verschiedene Peptide für ein Protein [78, 79] nicht möglich ist. In jedem biologischen Replikat konnten die zur Quantifizierung ausgewählten Rezeptoren über proteotypische Peptide detektiert und mithilfe vom Datenbankabgleich eindeutig identifiziert werden.

5.1 TXP-Konzept

In quantitativen Proteinanalysemethoden ist der Einsatz von antikörperbasierten Methoden weit verbreitet, da eine Anreicherung der Analyten oft eine notwendige Voraussetzung für die Detektierbarkeit darstellt. Allerdings besteht bei vielen Immunoassays das Problem von unzureichender Spezifität, Kreuzreaktivität (vor allem zwischen Proteinisoformen) oder zu hohen unspezifischen Wechselwirkungen der Antikörper. Darüber hinaus existieren für einige Proteine keine Antikörper, da beispielsweise aufgrund der Struktur der Proteine eine Antigenherstellung für die Antikörperherstellung nur sehr erschwert bis gar nicht möglich ist. Nicht zuletzt stellt auch die Variation der Antikörper-Affinität und Spezifität in unterschiedlichen Spezies in vielen Fällen ein Problem dar [14].

Der Einsatz von TXP-Antikörpern führt hingegen zu einer spezifischen Anreicherung gewählter Peptide und ermöglicht die parallele Analyse verschiedener Peptide, wenn diese das gleiche terminale Aminosäuremotiv aufweisen. Zudem können diese Antikörper spezieübergreifend eingesetzt werden, sofern die Epitope von 3-4 Aminosäuren in den entsprechenden Proteinen der jeweiligen Spezies übereinstimmen. Tabelle 12 zeigt für die ausgewählten TXP-Epitope die Anzahl der damit abgedeckten Analyte im Menschen, Maus und Ratte. Da G Protein-gekoppelte Rezeptoren in ihrer Aminosäuresequenz weitgehend stark konserviert sind, sind gerade Peptide dieser Proteinfamilie geeignet, um durch denselben Antikörper aus allen drei Spezies angereichert zu werden.

Für die herkömmliche Herstellung von Antikörpern ist die native Struktur des Zielproteins von großer Bedeutung, da diese für gewöhnlich gegen die Tertiär- bzw. Quartärstrukturen der Proteine gerichtet sind. Gerade die Struktur von Transmembranproteinen, wie GPCRs, ist jedoch sehr abhängig von ihrer Plasmamembranumgebung. Da sie eingelagert in dieser Membrandoppelschicht, aber kaum zugänglich sind, sind gängige Antikörperherstellungsverfahren ungeeignet.

Der geringe Anteil der Transmembranrezeptoren, der von der extrazellulären Seite zugänglich ist, wird zudem ständig dem Immunsystem präsentiert. Da GPCRs eine starke Konservierung über die Speziesgrenzen hinweg aufweisen, ist daher davon auszugehen, dass dieser extrazelluläre Teil nur eine geringe Immunantwort bei der Immunisierung eines Wirtstieres hervorrufen kann.

Die in der hier vorgestellten Arbeit generierten TXP-Antikörper binden an kurze lineare N- oder C-terminale Epitope, die durch enzymatischem Verdau entstehen, daher für eine Antigen-Antikörper-Interaktion frei zugänglich und unabhängig von der komplexen Tertiärstruktur des Proteins sind. Aus diesen Gründen sind sie besonders gut geeignet für die Anreicherung schwieriger Analyten, wie GPCRs, für die es bisher keine ausreichend spezifischen Antikörper oder geeigneten Methoden zum Nachweis auf Proteinebene gibt.

5.1.1 Anwendungen

Für verschiedene Ansätze und für unterschiedliche Problemstellungen wurden TXP-Antikörper aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften (Spezies-übergreifend, lineare Epitope, Peptidgruppen-spezifisch) hergestellt und verwendet. Für die Anreicherung von Peptiden, die von G Protein-gekoppelten Rezeptoren stammen, stellten sich diese Peptidgruppen-spezifischen TXP-Antikörper als sehr geeignet heraus. Eine Vielzahl von GPCRs konnte damit angereichert, mittels massenspektrometrischer Methoden detektiert und mithilfe von Tandem-Massenspektrometrie und Datenbanksabgleichen identifiziert werden [71].

In einer Plasma-Proteom-Studie wurden Antikörper gegen 15 verschiedene C- oder N-terminale Sequenzen generiert. Damit war es möglich 37 Signaturpeptide aus einem Plasmaproteinverdau anzureichern und anschließend zu identifizieren. Mit einem einzelnen Antikörper war die Anreicherung von 6 verschiedenen Peptiden möglich [72]. Trotz der hohen Komplexität des Plasmaproteoms und dem darin enthaltenen Protein-Konzentrationsbereich von über 10 Größenordnungen [41] war dies möglich ohne vorherige Depletion der hochabundanten Plasmaproteine oder einer flüssigchromatographischen Trennung der Probe.

5.1.2 Charakterisierung der TXP-Antikörper

Mit verschiedenen Methoden wurden die verwendeten TXP-Antikörper auf ihre Spezifität getestet. Auf einer mikrosphärenbasierten Plattform wurden den Antikörpern verschiedene kurze terminale Sequenzen zur Bindung angeboten. Eine hohe Spezifität gegenüber ihren Zielstrukturen konnte dabei vor allem bei C-terminalen Antikörpern beobachtet werden. N-terminale TXP-Antikörper zeigten hingegen eine geringere Spezifität.

Zudem wurden auch „geblockte“ Sequenzen angeboten, bei denen die C-terminale Carboxylgruppe amidiert vorlag. Mit dieser Modifikation wurde eine weitere Peptidbindung imitiert, wie sie bei einer übersprungenen tryptischen Schnittstelle vorliegen würde. Diese „ungeschnittenen“ Peptide führten im Ansatz zu wesentlich geringeren Signalen als die „freien“ Termini.

Beide Beobachtungen zeigen, dass die freie Carboxylgruppe ein wichtiges Element für die Antikörperbindung darstellt. Diese Gruppe ist chemisch sehr polar und trägt zudem bei physiologischem pH-Wert eine negative Ladung. Dadurch bietet sich eine gute Möglichkeit für starke Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen. Fällt diese Gruppe als Bindestelle für den Antikörper weg, liegt eine verringerte Affinität des Antikörpers nahe.

Wenn möglich, wurde durch Kompetitionsassays die apparente Bindungsaffinität der polyclonalen Antikörper bestimmt. Die ermittelten K_d -Werte lagen zwischen 0,06 nM und 18,79 nM. Diese Messungen verdeutlichen, dass eine Epitoplänge von 4 Aminosäuren ausreicht, um eine starke Antikörper-Antigen-Wechselwirkung zu gewährleisten.

Die TXP-Antikörper wurden in Antigenbindungsstudien hinsichtlich Selektivität und Spezifität analysiert. Neben den mikrosphärenbasierten Versuchen zur Charakterisierung der Antikörper wurden außerdem verschiedene MS-basierte Versuche durchgeführt. Eine hohe Spezifität der TXP-Antikörper zu ihren Zielsequenzen wurde festgestellt. Wenn das freie Ende des TXP-Epitops geblockt wurde, konnte eine stark reduzierte Bindung beobachtet werden.

Zusätzlich zu diesen eher artifiziellen Charakterisierungsansätzen, können Immunpräzipitationen aus Mischungen synthetischer Peptide, Peptidbibliotheken und aus verschiedensten biologischen Proben (Zellkulturmaterial, Gewebelysate und Plasmaproben) für die Charakterisierung der Antikörperspezifität als Grundlage dienen. Wie bereits in früheren Arbeiten beobachtet [45], gibt es Aminosäuren in den Epitopen, die eine wichtige Rolle bei der Antikörperbindung spielen und andere, die offensichtlich eine untergeordnete Rolle spielen.

Durch die Experimente mit Peptidbibliotheken konnten die prominenten und weniger prominenten Positionen eines Epitops festgestellt werden.

Mithilfe des entwickelten bioinformatischen Algorithmus „MATERICS“, zur Charakterisierung der Antikörper mittels Immunpräzipitation aus komplexen biologischen Proben (Abbildung 15), wurde die Charakterisierung durch Peptidbibliotheken erweitert. Dieses bioinformatische Werkzeug verwendet Signale die in Massenspektren nach der Anreicherung von Peptiden durch einen Antikörper

detektiert werden. Nach einem Datenbankabgleich mit einer ausgewählten *in silico* verdauten Proteindatenbank, ermöglicht MATERICS die Vorhersage, welches Epitop der verwendete Antikörper wahrscheinlichsten bindet. Im Vergleich mit den Peptidbibliotheken besteht der Vorteil, dass keine Bibliotheken aufwändig synthetisiert werden müssen. Isobare Peptide in den Peptidbibliotheken können massenspektrometrisch nicht unterschieden werden, sodass eine bevorzugte Antikörperbindung an eines von zwei isobaren Peptide nicht von der anderen abgegrenzt werden kann. Unter Verwendung einer Immunpräzipitation aus komplexen, biologischen Proben werden endogene Peptide angereichert, die sich neben dem terminalen Epitop auch an anderen Aminosäurepositionen unterscheiden. Die anschließende Auswertung der MS-Daten durch MATERICS zeigt beispielsweise eine bevorzugte Bindung des Antikörpers an Leucin und Isoleucin im Epitop. Der größte Vorteil der Antikörpercharakterisierung durch MATERICS ist, dass die Bestimmung der bevorzugten Antikörperbindung an ein Epitop unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wird, wie sie bei der späteren Anwendung der Antikörper vorliegen.

Durch die Kombination der Ergebnisse aus den beiden Epitop-Charakterisierungsmethoden wurden die Epitope der TXP-Antikörper ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass je nach Antikörper, einige Positionen im Epitop sehr wichtig für die Antikörper-Antigen-Interaktion sind. Andere Positionen scheinen keinen großen Einfluss auf die Bindung zu haben. Ein Aminosäureaustausch an einer solchen Position beeinflusst daher die Antikörperbindung nur wenig oder nicht.

Der TXP-Ansatz profitiert von dieser Variabilität, da sich die Anzahl der anreicherbaren Peptide erweitert. So konnte beispielsweise mit dem „anti-ISLDR-Antikörper“ auch ein Fragment des Oxytozin-Rezeptors mit der terminalen Sequenz „MSLDR“ angereichert werden.

Dennoch ist die Spezifität noch hoch genug, um im Vergleich zum gesamten Proteom eine deutlich verringerte Komplexität und somit eine gute massenspektrometrische Analyse zu gewährleisten.

5.2 Western Blots

Die Western Blot Analyse mit kommerziell erhältlichen Antikörpern zeigt deutlich den Bedarf nach neuen, alternativen Methoden zur Analyse von Membranproteinen, wie beispielsweise GPCRs (Abbildung 23). Bei allen verwendeten Antikörpern sind sehr viele starke Signale zu erkennen, die nicht im Bereich der erwarteten Masse liegen. Zudem fehlt in den meisten Fällen ein Signal im Bereich der erwarteten Masse.

Nur ein Antikörper von fünf getesteten zeigte neben unspezifischen Banden auch ein spezifisches Signal auf der erwarteten Laufhöhe des Rezeptors. Dabei handelte es sich um den Western Blot für den Serotonin Rezeptor 1B. Für diesen Rezeptor wurden auch im immunoaffinitäts-MS Ansatz die höchsten Konzentrationen aller untersuchten Rezeptoren bestimmt. Besonders die Western Blot-Analyse für den Oxitozin Rezeptor ergab kein spezifisches Signal, sondern viele Nebenbanden. Dieser Rezeptor ist auch nach den Ergebnissen der Immunoaffinitäts-MS Analyse am geringsten in den drei Geweben exprimiert.

Unter Umständen könnten zusätzliche Anreicherungen der Rezeptoren, beispielsweise durch subzelluläre Fraktionierung und Isolierung der Membranfraktion, vor der Western Blot Analyse zu besseren Signalen führen.

Da Western Blot Analysen keine eindeutige Identifikation der verschiedenen Banden zulassen, ist die Aussagekraft eines solchen Blots sehr gering. In Allgemeinen werden Proteine, die im Western Blot durch Antikörper detektiert werden, nicht weiter identifiziert, sodass ein Antikörper nur dann als Western Blot tauglich klassifiziert wird, wenn lediglich eine Bande auf der richtigen Laufhöhe sichtbar ist. Massenspektrometrische Ausleseverfahren erlauben hingegen durch Sequenzinformation der Peptide eine eindeutige Zuordnung der Signale und Identifikation der Proteine. Dadurch können spezifische Signale von Hintergrund und anderen unspezifischen Signalen abgegrenzt werden. Vor allem durch die unzureichende Spezifität der derzeit erhältlichen (bzw. der getesteten) Antikörper sind Western Blot, Radio Immunoassays, ELISAs oder auch die Immunhistochemie für die Analyse von G Protein-gekoppelten Rezeptoren und anderen Membranproteinen anscheinend nicht geeignet.

5.3 Immunoaffinitäts-MS von Transmembran-Proteinen

Analysemethoden zum Nachweis von Membranproteinen beinhalten für gewöhnlich eine Anreicherung der Membranfraktion um die Gesamtkonzentration der Membranproteine in der Probe zu erhöhen [80, 81]. Dieser Schritt der Probenvorbereitung zeigt generell eine hohe Variationsbreite und trägt somit stark zur inter- und intra-Assay-Varianz bei. Durch die Affinitätsanreicherung der proteotypischen Peptide mittels TXP-Antikörpern werden spezifische proteotypische Zielpeptide gezielt angereichert und von sehr häufig vorkommenden Peptiden abgetrennt. Daher benötigt der hier gewählte Ansatz keine aufwändige Membrananreicherung. Dies stellt einen großen Vorteil dieser Methode dar, da zusätzliche Arbeitsschritte zur Voranreicherung vermieden werden können, die eine zusätzliche Quelle für Artefakte darstellen [82, 83].

Die starke Anreicherung der GPCR-spezifischen Peptide durch den Immunoaffinitätsschritt zeigt sich insbesondere darin, dass keines dieser Peptide in empirischen Datenbanken, wie dem „Peptide Atlas“ [84] oder der „Global Proteome Machine“ [85] bisher aufgeführt ist. Auch von den möglichen GPCR Fragmenten, die mittels eines *in silico* Verdaus ermittelt wurden, konnten keine Übereinstimmungen in den Datenbanken gefunden werden. Bis dato wurde in den dort vorgestellten Daten keiner der hier untersuchten GPCRs identifiziert.

Diese Beobachtung unterstreicht die Schwierigkeiten, die entstehen, wenn man Membranproteine mit den etablierten Methoden der Proteinanalytik analysiert. Insbesondere lange alpha-helikale Transmembranmotive werden in der Literatur als schwer detektierbar und identifizierbar beschrieben [86]. Die Solubilisierung aus der Plasmamembran durch Detergenzien, tryptischer Verdaus und iTraQ-Markierung helfen dabei, proteotypische Peptide von Membranrezeptoren massenspektrometrisch identifizierbar und quantifizierbar zu machen.

5.4 Quantifizierungsmethode

Die hier neu entwickelte Methode zur Quantifizierung von G Protein-gekoppelten Rezeptoren durch die Kombination von Peptidgruppen-spezifischer Anreicherung durch TXP-Antikörper mit iTRAQ-markierten Peptidstandards (Abbildung 3) weist einige Vorteile auf, mit denen sie sich von anderen Ansätzen absetzt.

Der Einsatz der TXP-Antikörper führt dazu, dass mehrere Rezeptoren gleichzeitig in einer Probe analysiert werden können. Somit werden Zeit und Kosten gespart, da nicht für jeden Rezeptor ein Antikörper generiert werden muss.

Durch die Verwendung von iTRAQ-markierten Standardpeptiden wird der Einsatz von sehr teuren isotopenmarkierten Referenzpeptiden vermieden. Beispielsweise in SRM/MRM-Ansätzen [87] oder für die AQUA-Methode werden solche isotopenmarkierte Peptide eingesetzt. Bei Quantifizierungen über die QconCAT-Methode werden Concatamere aus schweren Peptiden verwendet, die bakteriell oder durch *in vitro* Proteinsynthese hergestellt werden [88, 89]. Im Gegensatz dazu können in der iTRAQ-Methode Standardpeptide verwendet werden. Sowohl die synthetischen Peptide, als auch die biologische Probe werden mit den entsprechenden iTRAQ-Reagenzien markiert. Diese sind isobar und weisen exakt dieselben physikochemischen Eigenschaften auf. Daher verhalten sie sich identisch bei der Flüssigchromatographie und im MS-Modus von Massenspektrometern. Erst im MS/MS-Modus werden die einzelnen iTRAQ Reagenzien durch eine unterschiedliche Isotopenverteilung der Reporterionen unterschieden. Dieser Ansatz ermöglicht den Einsatz von 3 bis 7 Referenzpunkten (iTRAQ 4plex oder iTRAQ 8plex; AB Sciex, USA), welche in die Probe eingebracht werden können [90]. Diese Referenzpunkte können als interne Standardkurve in der Probe verwendet werden, mit der die Konzentration des Zielpeptids, und somit auch die Konzentration des Proteins, in der Probe berechnet werden kann.

Neben dem finanziellen Aspekt und der Möglichkeit, mehrere Referenzpunkte in eine Probe einzubringen, zeigten sich weitere technisch wichtige Vorteile. Vier der fünf Signaturpeptide bestanden jeweils aus einer vollständigen Transmembrandomäne und hatten eine Länge zwischen 21 und 24 Aminosäuren. Diese Peptide wiesen in

massenspektrometrischen Probemessungen generell eine schlechte Ionisierbarkeit auf. Im Allgemeinen kann diese Eigenschaft der Peptide durch die chemische Markierung verbessert werden [91]. Durch die Verwendung des iTRAQ-Reagenzes konnte eine verbesserte Ionisierbarkeit der hier analysierten GPCR-spezifischen Peptide beobachtet werden. Vor allem bei den langen und hydrophoben Peptiden war dieser Effekt stark ausgeprägt (Abbildung 16). Es ist anzunehmen, dass die Modifikation durch das Reagenz die ansonsten sehr hydrophoben und unpolaren Peptide aus den Transmembrandomänen der Rezeptoren polarisiert und somit bessere Ionisierungseigenschaften für die massenspektrometrische Analyse haben.

Die iTRAQ markierten Standardpeptide unterscheiden sich im MS-Modus nicht von den ebenfalls markierten endogenen Peptiden. Erst bei der Fragmentierung werden sie durch die verschiedenen Reporterionen unterschieden. Dies führt zu einer Signaladdition im MS-Modus, und somit zu einer verbesserten Detektierbarkeit und einer vereinfachten Selektion für eine weitere Fragmentierung [35]. Vor allem bei niedrig exprimierten Proteinen stellt dies einen großen Vorteil dar. Den gleichen Effekt kann man auch im MS/MS Modus beobachten, da sich auch hier die Signale der Peptidfragmente aufsummieren, was zu einer verbesserten Sequenzabdeckung führt und damit auch die Identifikation des Peptids vereinfacht. Im MS/MS-Modus werden die verschiedenen Reporterionen der iTRAQ Reagenzien bei der Fragmentierung der Peptide, durch eine „Neutral Loss“-Abspaltung der Balance-Gruppe unterscheidbar. Dadurch können die Quantitäten der einzelnen Komponenten diskriminiert werden. Parallel wird durch die Fragmentierung der Peptide eine Unterscheidung von isobaren Peptiden und die Identifikation anhand eines Datenbankabgleiches der MS/MS-Signale ermöglicht.

5.5 Quantifizierungsergebnisse

In allen untersuchten Geweben konnten erfolgreich fünf verschiedene G Protein-gekoppelte Rezeptoren (5-HT R1B, 5-HT R1F, 5-HT R4, mAChR M2 und OxyR) quantifiziert werden. Vor allem in Cerebellum und Cortex konnten hohe Spiegel an Serotonin Rezeptoren festgestellt werden. Der Oxitozin Rezeptor und der muskarinische Acetylcholinrezeptor M2 waren dagegen stärker im Herzgewebe vertreten.

Die Quantifizierungsversuche wurden in drei technischen Replikaten durchgeführt. Ausgehend von einer Gewebeprobe wurden je drei enzymatische Verdaus durchgeführt, die parallel behandelt wurden. Direkt nach dem Markierungsschritt mit dem iTRAQ Reagenz wurden die ebenfalls markierten Standardpeptide zu den Proben zugegeben und fortan exakt gleich behandelt, wie die endogenen Peptide, die in der Probe durch tryptischen Verdau erzeugt wurden.

In den meisten Fällen konnten die Konzentrationen der Standardpeptide so gewählt werden, dass die Signale der endogenen Peptide innerhalb der Standardkurve lagen. In den wenigen Fällen, bei denen dies nicht der Fall war, konnten die Werte dieser Proben extrapoliert werden. Dabei war bei allen Proben der Faktor kleiner als 2.5x über dem höchsten Signal der Standardreihe. In früheren Studien wurde gezeigt, dass in einfachen Proben (wie sie nach der Immunpräzipitation durch TXP-Antikörper vorliegen) ein dynamischer Bereich von 1:50 eine solide Quantifizierung zulässt [16]. Selbst in Relation zu dem am niedrigsten konzentrierten Standardpeptid der Kalibrierkurve lag bei den Messungen maximal ein Faktor von 22.5x vor. Somit liegen alle Verhältnisse von endogenem Peptid zu Standardpeptid in einem akzeptablen dynamischen Bereich.

Die Messungen der reinen Standardpeptide, ohne biologische Probe, wiesen eine lineare Korrelation auf (zwischen 0.96 und 1; Tabelle 17). Der lineare Korrelationskoeffizient bei den Messungen aus den Gewebeproben lag für die meisten Messungen zwischen 0,99 und 0,85.

In wenigen Ausnahmen wurde nur ein Korrelationskoeffizient zwischen 0,6-0,7 erreicht, sodass in diesen Fällen keine Linearität mehr anzunehmen ist. Zusätzliche

Referenzpunkte der Standardkurve sollten in diesen Fällen bei zukünftigen Messungen zu einer verbesserten linearen Korrelation führen, da Schwankungen der einzelnen Messungen besser ausgeglichen werden können. Dadurch können Unterschiede der Quantifizierungsergebnisse zwischen den Replikaten verringert werden.

Die Ergebnisse der Analysen wiesen im Allgemeinen eine gute Präzision auf. Die relativen Standardabweichungen der Quantifizierungsergebnisse lagen weitestgehend unter 25%, in 3 Fällen zwischen 25% und 40% und in lediglich 2 Fällen bei über 40%.

Die Standardabweichungen der Replikate können ihren Ursprung bei Artefakten des tryptischen Verdauens, der Peptid-Wiederfindung, Probenstabilität oder auch der Markierungseffizienz haben [35]. Die erhöhten Standardabweichungen traten vor allem bei den Proben auf, bei denen die Reportersignalintensitäten der endogenen Peptide außerhalb der Standardkurve lagen. Um dies zu verbessern, wären zwei Wege möglich. Das hier verwendete iTRAQ 4plex-Kit ließe sich durch ein iTRAQ 8plex-Kit zu ersetzen, um eine 7-Punkt Kalibrierkurve zu generieren und einen breiteren Konzentrationsbereich abzudecken.

Alternativ könnten mithilfe eines iTRAQ 8plex-Kits die Triplikate der verschiedenen Verdauansätze je mit einem unterschiedlichen Markierungsreagenz versehen werden, sodass alle Proben in einem Arbeitsgang prozessiert und gemessen werden könnten. Somit könnte die Varianz der Replikate weiter reduziert werden.

Mithilfe des vorgestellten Ansatzes wurden Rezeptor-Proteinmengen im Bereich von femto- bis pikomol Rezeptor pro Milligramm Gewebelysat in einem multiplexen Ansatz bestimmt. Ausgehend von einer Gesamtproteinkonzentration von ca. 500 pg pro Zelläquivalten [92] liegt das Verhältnis von GPCR zu Gesamtprotein im Schnitt bei etwa 1:20000. Verschiedenste Methoden zur Analyse von GPCRs sind in der Literatur beschrieben. Für die Charakterisierung der Serotonin Rezeptoren sind beispielsweise genetische Studien, funktionelle Assays, Bindungsstudien zur Agonist- und Antagonisten-Bindung, Positronen Emissionen Tomographie (PET) oder Histochemie bekannt [58-61]. In diesen Studien wird die regulatorische Funktion der 5-HT Rezeptoren in Nerven- und Herzgewebe beschrieben. Vor allem im Cortex wurden

durch die Bindung eines markierten Rezeptoragonisten und anschließender PET-Scan-Analyse hohe Expressionsniveaus bestimmt [93]. Im Gegensatz zu der hier vorgestellten Methode zur Quantifizierung von GPCRs auf Proteinebene, ergeben diese Methoden jedoch keine quantitativen Ergebnisse und zudem, in den meisten Fällen, keine eindeutige Rezeptoridentifikation, wie sie durch die Massenspektrometrie ermöglicht wird. In Ratten-Gewebeproben aus dem Cortex wurden beispielsweise sehr hohe Konzentrationen des 5-HT 1B Rezeptors nachgewiesen.

Für den muskarinischen Acetylcholinrezeptor wurden Konzentrationen zwischen 1,4 pmol/mg Cortextgewebe und 5,1 pmol/mg Herzwewebe bestimmt. Erste Studien zur Charakterisierung des muskarinischen Acetylcholin Rezeptors wurden 1985 beschrieben. Dazu wurden die Rezeptoren aus Schweinearterien und Herzwewebe angereichert [94, 95]. Der Einfluss dieser Rezeptorfamilie auf die Herzschlagrate, das Schlagvolumen und somit auf den Blutdruck ist gut beschrieben [62, 63, 94, 95]. Diese Studien stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, bei denen im Vergleich zu anderen Geweben eine erhöhte Rezeptorkonzentration des mAChR M2 im Herz festgestellt wurde.

Als weiterer Rezeptor wurde der Oxytozin Rezeptor analysiert. Oxytozin ist ein Neuropeptid des Zentralen Nervensystems und ein Neurohormon, Neurotransmitter und Neuromodulator [65]. Die niedrigsten Konzentrationen der untersuchten Rezeptoren wurden für den Oxytozin Rezeptor bestimmt. Hier lagen die ermittelten Konzentrationen zwischen 0,7 und 3,1 pmol/mg Gewebe. Dies entspricht weniger als 250.000 Rezeptorkopien pro Zelle und einem Verhältnis von 1 Rezeptor pro 25000 Proteine in den untersuchten Geweben. Die Standardabweichungen der Quantifizierung des Oxytozinrezeptors lagen zwischen 24,5 und 60,6%. Diese starken Schwankungen können dadurch erklärt werden, dass bei diesen Messungen die meisten iTRAQ-Reportersignale unter dem Detektionslimit lagen. Quantitative Aussagen lassen sich daher nicht treffen. Eine größere Menge an Gewebelysat und höhere Konzentrationen der Standardpeptide könnten bei zukünftigen Analysen eingesetzt werden, um Signale über dem unteren Quantifizierungslimit zu erzielen.

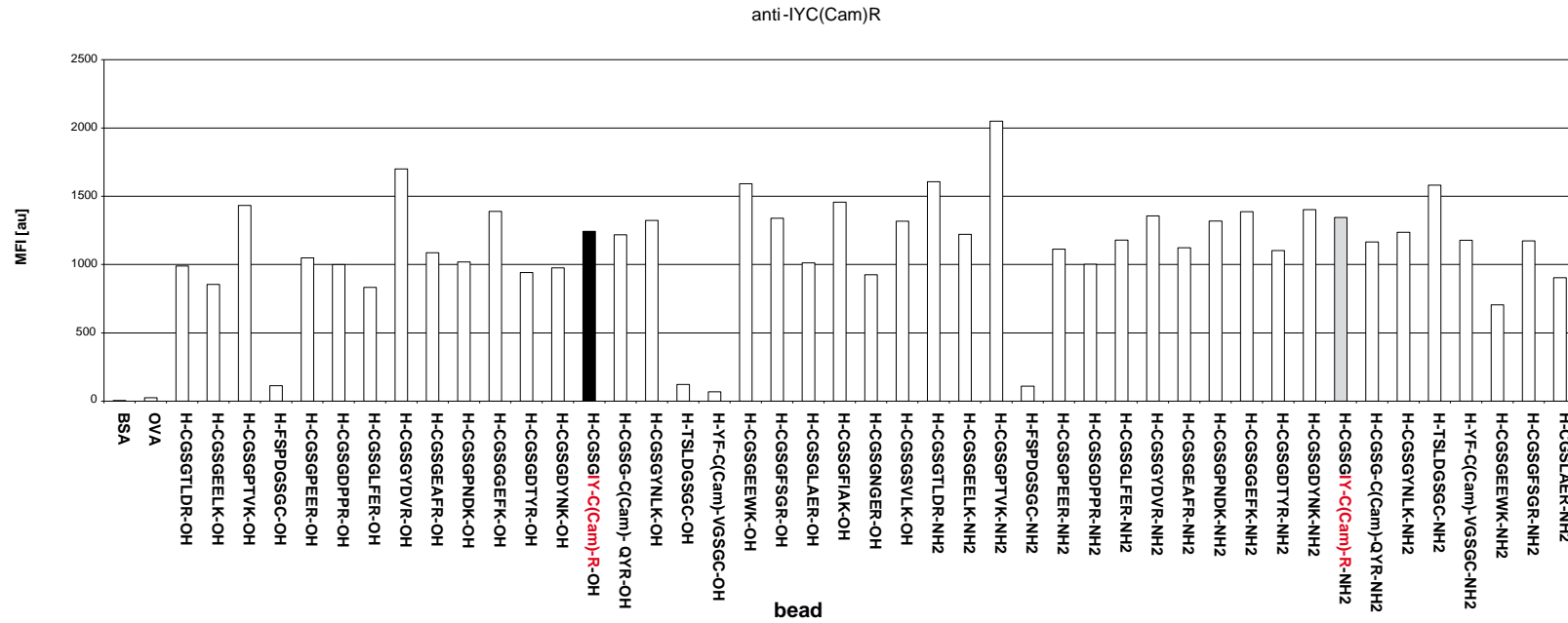
In einem immuno-SRM Ansatz zeigten Schoenherr et al. einen Quantifizierungsansatz von „Epidermal Growth Factor Receptor 2“ (HER2) und „Estrogen Receptor“ (ER) in menschlichen Proben [96] und damit ebenfalls eine erfolgreiche Methode für die Quantifizierung von Membranrezeptoren. Dabei handelt es sich jedoch um sehr gut charakterisierte Proteine mit großen extrazellulären Domänen und nur einer Transmembrandomäne. Im Vergleich dazu sind GPCRs wesentlich tiefer in die Membran eingebettet und präsentieren nur einen sehr geringen Anteil ihrer Struktur nach außen, sodass nur ein kleiner Teil des Proteins als Antikörperbindungsstelle zur Verfügung steht. Zudem weist der Großteil des Rezeptors eine sehr hohe Hydrophobizität auf. Diese Eigenschaften erschweren die Analyse von GPCRs, was erklärt wieso bislang noch keine quantitativen Peptid- oder Protein-basierten Daten dieser Rezeptorsuperfamilie vorlagen. Erst durch den tryptischen Verdau der Rezeptoren und eine Peptid-spezifische Anreicherung konnte eine Quantifizierung von GPCRs durchgeführt werden. Durch die vorgestellte Methode wird eine Quantifizierung von Transmembranproteinen ermöglicht, sodass auch solche Proteine beispielsweise in einem GPCR-Atlas erfasst werden können. Ein solches Projekt könnte bereits vorhandene Daten, wie sie beispielsweise im Protein Atlas [97] gesammelt sind, erweitern. Die gewonnenen Daten und Informationen können durch weitere Antikörper und Analysen ergänzt werden und so zur Erstellung eines GPCR-Atlas beitragen. Ein solcher Atlas wäre ein wertvolles Werkzeug, um potentielle Wirkungs- und Nebenwirkungsorte von Medikamenten zu identifizieren. Zudem könnte ein solches Projekt große Lücken in systembiologischen Modellen und Signalweg-Analysen füllen. Wichtige Informationen über die Expressionsmengen verschiedener G Protein-gekoppelter Rezeptoren, die bei der Entstehung unterschiedlicher Krebsformen beteiligt sind, können gewonnen werden. Nicht zuletzt kann diese Methode auch zur besseren Charakterisierung von Modellorganismen (von Zellkultur- bis hin zu Tiermodellen) verwendet werden.

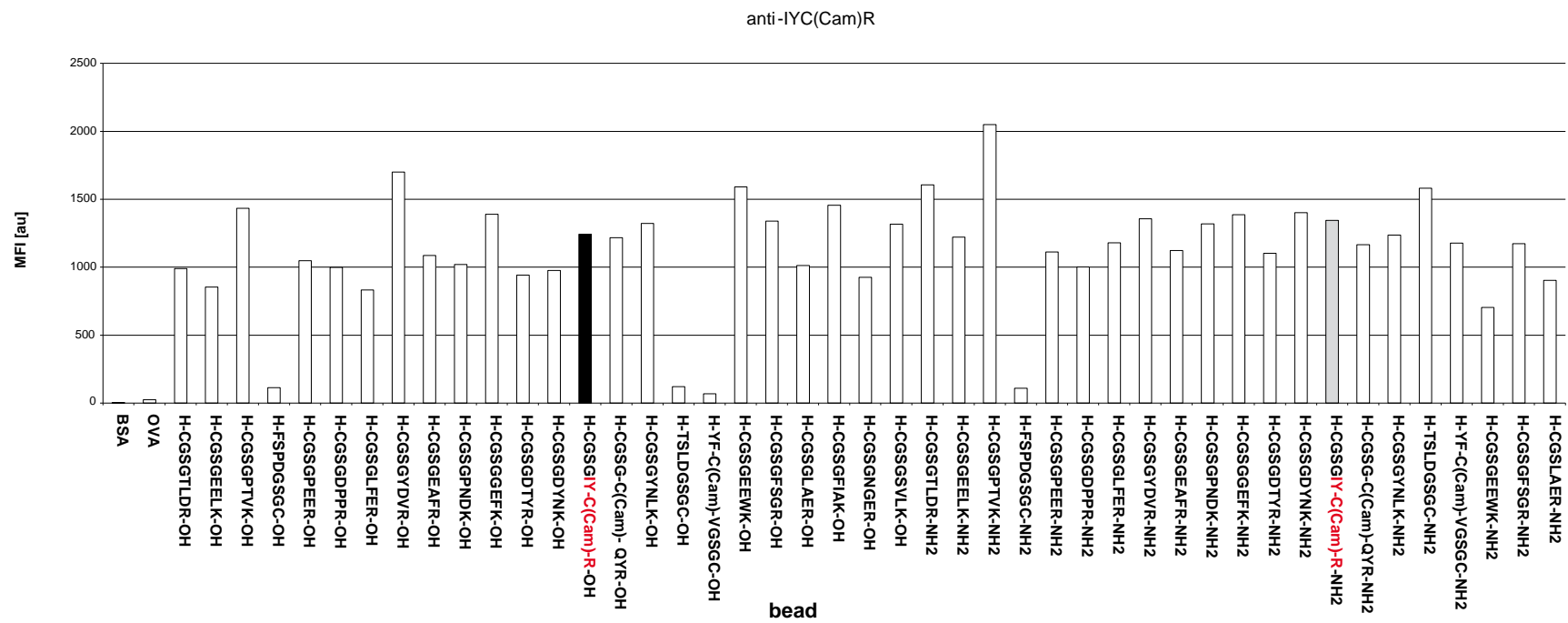
6. Zusammenfassung

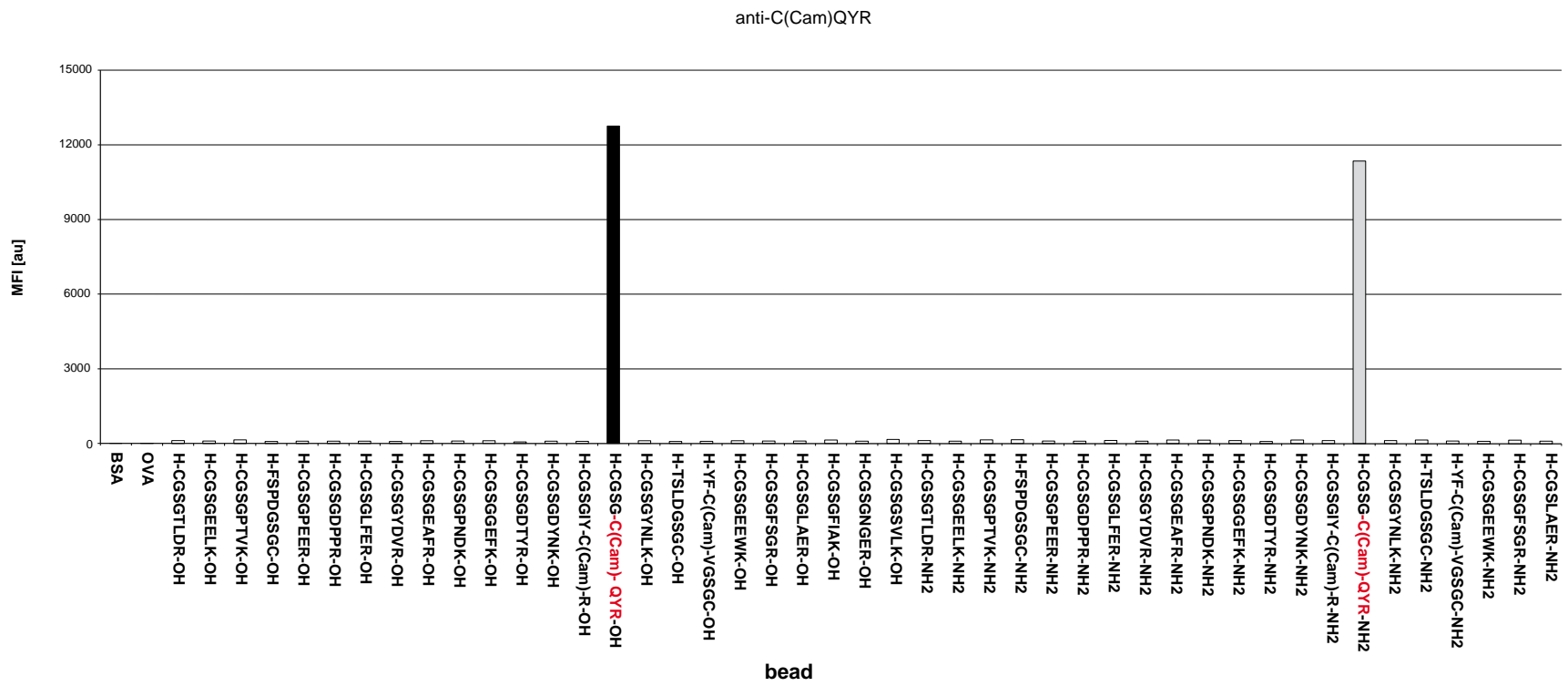
Die hohe physiologische Bedeutung und das daraus resultierende große Interesse der pharmazeutischen Industrie an G Protein-gekoppelten Rezeptoren unterstreichen den Bedarf an neuen geeigneten Methoden zur Analyse der größten Gruppe von Membranrezeptoren. Immunoaffinitäts- und massenspektrometrie-basierte Ansätze bieten für eine quantitative Analyse von Membranproteinen viele Vorteile gegenüber Standardmethoden der Proteinanalytik. Wie in dieser Arbeit exemplarisch anhand von Western Blot Analysen gezeigt, sind bisher keine geeigneten Antikörper zum Nachweis von GPCRs verfügbar. Dies liegt an der Vielzahl von Isoformen, der hohen Homologie und den Schwierigkeiten, die sich bei der klassischen Herstellung von Antikörpern gegen Transmembranproteine ergeben. Es wurde gezeigt, dass das TXP-Konzept für den Einsatz in der Analyse von G Protein-gekoppelten Rezeptoren sehr gut geeignet ist. Bioinformatische Berechnungen zeigten, dass es theoretisch möglich ist, mit nur 11 TXP-Antikörpern im Menschen 155 Peptide für eine massenspektrometrische Analyse anzureichen. Mit den gleichen TXP-Antikörpern können aus Mausgewebe 263 und aus Rattengewebe 309 proteo-typische Peptide angereichert werden. Die in dieser Arbeit generierten TXP-Antikörper wurden in Bindungsstudien und in funktionellen Test mit Hilfe eines kompetitiven Immunoassays und mit massenspektrometrischen Analysen ausgiebig charakterisiert. Das neue bioinformatische Werkzeug MATERICS wurde verwendet, um Epitope von TXP-Antikörpern nach Immunpräzipitationen aus komplexen, enzymatisch verdauten Proben zu charakterisieren. Nach der Charakterisierung wurden die Antikörper erfolgreich für die qualitative und quantitative Analysen von vier GPCR-Proteinen in drei verschiedenen Rattengeweben eingesetzt. In der vorgestellten Arbeit wurde eine schnelle und sensitive Methode etabliert, welche die quantitative Analyse von G Protein-gekoppelten Rezeptoren ermöglicht. Diese Methode bietet die Möglichkeit akkurat und effizient Messungen zur Quantifizierung von Transmembranproteinen durchzuführen. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal G Protein-gekoppelte Rezeptoren auf Peptidebene quantifiziert werden. Dabei wurden unterschiedliche Protein-Expressionen in verschiedenen Gewebeproben nachgewiesen.

7. Anhang

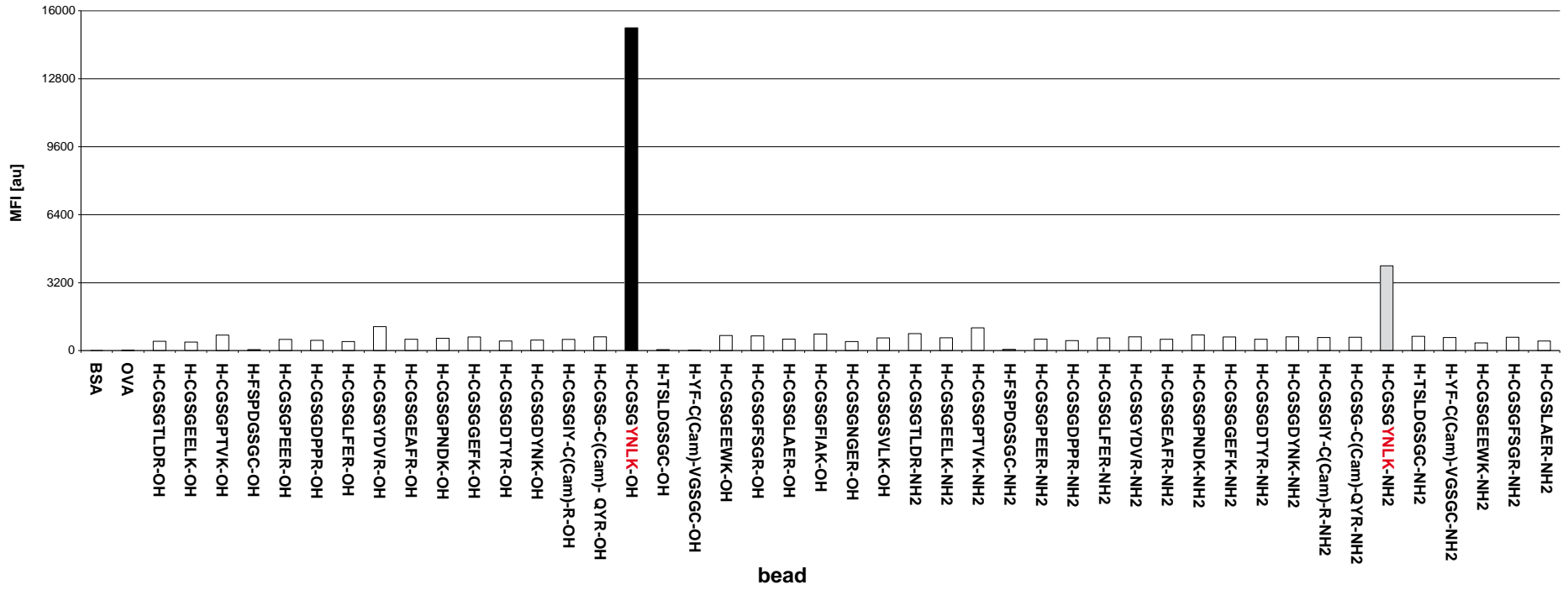
Mikrosphärenbasierte Assays zur Charakterisierung weiterer TXP-Antikörper



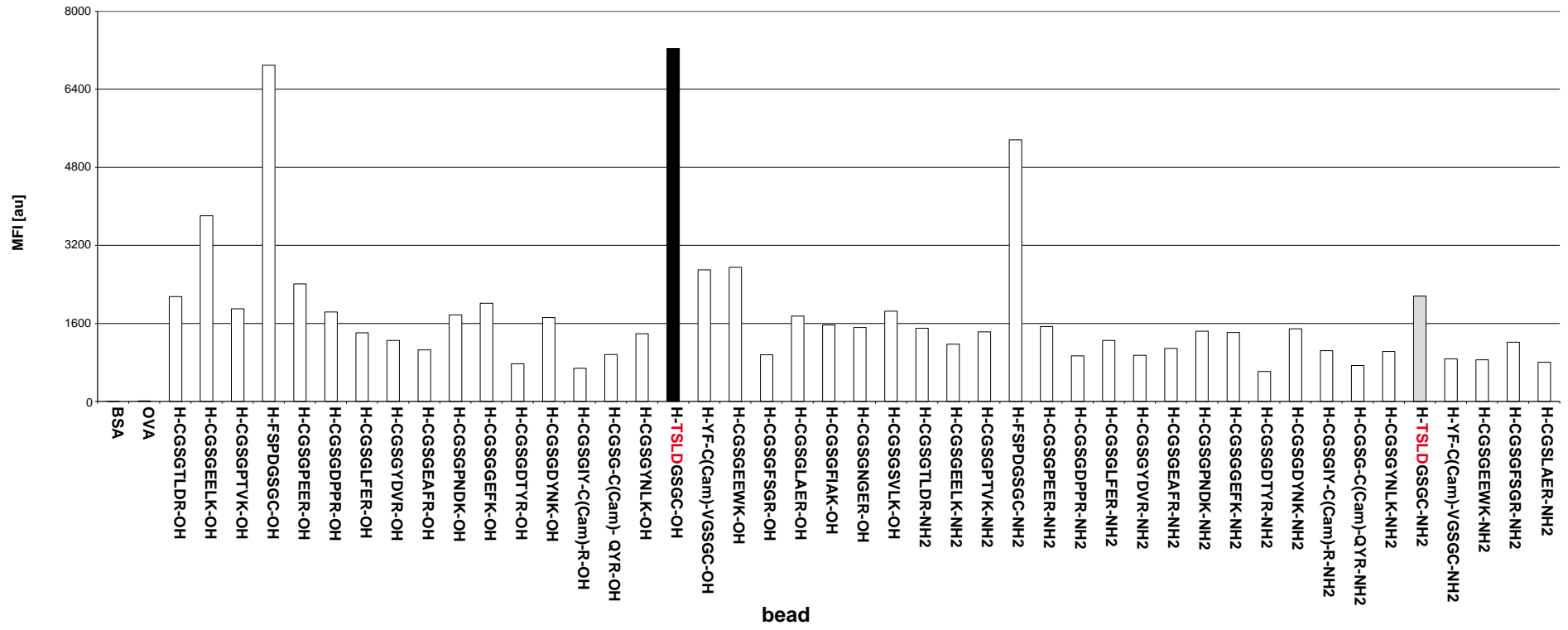


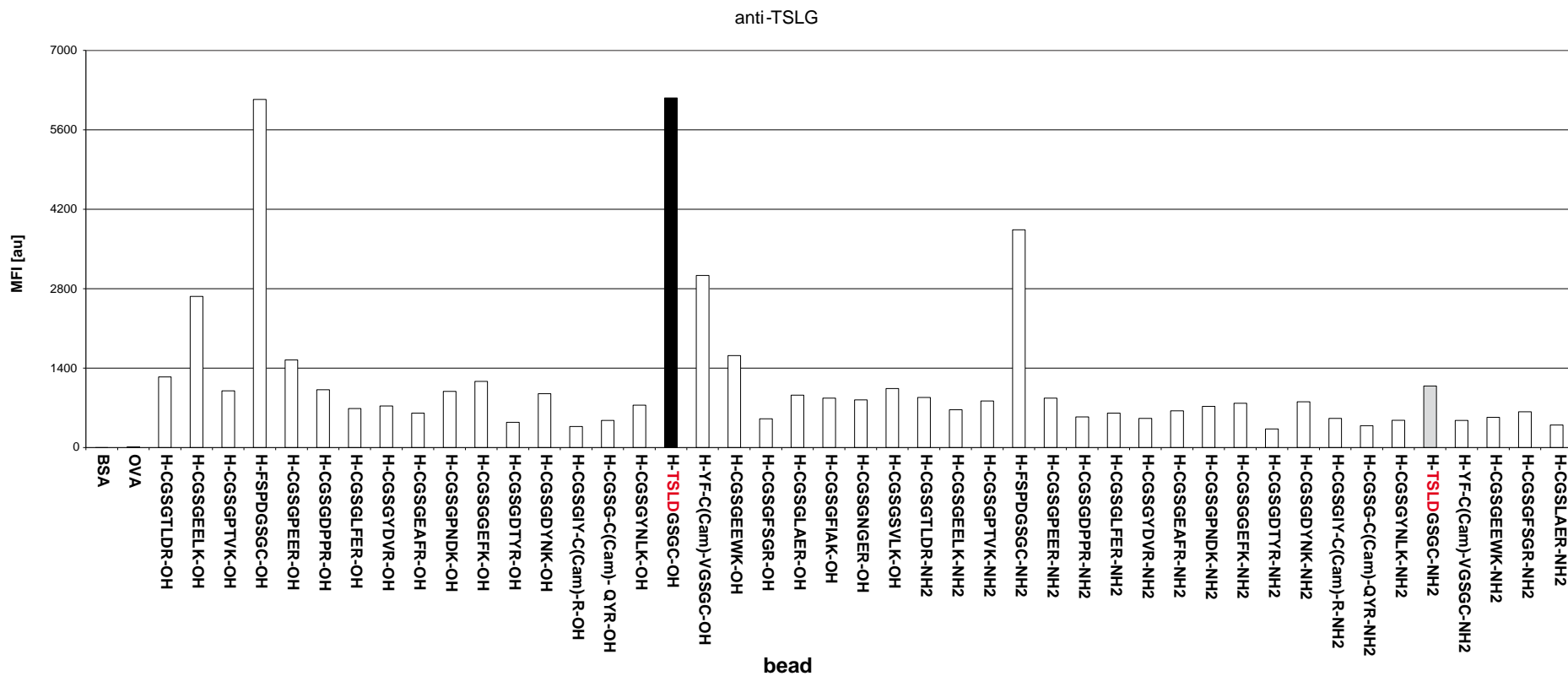


anti -YNLK



anti-TSLG





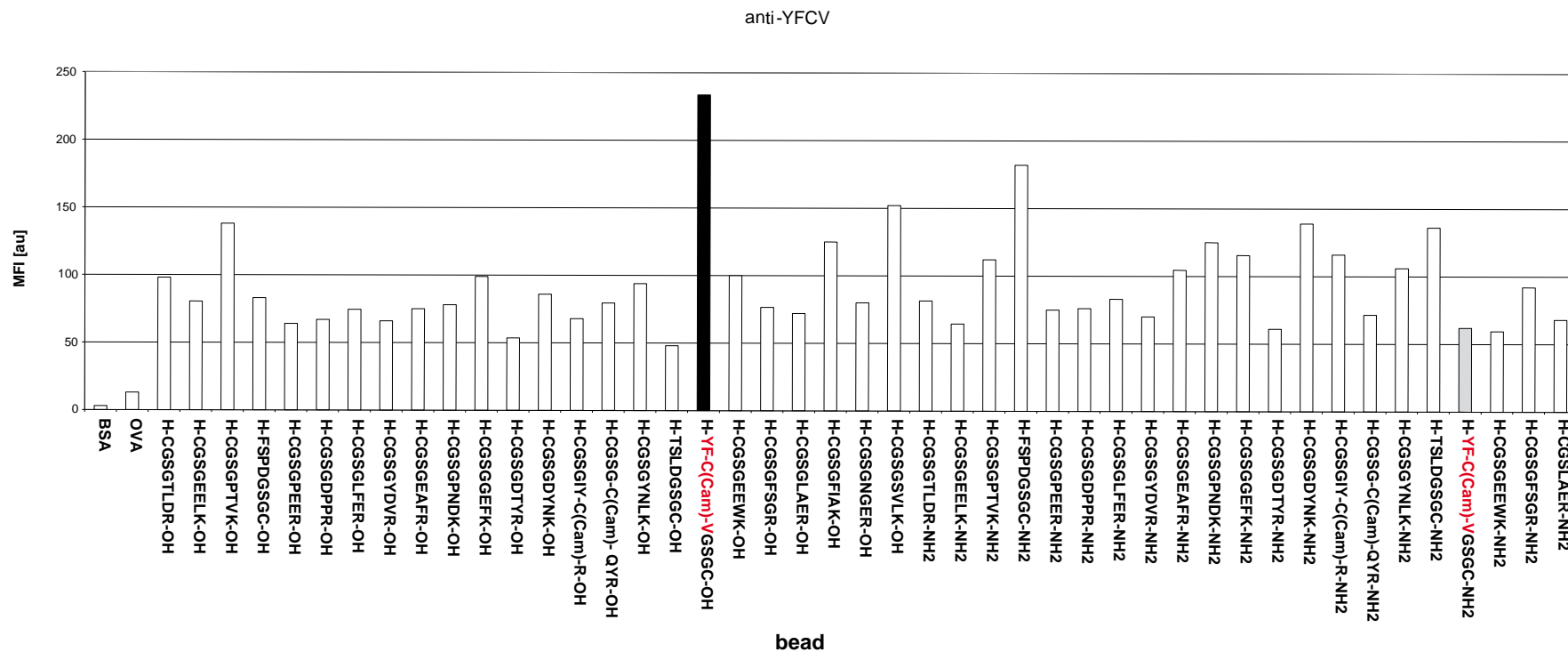


Abbildung 24: Beadbasierte Assays zur Charakterisierung weiterer TXP-Antikörper

Polyklonale Kaninchenantikörper wurden auf einer mikrosphärenbasierten Plattform auf ihre Spezifität überprüft. Dazu wurden kurze Aminosäuresequenzen auf farbcodierte Polystyren-Mikrosphären gekoppelt und diese den Antikörpern als Zielstrukturen angeboten. Gebundene Antikörper wurden durch einen PE-markierten Sekundärantikörper im Luminex™ -System detektiert. Die Signale sind angegeben in Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI).

8. Referenzen

- [1] Kenyon, G. L., DeMarini, D. M., Fuchs, E., Galas, D. J., *et al.*, Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 763-780.
- [2] Bensimon, A., Heck, A. J., Aebersold, R., Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu Rev Biochem* 2012, 81, 379-405.
- [3] Wilkins, M., Proteomics data mining. *Expert Rev Proteomics* 2009, 6, 599-603.
- [4] Tyers, M., Mann, M., From genomics to proteomics. *Nature* 2003, 422, 193-197.
- [5] Celis, J. E., Moreira, J. M., Clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7, 1779.
- [6] Lottspeich, F., Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999, 38, 2476-2492.
- [7] Klose, J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975, 26, 231-243.
- [8] O'Farrell, P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975, 250, 4007-4021.
- [9] Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y., Aebersold, R., Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97, 9390-9395.
- [10] Fields, S., Song, O., A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989, 340, 245-246.
- [11] 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. *Mol Cell Proteomics* 2006, 5, 1811-1818.
- [12] Borchers, C. H., Thapar, R., Petrotchenko, E. V., Torres, M. P., *et al.*, Combined top-down and bottom-up proteomics identifies a phosphorylation site in stem-loop-binding proteins that contributes to high-affinity RNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 3094-3099.
- [13] Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J. A., Christmas, R., *et al.*, Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 2001, 292, 929-934.
- [14] Hilgendorf, T. M. a. C., Quantification of membrane drug transporters and application in drug discovery and development. *European Pharmaceutical Review* 2012, 17, 9-12.

- [15] Aebersold, R., A stress test for mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* 2009, 6, 411-412.
- [16] Bantscheff, M., Boesche, M., Eberhard, D., Matthieson, T., *et al.*, Robust and sensitive iTRAQ quantification on an LTQ Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7, 1702-1713.
- [17] Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M., Kuster, B., Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem* 2007.
- [18] Bell, A. W., Deutsch, E. W., Au, C. E., Kearney, R. E., *et al.*, A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* 2009, 6, 423-430.
- [19] Zhu, W., Smith, J. W., Huang, C. M., Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 840518.
- [20] Voyksner, R. D., Lee, H., Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999, 13, 1427-1437.
- [21] Liu, H., Sadygov, R. G., Yates, J. R., 3rd, A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* 2004, 76, 4193-4201.
- [22] Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K. G., *et al.*, Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2005, 4, 1487-1502.
- [23] Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., Gygi, S. P., Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 6940-6945.
- [24] Anderson, L., Hunter, C. L., Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* 2006, 5, 573-588.
- [25] Keshishian, H., Addona, T., Burgess, M., Kuhn, E., Carr, S. A., Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6, 2212-2229.
- [26] Wolf-Yadlin, A., Hautaniemi, S., Lauffenburger, D. A., White, F. M., Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, 5860-5865.
- [27] Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., *et al.*, Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6, 2139-2149.

- [28] Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D., Chait, B. T., Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96, 6591-6596.
- [29] Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., *et al.*, Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 376-386.
- [30] Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E., Matthews, D. E., Yates, J. R., 3rd, Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis. *Anal Chem* 2004, 76, 4951-4959.
- [31] Schutz, W., Hausmann, N., Krug, K., Hampp, R., Macek, B., Extending SILAC to proteomics of plant cell lines. *Plant Cell* 2011, 23, 1701-1705.
- [32] Krijgsveld, J., Ketting, R. F., Mahmoudi, T., Johansen, J., *et al.*, Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 2003, 21, 927-931.
- [33] Reynolds, K. J., Fenselau, C., Quantitative protein analysis using proteolytic [¹⁸O]water labeling. *Curr Protoc Protein Sci* 2004, Chapter 23, Unit 23 24.
- [34] Mason, C. J., Therneau, T. M., Eckel-Passow, J. E., Johnson, K. L., *et al.*, A method for automatically interpreting mass spectra of ¹⁸O-labeled isotopic clusters. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6, 305-318.
- [35] Dayon, L., Turck, N., Kienle, S., Schulz-Knappe, P., *et al.*, Isobaric tagging-based selection and quantitation of cerebrospinal fluid tryptic peptides with reporter calibration curves. *Anal Chem* 2012, 82, 848-858.
- [36] Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., *et al.*, Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem* 2003, 75, 1895-1904.
- [37] Anderson, N. L., Jackson, A., Smith, D., Hardie, D., *et al.*, SISCAPA peptide enrichment on magnetic beads using an in-line bead trap device. *Mol Cell Proteomics* 2009, 8, 995-1005.
- [38] Ackermann, B. L., Berna, M. J., Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers. *Expert Rev Proteomics* 2007, 4, 175-186.
- [39] Barnidge, D. R., Goodmanson, M. K., Klee, G. G., Muddiman, D. C., Absolute quantification of the model biomarker prostate-specific antigen in serum by LC-MS/MS using protein cleavage and isotope dilution mass spectrometry. *J Proteome Res* 2004, 3, 644-652.

- [40] Kuhn, E., Wu, J., Karl, J., Liao, H., *et al.*, Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics* 2004, 4, 1175-1186.
- [41] Anderson, N. L., Anderson, N. G., The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 845-867.
- [42] Echan, L. A., Tang, H. Y., Ali-Khan, N., Lee, K., Speicher, D. W., Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 2005, 5, 3292-3303.
- [43] Ramadan, M. M., Kodama, M., Mitsuma, W., Ito, M., *et al.*, Impact of percutaneous coronary intervention on the levels of interleukin-6 and C-reactive protein in the coronary circulation of subjects with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2006, 98, 915-917.
- [44] Nelson, R. W., Krone, J. R., Bieber, A. L., Williams, P., Mass spectrometric immunoassay. *Anal Chem* 1995, 67, 1153-1158.
- [45] Hoeppe, S., Schreiber, T. D., Planatscher, H., Zell, A., *et al.*, Targeting peptide termini - a novel immunoaffinity approach to reduce complexity in mass spectrometric protein identification. *Mol Cell Proteomics* 2010, 10, M110 002857.
- [46] Whiteaker, J. R., Zhao, L., Anderson, L., Paulovich, A. G., An automated and multiplexed method for high throughput peptide immunoaffinity enrichment and multiple reaction monitoring mass spectrometry-based quantification of protein biomarkers. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 2010, 9, 184-196.
- [47] Poetz, O., Hoeppe, S., Templin, M. F., Stoll, D., Joos, T. O., Proteome wide screening using peptide affinity capture. *Proteomics* 2009, 9, 1518-1523.
- [48] Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., *et al.*, Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2007, 450, 383-387.
- [49] Eisen, D., Planatscher, H., Hardie, D. B., Kraushaar, U., *et al.*, *Journal of Proteomics* 2012.
- [50] Planatscher, H., Supper, J., Poetz, O., Stoll, D., *et al.*, Optimal selection of epitopes for TXP-immunoaffinity mass spectrometry. *Algorithms Mol Biol* 2010, 5, 28.
- [51] Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J* 1992, 6, 2323-2331.
- [52] Gaillard, I., Rouquier, S., Giorgi, D., Olfactory receptors. *Cell Mol Life Sci* 2004, 61, 456-469.

- [53] Ji, T. H., Grossmann, M., Ji, I., G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 1998, 273, 17299-17302.
- [54] Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004, 431, 931-945.
- [55] Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., *et al.*, International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 2005, 57, 279-288.
- [56] Brattelid, T., Levy, F. O., Quantification of GPCR mRNA using real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol* 2011, 746, 165-193.
- [57] Kishi, T., Tsunoka, T., Ikeda, M., Kawashima, K., *et al.*, Serotonin 1A receptor gene and major depressive disorder: an association study and meta-analysis. *J Hum Genet* 2009, 54, 629-633.
- [58] Kopf, B. S., Langhans, W., Geary, N., Asarian, L., Serotonin 2C receptor signaling in a diffuse neuronal network is necessary for LPS anorexia. *Brain Res* 2007, 1306, 77-84.
- [59] Kurian, S. S., Ferri, G. L., De Mey, J., Polak, J. M., Immunocytochemistry of serotonin-containing nerves in the human gut. *Histochemistry* 1983, 78, 523-529.
- [60] Mikhailova, S. D., Semushkina, T. M., Storozhakov, G. I., Effect of serotonin on impulse activity of bulbar cardiovascular neurons. *Bull Exp Biol Med* 2009, 147, 167-169.
- [61] Villalon, C. M., Terron, J. A., Hong, E., Saxena, P. R., [The cardiovascular effects of serotonin receptor agonists and antagonists (II)]. *Arch Inst Cardiol Mex* 1993, 63, 553-561.
- [62] Szeto, H. H., Hinman, D. J., Central muscarinic modulation of fetal blood pressure and heart rate. *J Dev Physiol* 1990, 13, 17-23.
- [63] Vandecasteele, G., Eschenhagen, T., Scholz, H., Stein, B., *et al.*, Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 1999, 5, 331-334.
- [64] Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. J., Okayama, H., Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 1992, 356, 526-529.
- [65] Kiss, A., Mikkelsen, J. D., Oxytocin--anatomy and functional assignments: a minireview. *Endocr Regul* 2005, 39, 97-105.
- [66] Fang, Y., Lahiri, J., Picard, L., G protein-coupled receptor microarrays for drug discovery. *Drug Discov Today* 2003, 8, 755-761.
- [67] Qoronfle, M. W., Benton, B., Ignacio, R., Kaboord, B., Selective Enrichment of Membrane Proteins by Partition Phase Separation for Proteomic Studies. *J Biomed Biotechnol* 2003, 2003, 249-255.

- [68] Flower, D. R., Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1422, 207-234.
- [69] Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., *et al.*, The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 4903-4908.
- [70] Euroscreen, D. D., 2012.
- [71] Eisen, D., *Biochemistry*, University of Tübingen, Tübingen 2009 p. 89.
- [72] Volk, S., Schreiber, T. D., Eisen, D., Wiese, C., *et al.*, Combining Ultracentrifugation and Peptide Termini Group-specific Immunoprecipitation for Multiplex Plasma Protein Analysis. *Mol Cell Proteomics*, 11, O111 015438.
- [73] Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M. E., Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1985, 77, 305-319.
- [74] Nieba, L., Krebber, A., Pluckthun, A., Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* 1996, 234, 155-165.
- [75] Braeuning, A., Sanna, R., Huelsken, J., Schwarz, M., Inducibility of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics in mice with liver-specific knockout of Ctnnb1. *Drug Metab Dispos* 2009, 37, 1138-1145.
- [76] Yamamoto, Y., Sakamoto, M., Fujii, G., Tsuiji, H., *et al.*, Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology* 2003, 37, 528-533.
- [77] Sadowski, P. G., Groen, A. J., Dupree, P., Lilley, K. S., Sub-cellular localization of membrane proteins. *Proteomics* 2008, 8, 3991-4011.
- [78] Orchard, S., Proteomics: from technology development to biomarker applications. *Expert Rev Proteomics* 2007, 4, 709-710.
- [79] Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Issaq, H. J., What to do with "one-hit wonders"? *Electrophoresis* 2004, 25, 1278-1279.
- [80] Bernocco, S., Fondelli, C., Matteoni, S., Magnoni, L., *et al.*, Sequential detergent fractionation of primary neurons for proteomics studies. *Proteomics* 2008, 8, 930-938.
- [81] Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., *et al.*, Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos*, 40, 83-92.

- [82] Hajos, F., Tapia, R., Wilkin, G., Johnson, A. L., Balazs, R., Subcellular fractionation of rat cerebellum: an electron microscopic and biochemical investigation. I. Preservation of large fragments of the cerebellar glomeruli. *Brain Res* 1974, 70, 261-279.
- [83] Hubbard, M. J., McHugh, N. J., Calbindin28kDa and calbindin30kDa (calretinin) are substantially localised in the particulate fraction of rat brain. *FEBS Lett* 1995, 374, 333-337.
- [84] Deutsch, E. W., Lam, H., Aebersold, R., PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Rep* 2008, 9, 429-434.
- [85] Craig, R., Cortens, J. P., Beavis, R. C., Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data. *J Proteome Res* 2004, 3, 1234-1242.
- [86] Eichacker, L. A., Granvogl, B., Mirus, O., Muller, B. C., *et al.*, Hiding behind hydrophobicity. Transmembrane segments in mass spectrometry. *J Biol Chem* 2004, 279, 50915-50922.
- [87] Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R., Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2008, 4, 222.
- [88] Beynon, R. J., Doherty, M. K., Pratt, J. M., Gaskell, S. J., Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat Methods* 2005, 2, 587-589.
- [89] Pratt, J. M., Simpson, D. M., Doherty, M. K., Rivers, J., *et al.*, Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat Protoc* 2006, 1, 1029-1043.
- [90] Pottiez, G., Wiederin, J., Fox, H. S., Ciborowski, P., Comparison of 4-plex to 8-plex iTRAQ quantitative measurements of proteins in human plasma samples. *J Proteome Res*, 11, 3774-3781.
- [91] Ernoult, E., Gamelin, E., Guette, C., Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci* 2008, 6, 27.
- [92] Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P. B., A., *Molecular Cell Biology* Palgrave Macmillan 2007.
- [93] Lanzenberger, R., Wadsak, W., Spindelegger, C., Mitterhauser, M., *et al.*, Cortisol plasma levels in social anxiety disorder patients correlate with serotonin-1A receptor binding in limbic brain regions. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010, 13, 1129-1143.
- [94] Luetje, C. W., Brumwell, C., Norman, M. G., Peterson, G. L., *et al.*, Isolation and characterization of monoclonal antibodies specific for the cardiac muscarinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 1987, 26, 6892-6896.

- [95] Peterson, G. L., Rosenbaum, L. C., Broderick, D. J., Schimerlik, M. I., Physical properties of the purified cardiac muscarinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 1986, 25, 3189-3202.
- [96] Schoenherr, R. M., Whiteaker, J. R., Zhao, L., Ivey, R. G., *et al.*, Multiplexed quantification of estrogen receptor and HER2/Neu in tissue and cell lysates by peptide immunoaffinity enrichment mass spectrometry. *Proteomics* 2012, 12, 1253-1260.
- [97] Uhlen, M., Bjorling, E., Agaton, C., Szigyarto, C. A., *et al.*, A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2005, 4, 1920-1932.

9. Lebenslauf

Diplomarbeit

Titel Immunoaffinity MS for GPCR Expression Analysis– A TXP Approach
Betreuer Dr. Thomas Joos, Dr. Oliver Pötz
Ort NMI an der Universität Tübingen

Doktorarbeit

Titel Immunoaffinitäts- und Massenspektrometrie-basierte Assays & Peptid-gruppenspezifische Antikörper zur Expressionsanalyse von G protein-gekoppelten Rezeptoren
Betreuer Prof. Dr. Stefan Stevanovic, Dr. Thomas Joos und Dr. Oliver Pötz
Ort NMI an der Universität Tübingen

Wissenschaftliche Arbeiten

Paper

Titel Combining Ultracentrifugation and Peptide Termini Group-specific Immunoprecipitation for Multiplex Plasma Protein Analysis
Autoren S. Volk*, D. Eisen*, T. D. Schreiber*, C. Wiese, H. Planatscher, C. J. Pynn, D. Stoll, M. F. Templin, T. O. Joos and O. Pötz
(*Authors contributed equally to this work)
Journal Mol Cell Proteomics

Titel Identification and quantification of a new family of peptide endocannabinoids (Pepcans) showing negative allosteric modulation at CB1 receptors
Autoren Mark Bauer, Andrea Chicca, Marco Tamborrini, David Eisen, Raissa Lerner, Beat Lutz, Oliver Pötz, Gerd Pluschke, Jürg Gertsch
Journal Journal of Biological Chemistry

Titel G protein-coupled receptor quantification using peptide-group specific enrichment combined with internal peptide standard reporter calibration
Autoren David Eisen, Hannes Planatscher, Udo Kraushaar, Christoph Borchers, Thomas O. Joos, Oliver Pötz
Journal Journal of Proteomics

Titel MATERICS – Terminal epitope fingerprinting from MS data
Autoren Hannes Planatscher, David Eisen, Frederik Weiß, Christopher Pynn, Dieter Stoll, Thomas Joos, Oliver Pötz (*submitted*)

Vorträge und Poster

Titel TXP Proteomics – A Multiplexed Detection Method for G-Protein Coupled Receptors in a Novel Immunoaffinity-MS Approach (Vortrag)
Konferenz Global Biomarker Conference, Vancouver, BC; September 2010

Titel	Multiplexer Nachweis von G-Protein gekoppelten Rezeptoren mittels eines neuartigen Immunoaffinitäts-MS Ansatzes (Vortrag)
Konferenz	17. Arbeitstagung Mikromethoden in der Proteinchemie, München, Juni 2010
Titel	Immunoaffinity MS for GPCR Expression Analyses (Vortrag)
Konferenz	3 rd European Summer School Proteomic Basics, Brixen, August 2009
Titel	G Protein-Coupled Receptor Quantification using Peptide-Group Specific Antibody-Enrichment and Internal Peptide Standards (Poster)
Konferenz	5 th EU Summer School in Proteomic Basics, Brixen, August 2011
Titel	G Protein-Coupled Receptor Quantification using Peptide-Group Specific Antibody-Enrichment and Internal Peptide Standards (Poster)
Konferenz	HUPO - 10th Annual World Congress, Genf, September 2011

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich,

1. dass ich meine Doktorarbeit ohne fremde Hilfe angefertigt habe;
2. dass ich die Verwendung der Gedanken anderer Autoren an den entsprechenden Stellen innerhalb der Arbeit gekennzeichnet habe;
3. dass ich meine Doktorarbeit bei keiner anderen Prüfung vorgelegt habe.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)