

**Etablierung eines Nachweissystems zur
Quantifizierung von Cytochrom P450 Enzymen
in der menschlichen Leber**

Dissertation

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

vorgelegt von
Frederik Weiß
aus Laupheim

Tübingen
2015

Tag der mündlichen Qualifikation:

19.05.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

Betreuer an der Eberhard Karls Universität Tübingen

Prof. Dr. Stefan Stevanović

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

Dr. Oliver Pötz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1. Proteomik	1
1.2. Massenspektrometrie-basierte Proteomik	2
1.3. Zielgerichtete Proteomik (targeted proteomics)	3
1.4. Triple-X-Proteomics	7
1.5. Fremdstoffmetabolismus	8
1.5.1. Das Cytochrom P450 System	9
1.5.2. Nukleäre Rezeptoren	11
1.5.2.1. PXR - Pregnane X Receptor	12
1.5.2.2. CAR - Constitutive Androstane Receptor	12
1.5.2.3. AhR - Aryl-Hydrocarbon-Receptor	13
1.6. Herausforderung	13
2. Ziele der Arbeit	15
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien	17
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3. Puffer und Lösungen	19
3.1.4. Geräte	20
3.1.5. Software	21
3.1.6. Datenbanken	22
3.2. Herstellung polyklonaler TXP-Antikörper	22
3.3. Auswahl der TXP-Motive für die Gewinnung polyklonaler Antikörperseren und die Synthese proteinspezifischer Nachweispeptide	22

Inhaltsverzeichnis |

3.4.	Antikörperaufreinigung	23
3.5.	Peptidsynthese	24
3.6.	Gewebeaufschluss	24
3.7.	Zellkultur	24
3.8.	Zellyse nach Zellkultur im 96-Well-Format	25
3.9.	Proteinbestimmung	26
3.10.	Tryptische Proteolyse	26
3.10.1.	Tryptische Proteolyse von Gewebelysaten und Mikrosomenfraktionen	26
3.10.2.	Tryptische Proteolyse von Zelllysaten im 96-Well-Format	26
3.11.	Automatisierung der Immunopräzipitation	27
3.11.1.	Bindekapazität aufgereinigter polyklonaler TXP-Antikörper	28
3.11.2.	Epitopanalysen der TXP-Antikörper	29
3.11.3.	Peptidverdünnung	29
3.12.	Bestimmung von Bindungsaffinitäten mittels mikrosphärenbasierten Kompetitionstests	29
3.13.	LC-MS-Analyse	30
3.13.1.	Peptidquantifizierung mittels tSIM-MS-Methode (targeted Single Ion Monitoring)	31
3.13.2.	Peptidentifikation mittels FULL-MS-Methode	32
3.13.3.	Identifizierung von Peptiden mit Mascot und SEQUEST	33
3.14.	Zugabe von Referenzpeptiden in Quantifizierungsstudien	34
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Geeignete TXP-Motive für den Nachweis proteinspezifischer Peptide	35
4.2.	Entwicklung einer auf TXP-Antikörpern basierenden Quantifizierungs-methode	39
4.2.1.	Vorteile der auf Immunopräzipitation basierenden TXP-Quantifizierungsstrategie für die Verwendung kurzer chromatographischer Gradienten	39
4.2.2.	Bindekapazität aufgereinigter polyklonaler TXP-Antikörperseren	43
4.2.3.	Chromatographische Auftrennung der Analytsequenzen	47
4.2.3.1.	Trennung von Peptiden nach Immunopräzipitation mit anti-LPNK, anti-LAER, anti-NGER, anti-FIAK, anti-SVLK und anti-FVEK (TXP-Multiplex-Gradient 1)	48
4.2.3.2.	Trennung von Analytsequenzen nach Immunopräzipitation mit anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR (TXP-Multiplex-Gradient 2)	49
4.2.4.	Affinitätsbestimmung der TXP-Antikörper	50
4.2.5.	Peptidanreicherung durch TXP-Antikörper - Analyse des TXP-Epitops	53
4.2.5.1.	Anreicherung des TXP-Zielmotivs	53
4.2.5.2.	Beschreibung des TXP-Motivs	54
4.2.5.3.	Beschreibung des TXP-Motivs in verschiedenen biologischen Matrices	57

4.2.5.4.	Anreicherungseigenschaften der TXP-Antikörper unter Berücksichtigung variabler Positionen im TXP-Motiv	58
4.2.5.5.	Einfluss epitopbenachbarter Aminosäuren auf die Anreicherung mittels TXP-Antikörper	59
4.2.6.	Dynamischer Messbereich der TXP-Tests	62
4.2.6.1.	Richtigkeit in verschiedenen Matrices (Accuracy)	62
4.2.6.2.	Wahl der geeigneten MS-Messmethode	64
4.2.6.3.	Linearer Messbereich der auf Immunopräzipitation basierenden TXP-Tests	68
4.2.6.4.	Zusammenfassung des linearen Messbereichs der 18 entwickelten TXP-Tests	71
4.2.7.	Wahl geeigneter Referenzpeptideinsatzmengen für eine robuste Quantifizierung in komplexer Probe	76
4.2.8.	Vergleich der TXP-Quantifizierungsstrategie mit der spektralen Quantifizierung von Cytochrom P450-Enzymen	78
4.3.	Anwendung der TXP-Quantifizierungsstrategie	80
4.3.1.	MDR1-Expression in menschlichen Tumorzellen nach Xenotransplantation	80
4.3.2.	Quantifizierungsstudie: Cytochrom P450-Enzymkonzentrationen in menschlicher Leber	81
4.3.2.1.	Vergleich zweier Quantifizierungsstrategien: Cytochrom P450-Quantifizierung aus präparierten Mikrosomenfraktionen mittels Immuno-MS und Western Blot	81
4.3.2.2.	Anreicherung von membrangebundenen Cytochrom P450 Enzymen durch Präparation mikrosomaler Fraktionen	84
4.3.2.3.	Quantifizierungsstudie aus menschlichen Lebergewebe	85
4.3.3.	Induktionsstudien	87
4.3.3.1.	PXR-vermittelte Induktion der Cytochrom P450-Enzyme	88
4.3.3.2.	CAR-vermittelte Induktion der Cytochrom P450-Enzyme	90
4.3.3.3.	Ah-Rezeptor-vermittelte Induktion der Cytochrom P450-Enzyme	91
4.3.3.4.	Induktionsmechanismen von CYP2C18, CYP2D6 und CYP2E1	92
4.3.3.5.	Induktionsverhalten von MDR1 und CPR	94
4.3.3.6.	Zusammenstellung der induktiven und repressiven Wirkungen von Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol auf das Cytochrom P450-System	96
5.	Diskussion	99
5.1.	Auswahl geeigneter TXP-Motive für proteinspezifische Peptide	99
5.2.	Vorteile der TXP-Quantifizierungsstrategie	101
5.3.	Spezifität der TXP-Antikörper	104
5.4.	Linearer Messbereich der TXP-Tests	105
5.5.	MDR1-Expression nach Xenotransplantation	107
5.6.	Cytochrom P450-Enzymkonzentrationen in menschlicher Leber	108
5.7.	Die TXP-Quantifizierungsstrategie als Analysemethode für Induktionsstudien	110

Inhaltsverzeichnis |

5.7.1. Rifampicin-vermittelte Induktion des Cytochrom P450 Systems	111
5.7.2. Phenobarbital-vermittelte Induktion des Cytochrom P450 Systems	113
5.7.3. Omeprazol-vermittelte Induktion des Cytochrom P450 Systems	114
6. Zusammenfassung	119
Quellenverzeichnis	121
Danksagung	127
Curriculum Vitae	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - TXP-Prinzip	8
Abbildung 2 - Beteiligung der Cytochrom P450 Enzyme an der Verstoffwechslung der 200 in den USA am häufigsten verschrieben Medikamente	10
Abbildung 3 - Prozessstrategie zur TXP-Test-Entwicklung	16
Abbildung 4 - Kultivierung kryokonservierter Hepatozyten im 96-Well-Format	25
Abbildung 5 - Vergleich der mit und ohne Immunopräzipitation detektierten MS-Signale von LPNK-, LAER-, NGER-, FIAK-, SVLK- und FVEK-Peptiden	40
Abbildung 6 - Vergleich der mit und ohne Immunopräzipitation detektierten Massenspuren am Beispiel des CYP3A4-Peptids LQEEIDAVLPNK	41
Abbildung 7 - Vergleich der mit und ohne Immunopräzipitation detektierten Massenspuren für die Motivpeptide GIFPLAER (CYP2C9) und GHFPLAER (CYP2C19)	41
Abbildung 8 - Vergleich der mit und ohne Immunopräzipitation detektierten MS-Signale von FSGR-, VIGR- und ENLR-Peptiden	42
Abbildung 9 - Bindekapazität verschiedener aufgereinigter TXP-Antikörperseren, die gegen die Motive „LPNK“ und „FSGR“ immunisiert wurden	44
Abbildung 10 - Gradient für TXP-Multiplex 1	48
Abbildung 11 - Gradient für TXP-Multiplex 2	50
Abbildung 12 - ELISA-basierte Bestimmung von Affinitätskonstanten für die TXP-Antikörper anti-LPNK, anti-LAER, anti-FIAK und anti-NGER	51
Abbildung 13 - Immunotest-basierte Bestimmung von Affinitätskonstanten für die TXP-Antikörper anti-SVLK, anti-FVEK, anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR	52
Abbildung 14 - Peptididentifikationen nach Immunopräzipitation mit TXP-Antikörpern aus tryptisch fragmentiertem HEPG2-Lysat	54
Abbildung 15 - Motivlogozusammenstellung der in die weitere Testentwicklung eingehenden TXP-Antikörper anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR.	55
Abbildung 16 - Zellsystemabhängige Anreicherung unter Verwendung des TXP-Antikörpers anti-LPNK.	57
Abbildung 17 - Peptididentifikationen pro TXP-Motiv im Verhältnis zu der maximal möglichen Anzahl an Identifikationen	58
Abbildung 18 - Einfluss motivbenachbarter Aminosäuren auf die Anreicherung am Beispiel des TXP-Antikörpers anti-LPNK	60
Abbildung 19 - Einfluss motivbenachbarter Aminosäuren auf die Anreicherung am Beispiel des TXP-Antikörpers anti-FSGR	61
Abbildung 20 - Wiederfindungsrate der vier „LPNK“-Motivpeptide nach Verdünnung in unterschiedlichen Diluenten	63
Abbildung 21 - Wiederfindungsrate der vier „LPNK“-Motivpeptide nach Verdünnung in H ₂ O + 0,001% Chaps	66

Abbildungsverzeichnis |

Abbildung 22 - Vergleich des linearen Messbereichs zweier CYP3A4-, CYP3A5- und CYP3A7-Testanordnungen	69
Abbildung 23 - Vergleich des linearen Messbereichs zweier MDR1-Testanordnungen	70
Abbildung 24 - Linearer Messbereich der für CYP3A4 und CYP3A5 entwickelten TXP-Tests	71
Abbildung 25 - Linearer Messbereich der für CYP3A7 und MDR1 entwickelten TXP-Tests	72
Abbildung 26 - Linearer Messbereich der für CYP2C9 und CYP2C19 entwickelten TXP-Tests	72
Abbildung 27 - Linearer Messbereich der für CYP2A6 und CYP2A13 entwickelten TXP-Tests	73
Abbildung 28 - Linearer Messbereich der für CYP2D6 und CPR entwickelten TXP-Tests	73
Abbildung 29 - Linearer Messbereich der für CYP2B6, CYP2C8, CYP2C18 und CYP2S1 entwickelten TXP-Tests	74
Abbildung 30 - Linearer Messbereich der für CYP2F1 und CYP2S1 entwickelten TXP-Tests	75
Abbildung 31 - Linearer Messbereich der für CYP1A1 und CYP1A2 entwickelten TXP-Tests	75
Abbildung 32 - Linearer Messbereich der für CYP2C8 und CYP2D6 entwickelten TXP-Tests	76
Abbildung 33 - Einfluss der gewählten Konzentration des isotope-markierten Peptidstandards auf das Quantifizierungsergebnis am Beispiel von CYP3A4 und CYP3A5	77
Abbildung 34 - Einfluss der gewählten Konzentration des isotope-markierten Peptidstandards auf das Quantifizierungsergebnis am Beispiel von CYP3A7 und MDR1	78
Abbildung 35 - Vergleich zweier Methoden zur Quantifizierung des Cytochrom P450-Systems	79
Abbildung 36 - MDR1-Quantifizierung in menschlichen Tumorzellen nach Xenotransplantation	80
Abbildung 37 - Vergleich der über Western Blot und Immuno-MS quantifizierten Enzymkonzentrationen in Relation zur ermittelten CYP3A4-Konzentration	83
Abbildung 38 - Expression von Cytochrom P450-Enzymen in 18 verschiedenen Lebergeweben	86
Abbildung 39 - CYP3A4-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	88
Abbildung 40 - CYP3A5-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	89
Abbildung 41 - CYP2C9-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	89
Abbildung 42 - CYP2C8-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	90
Abbildung 43 - CYP2B6-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	91
Abbildung 44 - CYP1A1-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol.	92
Abbildung 45 - CYP1A2-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	92
Abbildung 46 - CYP2C18-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	93

Abbildung 47 - CYP2D6-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	93
Abbildung 48 - Veränderung des CYP2D6-Basalniveaus in kryokonservierten Hepatozyten über 72 Stunden Kultivierung	94
Abbildung 49 - CYP2E1-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	94
Abbildung 50 - MDR1-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	95
Abbildung 51 - CPR-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol	95
Abbildung 52 - Anzahl nach Immunopräzipitation aus HEPG2-Lysat identifizierter und als statistisch signifikant angereichert erachteter Peptide im Verhältnis zur theoretisch proteomweit existierenden Anzahl an Peptiden gleichen Motivs	105
Abbildung 53 - Linearer Funktionsbereich des auf dem Motiv „SVLK“ beruhenden CYP2D6-TXP-Tests	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Fremdstoffmetabolismus-relevante Cytochrom P450 Enzyme	11
Tabelle 2 - Kultivierung kryokonservierter Hepatozyten - Behandlungsschema	25
Tabelle 3 - TXP-Motive und Analytanzahl pro Antikörper	28
Tabelle 4 - Gerätekonfiguration der für die Peptidquantifizierung verwendeten tSIM-Messmethode	31
Tabelle 5 - Gerätekonfiguration der für die Peptididentifikation verwendeten FULL-MS-Messmethode	32
Tabelle 6 - Mascot-Suchparameter	33
Tabelle 7 - SEQUEST-Suchparameter	33
Tabelle 8 - Einsatzmengen isotoopenmarkierter Peptide nach Aminosäureanalyse	34
Tabelle 9 - Auswahl von TXP-Motiven nach bioinformatischer Analyse	35
Tabelle 10 - Zusammenstellung weiterer Cytochrom P450-Enzyme und thematisch verwandter Proteine, die über die bioinformatisch ermittelten Motive als Analyt adressierbar sind.	37
Tabelle 11 - Zusammenfassung der für die Testentwicklung benötigten proteotypischen Peptide	38
Tabelle 12 - Anzahl der in die Testentwicklung eingehenden Peptide	39
Tabelle 13 - Bindekapazitäten der gegen das Motiv „LPNK“ immunisierten TXP-Antikörper	44
Tabelle 14 - Bindekapazitäten der gegen das Motiv „FSGR“ immunisierten TXP-Antikörper	45
Tabelle 15 - Bindekapazitäten der TXP-Antikörper	46
Tabelle 16 - Gewählte Darstellungsanordnung der für die Charakterisierung der TXP-Antikörper untersuchten Motive	50
Tabelle 17 - Antikörper-Dissoziationskonstanten der für die Entwicklung von TXP-Tests ausgewählten Antikörper	53
Tabelle 18 - Zusammensetzung der TXP-Motiv-Logos „LPNK“ und „FSGR“	56
Tabelle 19 - Häufigkeit einzelner Aminosäuren an 5. Aminosäureposition nach Immunopräzipitation mit dem TXP-Antikörper anti-LPNK aus HEPG2-Lysat	59
Tabelle 20 - Proteomweite Häufigkeit einzelner Aminosäuren an 5. Aminosäureposition nach <i>in silico</i> -Anreicherung mit anti-LPNK	60
Tabelle 21 - Zusammenfassung des Detektionsbereichs unter Verwendung der tSIM- und tMS2-Methode	67
Tabelle 22 - Aufbau der zwei entwickelten multiplexen TXP-Testanordnungen	71
Tabelle 23 - Vergleich der mit TXP-LC-MS und Western Blot ermittelten Quantifizierungsergebnisse für CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 und CYP2C19	81
Tabelle 24 - Vergleich der mit TXP-LC-MS und Western Blot ermittelten Quantifizierungsergebnisse für CYP2A6, CYP2D6 und CPR	82
Tabelle 25 - Vergleich der in Lebergewebe und präparierten Mikrosomenfraktionen quantifizierten CYP-Konzentrationen	84

Tabelle 26 - Mediane der in einer Expressionsstudie aus 18 Lebergeweben ermittelten Proteinkonzentrationen	85
Tabelle 27 - Zusammenfassung der mit Rifampicin (10 μ M) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „ <i>Heatmap</i> “-Darstellung	96
Tabelle 28 - Zusammenfassung der mit Phenobarbital (3 mM) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „ <i>Heatmap</i> “-Darstellung	97
Tabelle 29 - Zusammenfassung der mit Omeprazol (100 μ M) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „ <i>Heatmap</i> “-Darstellung	97
Tabelle 30 - Nach Fragmentierung entstehende γ +2-Ionen zweier isobarer Elternpeptide	100
Tabelle 31 - Strategie zur Findung eines geeigneten TXP-Motivs	104
Tabelle 32 - Zusammenfassung der mit Rifampicin (10 μ M) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „ <i>Heatmap</i> “-Darstellung	112
Tabelle 33 - Zusammenfassung der mit Phenobarbital (3 mM) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „ <i>Heatmap</i> “-Darstellung	114
Tabelle 34 - Zusammenfassung der mit Omeprazol (100 μ M) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „ <i>Heatmap</i> “-Darstellung	116

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Ammonium-Bicarbonat-(Puffer)
ABCC	Ammonium-Bicarbonat-(Puffer) + Chaps
ACN	Acetonitril
AhR	Aryl-Hydrokarbonrezeptor
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i>
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CYP-(Enzyme)	Cytochrom P450-(Enzyme)
Da	Dalton
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> - „und andere“
FA	<i>Formic acid</i> (Ameisensäure)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSA	Humanes Serumalbumin
kDa	Kilodalton
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LOD	<i>limit of detection</i> (Nachweisgrenze)
LOQ	<i>limit of quantification</i> (Quantifizierungsgrenze)

MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamidadeninnukleotid
NADPH	Nicotinamidadeninnukleotidphosphat
n.d.	nicht detektiert
nLC	<i>nano liquid chromatography</i> (nano-Flüssigkeitschromatographie)
NOG	n-Octyl- β -D-Glucopyranosid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PBSC	<i>phosphate buffered saline</i> + Chaps
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
ppm	<i>parts per million</i>
PXR	<i>Pregnan X Receptor</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SRM	<i>Single Reaction Monitoring</i>
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
Sulfo-SMPB	Sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethanolamin
TFA	Trifluoressigsäure
TXP	<i>Triple X Proteomics</i>
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

Aminosäureabkürzungen gemäß IUPAC-Dreibuchstabennomenklatur

1. Einleitung

1.1. Proteomik

Mit dem Begriff Proteom wird die Gesamtheit aller durch ein Genom exprimierter und modifizierter Proteine bezeichnet [1]. Das Proteom ist im Gegensatz zum Genom dynamisch und unterliegt, durch äußere Einflüsse wie Umweltfaktoren oder Wirkstoffe bedingt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten qualitativen und quantitativen Änderungen. Das Wissenschaftsgebiet, das sich mit der Erforschung der Bestandteile und der Funktionen dieser Proteinwelt beschäftigt, wird in Anlehnung an den Begriff Genomik/Genomics als Proteomik/Proteomics bezeichnet [2].

Da das Transkriptom eines Organismus keine direkten Schlüsse auf die Expression eines Proteoms zulässt [3], müssen möglichst viele Erkenntnisse über Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom gewonnen werden, um ein umfassendes Verständnis für systembiologische Prozesse zu erlangen.

In diesem Forschungsfeld haben sich verschiedene methodische Disziplinen herausgebildet [4]. In der massenspektrometrie-basierten Proteomik wird die Zusammensetzung komplexer Proteingemische erforscht. Separationstechniken wie 2D-Gelelektrophorese und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie helfen hierbei, die hochkomplexen Proteingemische vor der massenspektrometrischen Analyse aufzutrennen.

Die thematische Aufteilung der Proteomforschung wird durch mehrere Teildisziplinen ergänzt. So werden posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen mit den Begriffen Phosphoproteomik und *Glycomics* als eigene Forschungsgebiete bezeichnet.

Ein weiteres Rückgrat der Proteomik bildet die proteinarraybasierte Erforschung der Proteine [5]. Um Protein-Protein-Interaktionen aufzuklären, werden Technologien wie das „Two-hybrid“-System und Protein-Microarrays eingesetzt [6, 7].

Erkenntnisse in der Proteomforschung werden in großen Proteomprojekten zusammengetragen. Eines der bekanntesten, das „Human Proteome“-Projekt (HPP), teilt sich hierbei in viele Teildisziplinen auf, die sich beispielsweise verschiedenen

Krankheitsgebieten wie Krebs (Ca-HPP) und Diabetes (HDPP), dem näheren Verständnis von Organen wie Leber (HLPP), Niere (HKUPP) und Gehirn (HBPP), oder neben vielen weiteren Zielen der Erforschung der Plasmazusammensetzung (HPPP) widmen [8, 9].

1.2. Massenspektrometrie-basierte Proteomik

Bei der Anwendung massenspektrometrischer Ansätze ist man bestrebt, das gesamte Proteom möglichst vollständig oder ein zuvor definiertes Sub-Proteom in einem einzelnen Experiment analysieren zu können. Dazu bedarf es komplexer und sensitiver Trenn- und Analyseverfahren.

Bei der 2D-Gelelektrophorese werden Proteine in einem ersten Schritt isoelektrisch fokussiert und im Anschluss nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis elektrophoretisch getrennt. Die Proteinbanden werden daraufhin ausgestochen und der Inhalt dieser Gelstücke massenspektrometrisch analysiert. Die 2D-Gelelektrophorese weist jedoch bei der Trennung von sehr großen, sowie sehr kleinen Proteinen Limitierungen auf. Eine verminderte Trennleistung tritt ebenso bei Proteinen mit überaus stark sauren oder basischen Charakter auf [10].

Die mit Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS) vereint die Eigenschaften, Moleküle nach chromatographischer Trennung identifizieren, sowie quantifizieren zu können. Die Aufklärung von Modifikationen ist dabei ebenso möglich, wie die Unterscheidung von Isoformen [11, 12].

Zwei Strategien bestimmen maßgeblich die Anwendung der Massenspektrometrie, die „Top-Down“- und die „Bottom-up“-Methode. Mit der „Top-Down“-Anwendung werden Proteine identifiziert und charakterisiert, indem diese nach Auftrennung in intakter Form ins Massenspektrometer injiziert und über Tandem-Massenspektrometrie fragmentiert werden. Über die Massen der entstehenden Fragmente kann auf die Aminosäuresequenz und die Identität des Proteins geschlossen werden [13, 14].

Bei der „Bottom-up“-Anwendung werden die Proteine zunächst durch Zugabe einer Protease enzymatisch gespalten und im Anschluss massenspektrometrisch analysiert.

Ergänzt man die „Bottom-up“-Methode um eine leistungsstarke chromatographische Trennung, ist es möglich, die einzelnen Komponenten sehr komplexer Proteinmischungen zu analysieren. Dies wird als „Shotgun-Proteomics“ bezeichnet [15-17].

1.3. Zielgerichtete Proteomik (targeted proteomics)

Die anfängliche Analyse des Proteoms durch „Shotgun“-Methoden ist im Laufe der letzten Jahre durch zielgerichtete Methoden wie das Selected Reaction Monitoring bzw. Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM) ergänzt worden. Hierbei werden Elternionen der zu quantifizierenden Peptide nach chromatographischer Auftrennung in einem ersten Quadrupol selektioniert, im Anschluss in einer Stoßzelle (zweiter Quadrupol) fragmentiert und einzelne Produktionen in einem dritten Quadrupol für eine Quantifizierung ausgewählt. Die Methoden eignen sich, Peptide mit hoher Spezifität und Sensitivität schnell und robust zu quantifizieren.

Da die Anzahl an Peptiden, die für sich allein oder in Kombination mit anderen Substanzen als Biomarker von Interesse sind, stetig wächst, bedarf es Methoden, die die Vermessung mehrerer Analyte in einem einzelnen Vorgang ermöglichen (multiplexe Methoden). MRM ermöglicht die spezifische Quantifizierung von mehreren hundert Analyten in einem einzigen LC-MS-Lauf [18, 19]. Die Quantifizierung kann über synthetische isotope markierte Referenzpeptide (AQUA-Peptide - Absolute QUAntitation) erfolgen, die zuvor über eine Aminosäureanalyse absolut quantifiziert werden [20, 21]. Aufgrund gleicher physikochemischer Eigenschaften eluieren isotope markierte und endogene Peptide zeitgleich und besitzen dieselben Ionisationseigenschaften. Die unterschiedlichen Massen lassen eine Unterscheidung auf MS- und MS/MS-Ebene zu. Es ist ebenso möglich, isotope markierte Proteine vor der enzymatischen Proteolyse zuzugeben und die entstehenden Peptide im Anschluss zu quantifizieren [22]. Die vergleichsweise hohen finanziellen und zeitlichen Aufwendungen zur Herstellung isotope markierter Proteine stellen allerdings eine Limitierung für diese Strategie dar.

Mit der fortschreitenden Entwicklung immer robusterer und sensitiverer LC-gekoppelter Massenspektrometer, ist auch die Quantifizierung niedrig konzentrierter Proteine möglich

geworden. Die LC-MRM-Technologie erlaubt es, in einem dynamischen Bereich von drei bis vier Größenordnungen zu quantifizieren [23]. Die Sensitivität, mit der einzelne Analyten vermessen werden können, ist jedoch von der Komplexität und dem dynamischen Konzentrationsbereich der biologischen Probe abhängig. Die Analyse von Plasma stellt beispielsweise sehr hohe Ansprüche an die Probenseparation, da die Proteinkonzentrationen im Plasma einen Bereich von über zehn Größenordnungen überspannen [24]. Zudem limitiert die Kapazität des chromatographischen Systems die mögliche Probenauftragsmenge. Die Quantifizierungsgrenze liegt bei Instrumenten neuerer Bauart für die Analyse von tryptisch fragmentiertem Plasma meist zwischen 10-100 ng/mL. Im Allgemeinen wird hierzu 1 µg enzymatisch fragmentiertes Plasma eingesetzt, was einem Plasmavolumen von 14 nL entspricht [25]. Bei weniger komplexen Matrices wie Urin können bereits Peptidmengen zwischen 10 und 100 amol bei Einsatz von 1 µg enzymatisch fragmentiertem Protein detektiert und quantifiziert werden [26]. LC-MRM ist imstande, Proteine in nicht fraktioniertem Zelllysate ab einer Kopienzahl von 7500 zu detektieren. Hierbei reichen der Proteingehalt von 12 000 Zellen aus [27].

Ionensuppression stellt für die Analytdetektion häufig ein Problem dar. Grund hierfür sind koeluierende Substanzen. Eine verminderte Ausbeute an entstehenden Primärionen ist eine Folge dieses Vorgangs [28]. Die zeitaufwendige Trennung, die vonnöten ist, um Ionensuppression zu minimieren, mehrt den Bedarf an alternativen Methoden, die die Komplexität der zu untersuchenden Proben schneller und einfacher reduzieren.

Durch Depletion von hoch abundanten Proteinen kann bei Plasmaanalysen ein hoher Sensitivitätsgewinn erzielt werden. Ca. 85% der Gesamtproteinmenge setzt sich aus den sechs höchstkonzentrierten Proteinen zusammen. Durch Abtrennung dieser kann die Sensitivität um den Faktor 7 gesteigert werden. Die auf Immunoaffinitätsanreicherung basierende Proteinsubstraktionschromatographie (IASC) erlaubt es, hoch konzentrierte Proteine abzutrennen und damit die in Plasma vorliegenden Konzentrationsunterschiede zu verringern [29-31].

Da die abgetrennten Proteine jedoch *in vivo* als Träger- oder Interaktionsproteine für verschiedene Substanzen fungieren können, bergen Depletion und Fraktionierung immer die Gefahr, unfreiwillig Analyte der sich anschließenden Messung zu entziehen [32].

Eine Verminderung der Komplexität kann ebenso über Fraktionierungstechniken erreicht werden. Diese können zusätzlich mit Depletionstechniken kombiniert werden. In mehrdimensionalen Aufbauten können Proben beispielsweise über Größenausschluss-, Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie fraktioniert werden und im Anschluss über hydrophobe Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt werden [33-35]. Die Fraktionen können einzeln oder miteinander kombiniert analysiert werden. Die Mehrdimensionale Chromatographie ermöglicht es, niedrig abundante Proteine zu adressieren. Die Anzahl an Identifikationen kann so um ein Vielfaches erhöht werden [36]. Der Einsatz aufeinander folgender Separationstechniken ist jedoch, abhängig von der Anzahl der gewählten Fraktionierungen, gegenüber eindimensionalen Techniken mit einem hohen zeitlichen Mehraufwand verbunden.

Eine Alternative zu den erwähnten Separationstechnologien stellt der Einsatz analytspezifischer Antikörper dar. Für die Entwicklung massenspektrometriebasierter Immunotests können hierbei entweder protein- oder peptidspezifische Antikörper eingesetzt werden. Einen peptidspezifischen Ansatz entwickelten Anderson et al. mit der SISCAPA-Methode (St¹³Iso¹⁵Sto¹³Peptide St¹³Iso¹⁵Sto¹³Peptide St¹³Iso¹⁵Sto¹³Peptide St¹³Iso¹⁵Sto¹³Peptide) [37, 38]. Hierbei werden proteospezifische Peptide, die nach tryptischer Proteolyse eines Zielproteins entstehen, zeitgleich mit einem isoto¹⁵markierten sequenzgleichen Standard durch den Antikörper angereichert. Wie bei der AQUA-Technik lässt sich die Menge des endogenen Peptides über das Verhältnis der für isoto¹⁵markiertes und endogenes Peptid integrierten Signalfächen ermitteln und somit auf die Konzentration des Proteins schließen. Die Anreicherung über einen immunoaffinitätsbasierten Ansatz erlaubt aufgrund der anschließend reduzierten Probenkomplexität schnelle chromatographische Gradienten und hat den Vorteil, Ionensuppression zwischen den aufgetrennten Substanzen zu minimieren. Es können hohe Sensitivitäten erreicht werden, die im niedrigen ng/mL-Bereich liegen [38, 39].

Die Immunpräzipitation kann „*in-line*“ oder „*off-line*“ der LC-MS-Detektion der Peptide vorgeschaltet sein. Neubert et al. beschreiben eine Methode, bei der eine Säule mit Antikörpern belegt wird und verbinden diese direkt („*in-line*“) mit der Chromatographieanlage. Nach Auftragung der Probe und anschließender Waschprozedur wird der gebundene Analyt eluiert und über die analytische Säule der

Chromatographieanlage getrennt. Sensitivitäten lassen sich auf diese Weise gegenüber Methodiken, die keine Immunoaffinitätsanreicherung einbeziehen, über den Faktor 100 steigern [37, 40]. Um Überträge durch unvollständige Elution vom Antikörper zu vermeiden, die darauffolgende Messungen verzerren können, lässt sich die Affinitätsanreicherung auch von der chromatographischen Auftrennung entkoppelt „off-line“ durchführen. Hierzu können magnetische Mikropartikel verwendet werden, die mit Protein A/G beladen sind [41]. Die Antikörper werden über ihren Fc-Teil an Protein A/G auf den Mikropartikeln gebunden. In einem automatischen Verfahren kann der Antikörper-Peptid-Komplex aus der Probe heraus über mehrere Waschschritte in die Elutionslösung transferiert werden. Der Einsatz von magnetischen Mikropartikeln bietet den Vorteil, im 96-Well-Format Anreicherungen parallel durchführen zu können [39, 42, 43]. Durch Kombination mehrerer verschiedener Antikörper lässt sich eine multiplexe Anreicherungsstrategie verfolgen [39, 44, 45]. Ebenso ist es denkbar, die Probe für eine wiederholte Anreicherungsprozedur zu verwenden [46, 47].

Die Entwicklung MS-basierter Immunotests zur Quantifizierung von Thyroglobulin als Biomarker für das Thyroidkarzinom [48], sowie weiterer Tests basierend auf der Quantifizierung von Troponin 1, des Epidermal Growth Factor 2 (HER-2) und des Estrogenrezeptors haben bereits gezeigt, dass die SISCAPA-Methode für klinische Fragestellungen robust und sensitiv genug ist [44, 49].

Eine *Top-down*-Methode stellt die MSIA-Anwendung (Mass Spectrometric ImmunoAssays) dar [50, 51]. Hierbei werden Proteine in ihrer intakten Form angereichert und können direkt über MALDI-MS oder proteolytisch fragmentiert in einer LC-MS-Anwendung quantifiziert werden [52, 53]. Eine Limitierung stellt hierbei die Verfügbarkeit von Standardproteinen dar. Die Methode macht es jedoch möglich, Proteinisoformen in klinischen Proben zu analysieren [54, 55].

Eine Kombination aus einer proteinspezifischen und einer sich nach tryptischer Proteolyse anschließenden zweiten peptidspezifischen Anreicherung ermöglichte es, Sensitivitäten im zwei- bis dreistelligen pg/mL-Bereich zu erreichen. Neubert et al. unterstreichen hiermit die Eignung immunoaffinitätsbasierter Testaufbauten für die Entwicklung sensitiver LC-MS-Tests [56].

1.4. Triple-X-Proteomics

Die breite Anwendung von immunoaffinitätsbasierten Anreicherungsstrategien erfordert eine möglichst große Auswahl an spezifischen Antikörpern [57]. Die Generierung und Charakterisierung analytspezifischer Antikörper stellt jedoch hierbei einen arbeits- und kostenintensiven Entwicklungsprozess dar. Antikörperbasierte Anreicherungsstrategien bieten dennoch den Vorteil, die Detektion von besonders niedrig konzentrierten Peptiden aus komplexen Proben wie Zelllysaten, Geweben und Plasmen zu erleichtern und zu beschleunigen. Der Umstand, für jeden Analyten jeweils einen funktionellen Antikörper entwickeln zu müssen, lässt jedoch die mit Immunoaffinität gekoppelten Massenspektrometrietests nur für die Entwicklung einzelner, durch SRM/MRM nicht adressierbarer Analyten in den Fokus rücken.

Die Idee der Triple-X-Proteomics-Antikörper (TXP) begegnet diesem Problem [58, 59]. Bei TXP-Antikörpern handelt es sich um peptidspezifische Antikörper, die kurze vier Aminosäuren umfassende N-terminale oder C-terminale Sequenzen binden. TXP-Antikörper sind in der Lage, gruppenspezifisch Peptide, die eine terminale gemeinsame Motivsequenz besitzen, aus komplexen Matrices anzureichern. Es besteht somit die Möglichkeit, mit einer geringen Anzahl von Antikörpern eine große Anzahl an Peptiden und damit indirekt Proteinen zu adressieren.

Bioinformatische Algorithmen helfen, nach *in silico*-Proteolyse einer zuvor definierten Proteinliste, Sequenzmotive zu ermitteln, die eine möglichst große Zahl an Zielanalyten teilt. Dabei gilt es zu beachten, dass Peptidsequenzen, in denen das TXP-Motiv zu finden ist, spezifisch für ein Protein stehen müssen. Um die Detektion niedrig konzentrierter Analyte zu ermöglichen, sollte die Auswahl von TXP-Motiven, die ebenso in hoch abundanten Proteinen vertreten sind, vermieden werden.

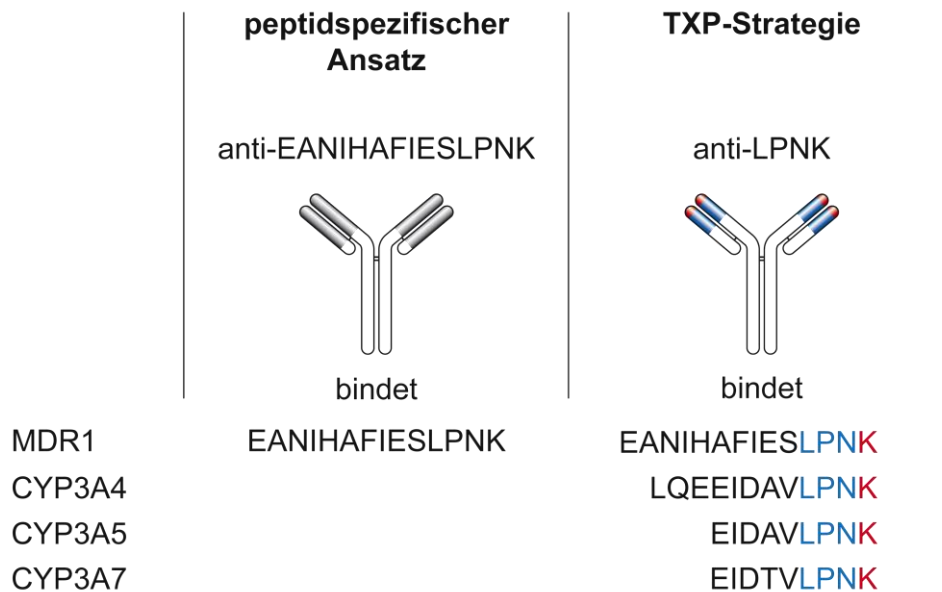


Abbildung 1 - TXP-Prinzip

Der TXP-Ansatz ermöglicht es, mit einer geringen Anzahl an Antikörpern eine Vielzahl an Analyten zu analysieren. Ein einzelner TXP-Antikörper kann, abhängig vom gewählten Motiv, dazu genutzt werden, in einer Spezies von einigen wenigen bis mehreren hundert proteospezifischen Sequenzen anzureichern. Die Kombination mehrerer TXP-Antikörper in einem einzelnen Anreicherungsprozess kann die Zielgruppe auf mehrere tausend Analyte erweitern. Neben deutlich geringer anfallenden Entwicklungskosten pro Test bieten die TXP-Antikörper den Vorteil, speziesübergreifend eingesetzt werden zu können. Bei konservierten Peptidsequenzen stellen TXP-Antikörper ein vielseitig einsetzbares Werkzeug dar, um mehrere Vertreter einer Proteinfamilie, Proteine ähnlicher Lokalisation oder Funktion unter Verwendung eines einzigen Antikörpers zu analysieren [60].

1.5. Fremdstoffmetabolismus

Durch Umwelteinflüsse, Nahrung oder Medikamenteneinnahme ist der menschliche Körper Substanzen ausgesetzt, die aufgrund ihres lipophilen Charakters nicht direkt ausgeschieden werden können. Fremdstoffe, sowie körpereigene lipophile Abbauprodukte unterlaufen aus diesem Grund einer Biotransformation in der Leber. Um die Ausscheidung als hydrophiles

Konjugat zu ermöglichen, werden schwer auszuscheidende Stoffe chemisch modifiziert (Phase I), an Trägersubstanzen konjugiert (Phase II) und im Anschluss ausgeschleust (Phase III). Dies geschieht in drei Phasen [61].

Zu den Phase I-Enzymen werden unterschiedliche Enzymklassen gezählt. Neben den Monooxygenasen des Cytochrom P450-Systems (CYP-Enzyme) greifen auch Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO), Dehydrogenasen wie Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen, Monoaminoxxygenasen (MAO), Cyclooxygenasen (COX), sowie Enzyme mit Hydrolyse- und Reduktasefunktion ein [62]. Die Enzyme führen funktionelle Gruppen in apolare, lipophile Substanzen ein. Häufige Reaktionen stellen hierbei Oxidationen dar, die Hydroxylgruppen oder Epoxidgruppen einführen.

In Phase II werden hydrophile Moleküle wie Glucuronsäure, Glutathion, Glycin, sowie Sulfate, Methyl-, Acethyl- und Acylgruppen über funktionelle Gruppen konjugiert [62].

Unter Phase III werden Transportvorgänge zusammengefasst, die die Konjugate für die Ausscheidung durchlaufen. Die Konjugate werden beispielsweise über ABC-Transporter wie die „Multidrug Resistance-Related“-Proteine (MRP) durch die Membran aus den Zellen ausgeschleust [63].

1.5.1. Das Cytochrom P450 System

Die Superfamilie der menschlichen Cytochrom P450 Enzyme besitzt nach derzeitigem Kenntnisstand 57 Vertreter [64]. Cofaktor der CYP-Enzyme ist das Häm. Die CYP-Enzyme katalysieren vorwiegend Monooxygenasereaktionen, bei denen aliphatische Gruppen hydroxyliert werden. Sie weisen dabei eine geringe Substratspezifität auf. Als Reduktionsmittel dienen die Nicotinamidadenindinukleotide NADH und NADPH, aber auch Flavinproteine, die FAD und FMN als Cofaktoren besitzen. Die meisten CYP-Enzyme sind an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums zu finden. Neben der aktiven Rolle im Fremdstoffmetabolismus haben verschiedene CYP-Enzyme auch Aufgaben bei der Modifizierung von Fettsäuren und der Biosynthese von Steroidhormonen. CYP-Enzyme kommen in vielen Geweben vor. Neben der Leber sind sie auch in Lunge, Niere, Darm und Hirn zu finden [65].

Das Cytochrom P450 System ist am Abbau von über 70% der 200 am häufigsten in den USA verschrieben Medikamente beteiligt (Stand 2002) [66]. Die Aktivität und Expression von CYP-Enzymen stellt aus diesem Grund einen eigenen Schwerpunkt in der pharmakologischen Forschung dar [67]. Die meisten Oxidationsprozesse werden von Vertretern der CYP3A-Familie umgesetzt (46%). Die CYP-Enzyme CYP2C9 (16%), CYP2C19 (12%), CYP2D6 (12%) und die CYP1A-Familie (9%) sind ebenso am Abbau beteiligt. CYP2B6 und CYP2E1 kommen lediglich bei 2% der Abbaureaktionen eine Rolle zu. Ein Fremdstoff durchläuft bei seiner Verstoffwechslung für gewöhnlich mehrere Katalyseschritte. Es besteht dadurch die Möglichkeit, dass mehrere CYP-Enzyme in dieser Abbaukaskade beteiligt sein können [61].

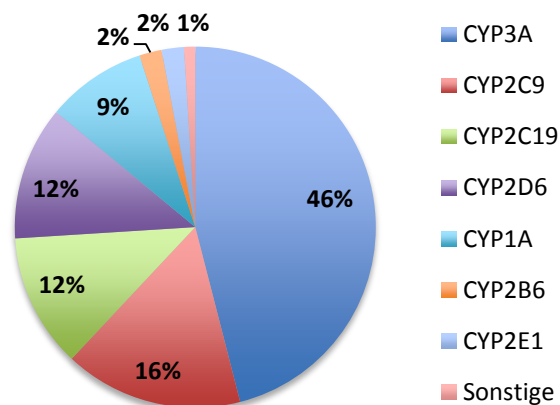


Abbildung 2 - Beteiligung der Cytochrom P450 Enzyme an der Verstoffwechslung der 200 in den USA am häufigsten verschrieben Medikamente (Stand 2002) [66].

Bei der Medikamentenentwicklung stellen Adsorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung (adsorption, distribution, metabolism and excretion - ADME) wichtige Kriterien dar, nach denen die Wirkungsweise eines Stoffes analysiert und charakterisiert wird. Einen großen Bestandteil der Metabolismusstudien bilden Tests zur CYP-Inhibition. Hierbei wird eine potentielle inhibierende Wirkung der getesteten Substanz oder eines ihrer Abbauprodukte untersucht. Der Mechanismus einer Inhibierung kann irreversibel, quasi-irreversibel oder reversibel sein [68]. Neben fluorometrischen Methoden finden bei Inhibitionsstudien ebenso LC-MS-Anwendungen ihren Einsatz [69-72].

Nach derzeitigem Kenntnisstand werden dem menschlichen Fremdstoffmetabolismus 15 CYP-Enzyme zugerechnet [64]:

Tabelle 1 - Fremdstoffmetabolismus-relevante Cytochrom P450 Enzyme

Enzym	UniProt-ID
CYP1A1	P04798
CYP1A2	P05177
CYP2A6	P11509
CYP2A13	Q16696
CYP2B6	P20813
CYP2C8	P10632
CYP2C9	P11712
CYP2C18	P33260
CYP2C19	P33261
CYP2D6	P10635
CYP2E1	P05181
CYP2F1	P24903
CYP3A4	P08684
CYP3A5	P20815
CYP3A7	P24462

1.5.2. Nukleäre Rezeptoren

Die Expression von Phase I-, II- und III-Proteinen wird in der Zelle über nukleäre Rezeptoren vermittelt. Die Rezeptoren binden über Liganden-Bindedomänen Fremdstoffe und aktivieren im Anschluss nach Anlagerung an DNA-Motive in Promotorregionen von Cytochrom P450-Genen den Fremdstoffmetabolismus. Zwei Proteinfamilien nehmen bei diesem Thema einen besonderen Platz ein; die Familie der nukleären Hormonrezeptoren (NHR), zu denen PXR (Pregnane X Receptor) und CAR (Constitutive Androstane Receptor) gehören, sowie der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor [73].

Die nukleären Hormonrezeptoren besitzen eine N-terminal gelegene Transaktivierungsdomäne, eine sehr konservierte DNA-Bindungsdomäne (DBD) und eine Ligandenbindungsdomäne (LBD) [74, 75]. PXR und CAR bilden mit RXR (Retinoid X Receptor) Heterodimere und binden ER- (everted repeats) und DR-Motive (direct repeats) der DNA [76]. Beide Rezeptoren sind für die Aktivierung von CYP2B- und CYP3A-Genen verantwortlich.

Der Ah-Rezeptor reguliert Cytochrom P450-Enzyme der Familie 1. Er gehört zur Superfamilie der PAS-Domäne-tragenden Proteine (Per - „period circadian protein“, Arn - „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein“, Sim - „single-minded protein“) und vermittelt die adaptive Antwort bei Anwesenheit von planaren aromatischen Hydrocarbonen und Dioxinen [73, 77].

1.5.2.1. PXR - Pregnane X Receptor

Bei PXR handelt es sich um einen Rezeptor, der mit niedriger Affinität eine Vielzahl an Liganden binden kann [78]. Mit nur wenig polaren Gruppen können vor allem hydrophobe Substanzen gebunden werden. Die Bindung ist im Vergleich zu anderen Rezeptoren wenig selektiv; sowohl kleine, als auch größere Substanzen können in mehreren Orientierungen in der relativ großen hydrophoben Bindungstasche gebunden werden [79]. Der Rezeptor ist in der Lage, nach Ausbildung eines Heterodimers mit RXR die Transkription mehrerer Gene nach Bindung zu verschiedenen DNA-Motiven (DR3, DR4, ER6) hochzuregulieren [80]. In menschlichen Zellen erfolgt die Induktion der CYP3A-Gene über eine Bindung an ein ER6-Motiv. Maximale Induktion wird über die zusätzliche Bindung zu einem DR3-Motiv erreicht [81, 82]. Über die Bindung an ein DR4-Motiv können die Promotoren der CYP2B-Gene [83] und der Transporter MDR1 ebenso aktiviert werden [84]. PXR aktiviert somit Gene, die ebenso der Rezeptor CAR adressiert. Im Gegenzug konnte ebenso nachgewiesen werden, dass CAR mit RXR als Heterodimer kombiniert, CYP3A-Gene aktivieren kann [85]. Es sind noch weitere nukleäre Rezeptoren bei der Genaktivierung beteiligt. Bei Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) durch Dexamethason können über GR-Elemente vermittelt PXR und CAR hochreguliert werden. Dies kann zu einer erhöhten Expression von CYP3A-Genen führen [86].

1.5.2.2. CAR - Constitutive Androstane Receptor

Der nukleäre Rezeptor CAR ist konstitutiv aktiv. Über die Zugabe von Phenobarbital kann die Expression von CYP2B-Genen stärker aktiviert werden. Phenobarbital führt dies nicht über direkte ligandeninduzierte Aktivierung von CAR bei, sondern indirekt über eine Inhibierung

der EGFR-Signalkaskade und eine dadurch initiierte Phosphorylierung von CAR [87]. Als Folge transloziert CAR in den Zellkern und heterodimerisiert dort nach weiteren Phosphorylierungsprozessen mit RXR. Das CAR-RXR-Dimer bindet an das „PB-responsive enhancer“-Modul (PBREM) [88]. Es werden neben dem DR4-Motiv auch die Motive DR3, DR5 und ER6 gebunden [88-90]. CAR und PXR haben aufgrund gemeinsamer Erkennungsregionen auf der DNA Einfluss auf dieselben Zielgene [85, 91].

Androstane binden als direkte Liganden an CAR. Sie wirken als „inverse Agonisten“ repressiv auf CAR-vermittelte Transkriptionen, indem die Bindung von mit CAR assoziierten Koaktivatoren aufgelöst wird [92]. Im Gegenzug wirken Estrogene im Mausmodell als Aktivatoren von CAR. In menschlichen Zellen konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden [93].

1.5.2.3. AhR - Aryl-Hydrocarbon-Receptor

Über die Aktivierung des Ah-Rezeptors können die CYP-Enzyme der Familie 1 induziert werden. Inaktiv liegt der Ah-Rezeptor cytosolisch in einem Proteinkomplex mit den Chaperonen Hsp90, ARA9 und p23, sowie weiteren Faktoren vor [94]. Durch Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung und der Proteinkomplex transloziert in den Nucleus. Dort lösen sich die Chaperone vom AhR-Komplex und der Ah-Rezeptor bildet mit dem Protein ARNT (AhR nuclear translocator) ein Heterodimer [95, 96]. Über die Bindung an das „dioxin-responsive element“ werden unter anderem die Cytochrom P450 Enzyme CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 induziert [97-99]. Halogenierte aromatische Hydrocarbone wie 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD), polychlorinierte Biphenyle und Benzofurane stellen neben Dioxin Liganden für den Ah-Rezeptor dar [100].

1.6. Herausforderung

Die Superfamilie der Cytochrom P450 Enzyme ist hoch konserviert. Enzyme mit einer Sequenzidentität von >40% werden in Familien zusammengefasst, Enzyme mit >55%

Sequenzidentität in Unterfamilien [101]. Aufgrund der hohen Sequenzidentität ist die Analyse der Cytochrom P450 Enzyme über Antikörper, die gegen die Sekundär- und Tertiärstrukturen immunisiert wurden, aufgrund der hohen Struktur- und Sequenzähnlichkeit erschwert.

Eine weitere Herausforderung stellen die zum Teil niedrigen, zusätzlich stark zwischen den biologischen System variierenden Expressionsspiegel der Cytochrom P450 Enzyme dar [102]. Aufgrund der genetischen Varianz sind zwischen Individuen unterschiedlich stark ausgeprägte Expressionsspiegel zu erwarten [103]. Da mögliche Prädispositionen mit Medikamenten und anderen Fremdstoffen Cytochrom P450 Enzyme stark induzieren können [61], müssen Testsysteme zur Quantifizierung des Cytochrom P450 Systems einen großen dynamischen Bereich abdecken können.

2. Ziele der Arbeit

Das Cytochrom P450 System nimmt im menschlichen Fremdstoffmetabolismus eine bedeutende Rolle ein. Da die Untersuchung des Enzymsystems bislang vorwiegend auf mRNA-Expressionsstudien und Enzymaktivitätstests beruht, soll in dieser Arbeit ein immunoaffinitätsbasiertes Testsystem entwickelt werden, das die Quantifizierung der Cytochrom P450 Enzyme auf Proteinebene ermöglicht.

Die Expression der CYP-Enzyme variiert zwischen Individuen stark. Dies kann sowohl genetisch, als auch durch exogene Faktoren, denen das Individuum ausgesetzt ist, bedingt sein. Fremdstoffe können die Expression von CYP-Enzymen um ein Vielfaches induzieren. Zur Untersuchung bedarf es aus diesem Grund Testsysteme, die einen großen dynamischen Bereich aufweisen.

Die zum Teil sehr niedrigen Konzentrationsspiegel der Cytochrom P450-Enzyme, sowie limitierte Mengen an Probenmaterial, wie beispielsweise Biopsien, erfordern ein sehr sensitives Testsystem. Zwar ermöglicht eine auf LC-MRM basierende Quantifizierungsmethode im Vergleich zu 2D-Gelelektrophorese und Western Blot einen höheren Probendurchsatz, sowie einen erweiterten dynamischen Bereich, doch stellen niedrige CYP-Konzentrationsspiegel und durch Probenkomplexität bedingte Suppressionseffekte eine Limitierung des Systems dar.

Aufgrund der Proteinhomologie in der Superfamilie der Cytochrom P450 Enzyme existieren nur wenige Antikörper, die die Unterscheidung zwischen einzelnen Vertretern der Enzymfamilie ermöglichen.

Eine auf Antikörpern basierende Anreicherungsstrategie soll diesen Herausforderungen begegnen. Nach Immunopräzipitation, chromatographischer Auftrennung und Detektion im Massenspektrometer ist die Quantifizierung von allen im menschlichen Fremdstoffmetabolismus beteiligten CYP-Enzymen angestrebt. Die Möglichkeit, mehrere Tests miteinander kombinieren zu können, stellt aufgrund der meist geringen Probenmengen ein entscheidendes Ziel dar. Es besteht die Absicht, die simultane Quantifizierung möglichst vieler CYP-Enzyme direkt aus Zellkultur- oder Gewebelysat zu erreichen.

Ziele der Arbeit |

Die zu entwickelnden Tests sollen die Möglichkeit bieten, Induktionsprozesse in Zellkulturexperimenten kleineren Formats (96-Well-Format) analysieren zu können. Hauptaugenmerk liegt auf einer hohen Sensitivität der zu entwickelnden Teststrategie.

Für die Entwicklung der Tests wurden folgende Arbeitspakete definiert:

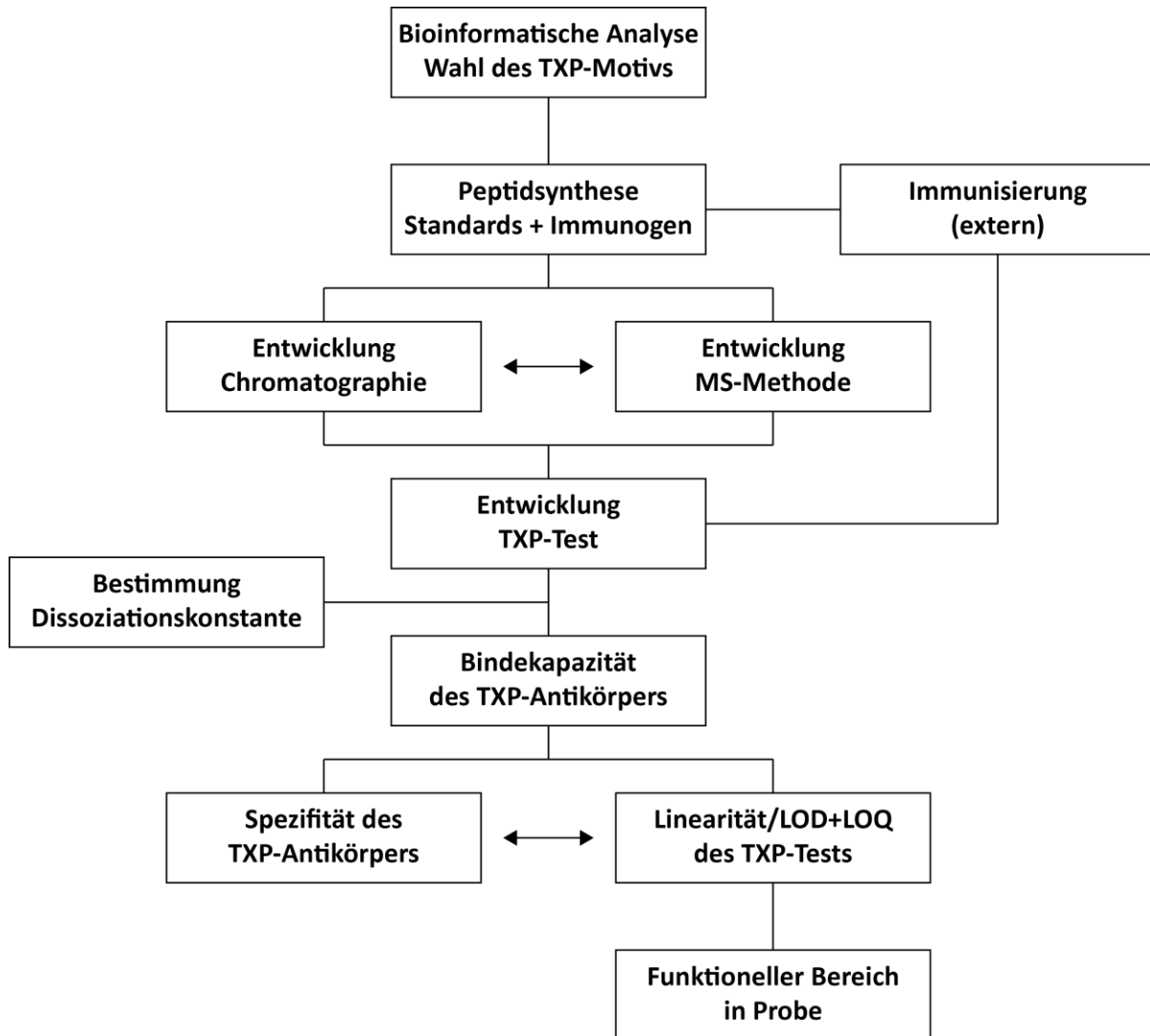


Abbildung 3 - Prozessstrategie zur TXP-Test-Entwicklung

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril, LC-MS Grade	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
Bactosomes - CYP1A1R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP1A2R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2A6R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2A13R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2B6R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2C8R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2C9R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2C18LR Easy CYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2C19R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2D6R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP2E1R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP3A4R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP3A5R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - CYP3A7R EasyCYP	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Bactosomes - Reductase	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
BCA Protein Assay Reagent (Bicinchoninsäure)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Blocking Reagent (for ELISA)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]- 1-propanesulfonat (Chaps)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]- carbodiimid hydrochlorid (EDC)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Iodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
n-Octyl-β-Glucopyranosid (NOG)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements (Gibco®)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Primary Hepatocyte Maintenance Supplements (Gibco®)	Life Technologies, Carlsbad, USA
2-Propanol, LC-MS Grade	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)- butyrat (Sulfo-SMBP)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Triethanolamin (TEA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin (Protease - MS-Grade)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasser (LC-MS Grade)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
10 mL Spritze	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
1,5 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
15 mL PP Reaktionsgefäß	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
50 mL PP Reaktionsgefäß	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96-Well PCR-Mikrotiterplatte	Thermo Scientific, Waltham, USA
96-Well Mikrotiterplatte, klar, flacher Boden	Thermo Scientific, Waltham, USA
96-Well Mikrotiterplatte mit Filtereinheit	Merck Millipore, Billerica, USA
96-Well Zellkulturplatte - Collagen I coated (Gibco®)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Dynabeads® Protein G	Life Technologies, Carlsbad, USA
HiTrap NHS-Activated HP	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
KG-Schraubkappe	VWR, Radnor, USA
KingFisher™ 96 tip comb (PCR-Kämme)	Thermo Scientific, Waltham, USA
LTQ Velos ESI Positive Calibration Solution	Thermo Scientific, Waltham, USA
Luminex® xMap® Mikrosphären	Luminex, Austin, USA
MicroAmp® 8-Cap Strip	Life Technologies, Carlsbad, USA
Mikroeinsatz 0,1 mL, 31x6mm	VWR, Radnor, USA
PCR-Mikroplatten-Verschussfolie (AxySeal®)	Corning, New York, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
William's E Medium (Gibco®)	Life Technologies, Carlsbad, USA

3.1.3. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Bestandteile	Konzentration
ABC-Puffer pH 7,4	NH ₄ HCO ₃ NH ₃	50 mM pH-Justierung

Puffer und Lösungen	Bestandteile	Konzentration
Auftau- und Anwachsmedium	Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements L-Glutamin William's E Medium	
Erhaltungsmedium	Primary Hepatocyte Maintenance Supplements L-Glutamin William's E Medium	
Lysepuffer	Triton X-100 SDS NaCl Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O EDTA	0,5 % 0,01 % 0,15 M 0,01 M 2 mM
PBS pH 7.4	NaCl KCl H ₃ PO ₄	137 mM 2,7 mM 12 mM
TEA-Puffer 1 - pH 8,5	Triethanolamin	50 mM
TEA-Puffer 2 - pH 8,5	Triethanolamin	100 mM
Waschpuffer pH 7,4	PBS Tween-20	1x 0,05%

3.1.4. Geräte

Geräte	Hersteller
ÄKTExpress™	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
FlexMap 3D® - Durchflusszytometer	Luminex, Austin, USA
KingFisher™ 96 - Magnet Partikel Prozessor	Thermo Scientific, Waltham, USA
KingFisher™ Flex - Magnet Partikel Prozessor	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikro-Disembrator U	Sartorius, Göttingen, Deutschland
pH-Meter 766	Knick, Berlin, Deutschland
Q Exactive™ - Orbitrap Mass Spectrometer	Thermo Scientific, Waltham, USA

Geräte	Hersteller
Q Exactive Plus™ - Orbitrap Mass Spectrometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Rotator Revolver Mixer	Labnet, Edison, USA
Rotilabo®-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sonoplus HD60	Bandelin, Berlin, Deutschland
Taumel-Rollenmischer RM 5	Assistent, Sondheim, Deutschland
Thermo Mixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UltiMate 3000 RSLCnano System	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ultraschallbad Sonorex RK 31	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Ultraschallbad Transsonic T780/H	Bender & Hobein, Bruchsal, Deutschland
Varioschüttler KL-2	Edmund Bühler Lab Tec, Hechingen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Explorer	OHAUS Waagen, Bad Hersfeld, Deutschland
Waage HF200G	A&D Engineering, San Jose, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R, gekühlt	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.5. Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS5	Adobe, San Jose, USA
Adobe Illustrator CS5	Adobe, San Jose, USA
BindIt Software 3.0	Thermo Scientific, Waltham, USA
Chromeleon 6.8	Thermo Scientific, Waltham, USA
Endnote X6	Thomson, Philadelphia, USA

Software	Hersteller
Microsoft Office 2011	Microsoft, Redmond, USA
Origin 7.5	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Pinpoint 1.2	Thermo Scientific, Waltham, USA
Proteome Discoverer 1.3	Thermo Scientific, Waltham, USA
Xcalibur 3.0	Thermo Scientific, Waltham, USA
xPONENT Software Solutions IS 2.2	Luminex, Austin, USA

3.1.6. Datenbanken

Datenbanken/Suchmaschine	Hersteller
Complete Proteome Set (08/2013)	UniProt Konsortium
Mascot - Version 2.3.02	Matrix Science Ltd., London, Großbritannien
SEQUEST - Version 28.0.0.0	University of Washington, Seattle, USA

3.2. Herstellung polyklonaler TXP-Antikörper

Die Immunisierung der polyklonalen TXP-Antikörper wurde von der Firma „Pineda Antikörper-Service“ (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Das für die Immunisierung erforderliche Antigenkonjugat wurde nach Hoeppe et al. über Kopplung eines Immunisierungspeptides an das Trägerprotein KLH hergestellt. Immunisierungspeptid und Trägerprotein wurden kovalent über einen molekularen Abstandsgewinner miteinander verknüpft [58].

3.3. Auswahl der TXP-Motive für die Gewinnung polyklonaler Antikörperseren und die Synthese proteinspezifischer Nachweispeptide

Die Auswahl der TXP-Motive gründete sowohl auf der Anwendung eines kombinatorischen bioinformatischen Ansatzes, als auch auf der physiologischen Bedeutung der zu

untersuchenden Proteine. Die bioinformatische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Hannes Planatscher (NMI Reutlingen) durchgeführt [59, 60]. Hierzu wurden alle Sequenzinformationen des menschlichen Proteoms (UniProt-Datenbank - Version 06/2009) *in silico* tryptisch fragmentiert. Die theoretischen Fragmente wurden daraufhin in mehreren aufeinander aufbauenden Schritten gefiltert. Die TXP-Motive sollten C-terminal gelegen sein und vier Aminosäuren umfassen.

Hierbei stand die Bedingung im Vordergrund, mit einer möglichst kleinen Anzahl an Motiven möglichst viele proteospezifische Peptide einer zuvor definierten Anzahl an Proteinen zu adressieren. Sequenzen, die sich aus weniger als sechs Aminosäuren zusammensetzen, sowie Peptidsequenzen mit einer Masse über 2000 Dalton, wurden nicht für die Motivwahl berücksichtigt. Da die Aminosäure Methionin leicht oxidieren kann, wurden Sequenzen mit dieser Aminosäure im Motiv nicht für eine Motivwahl herangezogen. Es wurde, sofern möglich, auf Motive verzichtet, die in potentiellen Fragmenten aus dem hoch abundanten Protein Serumalbumin vorkommen. Durch diese Einschränkung soll vermieden werden, dass hoch abundante Peptide gleichen Motivs die Kapazität des Antikörpers soweit einschränken, dass die Quantifizierung nach chromatographischer Auftrennung und Detektion im Massenspektrometer nicht oder nur unzureichend möglich ist.

3.4. Antikörperaufreinigung

Nach Immunisierung standen 60-80 mL Kaninchenserum pro Tier zur Verfügung. Die TXP-Antikörper wurden über eine Affinitätsanreicherung nach Hoeppe et al. gewonnen [58]. Hierzu wurden pro Reinigungszyklus 20 mL Serum über PES-Spritzenfilter (0,22 µm) steril filtriert und die TXP-Antikörper über ein chromatographisches Aufreinigungssystem (ÄKTexpress, GE Healthcare) gewonnen. Hierzu wurden HiTrap-Säulen (HiTrap NHS-Activated HP) mit einem Volumen von 1 mL eingesetzt. Diese enthalten NHS-aktivierte Sepharose, die über einen Abstandshalter kovalent mit Motivpeptiden gekoppelt wurden. Nach Anreicherung wurden die TXP-Antikörper mithilfe von Citratpuffer (pH 2,5) sauer eluiert und anschließend entsalzt. Über eine Kombination aus drei 5 mL-Gelfiltrationssäulen wurden die angereicherten Antikörper in PBS umgepuffert. Die Antikörper wurden nach Zugabe von 0,05% Azid bei 4°C gelagert.

3.5. Peptidsynthese

Die für die Immunisierung und Antikörperaufreinigung verwendeten Peptide wurden von der INTAVIS AG synthetisiert. Der Reinheitsgrad wurde über HPLC und MALDI-MS bestimmt. Für alle isotoopenmarkierten Peptide, die nach abgeschlossener Testentwicklung in Quantifizierungsstudien eingesetzt wurden (ab 4.2.8), wurde eine Aminosäureanalyse (ASA) durchgeführt (siehe 3.14).

3.6. Gewebeaufschluss

Gewebeproben wurden unter Kühlung (Stickstoff) im Mörser in grobe Stücke zerkleinert (5 - 20 mg). Mithilfe einer Kugelmühle (Mikro-Disembrator U, Sartorius, Deutschland) wurden die durchschnittlich 10 mg schweren Bruchstücke pulverisiert. Die pulverisierten Gewebereste wurden in 300 µL Lysepuffer aufgenommen und 1 h bei 4°C in einem Rotator (Rotator Revolver Mixer, Labnet, USA) lysiert. Nicht gelöste Bestandteile wurden bei 4°C und 15.000 x g abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mittels eines BCA-Tests bestimmt (3.9).

3.7. Zellkultur

Für Induktionsexperimente wurden kryokonservierte Hepatozyten (Human Plateable Hepatocytes, Induction Qualified (HU8148) - Life Technologies) verwendet. Die Zellen wurden im 96-Well-Format in kollagenisierten Zellkulturplatten kultiviert. Pro Well wurden 50 000 Zellen ausgesät.

Auftauprozess und Anwachsphase erfolgte unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Auftau- und Anwachsmediums. Der erste Medienwechsel erfolgte nach 24 h. Ab diesem Zeitpunkt wurde Erhaltungsmedium eingesetzt. Nach 48 h erfolgte die Induktion mit den Wirkstoffen Rifampicin (10 µM), Phenobarbital (3 mM) und Omeprazol (100 µM).

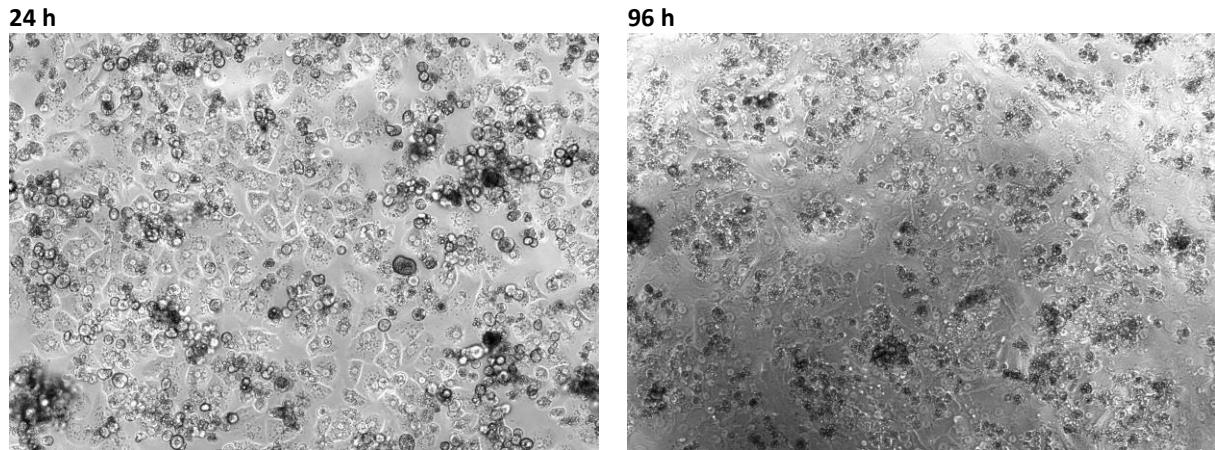


Abbildung 4 - Kultivierung kryokonservierter Hepatozyten im 96-Well-Format (Medium + 0,1% DMSO)

Die Wirkstoffe Rifampicin und Omeprazol wurden in DMSO, Phenobarbital in Wasser gelöst. Um Vergleichbarkeit zwischen den Zellbehandlungen zu gewährleisten, wurde DMSO sowohl bei den Zellbehandlungen mit Phenobarbital, als auch bei Kontrollbehandlungen zugegeben. Die DMSO-Konzentration betrug hierbei 0,1% (Kontrolle 1).

Um DMSO-bedingte induktive Effekte auf das Cytochrom P450 über die Kultivierungsdauer ermitteln (96 h), wurden zusätzlich Kontrollbehandlungen mit Erhaltungsmedium ohne DMSO-Zugabe (Kontrolle 2) durchgeführt [104, 105].

Tabelle 2 - Kultivierung kryokonservierter Hepatozyten - Behandlungsschema

Phasen t	Anwuchsphase		Induktionsphase		
	0h	24h	48h	72h	96h
Tätigkeit	Zellaussaat	Medienwechsel	Induktion (1. Zugabe)	Induktion (2. Zugabe)	Zellernte
Induktion	Anwachsmedium	Erhaltungsmedium	Wirkstoff (1. Zugabe)	Wirkstoff (2. Zugabe)	Lysepuffer
Kontrolle 1	Anwachsmedium	Erhaltungsmedium	Medium (0,1% DMSO)	Medium (0,1% DMSO)	Lysepuffer
Kontrolle 2	Anwachsmedium	Erhaltungsmedium	Medium (0% DMSO)	Medium (0% DMSO)	Lysepuffer

3.8. Zellyse nach Zellkultur im 96-Well-Format

Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen mit eiskaltem PBS einmal gewaschen und durch Zugabe von 30 µL Lysepuffer lysiert. Die Zellen wurden im Anschluss 1 h in einem Kühlraum auf einem Schüttler bei 4°C lysiert. Die vollständige Ablösung des Zellrasens wurde

durch Abkratzen der Zellen mithilfe einer 20-200 µL-Pipettenspitze erreicht. Die Lysate wurden in 96-Well PCR-Platten überführt und bei 3000 x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Über einen BCA-Test wurde die Proteinkonzentrationen der Überstände bestimmt.

3.9. Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde ein BCA-Test der Firma Thermo Scientific (BCA Protein Assay Reagent) verwendet.

3.10. Tryptische Proteolyse

3.10.1. Tryptische Proteolyse von Gewebelysaten und Mikrosomenfraktionen

Jeweils 40 µg Protein wurden pro Proteolyseansatz eingesetzt und mit Lysepuffer auf ein Volumen von 20 µL aufgefüllt. Nach Zugabe von 180 µL TEA-Puffer 1 (50 mM) und 10 µL NOG (10%) wurden die Proteine mit TCEP (5 mM) bei 99°C für 5 min in einem Schüttler mit 650 rpm reduziert. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurde Iodacetamid (1 M) mit einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und die Proben für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln in einem Schüttler inkubiert. Trypsin (Pierce - MS-Grade) wurde im Verhältnis von 1:40 zur vorher bestimmten Proteinkonzentration eingesetzt (1 µg). Die enzymatische Proteolyse erfolgte im Schüttler bei 650 rpm über 16 h bei 37°C im Dunkeln. Die Protease Trypsin wurde durch einen Erhitzungsschritt inaktiviert. Hierzu wurde die Probe 5 min bei 99°C auf einem Schüttler erhitzt. Nach Abkühlung der Probe wurde PMSF (200 mM) mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Nach Beendigung der Proteolyseprozedur lag ein Volumen von 220 µL vor.

3.10.2. Tryptische Proteolyse von Zelllysaten im 96-Well-Format

Für die Proteolyse im 96-Well-Format wurden, je nach Proteingehalt Zellkulturhomogenat, zwischen 5 und 20 µg Protein eingesetzt. Das Lysat wurde mit Lysepuffer auf ein

Gesamtvolumen von 30 μL aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 70 μL TEA-Puffer 2 (100 mM) und 10 μL NOG (10%). Die Reduktion der Proteine erfolgte durch Zugabe von 1 μL TCEP (0,55 M) und einer anschließenden Inkubation bei 99°C für 5 min auf dem Schüttler bei 650 rpm. Nach Abkühlung wurden 2 μL einer 0,55 M Iodacetamidlösung hinzugegeben. Es folgten 30 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln. Im Anschluss wurden 4 μL einer 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konzentrierten Trypsinlösung zugegeben und die Proben bei 37°C im Dunkeln auf dem Schüttler bei 650 rpm inkubiert. Nach 16 h erfolgte die Zugabe von weiteren 4 μL Trypsinlösung. Die Verdauprozedur wurde nach 40 h durch fünfminütiges Erhitzen bei 99°C auf einem Schüttler (650 rpm) abgestoppt. Im Anschluss wurden 5 μL PMSF (46 mM) hinzugegeben. Das Verdauvolumen betrug nach Beendigung des enzymatischen Proteolyse 126 μL .

3.11. Automatisierung der Immunopräzipitation

Für die Automatisierung der Immunopräzipitationsprozedur kam ein Magnet Partikel Prozessor System (KingFisher™ 96/Flex, Thermo Scientific) auf der Basis von 96-Well-PCR-Platten zum Einsatz. Die Durchführung der Immunoaffinitätsanreicherung wurden in vorherigen Arbeiten bereits beschrieben [42, 60].

In einem ersten Schritt wurden die Proben mit einem oder mehreren TXP-Antikörpern für 1 h inkubiert. Mit PBS, das mit 0,3% Chaps versetzt war (PBSC), wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 μL aufgefüllt. In sechs zehnminütigen Zyklen wurden die Proben abwechselnd 2 min gemischt und 8 min ruhen gelassen.

In einem zweiten Schritt wurden magnetische Partikel, die mit Protein G besetzt sind (Dynabeads® Protein G, Life Technologies), zu den ausgebildeten Peptid-Antikörper-Komplexen hinzugegeben. Pro eingesetztem Mikrogramm Antikörper wurden 5 μL einer zuvor mit PBSC gewaschenen Partikelsuspension eingesetzt. Der Fc-Teil der TXP-Antikörper konnte in einer weiteren einstündigen Inkubation an das Protein G auf den Partikeln binden. Die Mischzyklen orientierten sich an denen des ersten Inkubationsschrittes.

Nach Ausbildung der Peptid-Antikörper-Partikelkomplexe schlossen sich fünf Waschzyklen an. In den ersten beiden Waschschrritten wurden PBSC und in den folgenden drei

Waschschritten Ammoniumbicarbonatpuffer mit 0,3% Chaps (ABCC) verwendet. Die Peptide wurden sauer in 20 µL 1% Ameisensäure eluiert.

3.11.1. Bindekapazität aufgereinigter polyklonaler TXP-Antikörper

Der Einsatz von 1 µg TXP-Antikörper ermöglicht in der Theorie die Bindung von 13,3 pmol Peptid. Hierzu wurden isotopenmarkierte Peptide mit jeweils 1 pmol in den Immunopräzipitationsprozess eingesetzt. Den Antikörpern standen, abhängig von der Anzahl motivgleicher Peptidsequenzen, unterschiedlich viele Peptide für eine Präzipitation zur Verfügung. Dem Antikörper anti-FSGR standen mit 6 verschiedenen motivgleichen Peptidsequenzen 6 pmol, dem Antikörper anti-LPNK mit 4 unterschiedlichen Peptiden 4 pmol und dem Antikörpern anti-ENLR mit nur einem Motivpeptid 1 pmol präzipitierbares isotopenmarkiertes Peptid zur Verfügung (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 - TXP-Motive und Analytanzahl pro Antikörper. Pro Motivpeptid wurden 1 pmol eingesetzt.

	TXP-Motiv	# Peptide
1	EEWK	1
2	ENLR	1
3	ETFR	2
4	FIK	1
5	FSGR	6
6	FVEK	1
7	IQER	2
8	LAER	2
9	LPNK	4
10	NGER	1
11	STTR	2
12	SVLK	1
13	VIGR	3

Zur Quantifizierung der eluierten Peptidmenge wurden in der Elutionsplatte 1 pmol nicht markierte Peptide vorgelegt. Um Verdunstung und Adsorptionseffekte zu minimieren, wurden die Referenzpeptide erst kurz vor der Elution in die PCR-Platte gegeben. Nach Elution wurde das Eluat in Glaseinsätze überführt und pro Probe 5 µL für einen LC-MS-Lauf injiziert.

Die chromatographische Auftrennung erfolgte über einen Stufengradienten, der ausgehend von 15% Eluent B (100% B = Eluent B: 80% ACN, 20% H₂O, 0,1% FA), über acht Minuten auf 40% Eluent B ansteigt (siehe 3.13). Die Quantifizierung erfolgte über eine tSIM-MS-Methode (siehe 3.13.1).

3.11.2. Epitopanalysen der TXP-Antikörper

Um die Spezifität der angereicherten TXP-Antikörper zu testen, wurde eine Immunopräzipitation unter Einsatz von 5 µg Antikörper aus 20 µg tryptisch fragmentiertem Zelllysat (3.10.1) durchgeführt. Die Peptid-Antikörper-Komplexe wurden mit 25 µL PBSC gewaschener Partikelsuspension angereichert.

Nach Elution des Peptidgemischs in 20 µL 1% Ameisensäure wurden 10 µL Eluat für die anschließende chromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Analyse injiziert.

3.11.3. Peptidverdünnung

Alle Peptide wurden nach der Synthese in ddH₂O gelöst und in einer Konzentration von 1 mM bei -20°C gelagert. Alle seriellen Verdünnungen wurden, wenn nicht explizit auf andere Weise beschrieben, in Blockierungspuffer durchgeführt. Die für die Quantifizierung benötigten isotopenmarkierten Referenzpeptide wurden ebenso in Blockierungspuffer verdünnt.

3.12. Bestimmung von Bindungsaffinitäten mittels mikrosphärenbasierten Konkurrenztests

Die Bindungsaffinitäten der aufgereinigten polyklonalen Antikörperseren wurden über einen mikrosphärenbasierten Konkurrenztest bestimmt [106, 107].

Die TXP-Antikörper (10 ng/mL) wurden hierzu mit dem Peptid, das für die Aufreinigung eingesetzt wurde, für 1 h inkubiert. Die Peptide wurden hierzu in 12 Konzentrationen eingesetzt. Als serielle Verdünnung (1:3) wurden diese, ausgehend von einer Höchstkonzentration von 5 µM, in 11 Schritten bis zu einer Konzentration von 28 pM verdünnt. Die Antikörper und Peptidverdünnungen wurden jeweils in Volumina von 30 µL gemischt.

Für den zweiten Inkubationsschritt wurden mit Motivpeptid beschichteten Mikrosphären hinzugegeben. Diese waren im Vorhinein herzustellen:

Hierzu wurden die auf den Mikrosphären befindlichen aktivierten Carboxylgruppen mit BSA beladen [58, 108]. Über den Abstandshalter sulpho-SMPB wurden die TXP-Motivpeptide über ein in der Sequenz enthaltenes Cystein an den Abstandshalter auf den Mikrosphären konjugiert [58].

Es wurden pro Ansatz 500 Mikrosphären in einem Volumen von 10 µL hinzugegeben. Für die Einstellung des Bindungsgleichgewichtes folgte eine Inkubation von 45 min. Um die Peptid-Antikörper-Mikrosphären-Komplexe zu detektieren, wurden 30 µL eines mit Phycoerythrin markierten anti-Kaninchen-Antikörpers für 30 min hinzugegeben (2,5 µg/mL). Es folgten zwei Waschschrte mit Waschpuffer und die Aufnahme in Blockierungspuffer mit anschließender Vermessung in einem Durchflusszytometer (FlexMap 3D™, Luminex). Eine Eichreihe des verwendeten Antikörpers wurde, ausgehend von 100 ng/mL, in zehn seriellen Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:3 angefertigt, um den freien Anteil an Antikörper zu quantifizieren. Ebenso wurde eine Blindprobe erstellt.

3.13. LC-MS-Analyse

Allen MS-Analysen ging eine Auftrennung über ein Hochdruckflüssigkeitschromatographiesystem (Ultimate 3000 Nano HPLC System, Thermo Scientific) voran. Als Vorsäule diente hierbei eine C18 PepMap100 µ-Precolumn (Innendurchmesser: 300 µm x 5 mm; Partikelgröße: 5 µm; Porengröße: 100 Å - Thermo Scientific). Die Trennung erfolgte über eine analytische C18-Säule mit einer Länge von 150 mm, einer Partikelgröße von 2,2 µm und

einer Porengröße von 100 Å (Acclaim Rapid Separation LC (RSLC) Column - Thermo Scientific).

Für die Bindung der Probe auf die Vorsäule wurde Beladungspuffer (98% ddH₂O, 2% ACN, 0,05% TFA) und eine Flussrate von 20 µL/min verwendet. Der Säulenofen war auf 40°C eingestellt. Als Laufmittel A diente ddH₂O mit 0,1% FA. Laufmittel B setzte sich aus 80% ACN, 20% ddH₂O und 0,1% FA zusammen. Die analytische Trennung erfolgte mit einer Flussrate von 300 nL/min.

3.13.1. Peptidquantifizierung mittels tSIM-MS-Methode (targeted Single Ion Monitoring)

Bei allen Experimenten, deren Ziel es war, Analyten im Verhältnis zu einem isotopenmarkierten Referenzpeptid zu quantifizieren, kam eine „targeted Single Ion Monitoring“-Methode (tSIM) zum Einsatz. Die Methode war hierbei um die Möglichkeit erweitert, bei ausreichend starker Signalintensität in festen Zeitabständen ein verifizierendes MS/MS-Spektrum aufzunehmen (tSIM → ddMS²). Alle tSIM-ddMS²-Gradienten hatten eine Laufzeit von 18 min und wurden im Positivmodus mit der Vorgabe, zweifach geladene Ionen zu berücksichtigen, vermessen. Die Massen der Zielanalyte wurden in einer „inclusion list“ der Methode zugeführt.

Tabelle 4 - Gerätekonfiguration der für die Peptidquantifizierung verwendeten tSIM-Messmethode

SIM-Einstellungen	
Resolution	35 000
AGC target	5e6
Maximum IT	60/120 ms
Loop count	2
MSX count	2
Isolation window	2.0 m/z
Scan range	300 to 1200 m/z

datenabhängiges-MS ²	
Resolution	17 500
AGC target	2e5
Maximum IT	60/120 ms
Loop count	1
TopN	1
Fixed first mass	---
NCE / stepped NCE	30

datenabhängige Einstellungen	
Underfill ratio	0.6%
Intensity threshold	2.0e4
Apex trigger	---
Charge exclusion	---
Peptide match	---
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	2.0 s

3.13.2. Peptididentifikation mittels FULL-MS-Methode

Für Experimente, bei denen die Identifikation von Analyten mittels MS/MS im Vordergrund stand, wurde eine „FULL MS“-Methode mit anschließender MS/MS-Fragmentierung angewendet (FULL MS → ddMS2). Es wurde im Positivmodus gemessen und ein zweifacher Ladungsstand als Standard gewählt. Die Laufzeit der Gradienten betrug 45 min. Die Trennung erfolgte über 20 min von 4% auf 55% Eluent B. Es schlossen sich mehrere Waschschrte an.

Tabelle 5 - Gerätekonfiguration der für die Peptididentifikation verwendeten FULL-MS-Messmethode

FULL MS	
Resolution	70 000
AGC target	3e6
Maximum IT	100 ms
Scan range	300 to 2000 m/z

datenabhängige Einstellungen	
Underfill ratio	0.0%
Intensity threshold	0.0
Apex trigger	---
Charge exclusion	unassigned, 1, 5-8, >8
Peptide match	---
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	5.0 s

datenabh.-MS²/datenabh.-SIM	
Resolution	17 500
AGC target	5e5
Maximum IT	60 ms
Loop count	10
TopN	10
Isolation window	2.0 m/z
Fixed first mass	---
NCE / stepped NCE	25

3.13.3. Identifizierung von Peptiden mit Mascot und SEQUEST

Peptide wurde über eine Kombination zweier Algorithmen identifiziert. Grundlage für beide Suchstrategien bildete die Datenbank UniProt (Complete Proteome Set - 08/2013). Folgende Suchparameter wurden vorgegeben:

Tabelle 6 - Mascot-Suchparameter

Mascot - Version 2.3.02	
Protein Database	Complete Proteome Set (08/2013)
Enzyme name	Trypsin
Maximum Missed Cleavage Sites	1
Instrument	ESI-TRAP
Taxonomy	All entries
Precursor Mass Tolerance	5 ppm
Fragment Mass Tolerance	0.05 Da
Use Average Precursor Mass	false
Dynamic Modifications	Oxidation (M), Oxidation (HW)
Static Modifications	Carbamidomethyl (C)

Tabelle 7 - SEQUEST-Suchparameter

SEQUEST - Version 28.0.0.0	
Protein Database	Complete Proteome Set (08/2013)
Enzyme name	Trypsin
Maximum Missed Cleavage Sites	1
Precursor Mass Tolerance	5 ppm
Fragment Mass Tolerance	0.05 Da
Use Average Precursor Mass	false
Use Average Fragment Masses	false
Use Neutral Loss a Ions	True
Use Neutral Loss b Ions	True
Use Neutral Loss y Ions	True
Weight of a Ions	0
Weight of b Ions	1
Weight of c Ions	0
Weight of x Ions	0
Weight of y Ions	1
Weight of z Ions	0
Dynamic Modifications	Oxidation / +15.995 Da (H, M, W)
Static Modifications	Carbamidomethyl / + 57.021 Da (C)

Identifikationen, die sowohl über Mascot, als auch über SEQUEST erzielt wurden, wurden bei Auswertungen einfach gewichtet.

3.14. Zugabe von Referenzpeptiden in Quantifizierungsstudien

Nach abgeschlossener Testentwicklung (ab 4.2.8) wurde für alle Referenzpeptide, die in Quantifizierungsstudien eingesetzt werden sollten, eine Aminosäureanalyse durchgeführt (siehe 3.5).

Nachweispeptide wurden in den Immunopräzipitationsprozess für Quantifizierungsstudien in folgenden Mengen eingesetzt:

Tabelle 8 - Einsatzmengen isotopenmarkierter Peptide nach Aminosäureanalyse

Protein	Sequenz	MDR1-Expression nach Xenotransplantation	Quantifizierung in Mikrosomenfraktionen	Quantifizierung in Lebergewebe	Induktionsstudien
CYP1A1	IQEELDTVIGR*	--- fmol	76 fmol	7,6 fmol	7,6 fmol
CYP1A2	ELDTVIGR*	--- fmol	55 fmol	5,5 fmol	5,5 fmol
CYP2A6	GYGVVFSNGER*	--- fmol	63 fmol	6,3 fmol	6,3 fmol
CYP2A13	ELQGLEDFIAK*	--- fmol	77 fmol	7,7 fmol	7,7 fmol
CYP2B6	AEAFSGR*	--- fmol	56 fmol	5,6 fmol	5,6 fmol
CYP2C8	EALIDNGEEFSGR*	--- fmol	80 fmol	8,0 fmol	8,0 fmol
	VQEEIDHVIGR*	--- fmol	59 fmol	5,9 fmol	5,9 fmol
CYP2C9	GIFPLAER*	--- fmol	57 fmol	5,7 fmol	5,7 fmol
CYP2C18	EALIDHGEEFSGR*	--- fmol	75 fmol	7,5 fmol	7,5 fmol
CYP2C19	GHFPLAER*	--- fmol	54 fmol	5,4 fmol	5,4 fmol
CYP2D6	GTTLITNLSSVLK*	--- fmol	75 fmol	7,5 fmol	7,5 fmol
	GNPESSFNDENLR*	--- fmol	59 fmol	5,9 fmol	5,9 fmol
CYP2E1	DEFSGR*	--- fmol	81 fmol	8,1 fmol	8,1 fmol
CYP2F1	EALVDQGEEFSGR*	--- fmol	96 fmol	9,6 fmol	9,6 fmol
CYP2S1	EALGGQAEFSGR*	--- fmol	86 fmol	8,6 fmol	8,6 fmol
CYP3A4	LQEEIDAVLPNK*	--- fmol	57 fmol	5,7 fmol	5,7 fmol
CYP3A5	EIDAVLPNK*	--- fmol	56 fmol	5,6 fmol	5,6 fmol
CYP3A7	EIDTVLPNK*	--- fmol	56 fmol	5,6 fmol	5,6 fmol
MDR1	EANIHFIESLPNK*	51 fmol	51 fmol	5,1 fmol	5,1 fmol
CPR	ESSFVEK*	--- fmol	63 fmol	6,3 fmol	6,3 fmol

4. Ergebnisse

4.1. Geeignete TXP-Motive für den Nachweis proteinspezifischer Peptide

Für die Auswahl geeigneter TXP-Motive wurde eine bioinformatische Analyse durchgeführt. Hierfür war zunächst eine Auswahl an Zielproteinen zu definieren. Es wurden 16 Proteine ausgewählt. Die Zielgruppe setzte sich aus 15 Cytochrom P450-Enzymen und der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR) zusammen.

Die bioinformatische Analyse war in zwei Arbeitsschritte aufgeteilt. Im ersten Schritt wurden die Proteinsequenzen *in silico* tryptisch fragmentiert. Im zweiten Arbeitsschritt sollten durch einen Sequenzvergleich der C-terminal gelegenen vier Aminosäuren Motive ermittelt werden, die eine möglichst hohe Anzahl an Proteinen der zuvor definierten Zielgruppe teilt. Hierzu wurden ausschließlich proteotypische Peptidsequenzen berücksichtigt. Für die Analyse wurden Peptidsequenzen ab einer Länge von sechs Aminosäuren einbezogen.

Tabelle 9 - Auswahl von TXP-Motiven nach bioinformatischer Analyse. Eine definierte Auswahl an Proteinen, bestehend aus 15 am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Cytochrom P450-Enzymen und der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR), wurde *in silico* tryptisch fragmentiert und resultierende proteotypische Peptidsequenzen auf gemeinsame sequenzgleiche C-terminale Motive (TXP-Motive) abgeglichen.

	TXP-Motiv	# Treffer	CYP1A1	CYP1A2	CYP2A6	CYP2A13	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C18	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP2F1	CYP3A4	CYP3A5	CYP3A7	CPR
1	FSGR	5					X	X		X			X	X				
2	EEWK	3													X	X	X	
3	LPNK	3													X*	X	X	
4	VIGR	3	X	X				X										
5	LAER	2							X		X							
6	STTR	2	X	X														
7	ETFR	2	X	X														
8	FIAK	2			X	X												
9	SVLK	1										X						
10	ENLR	1										X						
11	NGER	1			X													
12	FVEK	1																X
13	IQER	1																X

Die bioinformatische Analyse lieferte für die Sequenz „FSGR“ fünf proteotypische Peptide, die in den Enzyme CYP2B6, CYP2C8, CYP2C18, CYP2E1 und CYP2F1 enthalten sind. Es ist

somit theoretisch möglich, mit einem gegen das Motiv „FSGR“ immunisierten Antikörper 31% der in der definierten Zielgruppe enthaltenen Proteine zu adressieren.

Die Enzyme CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 enthalten tryptische Sequenzen mit dem TXP-Motiv „EEWK“ und „LPNK“. Die in CYP3A4 vorkommende Peptidsequenz LQEEIDAVLPNK ist nicht proteotypisch (siehe Tabelle 9 - *). CYP3A43, ein Cytochrom P450 Enzym mit geringer Testosteron-Hydroxylase-Aktivität, beinhaltet ebenso diese Sequenz. Da CYP3A43, verglichen mit dem in der menschlichen Leber stark exprimierten CYP3A4, in sehr geringen Mengen vorkommt [102, 109], wurde das TXP-Motiv „LPNK“ ebenso für die Entwicklung eines CYP3A4-Tests als geeignet beurteilt und für eine Immunisierung ausgewählt.

Mit dem Motiv „VIGR“ lassen sich die beiden Zielanalyte CYP1A1 und CYP1A2 in CYP-Familie 1 und zusätzlich eine Peptidsequenz aus CYP2C8 adressieren. Proteotypische Peptide der Proteine CYP1A1 und CYP1A2 verfügen mit den Sequenztermini „STTR“ und „ETFR“ über weitere gemeinsame Motive. Proteinspezifische Sequenzen aus den Proteinen CYP2C9 und CYP2C19 teilen sich das Motiv „LAER“. Das Motiv „FIAK“ wird sowohl von einem proteotypischen Peptid in CYP2A6, als auch von einem proteinspezifischen Peptid aus CYP2A13 geteilt. Mit tryptischen Peptidsequenzen aus CYP2D6 und CPR lassen sich keine proteinspezifischen Sequenzteilmengen ausbilden. Für beide Proteine wurden jeweils zwei Motive für eine Immunisierung ausgewählt.

Um die 15 Cytochrom P450-Enzyme, sowie die NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase zu adressieren, werden demnach mindestens 7 TXP-Antikörper benötigt.

Neben der beschriebenen Proteingruppe decken die ermittelten Motive noch weitere Enzyme des Cytochrom P450-Systems ab. Das Motiv „NGER“ haben neben CYP2A6 ebenso proteinspezifische Sequenzen von CYP1B1 und CYP2S1 gemeinsam. Eine CYP2S1-Sequenz ist zusätzlich über das Motiv „FSGR“ adressierbar. Das Motiv „EEWK“ erlaubt die proteotypische Detektion von CYP3A43. Das Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1), ein ABC-Transporter, besitzt neben Peptiden von CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A4/CYP3A43 ebenso eine proteotypische Sequenz mit „LPNK“-Motiv.

Als Ergänzung zum hepatischen Fremdstoffmetabolismus wurde das im extrahepatischen Fremdstoffmetabolismus vorkommende CYP2S1 in die Analytliste der zu entwickelnden

Tests mit aufgenommen. Die Entwicklung eines CYP3A43-Tests soll nähere Erkenntnisse über die CYP3A43-Expression in der menschlichen Leber liefern und zusätzlich die Entwicklung eines kombinierten CYP3A4-Test ermöglichen, bei dem die über das Motiv „EEWK“ ermittelten CYP3A43-Menge mit der über das Motiv „LPNK“ angereicherten Peptidmenge aus CYP3A4/CYP3A43 errechnet werden kann. Die auf dem Motiv „LPNK“ beruhende Entwicklung der CYP3A4/CYP3A43-, CYP3A5- und CYP3A7-Tests wurde zusätzlich um den ABC-Transporter Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1) ergänzt. Von der Entwicklung eines CYP1B1-Tests wurde aufgrund der fehlenden biologischen Relevanz hinsichtlich des menschlichen Fremdstoffmetabolismus abgesehen.

Tabelle 10 - Zusammenstellung weiterer Cytochrom P450-Enzyme und thematisch verwandter Proteine, die über die bioinformatisch ermittelten Motive als Analyt adressierbar sind.

Protein	TXP-Motiv	UniProt-ID	Funktion
CYP1B1	NGER	Q16678	Synthese: Steroide, Fettsäuren, Retinoide
CYP2S1	FSGR	Q96SQ9	extrahepatischer Fremdstoffmetabolismus
CYP3A43	EEWK	Q9HB55	Testosteron-Hydroxylase-Aktivität
MDR1	LPNK	P08183	ABC-Transporter

Peptide mit einer Sequenzlänge von über 20 Aminosäuren wurden aufgrund des bei der angestrebten LC-MS-Anwendung zum Einsatz kommenden C18-Säulenmaterials nicht für eine Testentwicklung berücksichtigt.

Ebenso wurde von zwei auf dem Motiv „EEWK“ basierenden Testentwicklungen für die Enzyme CYP3A4 und CYP3A5 abgesehen. Die proteotypischen Nachweispeptide SAISIAEDEEWK (CYP3A4) und SAISLAEDEEWK (CYP3A5) unterscheiden an der jeweils fünften Position. Das CYP3A4-Peptid besitzt an der fünften Position ein Isoleucin, während das CYP3A5-Peptid ein Leucin aufweist. Da die beiden Aminosäuren und somit auch die beiden vollständigen Peptide die gleiche Masse haben, lassen sich diese auf MS-Ebene nicht voneinander unterscheiden. Da ein Aminosäureaustausch mit zwei isobaren Aminosäuren an derselben Sequenzposition vorliegt, entstehen auf MS2-Ebene keine unterschiedlich schweren Fragmente, die zu einer Unterscheidung herangezogen werden können. Aufgrund der sehr ähnlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften der beiden Aminosäuren war eine chromatographische Trennung mit den zur Verfügung stehenden Instrumenten nicht umsetzbar.

Tabelle 11 - Zusammenfassung der für die Testentwicklung benötigten proteotypischen Peptide. Angestrebte Testentwicklungen sind der Markierung in der Spalte „Test“ zu entnehmen.

	Protein	UniProt-ID	Motiv	Sequenz	Masse [Da]	Test
1	CYP1A1	P04798	VIGR	IQEELDTVIGR	1272,68	X
2			STTR	HSSFVPFTIPHSTTR	1713,87	X
3			ETFR	SHLPYMEAFILETFR	1853,93	X
4	CYP1A2	P05177	VIGR	ELDTVIGR	902,49	X
5			STTR	HSSFLPFTIPHSTTR	1727,89	X
6			ETFR	LSDRPQLPYLEAFILETFR	2308,23	X
7	CYP2A6	P11509	NGER	GYGVVFSNGER	1184,57	X
8			FAIK	HLPGPQQQAFQLLQGLEDFIAK	2478,31	
9	CYP2A13	Q16696	FAIK	ELQGLEDFIAK	1262,66	X
10	CYP1B1	Q16678	NGER	LGSCPIVVLNGER	1356,73	
11	CYP2B6	P20813	FSGR	AEAFSGR	737,36	X
12	CYP2C8	P10632	FSGR	EALIDNGEEFSGR	1436,67	X
13			VIGR	VQEEIDHVIGR	1294,68	X
14	CYP2C9	P11712	LAER	GIFPLAER	902,51	X
15	CYP2C18	P33260	FSGR	EALIDHGEEFSGR	1459,68	X
16	CYP2C19	P33261	LAER	GHFPLAER	926,48	X
17	CYP2D6	P10635	SVLK	GTTLITNLSSVLK	1346,79	X
18			ENLR	GNPESSFNDENLR	1478,65	X
19	CYP2E1	P05181	FSGR	DEFSGR	710,31	X
20	CYP2F1	P24903	FSGR	EALVDQGEEFSGR	1436,67	X
21	CYP2S1	Q96SQ9	FSGR	EALGGQAEFSGR	1350,63	X
22	CYP3A4	P08684	EEWK	SAISIAEDEEWK	1385,67	
23	CYP3A4/ CYP3A43	P08684/ Q9HB55	LPNK	LQEEIDAVLPNK	1368,74	X
24	CYP3A43	Q9HB55	EEWK	SALSFAEDEEWK	1411,64	X
25	CYP3A5	P20815	EEWK	SAISLAEDEEWK	1385,67	
26			LPNK	EIDAVLPNK	998,55	X
27	CYP3A7	P24462	EEWK	NAISIAEDEEWK	1404,66	X
28			LPNK	EIDTVLPNK	1028,56	X
29	MDR1	P08183	LPNK	EANIHFIESLPNK	1582,82	X
30	CPR	P16435	IQER	ATTPVIMVPGTGVAPFIGFIQER	2458,32	
31			FVEK	ESSFVEK	825,40	X

Die für die Immunierungspeptide ausgewählten Motive weisen proteomweit unterschiedliche Häufigkeiten auf. Das Motiv „FAIK“ kommt mit 33 proteotypischen Sequenzen unter den 13 bioinformatisch ermittelten Motiven am seltensten vor. Die Motive „SVLK“ und „LAER“ sind mit 204 und 201 Sequenzen über das sechsfache mehr vertreten. Über die 13 aus der bioinformatische Analyse hervorgehenden Motive gemittelt werden pro Motiv 91 verschiedene Peptidsequenzen adressiert.

Tabelle 12 - Anzahl der in die Testentwicklung eingehenden Peptide. Die proteomweit existierende Anzahl proteospezifischer Sequenzen gleichen Motivs ist dieser gegenübergestellt.

	TXP-Motiv	# Nachweispeptide pro Motiv für Testentwicklung	# Motivpeptide (proteomweit)
1	FSGR	5	85
2	EEWK	2	61
3	LPNK	4	50
4	VIGR	3	64
5	LAER	2	201
6	STTR	2	94
7	ETFR	2	61
8	FIAK	1	33
9	SVLK	1	204
10	ENLR	1	147
11	NGER	1	55
12	FVEK	1	64
13	IQER	1	62

4.2. Entwicklung einer auf TXP-Antikörpern basierenden Quantifizierungsmethode

4.2.1. Vorteile der auf Immunopräzipitation basierenden TXP-Quantifizierungsstrategie für die Verwendung kurzer chromatographischer Gradienten

Um die Vorzüge einer auf Immunopräzipitation basierenden Quantifizierungsstrategie unter Beweis zu stellen, wurde die Quantifizierung von Cytochrom P450 Enzymen in Hepatozytenlysat ohne und unter Verwendung einer Immunoaffinitätsprozedur durchgeführt.

Eine Limitierung des Versuches stellte die maximale Kapazität der Vorsäule (2 µg Protein) dar. Um einen direkten Vergleich zwischen der Vermessung mit und ohne Immunopräzipitation zu ermöglichen, wurden beide Versuche unter der Verwendung von 1 µg verdautem Hepatozytenlysat durchgeführt. Da nach Immunopräzipitation mit 5 µL lediglich 25% des gesamten Elutionsvolumens (20 µL) injiziert wurden, sind entsprechend bei der Vergleichsprobe ohne Immunopräzipitation 0,25 µg verdautes Hepatozytenlysat auf die Vorsäule geladen worden. Bei beiden Versuchsanordnungen wurden pro Zielsequenz

Ergebnisse |

10 fmol isotopenmarkiertes Referenzpeptid zugegeben. Somit waren jeweils 2,5 fmol für die chromatographische Auftrennung injiziert worden.

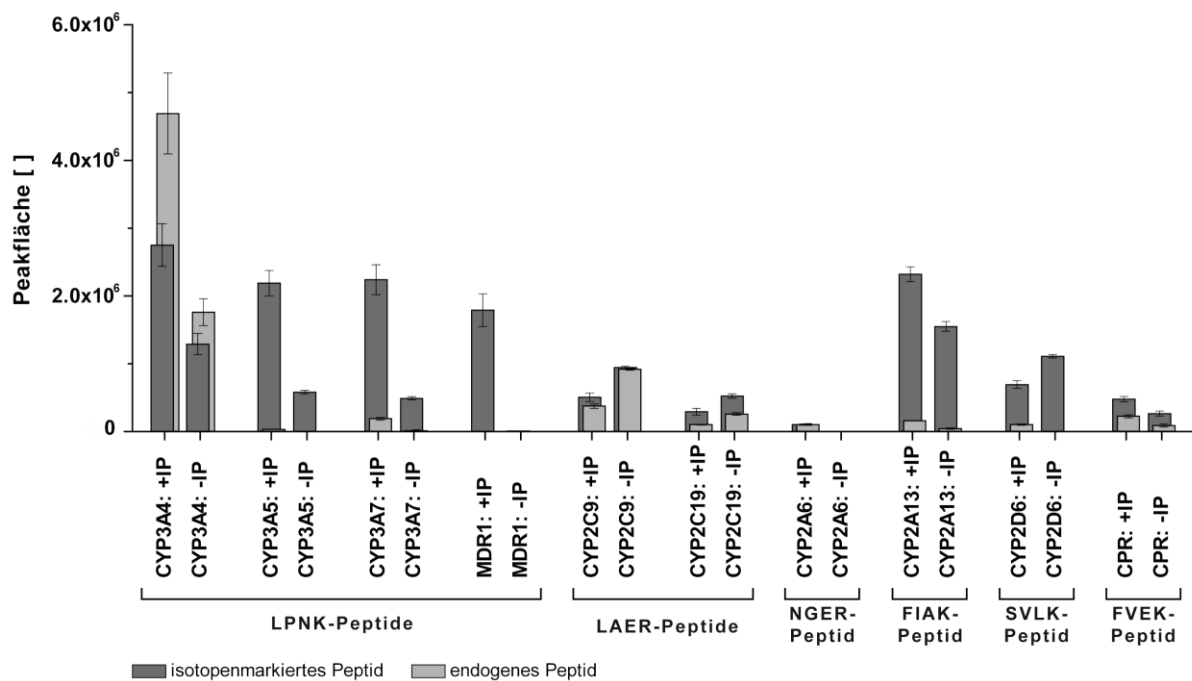
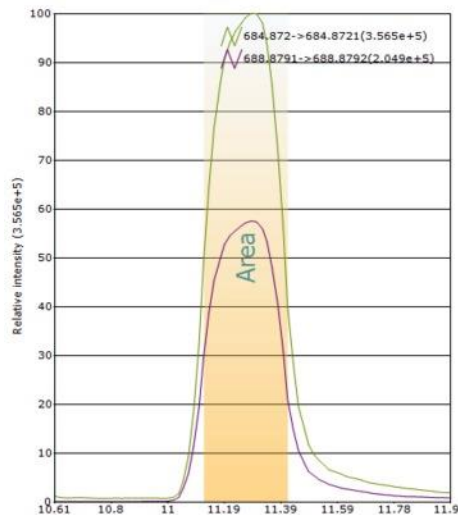
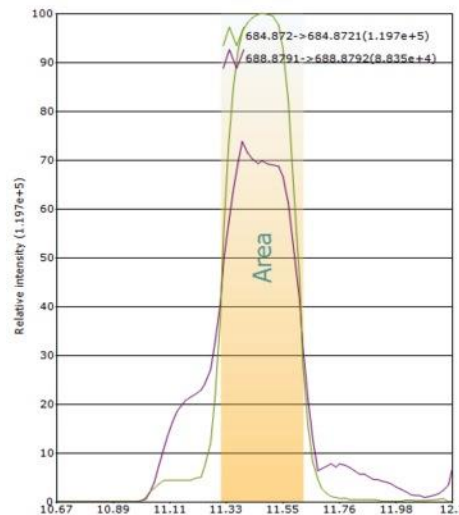


Abbildung 5 - Vergleich der mit und ohne Immunopräzipitation detektierten MS-Signale von LPNK-, LAER-, NGER-, FIAK-, SVLK- und FVEK-Peptiden

Die Immunopräzipitation mit anti-LPNK erbrachte im Vergleich zu den Messungen ohne Anreicherung für alle vier Zielpeptide eine höhere Signalintensität. Die angereicherten isotopenmarkierten Peptide wiesen eine zwei- bis dreifach höhere Signalintensität auf, als es die Vergleichsmessungen ohne Anreicherung zeigten. Die Detektion des isotopenmarkierten MDR1-Motivpeptids war ohne Immunopräzipitation nicht möglich. In beiden Versuchsaufbauten konnte die endogene Sequenz aus MDR1 nicht detektiert werden. Die endogenen Sequenzen von CYP3A5 und CYP3A7 waren ohne Immunopräzipitation nicht messbar. Die Signalform der CYP3A4-Massenspuren deutete bei den Proben, die nicht angereichert wurden, auf eine Überlagerung mit anderen zeitgleich eluierenden Substanzen hin. Einen Hinweis hierzu lieferte die fehlende Signal-Symmetrie, sowie ein verändertes Verhältnis zwischen isotopenmarkierten und nicht markierten Peptiden (siehe Abbildung 6 rechts).

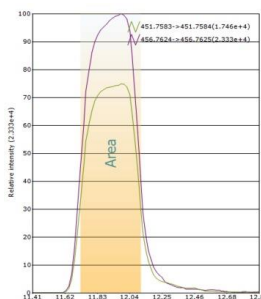


LQEEIDAVLPNK-Detektion (CYP3A4) mit Immunopräzipitation

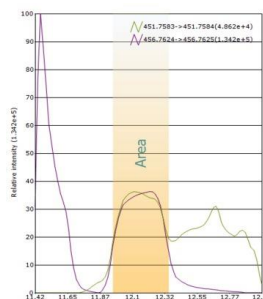


LQEEIDAVLPNK-Detektion (CYP3A4) ohne Immunopräzipitation

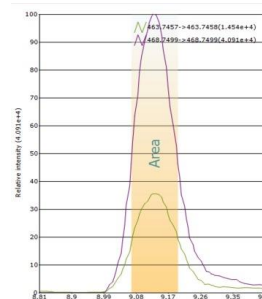
Abbildung 6 - Vergleich der mit und ohne Immunopräzipitation detektierten Massenspektren am Beispiel des CYP3A4-Peptids LQEEIDAVLPNK



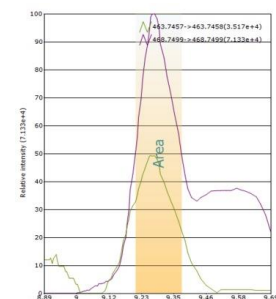
GIFPLAER-Detektion (CYP2C9) mit Immunopräzipitation



GIFPLAER-Detektion (CYP2C9) ohne Immunopräzipitation



GHFPLAER-Detektion (CYP2C19) mit Immunopräzipitation



GHFPLAER-Detektion (CYP2C19) ohne Immunopräzipitation

Abbildung 7 - Vergleich der mit und ohne Immunopräzipitation detektierten Massenspektren für die Motivpeptide GIFPLAER (CYP2C9) und GHFPLAER (CYP2C19)

Der Antikörper anti-LAER lieferte nach Anreicherungsprozedur niedrigere Signalintensitäten, als es ohne Immunopräzipitation der Fall war. Für eine korrekte Quantifizierung war eine Anreicherung der CYP2C9- und CYP2C19-Peptide jedoch unerlässlich, da ohne Immunoaffinitätsprozess ähnlich schwere Ionen zu Signalüberlagerungen führten (siehe Abbildung 7).

Ergebnisse |

Die Anreicherung mit anti-SVLK führte im Vergleich zur Direktmessung zu niedrigeren Signalintensitäten. Jedoch konnte bei der direkten Messung die endogene Zielsequenz nicht detektiert werden. Dies machte eine Quantifizierung ohne Immunopräzipitation nicht durchführbar.

Die Immunopräzipitationen mit den Antikörpern anti-NGER, anti-FIAK und anti-FVEK lieferten höhere Signale, als über eine Direktmessung erzielt werden konnten. Die Detektion von sowohl isotonenmarkierten, als auch nicht markierten CYP2A6-Sequenz war ohne Immunopräzipitation nicht möglich.

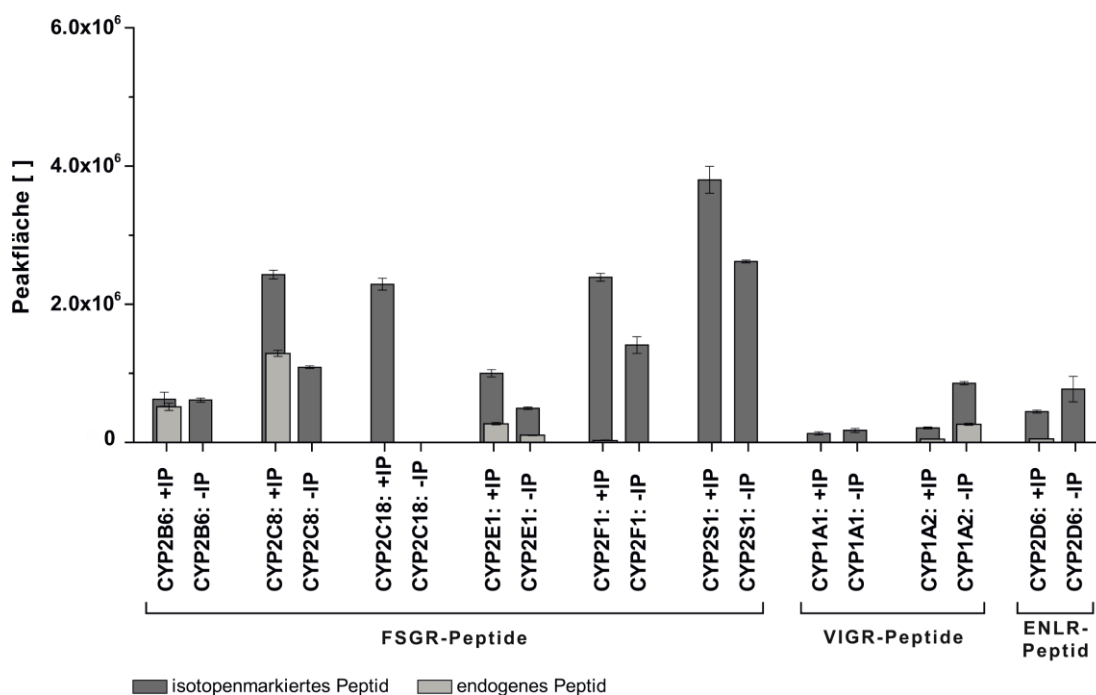


Abbildung 8 - Vergleich der mit und ohne Immunopräzipitation detektierten MS-Signale von FSGR-, VIGR- und ENLR-Peptiden

Die mit anti-FSGR angereicherten Peptide zeigten gegenüber den Direktmessungen für die isotonenmarkierten Sequenzen aus CYP2C8, CYP2E1, CYP2F1 und CYP2S1 eine etwa 1,5-2 fache Signalintensität. Die endogene Peptidsequenz von CYP2C8 konnte ohne Immunopräzipitation nicht detektiert werden. Für das ebenso über anti-FSGR anreicherbare CYP2C18-Peptid konnte bei Direktmessung aufgrund intensiver Signalüberlagerungen keine Integration durchgeführt werden. Das isotonenmarkierte CYP2B6-Peptid konnte in beiden

Versuchsaufbauten mit etwa gleich hohen Intensitäten detektiert werden. Bei der Direktmessung ohne Anreicherungsprozess war eine Integration der Massenspur der endogenen Peptidsequenz durch eine starke Überlagerung mit anderen Signalen nicht möglich. Die Anreicherung mit anti-VIGR und anti-ENLR erbrachte im Vergleich zu der Direktmessung keinen Gewinn an Signalintensität. Sowohl die Immunopräzipitation, als auch die Direktmessung lieferten für das CYP2C8 entstammende Zielpeptid mit dem Motiv „VIGR“ keine überlagerungsfreien Signale (Daten nicht gezeigt).

4.2.2. Bindekapazität aufgereinigter polyklonaler TXP-Antikörperseren

Um den Umstand aufzuklären, warum nach Immunoaffinitätsanreicherung mit den Antikörpern anti-LAER, anti-VIGR, anti-SVLK und anti-ENLR niedrigere Peptidintensitäten detektiert wurden, als es ohne Immunopräzipitation der Fall war, wurde die Bindekapazität der TXP-Antikörper ermittelt. Es sollte zum einen geklärt werden, ob die Bindekapazitäten der aufgereinigten Antikörperseren nicht ausreichten, um alle zur Verfügung stehenden Peptide zu binden. Zum anderen sollte die Bindekapazität als Kriterium herangezogen werden, welches Antikörperserum das geeignetere für eine weitere Testentwicklung darstellt.

Das isopenmarkierte Referenzpeptid wurde in einer absoluten Menge von 1 pmol in der Immunopräzipitation eingesetzt. Die für die Elution benötigte 1% Ameisensäure wurde mit 1 pmol nicht markiertem sequenzidentischem Peptid versetzt. Es wurde 1 µg Antikörper in der Immunopräzipitation eingesetzt. Die Menge an Antikörper ist theoretisch in der Lage, 13,3 pmol Peptid zu binden.

Die Bestimmung der Bindekapazität wurde für jedes Motiv einzeln durchgeführt. Für jeden TXP-Antikörper wurden alle zur Verfügung stehenden isopenmarkierten Motivsequenzen in die Immunopräzipitation eingesetzt. Im Falle des anti-LPNK-Antikörpers wurden die aus CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und MDR1 stammenden LPNK-Peptide mit insgesamt 4 pmol, im Falle des anti-FSGR-Antikörpers die Peptide aus CYP2E1, CYP2B6, CYP2S1, CYP2F1, CYP2C8 und CYP2C18 in Summe mit 6 pmol Motivpeptid eingesetzt.

Ergebnisse |

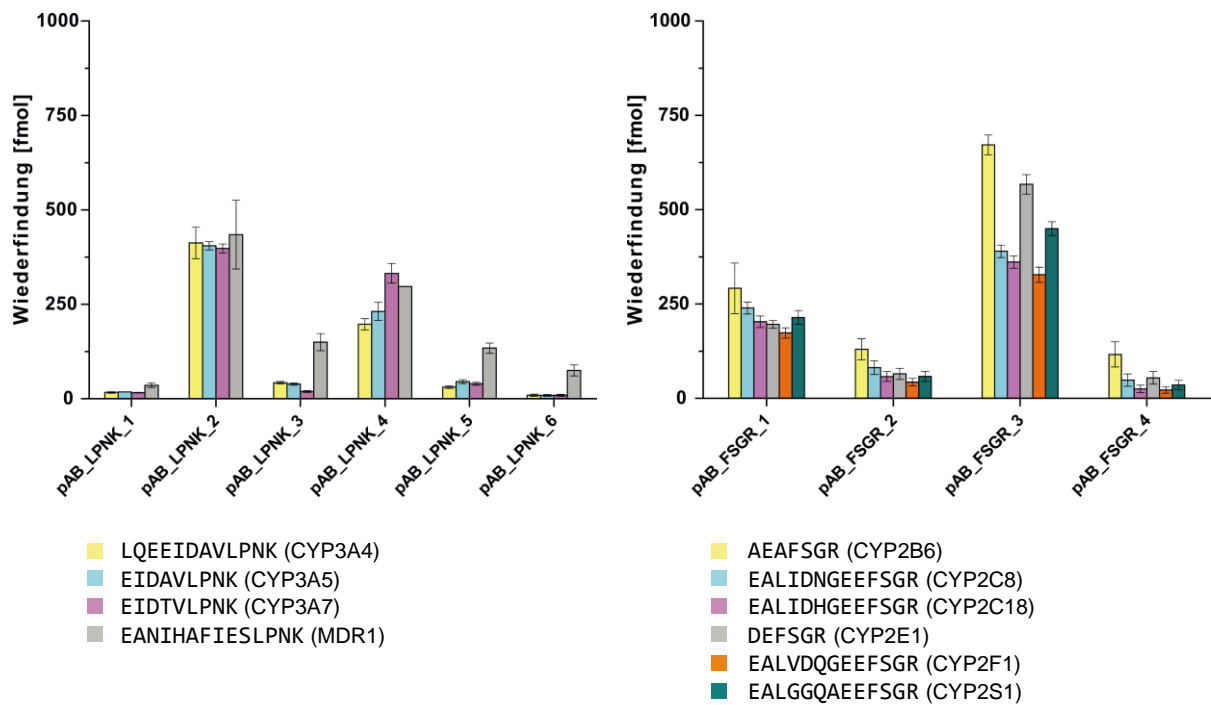


Abbildung 9 - Bindekapazität verschiedener aufgereinigter TXP-Antikörperseren, die gegen die Motive „LPNK“ und „FSGR“ immunisiert wurden

Die präzipitierten Referenzpeptide wurden mit der in der Elutionslösung enthaltenen nicht markierten Peptidmenge ins Verhältnis gesetzt und beispielhaft für die Motive „LPNK“ und „FSGR“ aufgetragen. Es standen für das Motiv „LPNK“ sechs und für das Motiv „FSGR“ vier aus unterschiedlichen Immunisierungen herrührende aufgereinigte Antikörperseren zur Verfügung.

Tabelle 13 - Bindekapazitäten der gegen das Motiv „LPNK“ immunisierten TXP-Antikörper. Den Antikörpern stand jeweils 1 pmol der aus CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und MDR1 entstammenden Motivsequenzen für eine Präzipitation zur Verfügung.

	CYP3A4- Peptid [fmol]	CYP3A5- Peptid [fmol]	CYP3A7- Peptid [fmol]	MDR1- Peptid [fmol]	Gesamt [fmol]	Binde- kapazität
pAB_LPNK_1	17	18	16	36	87	0,6%
pAB_LPNK_2	413	405	398	435	1651	12,4%
pAB_LPNK_3	43	39	19	150	251	1,9%
pAB_LPNK_4	197	231	332	297	1057	7,9%
pAB_LPNK_5	31	45	39	134	249	1,9%
pAB_LPNK_6	9	9	9	75	102	0,8%

Der aufgereinigte Antikörper pAB_LPNK_2 hat die größte Peptidmenge unter den sechs getesteten Antikörper präzipitiert. Mit 1651 fmol wurden 41,3% der zur Verfügung stehenden 4 pmol gebunden. Auf die theoretische Gesamtkapazität (13,3 pmol) von 1 µg Antikörper bezogen, sind somit 12,4% des aufgereinigten Antikörperserums in der Lage, Motivpeptide zu binden.

Das Antikörperserum pAB_FSGR_3 präzipitierte mit 2768 fmol das meiste Motivpeptid. Es wurden 46,1% der zur Verfügung gestandenen 6 pmol angereichert. Auf alle theoretischen Bindungsstellen von 1 µg Antikörper bezogen sind 20,7% des FSGR-Serums 3 bindungsfähig.

Tabelle 14 - Bindekapazitäten der gegen das Motiv „FSGR“ immunisierten TXP-Antikörper. Den Antikörpern standen jeweils 1 pmol der aus CYP2E1, CYP2B6, CYP2S1, CYP2F1, CYP2C8 und CYP2C18 entstammenden Motivsequenzen für eine Präzipitation zur Verfügung.

	CYP2E1- Peptid [fmol]	CYP2B6- Peptid [fmol]	CYP2S14- Peptid [fmol]	CYP2F1- Peptid [fmol]	CYP2C8- Peptid [fmol]	CYP2C18- Peptid [fmol]	Gesamt [fmol]	Binde- kapazität
pAB_FSGR_1	196	292	214	173	239	203	1317	9,9%
pAB_FSGR_2	65	130	58	43	81	58	435	3,3%
pAB_FSGR_3	567	672	450	328	390	361	2768	20,7%
pAB_FSGR_4	54	116	35	22	48	25	300	2,3%

Die Bindekapazitäten aller zur Verfügung stehenden TXP-Antikörper werden unter Angabe der präzipitierten Gesamtmenge in Tabelle 15 aufgeführt. Die absolute präzipitierte Peptidmenge wurde mit der maximalen Bindekapazität von 13,3 pmol für 1 µg Antikörper ins Verhältnis gesetzt und als Kapazität des Antikörpers (% Kapazität) bezeichnet. Für die weitere Testentwicklung wurde für jedes Zielprotein derjenige TXP-Antikörper ausgewählt, der die höchste Kapazität für das Zielmotiv aufwies. Bei Kapazitäten von unter 0,2% wurde keine Testentwicklung durchgeführt.

Für das Enzym CYP2D6 wurden zwei Motive ausgewählt („SVLK“ & „ENLR“). Es sollte verglichen werden, ob die ausgewählte Peptidsequenz einen Einfluss auf das Quantifizierungsergebnis hat. Für die Anreicherung des Motivs „NGER“ fiel die Entscheidung für die weitere Testentwicklung auf das Antikörperserum pAB_NGER_2, das mit 0,1% Bindekapazität weniger Bindevermögen als der mit 0,3% charakterisierte Antikörper pAB_NGER_1 aufwies. Erkenntnisse aus einem der Arbeit vorangegangenen

mikrosphärenbasierten Antigen-Antikörper-Test, der dem Antikörper pAB_NGER_2 eine deutlich höhere Spezifität bescheinigte, war Hintergrund für diese Entscheidung.

Tabelle 15 - Bindekapazitäten der TXP-Antikörper. Den Antikörpern stand von jedem Motivpeptid jeweils 1 pmol zur Verfügung. Die jeweils präzipitierte Peptidmenge wurde mit der maximalen Anzahl an theoretisch existierenden Bindungsstellen in Verhältnis gesetzt und als Kapazität des jeweiligen Antikörpers prozentual aufgeführt.

	Antikörper	präzipitiertes Peptid	Einsatz an Motivpeptiden	Kapazität	Zielprotein	Testentwicklung
1	pAB_EEWK_1	12 fmol	1000 fmol	0,1 %	3A7	
2	pAB_EEWK_2	12 fmol	1000 fmol	0,1 %	3A43	
3	pAB_ENLR_1	33 fmol	1000 fmol	0,2 %	2D6	x
4	pAB_ENLR_2	8 fmol	1000 fmol	0,1 %		
5	pAB_ENLR_3	1 fmol	1000 fmol	0,0 %		
6	pAB_ETFR_1	70 fmol	2000 fmol	0,5 %	1A1	
7	pAB_ETFR_2	211 fmol	2000 fmol	1,6 %	1A2	
8	pAB_FIAK_1	243 fmol	1000 fmol	1,8 %	2A13	x
9	pAB_FIAK_2	4 fmol	1000 fmol	0,0 %		
10	pAB_FSGR_1	1317 fmol	6000 fmol	9,9 %	2B6, 2C8, 2C18, 2E1, 2F1, 2S1	
11	pAB_FSGR_2	435 fmol	6000 fmol	3,3 %		
12	pAB_FSGR_3	2768 fmol	6000 fmol	20,7 %		x
13	pAB_FSGR_4	300 fmol	6000 fmol	2,3 %		
14	pAB_FVEK_1	428 fmol	1000 fmol	3,2 %	CPR	x
15	pAB_IQER_1	2 fmol	2000 fmol	0,0 %	CPR	
16	pAB_IQER_2	3 fmol	2000 fmol	0,0 %		
17	pAB_LAER_1	111 fmol	2000 fmol	0,8 %	2C9	x
18	pAB_LAER_2	4 fmol	2000 fmol	0,0 %	2C19	
19	pAB_LPNK_1	87 fmol	4000 fmol	0,6 %	3A4 3A5 3A7 MDR1	
20	pAB_LPNK_2	1651 fmol	4000 fmol	12,4 %		x
21	pAB_LPNK_3	251 fmol	4000 fmol	1,9 %		
22	pAB_LPNK_4	1057 fmol	4000 fmol	7,9 %		
23	pAB_LPNK_5	249 fmol	4000 fmol	1,9 %		
24	pAB_LPNK_6	102 fmol	4000 fmol	0,8 %		
25	pAB_NGER_1	44 fmol	1000 fmol	0,3 %	2A6	
26	pAB_NGER_2	15 fmol	1000 fmol	0,1 %		x
27	pAB_STTR_1	2 fmol	2000 fmol	0,0 %	1A1	
28	pAB_STTR_2	2 fmol	2000 fmol	0,0 %	1A2	
29	pAB_SVLK_1	168 fmol	1000 fmol	1,3 %	2D6	
30	pAB_SVLK_2	14 fmol	1000 fmol	0,1 %		
31	pAB_VIGR_1	2 fmol	3000 fmol	0,0 %	1A1 1A2 2C8	
32	pAB_VIGR_2	27 fmol	3000 fmol	0,2 %		
33	pAB_VIGR_3	8 fmol	3000 fmol	0,1 %		
34	pAB_VIGR_4	155 fmol	3000 fmol	1,2 %		x

4.2.3. Chromatographische Auftrennung der Analytsequenzen

Für die Entwicklung eines Gradienten, der die Peptide in ausreichender Weise voneinander trennt, galt es mehrere Gegebenheiten zu berücksichtigen. Zum einen ähneln sich die Sequenzen der zu analysierenden Peptide sehr. Aus diesem Grund gleicht sich ihr Elutionsverhalten. Zum anderen stellen die magnetischen Protein G-Partikel, die während des Immunopräzipitationsprozesses verwendet werden, eine Einschränkung dar. 5 μL Partikelsuspension sind in der Lage, 1 μg Antikörper über die Wechselwirkung zwischen Protein G und dem Fc-Teil des Antikörpers zu binden. Da die Elution nach Immunopräzipitation in ein kleines Volumen von 20 μL 1% Ameisensäure erfolgt, ist kein unbegrenzt hoher Einsatz an Partikel möglich, ohne einen rückstandslosen Partikeltransfer zu gewährleisten. Rückstände bergen die Gefahr, die in der Chromatographie eingesetzten C18-Säulen mit einem Innendurchmesser von 75 μm zu verstopfen. Ein rückstandsloser Partikeltransfer ist zusätzlich von der gewählten Detergenzkonzentration abhängig, die in den Waschlösungen vorliegt. Es wurde Chaps mit einer Konzentration von 0,3% in den Waschplatten eingesetzt. Durch Übertrag kleiner Mengen an Waschpuffer ist ein reibungsloser Transfer der Partikel aus der Elutionsplatte heraus bis zu einem ursprünglichen eingesetzten Partikelvolumen von 40 μL möglich. Dies ermöglicht den Einsatz von 8 μg Antikörper.

Um die Möglichkeit zu erhalten, die multiplexe Immunopräzipitation zu einem späteren Zeitpunkt auf weitere Analyten zu erweitern und einer simultanen Elution von Analytpeptiden zu entgehen, wurde entschieden, zwei einzelne chromatographische Gradienten zu entwickeln. Die Entzerrung der Elutionszeiträume ermöglicht es, höhere Signalstärken und damit eine höhere Sensitivität durch länger wählbare Sammelzeiten in der Ionenfalle des Massenspektrometers (Q Exactive Plus™ - Thermo Scientific) zu erreichen. Des Weiteren sollen durch Vermeidung von Messfensterüberschneidungen mehr Datenpunkte pro Massenspur und damit ein robusteres Messergebnis gewährleistet werden.

4.2.3.1. Trennung von Peptiden nach Immunopräzipitation mit anti-LPNK, anti-LAER, anti-NGER, anti-FIAK, anti-SVLK und anti-FVEK (TXP-Multiplex-Gradient 1)

Um eine schnelle und ausreichend gute Trennung in einem möglichst kurzen Gradienten zu erhalten, wurde ein Stufengradient, ausgehend von 10% B (100% B = Eluent B: 80% ACN, 20% H₂O, 0,1% FA), gewählt. Der Gradient steigt über acht Minuten auf 35% B an. Um die Säule möglichst vollständig zu äquilibrieren, folgen drei Waschzyklen mit Gradienten bis zu 95% B. Mit Waschschritten dauert ein analytischer Lauf 18 Minuten. Für Gradient 1 sind die Multiplex-Immunopräzipitationen der miteinander kombinierten TXP-Antikörper anti-LPNK, anti-LAER, anti-NGER, anti-FIAK, anti-SVLK und anti-FVEK vorgesehen worden.

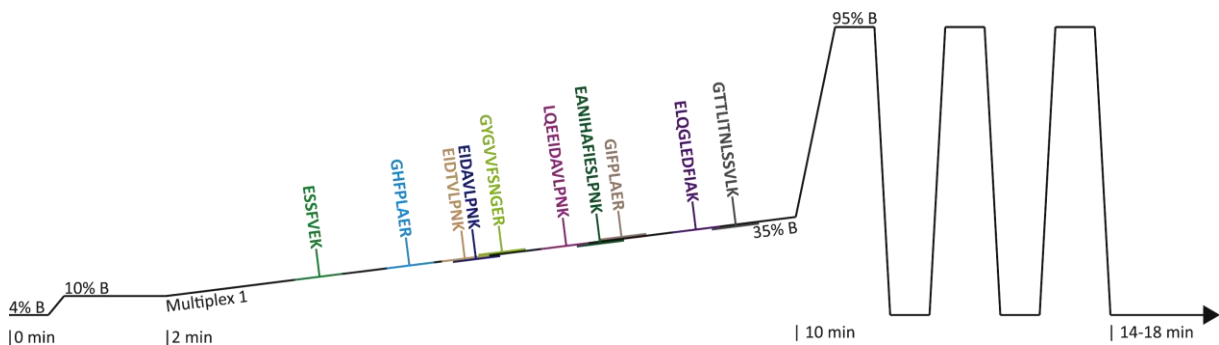


Abbildung 10 - Gradient für TXP-Multiplex 1: Ein achtminütiger Stufengradient trennt, beginnend von 10% Eluent B (100% B = Eluent B: 80% ACN, 20% H₂O, 0,1% FA) bis auf 35% B ansteigend alle Zielpeptide, die zuvor durch Immunopräzipitation mit anti-LPNK, anti-LAER, anti-NGER, anti-FIAK, anti-SVLK und anti-FVEK angereichert wurden. Es folgen drei Gradientenanstiege bis auf 95% B, um noch auf der Säule gebundene Peptide zu eluieren. Inklusive Waschprozedur und anschließender Äquilibrierungsphase hat der Gradient eine Laufzeit von 18 Minuten.

Die Peptide werden hierbei gleichmäßig über die Trennzeit aufgetrennt. Das Zeitfenster, in dem die Massenspuren des isotopenmarkierten und endogenen Peptides aufgenommen werden, wurde auf 0,7 min festgesetzt. Da die Zeitfenster sich nur wenig überschneiden, wurden als Sammelzeit 120 ms pro Massenspur gewählt. Die Vermessung eines aus isotopenmarkierten und endogenen Peptid bestehenden Peptidpaares nimmt somit 240 ms pro Messzyklus in Anspruch. Pro Sekunde ist prinzipiell die Aufnahme von vier Datenpunkten möglich, sofern die alle 400 ms vom Massenspektrometer geforderten Voraufnahmen (ca. 200 ms) nicht in die Rechnung mit einbezogen werden. Diese begrenzen die Analyse auf drei Datenpunkte pro Minute. Um neben der bekannten Retentionszeit der Peptidsequenz,

der simultanen Retention von isotopenmarkiertem und endogenem Peptid, sowie der von LC-MS-Massenspektrometern neuerer Generation auf vier Nachkommastellen genau detektierten Masse noch einen weiteren Kontrollmechanismus zur Peptididentifizierung zu erhalten, werden alle 2 s Fragmentspektren für beide Massenspuren eines Peptidpaares generiert. Als Sammelzeit wurden hierbei in Orientierung an die auf MS-Ebene festgesetzte Sammelzeit ebenso 120 ms gewählt. Da die Peptide sequenz- und konzentrationsabhängig unterschiedlich schnell eluieren, differiert die absolute Anzahl an aufgenommenen Spektren pro Peptidpaar. Bei einer Flussrate von 300 nL/min eluiert ein Peptidpaar mit jeweils 25 fmol Einzelpeptid bei guter Trennleistung des chromatographischen Systems vollständig in ca. 10-15 Sekunden. Beispielsweise eluiert die aus CYP2C19 entstammende Sequenz GHFPLAER in ca. 11 s und wird hierbei mit ca. 30 Datenpunkten auf MS-Ebene und jeweils 5 Fragmentspektren pro Massenspur aufgezeichnet.

4.2.3.2. Trennung von Analytsequenzen nach Immunopräzipitation mit anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR (TXP-Multiplex-Gradient 2)

Für den Gradienten 2 sind die Multiplex-Immunopräzipitationen der miteinander kombinierten TXP-Antikörper anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR vorgesehen worden. Eine effektive Trennung wurde über einen Stufengradient, der ausgehend von 10% Eluent B (100% B = Eluent B: 80% ACN, 20% H₂O, 0,1% FA), über acht Minuten auf 25% Eluent B ansteigt, erreicht. Um Übertrag zwischen Probenanalysen zu vermeiden und die Säule möglichst rückstandslos zu spülen, folgen drei Waschzyklen mit Gradienten bis zu 95% Eluent B. Der Multiplex-Gradient 2 besitzt inklusive Waschsritten eine Dauer von 18 Minuten. Da bei ca. 20% Eluent B vier Peptide nahezu gleichzeitig eluieren, wurde, um eine ausreichende Anzahl an Datenpunkten pro Massenspur aufzunehmen, die Sammelzeit in der Ionenfalle des Massenspektrometers auf 60 ms begrenzt. Für die im Abstand von 2 s aufgenommenen Fragmentierungsspektren wurden ebenso 60 ms gewählt.

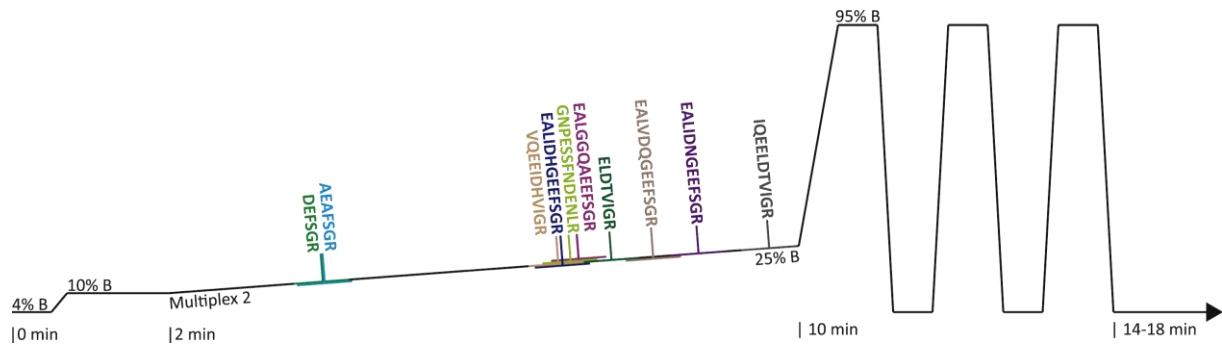


Abbildung 11 - Gradient für TXP-Multiplex 2: Ein zehnminütiger Stufengradient trennt beginnend von 10% Eluent B (100% B = Eluent B: 80% ACN, 20% H₂O, 0,1% FA) und bis 25% B ansteigend alle Zielpeptide, die über Immunopräzipitation mit anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR angereichert werden. Es folgen drei Gradientanstiege bis auf 95% B, um gebundene Peptide von der Säule zu eluieren. Inklusive Waschprozedur und anschließender Äquilibrierungsphase hat der Gradient eine Laufzeit von 18 Minuten.

Alle Abbildungen und Tabellen, die die Eigenschaften der TXP-Antikörper näher beschreiben, werden für eine bessere Unterscheidung der beiden multiplexen Testentwicklungen ab diesem Kapitel in folgender Reihenfolge dargestellt:

Tabelle 16 - Gewählte Darstellungsanordnung der für die Charakterisierung der TXP-Antikörper untersuchten Motive

Versuchsaufbau	TXP-Multiplex 1						TXP-Multiplex 2		
	LPNK	LAER	FIK	NGER	SVLK	FVEK	FSGR	VIGR	ENLR
# Zielanalyte	4	2	1	1	1	1	6	3	1

Den Anfang bilden Antikörpermotive, deren Zielpeptide in TXP-Multiplex-Gradient 1 chromatographisch getrennt werden. Die Motive werden, absteigend nach der Anzahl zugehöriger Analytsequenzen geordnet, dargestellt; auf gleiche Weise wird mit den im TXP-Multiplex-Gradienten 2 eingesetzten Motiven verfahren.

4.2.4. Affinitätsbestimmung der TXP-Antikörper

Die Affinität der TXP-Antikörper wurde mittels einer Abwandlung der von Friguet et al. beschriebenen ELISA-basierten Bestimmung von Affinitätskonstanten ermittelt [106]. Es kam ein kompetitiver Immunotest zum Einsatz, bei dem in einem ersten Schritt verschiedene Peptidkonzentrationen mit einer konstanten Antikörperkonzentration, deren Wert sich möglichst nahe an der zuvor unbekanntem Dissoziationskonstante orientierte, inkubiert

wurden. Die Konzentration des freien, nicht komplexierten Antikörpers wurde indirekt nach Zugabe der mit Motivpeptid gekoppelten Mikrosphären und anschließender Auslese mittels fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Detektionsantikörper in einem Durchflusszytometer (FlexMap 3D®, Luminex) bestimmt. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Antikörpers vermessen. Die Dissoziationskonstanten wurden über eine bivalente Regression nach Nieba et al. ermittelt [107].

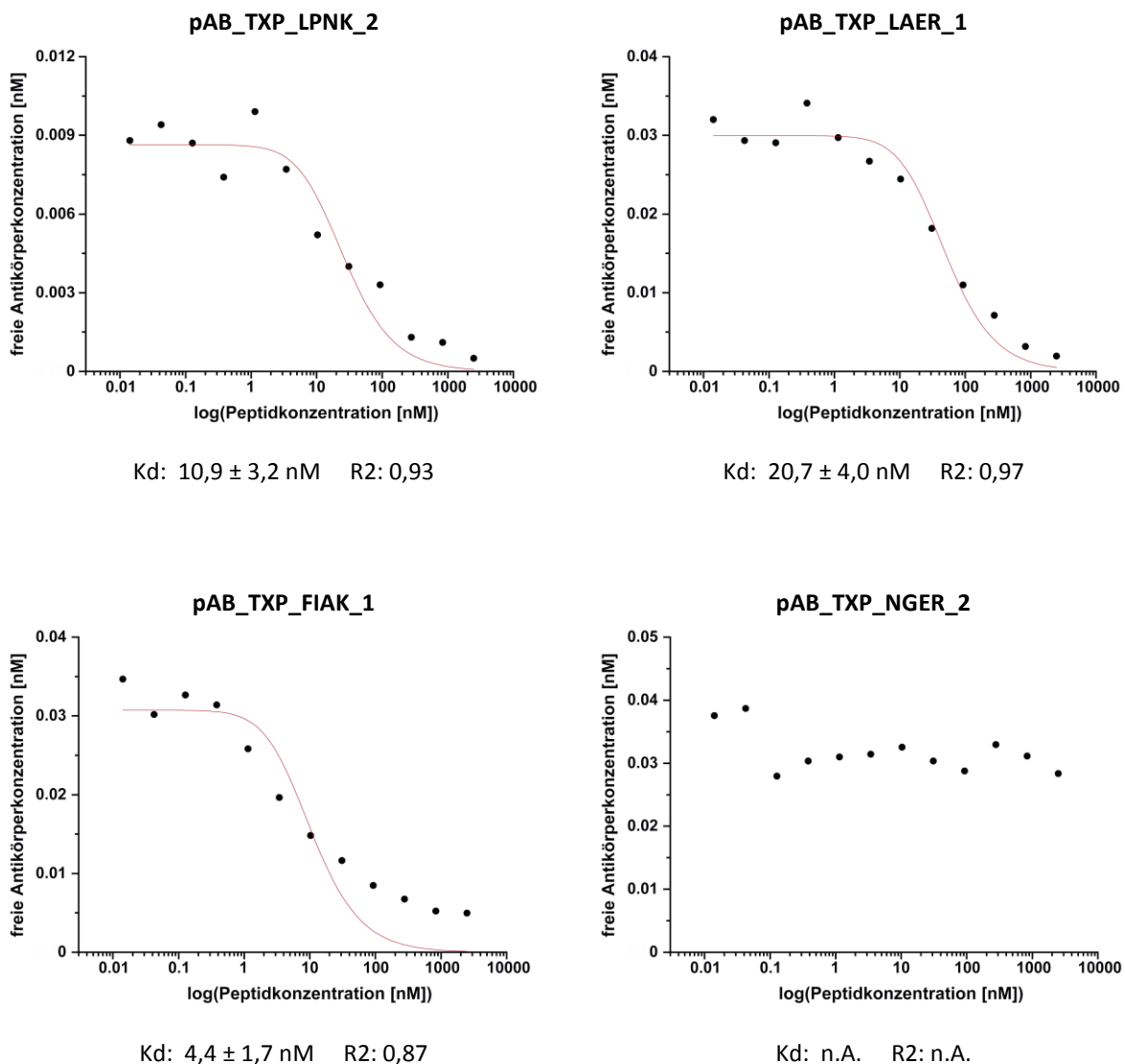
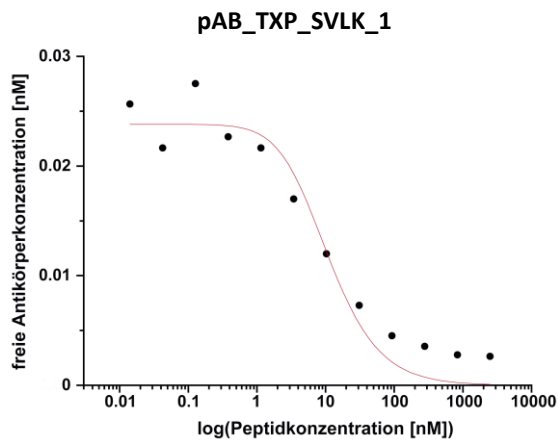
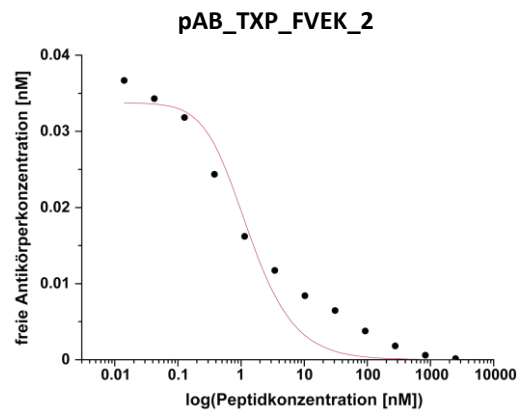


Abbildung 12 - ELISA-basierte Bestimmung von Affinitätskonstanten für die TXP-Antikörper anti-LPNK, anti-LAER, anti-FIAK und anti-NGER. In einem kompetitiven Immunotest wurden die Dissoziationskonstanten für in die Testentwicklung eingehende TXP-Antikörper bestimmt.

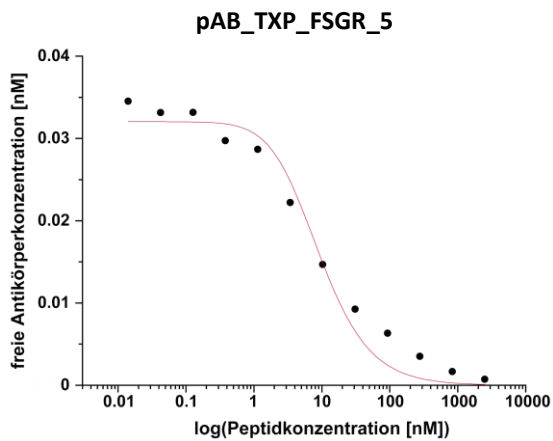
Ergebnisse |



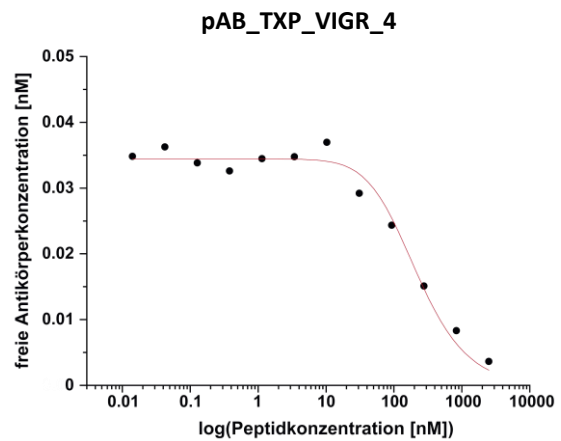
Kd: $4,4 \pm 1,2$ nM R2: 0,94



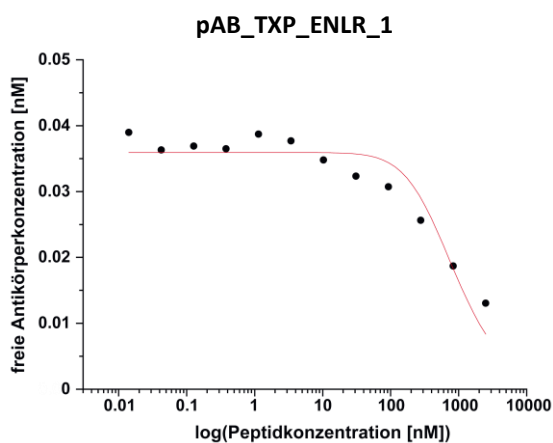
Kd: $0,5 \pm 0,2$ nM R2: 0,95



Kd: $3,8 \pm 0,7$ nM R2: 0,97



Kd: $88,7 \pm 11,6$ nM R2: 0,98



Kd: $354,8 \pm 71,8$ nM R2: 0,90

Abbildung 13 - Immunotest-basierte Bestimmung von Affinitätskonstanten für die TXP-Antikörper anti-SVLK, anti-FVEK, anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR. In einem kompetitiven Immunotest wurden die Dissoziationskonstanten für die in die Testentwicklung eingehende TXP-Antikörper bestimmt.

Die für TXP-Tests eingesetzten Antikörper besitzen Kd-Werte zwischen 0,5 nM und 355 nM. Für den Antikörper pAB_TXP_NGER_2 konnte keine Dissoziationskonstante bestimmt werden.

Tabelle 17 - Antikörper-Dissoziationskonstanten der für die Entwicklung von TXP-Tests ausgewählten Antikörper

Antikörper	TXP-Motiv	Zielpeptid	Kd [nM]	R ²
pAB_TXP_LPNK_2	LPNK	CGSG-LPNK	10,9 ± 3,2	0,93
pAB_TXP_LAER_1	LAER	CGSG-LAER	20,7 ± 4,0	0,97
pAB_TXP_FIAK_1	FIAK	CGSG-FIAK	4,4 ± 1,7	0,87
pAB_TXP_NGER_2	NGER	CGSG-NGER	n.A.	n.A.
pAB_TXP_SVLK_1	SVLK	CGSG-SVLK	4,4 ± 1,2	0,94
pAB_TXP_FVEK_2	FVEK	CGSG-FVEK	0,5 ± 0,2	0,95
pAB_TXP_FSGR_5	FSGR	CGSG-FSGR	3,8 ± 0,7	0,97
pAB_TXP_VIGR_4	VIGR	CGSG-VIGR	354,8 ± 71,8	0,98
pAB_TXP_ENLR_1	ENLR	CGSG-ENLR	88,7 ± 11,6	0,90

4.2.5. Peptidanreicherung durch TXP-Antikörper - Analyse des TXP-Epitops

4.2.5.1. Anreicherung des TXP-Zielmotivs

Für die Aufreinigung der TXP-Antikörper standen polyklonale Seren zu Verfügung. Da die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass nach Antikörperaufreinigung weiterhin ein Gemisch von verschiedenen Antikörpern vorliegt, wurde eine Immunopräzipitation aus komplexer Matrix durchgeführt, um die Spezifität der aufgereinigten Antikörper eingehender zu untersuchen. Hierzu wurde HEPG2-Lysat tryptisch verdaut und in einem Immunopräzipitationsprozess mit den einzelnen TXP-Antikörpern inkubiert. Die durch den TXP-Antikörper angereicherten Peptide wurden in einem 20-minütigen Gradienten chromatographisch aufgetrennt und mit einer FULL-MS-Methode im Massenspektrometer analysiert.

Mithilfe von Mascot und SEQUEST identifizierte Peptide, die das Zielmotiv des TXP-Antikörpers besaßen, wurden im Verhältnis zu allen theoretisch im Proteom vorkommenden Peptiden gleichen Motivs ins Verhältnis.

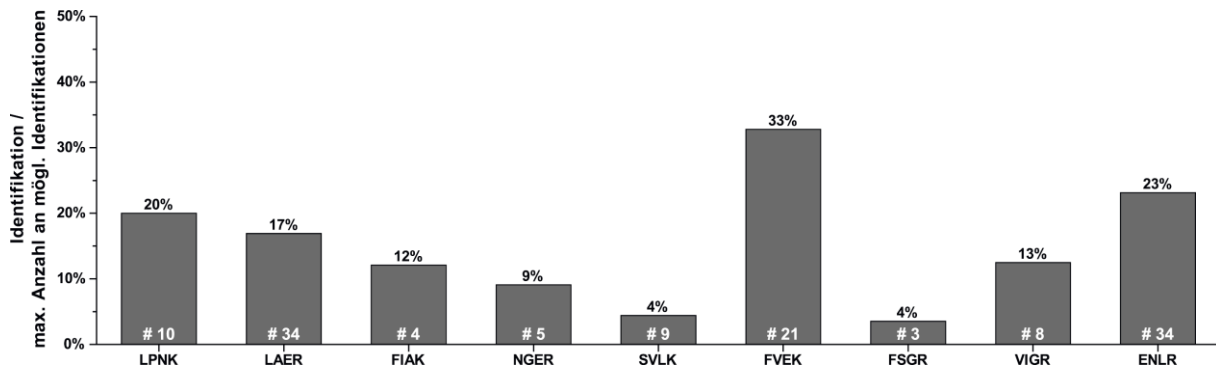


Abbildung 14 - Peptididentifikationen nach Immunpräzipitation mit TXP-Antikörpern aus tryptisch fragmentiertem HEPG2-Lysat und anschließender LC-MS-Analyse mit nachfolgender Mascot- und SEQUEST-Suche. Identifizierte Peptide, die das C-terminale TXP-Zielmotiv besaßen, wurden im Verhältnis zur proteomweit maximal möglichen Peptidanzahl gleichen Motivs aufgetragen. Die Anzahl der Peptididentifikationen mit Zielmotiv sind mit # gekennzeichnet.

Die Immunpräzipitation mit dem TXP-Antikörper anti-FVEK führte unter allen getesteten TXP-Antikörpern mit 21 identifizierten Zielmotivsequenzen zum anteilig höchsten Anreicherungsgrad (33%) aller proteomweit existierenden „FVEK“-Motivpeptide. Die Antikörper anti-LAER und anti-ENLR lieferten mit jeweils 34 Identifikationen eine höhere Anzahl an Identifikationen, reicherten aber aufgrund der höheren proteomweiten Häufigkeit des Zielmotivs nur 17% bzw. 23% aller theoretisch existierenden Zielpeptide an. Der TXP-Antikörper anti-FSGR lieferte mit 3 „FSGR“-Peptididentifikationen die niedrigste Anzahl an Zielpeptididentifikationen. Es handelte sich gleichzeitig um den geringsten prozentualen Anteil an theoretisch vorkommenden Zielsequenzen. Über alle neun TXP-Motive gemittelt, wurden im Schnitt 15% aller theoretisch vorkommenden Peptide identifiziert.

4.2.5.2. Beschreibung des TXP-Motivs

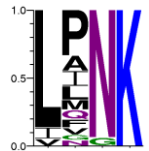
Die Gesamtheit aller über Mascot und SEQUEST ermittelten Peptididentifikationen wurden bioanalytisch auf Anreicherungsanalogien untersucht. Hierbei wurden Teilmotive, die statistisch signifikant auf eine Anreicherung schließen ließen, bestimmt (p-Wert = 5%). Die Teilmotive wurden nach der Anzahl der Peptide, die dieses Motiv tragen, gewichtet in kombinierten Logos zusammengefasst.



Abbildung 15 - Motivlogozusammenstellung der in die weitere Testentwicklung eingehenden TXP-Antikörper anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR.

Alle Motivlogos weisen an der von N-terminal gezählten vierten Position die durch die tryptische Fragmentierung vorgegebenen Aminosäuren Arginin und Lysin auf. Bei den ersten drei Positionen variieren die Bindeeigenschaften. Exemplarisch werden die nach „LPNK“- und „FVEK“-Anreicherung errechneten kombinierten Logos im Näheren beschrieben:

Tabelle 18 - Zusammensetzung der TXP-Motiv-Logos „LPNK“ und „FSGR“: Nach Immunopräzipitation aus tryptisch fragmentiertem HEPG2-Zellysate werden die mit LC-MS detektierten und über Mascot und SEQUEST identifizierten Peptide bioinformatisch analysiert. Peptide, deren Anreicherung als signifikant betrachtet werden kann, bilden mit Peptiden derselben C-terminalen Motivsequenz Teilmotive. Die unterschiedlichen Teilmotive werden in einem kombinierten Motivlogo visualisiert.

	signifikante angereicherte Peptidmotive	Anzahl identifizierter Motivepeptide	Anzahl proteomweit existierender Motivepeptide
1	L L N K	9	155
2	L P N K	10	50
3	L A N K	9	90
4	L I N K	9	102
5	L Q N K	6	102
6	I P N K	5	32
7	L M N K	4	28
8	L P G K	5	137
9	L F N K	4	59
10	L V N K	4	80
11	V P N K	3	32
12	L N N K	3	72
13	L G N K	3	93
Σ		74	1032

	signifikante angereicherte Peptidmotive	Anzahl identifizierter Motivepeptide	Anzahl proteomweit existierender Motivepeptide
1	G T G R	8	107
2	G S G R	12	210
3	I S G R	9	74
4	H S G R	10	59
5	S S G R	10	234
6	I T G R	8	51
7	F T G R	6	41
8	L T G R	6	140
9	M S G R	5	45
10	A S G R	6	164
11	Y T G R	5	50
12	W T G R	4	22
13	F S G K	4	78
Σ		93	1275

Nach Anreicherung mit dem Antikörper anti-LPNK konnten 74 Peptidsequenzen identifiziert werden, die als signifikant angereichert bestimmt, in das Motivlogo eingeflossen sind. Insgesamt konnten die 74 Peptide 13 verschiedenen Teilmotiven zugeordnet werden. 10 Peptidsequenzen besitzen die C-terminale Sequenz „LPNK“.

An der ersten von N-terminal gerechneten Aminosäureposition besitzen die Teilmotive Aminosäuren, die aliphatische Seitengruppen besitzen. Vorwiegend wurde Leucin (L) gebunden, aber auch Isoleucin (I) und Valin (V) charakterisierten die Binderegion als hydrophob. Die zweite Position ist im Vergleich weniger spezifisch. Aminosäuren unterschiedlichster Natur werden von anti-LPNK akzeptiert. Prolin (P) wird vorzugsweise gebunden. Die dritte Motivposition ist im Vergleich zur zweiten wiederum sehr spezifisch und lässt vorwiegend die Bindung von Asparagin (N) zu. C-terminal wird ausschließlich Lysin (K) gebunden.

Die Immunopräzipitation mit anti-FSGR lieferte 93 identifizierte Peptide. Insgesamt sind 13 unterschiedliche Motive in das Logo eingeflossen. Nur drei identifizierte Peptide besitzen am C-Terminus die Sequenz „FSGR“. Die Wahrscheinlichkeit, dass Motivpeptide mit dem Terminus „FSGR“ signifikant angereichert wurden, war ab einem angenommenen p-Wert von 11% gegeben. Da als Signifikanzgrenze ein p-Wert von 5% festgelegt wurde, ist das „FSGR“-Teilmotiv nicht in das Motivlogo eingegangen.

Die erste Motivposition des „FSGR“-Logos ist als variabel zu charakterisieren. Unter den 14 ermittelten Anreicherungsmotiven waren an dieser Position 10 verschiedene Aminosäuren zu finden. Im Gegenzug weist die zweite Position eine hohe Spezifität für Serin (S) und Threonin (T) auf. Die dritte Position ist ebenso sehr spezifisch. Ausschließlich Peptide, die ein Glycin (G) an dieser Position tragen, wurden statistisch signifikant gebunden. Mit Ausnahme des Einzelmotivs „FSGK“ wurde vorwiegend Arginin an der vierten Position gebunden.

4.2.5.3. Beschreibung des TXP-Motivs in verschiedenen biologischen Matrices

Um den Einfluss des Zellsystems auf die generierten Motivlogos zu untersuchen, wurde die Immunopräzipitation mit anti-LPNK vergleichend aus tryptisch fragmentiertem HEPG2-, HEK293- und Patienten-Hepatozytenlysate durchgeführt und die als signifikant zu betrachtenden Anreicherungen gegenübergestellt.

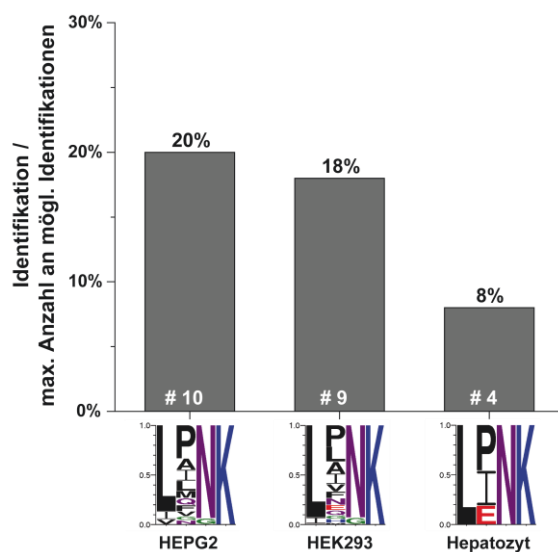


Abbildung 16 - Zellsystemabhängige Anreicherung unter Verwendung des TXP-Antikörpers anti-LPNK.

Die Immunopräzipitation aus HEPG2-Lysat führte zu 10 Identifikationen mit dem Zielmotiv „LPNK“, die aus HEK293-Lysat zu 9 Identifikationen. Aus Hepatozytenlysate konnten 4 Peptide mit „LPNK“-Zielmotiv identifiziert werden. Aus HEPG2-Lysat wurden somit die zahlenmäßig meisten der 50 proteomweit existierenden „LPNK“-Sequenzen identifiziert, im patienteneigenen Hepatozytenlysate die kleinste Anzahl.

4.2.5.4. Anreicherungseigenschaften der TXP-Antikörper unter Berücksichtigung variabler Positionen im TXP-Motiv

Um ein Verständnis für die Anreicherungseigenschaften der polyklonalen TXP-Antikörper zu erhalten, wurden alle Identifikationen, die nach Immunopräzipitation aus HEPG2-Lysat statistisch signifikant zu einem Teilmotiv „||“ eines Motivlogos zusammengefasst werden konnten, addiert. Im Anschluss wurde für jedes Teilmotiv „||“ die proteomweit vorkommende Menge an Motivpeptiden ermittelt und die für jedes Teilmotiv bestimmten Häufigkeiten addiert. Die Anzahl an tatsächlichen Motivpeptididentifikationen wurde mit der theoretisch proteomweit existierenden Anzahl an Motivpeptiden in Verhältnis gesetzt.

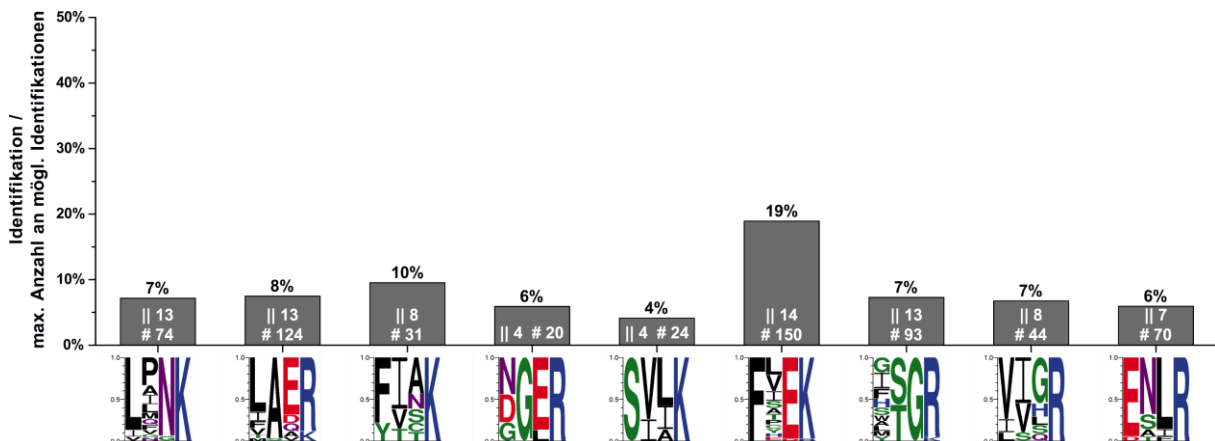


Abbildung 17 - Peptididentifikationen pro TXP-Motiv im Verhältnis zu der maximal möglichen Anzahl an Identifikationen, die von der Summe der in das Anreicherungslogo einfließenden Motiv-Sequenzen bestimmt wird. Die in das Motivlogo eingehende Anzahl an Peptididentifikationen ist mit „#“, die Anzahl der eingehenden Teilmotive mit „||“ gekennzeichnet.

4.2.5.5. Einfluss epitopbenachbarter Aminosäuren auf die Anreicherung mittels TXP-Antikörper

Für die Fragestellung, ob Aminosäuren, die N-terminal an ein TXP-Motiv angrenzen, einen Einfluss auf die Bindespezifität der TXP-Antikörper haben, wurden die vom C-Terminus aus gesehene fünfte und sechste Aminosäureposition analysiert:

H₂N-###5-LPNK-OH & H₂N-##6#-LPNK-OH

Tabelle 19 - Häufigkeit einzelner Aminosäuren an 5. Aminosäureposition nach Immunopräzipitation mit dem TXP-Antikörper anti-LPNK aus HEPG2-Lysat. Es konnten insgesamt 74 Peptide identifiziert werden, die statistisch signifikant zu einem kombinierten Motivlogo beitragen.

Aminosäure	# Aminosäuren an 5. Position	Aminosäure	# Aminosäuren an 5. Position
Ala (A)	9	Met (M)	0
Cys (C)	2	Asn (N)	2
Asp (D)	2	Pro (P)	4
Glu (E)	9	Gln (Q)	3
Phe (F)	2	Arg (R)	0
Gly (G)	4	Ser (S)	3
His (H)	2	Thr (T)	1
Ile (I)	6	Val (V)	16
Lys (K)	0	Trp (W)	0
Leu (L)	8	Tyr (Y)	1

Um beispielsweise den Einfluss der 5. Aminosäureposition auf das Anreicherungsresultat durch TXP-Antikörper zu untersuchen, wurde bei allen identifizierten Peptiden, die durch statistisch signifikante Anreicherung zu einem kombinierten Motivlogo beitragen, die Häufigkeit jeder einzelnen Aminosäure an der 5. Position erfasst (siehe Tabelle 19).

Das Vorkommen der einzelnen Aminosäuren sollte daraufhin ins Verhältnis zur maximal mit dem TXP-Antikörper präzipitierbaren Sequenzanzahl gesetzt werden. Hierfür war es nötig, zunächst eine absolute Menge an präzipitierbaren Peptiden zu definieren. Hierzu sollte das aus jeweils 13 Einzelmotiven bestehende kombinierte „LPNK“-Motivlogo dienen.

Um die in die kombinierten Logos eingegangenen Einzelmotive zur Beschreibung der theoretisch präzipitierbaren Menge heranziehen zu können, wurde für jedes Einzelmotiv die Anzahl aller proteomweit existierender Motivpeptide ermittelt (Beispiel: das C-terminale

Ergebnisse |

Motiv „LPNK“ teilen sich proteomweit 50 verschiedene Sequenzen (siehe Tabelle 12 und Tabelle 18)). Dies wurde für alle 13 in das kombinierte Motivlogo eingehende Einzelmotive durchgeführt. Aus der Summe an Sequenzen, die aus den 13 einzelnen Sequenzdatensätzen ermittelt wurden, wurde die Häufigkeit jeder einzelnen Aminosäure an der 5. Position erfasst (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20 - Proteomweite Häufigkeit einzelner Aminosäuren an 5. Aminosäureposition nach *in silico*-Anreicherung mit anti-LPNK. Für anti-LPNK konnten statistisch signifikant 13 verschiedene anreicherbare Teilmotive ermittelt werden, die proteomweit von 1032 verschiedenen proteospezifischen Peptiden geteilt werden.

Aminosäure	# Aminosäuren an 5. Position
Ala (A)	59
Cys (C)	31
Asp (D)	76
Glu (E)	90
Phe (F)	53
Gly (G)	66
His (H)	24
Ile (I)	65
Lys (K)	0
Leu (L)	101

Aminosäure	# Aminosäuren an 5. Position
Met (M)	21
Asn (N)	33
Pro (P)	58
Gln (Q)	54
Arg (R)	0
Ser (S)	101
Thr (T)	67
Val (V)	87
Trp (W)	18
Tyr (Y)	28

Die Aminosäurevorkommen aus dem praktisch ermittelten Datensatz wurde abschließend mit der proteomweit vorkommenden Anzahl ins Verhältnis gesetzt.

In gleicher Weise wurde für die Analyse der 6. Aminosäureposition verfahren.

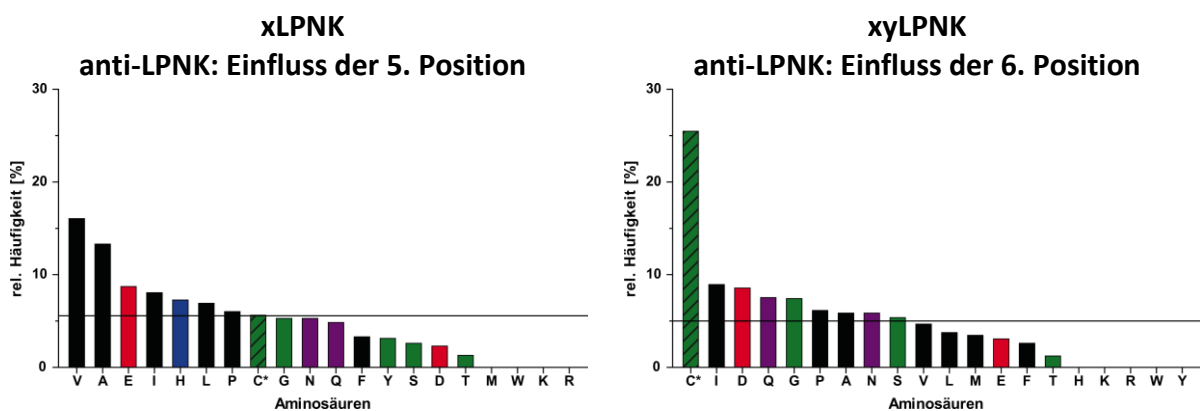


Abbildung 18 - Einfluss motivbenachbarter Aminosäuren auf die Anreicherung am Beispiel des TXP-Antikörpers anti-LPNK. Die Aminosäuren sind nach Art ihrer chemischen Funktion farblich gruppiert.

Nach Anreicherung mit anti-LPNK sind mit Ausnahme von Methionin, Tryptophan, Lysin und Arginin alle Aminosäuren an der vom C-Terminus aus gerechneten 5. Position in der Menge der identifizierten Peptide gefunden worden. Aufgrund der Tatsache, dass nur tryptische Peptide für die Analyse berücksichtigt wurden und somit sequenzintern Lysin und Arginin nur mit direkt C-terminal anschließenden Prolin auftauchen können, ist die Existenz der beiden Aminosäuren bei einer Anreicherung mittels „LPNK“-Motiv nicht möglich. Bei von der 5. Position vollständig unabhängiger Sequenzanreicherung sollte die relative Häufigkeit jeder vorgefundenen Aminosäure bei 5,56% liegen.

Dabei gilt es zu beachten, dass die Form der Auswertung lediglich eine Tendenz beschreibt, da der Versuch in einem Zellsystem stattgefunden hat, in dem es nicht gewährleistet ist, dass alle statistisch mit einbezogenen Sequenzen exprimiert bzw. in ausreichender, für das Massenspektrometer detektierbarer Menge vorhanden waren.

Valin war am häufigsten in der 5. Position nach Anreicherung mit anti-LPNK zu finden. Neben Valin wurden ebenso die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Prolin tendenziell häufiger vorgefunden. Peptide mit Tyrosin, Serin und Threonin an der 5. Position wurden seltener detektiert. Sie eint eine Hydroxylfunktion in der Seitenkette.

An der 6. Position sind bis auf Histidin, Lysin, Arginin, Tryptophan und Tyrosin alle Aminosäuren vorgefunden worden. Peptide, die ein carbamoyliertes Cystein trugen, wurden anteilmäßig am häufigsten gefunden.

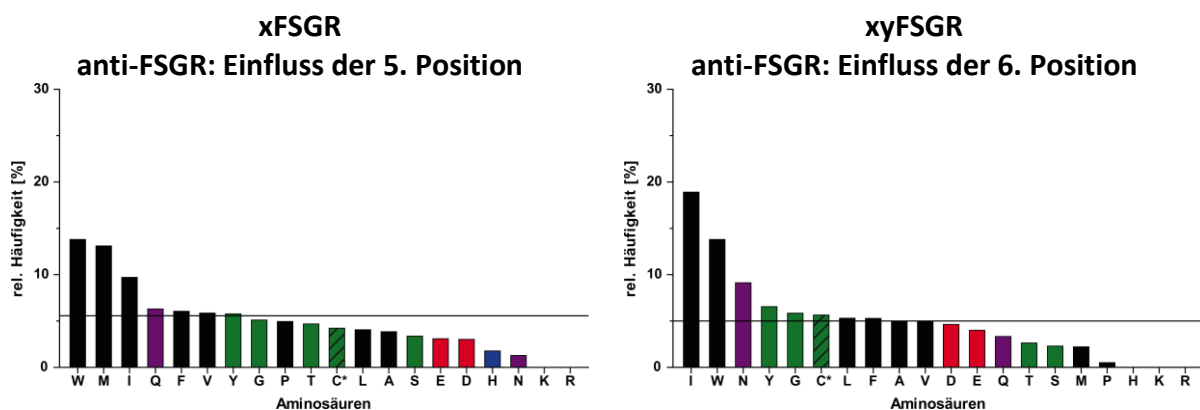


Abbildung 19 - Einfluss motivbenachbarter Aminosäuren auf die Anreicherung am Beispiel des TXP-Antikörpers anti-FSGR. Die Aminosäuren sind nach Art ihrer chemischen Funktion farblich gruppiert.

Die Analyse der mittels anti-FSGR angereicherten Peptide ergab, dass alle an dieser Position möglichen Aminosäuren identifiziert werden konnten. Die drei hydrophoben Aminosäuren Tryptophan, Methionin und Isoleucin waren am häufigsten, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Histidin und Asparagin am wenigsten zu finden.

An der 6. Position waren Leucin, Tryptophan und Asparagin die drei am häufigsten vorgefundenen Aminosäuren. Peptide, die ein Histidin, Lysin oder Arginin an dieser Position besitzen, konnten nicht identifiziert.

4.2.6. Dynamischer Messbereich der TXP-Tests

4.2.6.1. Richtigkeit in verschiedenen Matrices (Accuracy)

Um für jedes Motivpeptid die Ionisationseigenschaften während des LC-MS-Arbeitsablaufs zu untersuchen, wurden serielle Verdünnungen der isotopenmarkierten Referenzpeptide in konstant gehaltener Konzentration des nicht markierten sequenzgleichen Peptides in verschiedenen Diluenten durchgeführt. Das konstant gehaltene nicht markierte Peptid diente hierbei zur Ermittlung der Wiederfindungsrate des isotopenmarkierten Standardpeptids.

Als höchste Startkonzentration wurde das isotopenmarkierte Peptid auf 10 nM (in Anlehnung an geplante Immunopräzipitationen: 1 pmol Peptid in 100 µL Diluent) eingestellt. Das nicht markierte sequenzgleiche Peptid war auf 1 nM (100 fmol Peptid in 100 µL Diluent) verdünnt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:3 durchgeführt. Die niedrigste Konzentration des Referenzpeptides betrug nach acht Verdünnungsschritten 1,5 pM. Es wurden 5 µL für die Analyse über LC-MS injiziert. Die höchste injizierte Peptidmenge betrug absolut 50 fmol, die niedrigste 7,6 amol. Für die Messung wurde eine tSIM-Methode verwendet.

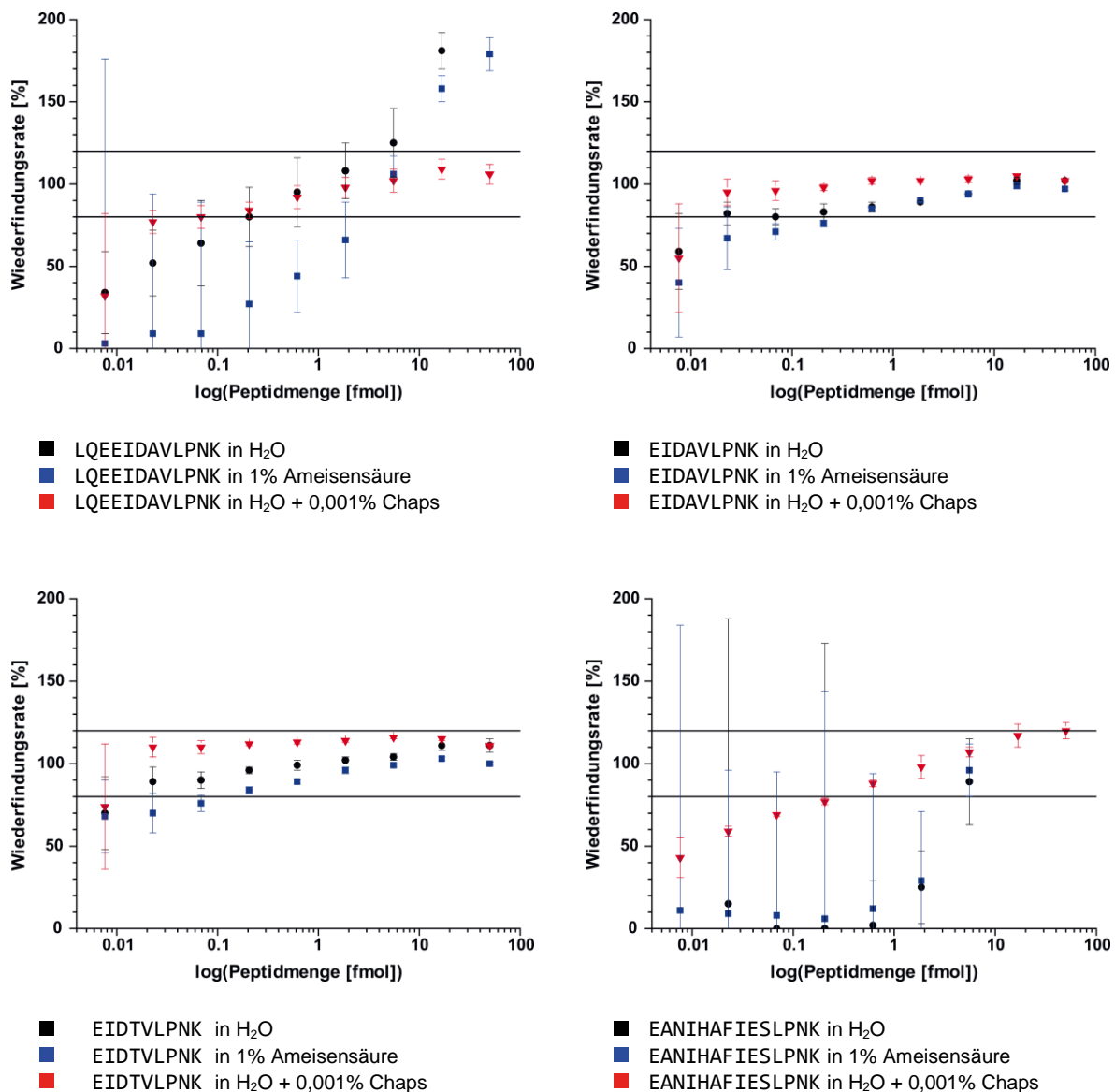


Abbildung 20 - Wiederfindungsrate der vier „LPNK“-Motivpeptide nach Verdünnung in unterschiedlichen Diluenten

Der Diluent, der über alle Peptide hinweg den größten linearen Messbereich erlauben würde, sollte zur Evaluierung der am besten zur Quantifizierung geeigneten MS-Methode herangezogen werden.

Die Wiederfindungsrate des in ddH₂O verdünnten CYP3A4-Peptides LQEEIDAVLPNK weist lediglich einen linearen Messbereich von einer Größenordnung auf. Dieser liegt unter der Konzentration des äquimolar zugegebenen nicht markierten Sequenzpeptides. Bei höher gewählter Konzentration des isotonenmarkierten Peptides wurde eine Überquantifizierung, bei niedriger gewählten Konzentrationen eine Unterquantifizierung ermittelt.

Ergebnisse |

Die Verdünnung in 1% Ameisensäure weist einen linearen Messbereich von einer halben Größenordnung auf. Eine Wiederfindungsrate um 100% war nur bei äquimolarer Zugabe des Peptidpaares gegeben. Die Zugabe von 0,001% Chaps in Wasser ermöglichte einen linearen Messbereich über drei Größenordnungen.

Die Peptide EIDAVLPNK für CYP3A5 und EIDTVLPNK für CYP3A7 weisen bei der Verdünnung in ddH₂O einen linearen Messbereich von drei Größenordnungen, bei Verdünnung in 1% Ameisensäure von zweieinhalb Größenordnungen auf. Die Verdünnung in mit Detergenz versetztem Wasser ermöglicht einen linearen Messbereich von dreieinhalb Größenordnungen.

Die Verdünnung des Peptides EANIHFIESLPNK ermöglicht in ddH₂O und 1% Ameisensäure die Quantifizierung nur bei annähernd äquimolarem Einsatz von isotope markierten und nicht markiertem Peptid. Die Zugabe von Detergenz erweitert den linearen Bereich auf zwei Größenordnungen.

Die Peptidverdünnung in ddH₂O mit 0,001% Chaps ermöglichte bei allen vier Peptiden den breitesten linearen Messbereich.

4.2.6.2. Wahl der geeigneten MS-Messmethode

Da die Peptidverdünnung in ddH₂O mit 0,001% Chaps unter den drei gewählten Diluenten den breitesten linearen Messbereich ergab, wurde die serielle Verdünnungsreihe dazu genutzt, die geeignetere zweier MS-Quantifizierungsmethoden zu ermitteln. Hierzu wurde auf der einen Seite die tSIM-Methode verwendet, bei der einzelne Ionen auf MS-Ebene gesammelt und vermessen werden. Die korrekte Identifikation der Analytsequenz ist hierbei durch die bekannte Retentionszeit, die Koelution mit dem isotope markierten sequenzgleichen Standard, die bis auf vier Dezimalen genau bestimmte Masse und die alle 2 s erfolgende MS²-Generierung gewährleistet.

Im Vergleich hierzu wurde mit der tMS²-Methode eine Detektionsstrategie getestet, bei der die Quantifizierung über das Verhältnis von isotope markierten und nicht markierten Fragmentationen erfolgt. Die Massenspektrometer (Q Exactive Plus™ - Thermo Scientific)

fokussiert hierbei im ersten Quadrupol auf die Elternmassen des Peptidpaares. Die Elternionen werden in der Ionenfalle gesammelt und daraufhin in die Stoßzelle geleitet. Dort werden die Elternionen über Zusammenstöße mit Stickstoffatomen in Fragmente gespalten. Die Fragmente werden daraufhin in die Messzelle übermittelt und detektiert.

Die auf das Verhältnis von Fragmentmassen beruhende Quantifizierung bietet den Vorteil, dem Umstand zu begegnen, dass coeluiierende isobare Substanzen das Quantifizierungsergebnis auf MS-Ebene durch Überlagerung verzerren könnten.

Die Ermittlung der Wiederfindungsrate erfolgte bei der tMS2-Methode über das Fragmention mit der jeweils höchsten Intensität.

Ergebnisse |

Exemplarisch sind die Wiederfindungsraten der tSIM- und tMS2-Methode für die vier LPNK-Motivpeptide aufgetragen:

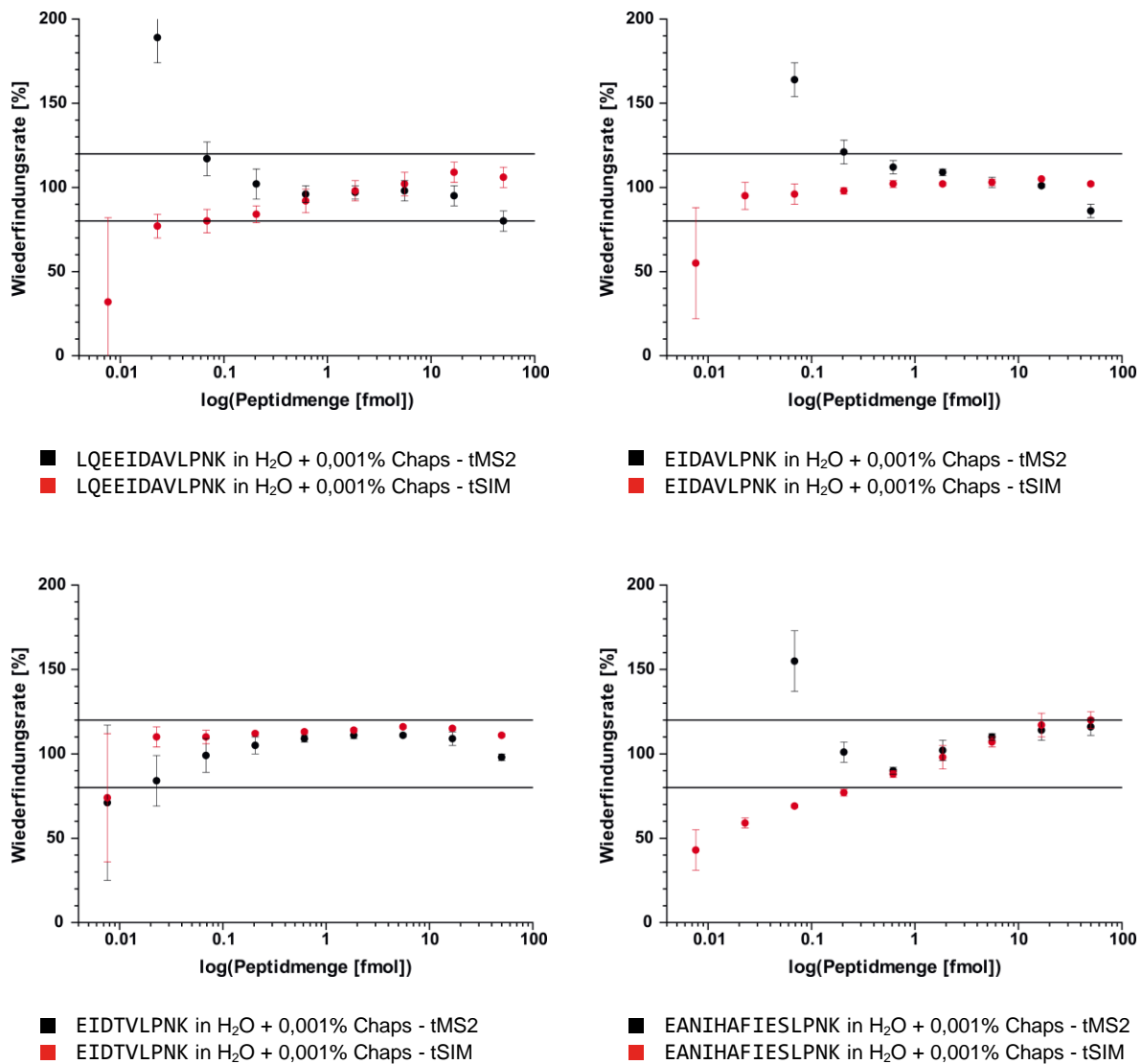


Abbildung 21 - Wiederfindungsrate der vier „LPNK“-Motivpeptide nach Verdünnung in H₂O + 0,001% Chaps

Die Wiederfindungsraten aller für die Testentwicklung vorgesehenen Peptide wurden für beide Detektionsmethoden tabellarisch aufgetragen. Die Bereiche, in denen sich die Wiederfindungsrate in den Grenzen von $\pm 20\%$ bewegten, wurden farblich markiert.

Die auf der Detektion von Elternionen basierende tSIM-Methode lieferte für die überwiegende Sequenzanzahl einen größeren linearen Messbereich, als mit der tMS2-Methode erzielt werden konnte. Einzige Ausnahme bildete die Motivsequenz EANIHFIESLPNK, die mit tMS2 eine halbe Größenordnung niedriger konzentriert noch mit

einer Wiederfindungsrate zwischen 80% und 120% detektiert werden konnte. Das Peptid EALIDHGEEFSGR war weder mit tSIM, noch mit tMS2 in keiner Verdünnungsstufe in diesem Bereich zu quantifizieren.

Tabelle 21 - Zusammenfassung des Detektionsbereichs unter Verwendung der tSIM- und tMS2-Methode. Für die Testentwicklung verwendete Motipeptide wurden nach serieller Verdünnung in H₂O + 0,001% Chaps mittels tSIM und tMS2 detektiert. Die Bereiche, in denen sich die Wiederfindungsrate in den Grenzen von ±20% bewegten, wurden farblich markiert (tSIM (rot) und tMS2 (schwarz)).

			10 amol	100 amol	1 fmol	10 fmol	100 fmol
		■ tSIM ■ tMS2					
LPNK	CYP3A4	LQEEIDAVLPNK					
	CYP3A5	EIDAVLPNK					
	CYP3A7	EIDTLPNK					
	MDR1	EANIHFIESLPNK					
LAER	CYP2C9	GIFPLAER					
	CYP2C19	GHFPLAER					
NGER	CYP2A6	GYGVVFSNGER					
FAIK	CYP2A13	ELQGLEDFIAK					
SVLK	CYP2D6	GTTLITNLSSVLK					
FVEK	CPR	ESSFVEK					
FSGR	CYP2B6	AEAFSGR					
	CYP2C8	EALIDNGEEFSGR					
	CYP2C18	EALIDHGEEFSGR					
	CYP2E1	DEFSGR					
	CYP2F1	EALVDQGEFSGR					
	CYP2S1	EALGGQAEFSGR					
VIGR	CYP1A1	IQEELDTVIGR					
	CYP1A2	ELDTVIGR					
	CYP2C8	VQEEIDHVIGR					
ENLR	CYP2D6	GNPESSFNDENLR					

4.2.6.3. Linearer Messbereich der auf Immunopräzipitation basierenden TXP-Tests

Die für die TXP-Tests benötigten isotoopenmarkierten Motivsequenzen wurden in Blockierungspuffer seriell mit nicht markierten sequenzgleichen Peptiden, deren Konzentration über alle Verdünnungsschritte konstant gehalten wurde, verdünnt.

Als Startkonzentration waren für das isotoopenmarkierte Peptid 100 nM gewählt. Nicht markiertes Peptid war in einer konstant gehaltenen Konzentration von 10 nM eingesetzt. In den Immunopräzipitationsprozess wurden jeweils 10 µL Peptidlösung eingesetzt. Dies entsprach in der höchsten Konzentration 1 pmol isotoopenmarkierten Peptids. Nicht markiertes Peptid war über alle Immunopräzipitationen mit 100 fmol vertreten. Als niedrigste Peptidmenge wurden 152 amol eingesetzt.

Die Elution erfolgte in 20 µL 1% Ameisensäure. Es wurden 5 µL Eluat in die Chromatographieanlage injiziert. Somit standen nach Durchlauf des LC-MS-Prozesses maximal 250 fmol isotoopenmarkiertes Peptid in der konzentriertesten Probe und 38 amol in der am niedrigsten konzentrierten Probe zur Detektion zur Verfügung.

Der Versuchsaufbau wurde in zwei Variationen durchgeführt. In einer ersten Versuchsanordnung wurde die Immunopräzipitation unter Verwendung von jeweils einem einzigen Motivantikörper je Immunopräzipitation durchgeführt. Die TXP-Antikörper kamen hierbei mit jeweils 5 µg zum Einsatz.

In einem zweiten Versuchsaufbau wurden alle TXP-Antikörper kombiniert in einen Immunopräzipitationsschritt eingesetzt, deren Motivpeptide jeweils über TXP-Multiplex-Gradient 1 oder TXP-Multiplex-Gradient 2 aufgetrennt werden würden. Es wurden die Antikörper anti-LPNK, anti-LAER, anti-NGER, anti-FIAK, anti-SVLK und anti-FVEK mit jeweils 1 µg in den TXP-Multiplex-Test 1, die Antikörper anti-FSGR, anti-VIGR und anti-ENLR mit jeweils 1 µg in den TXP-Multiplex-Test 2 eingesetzt.

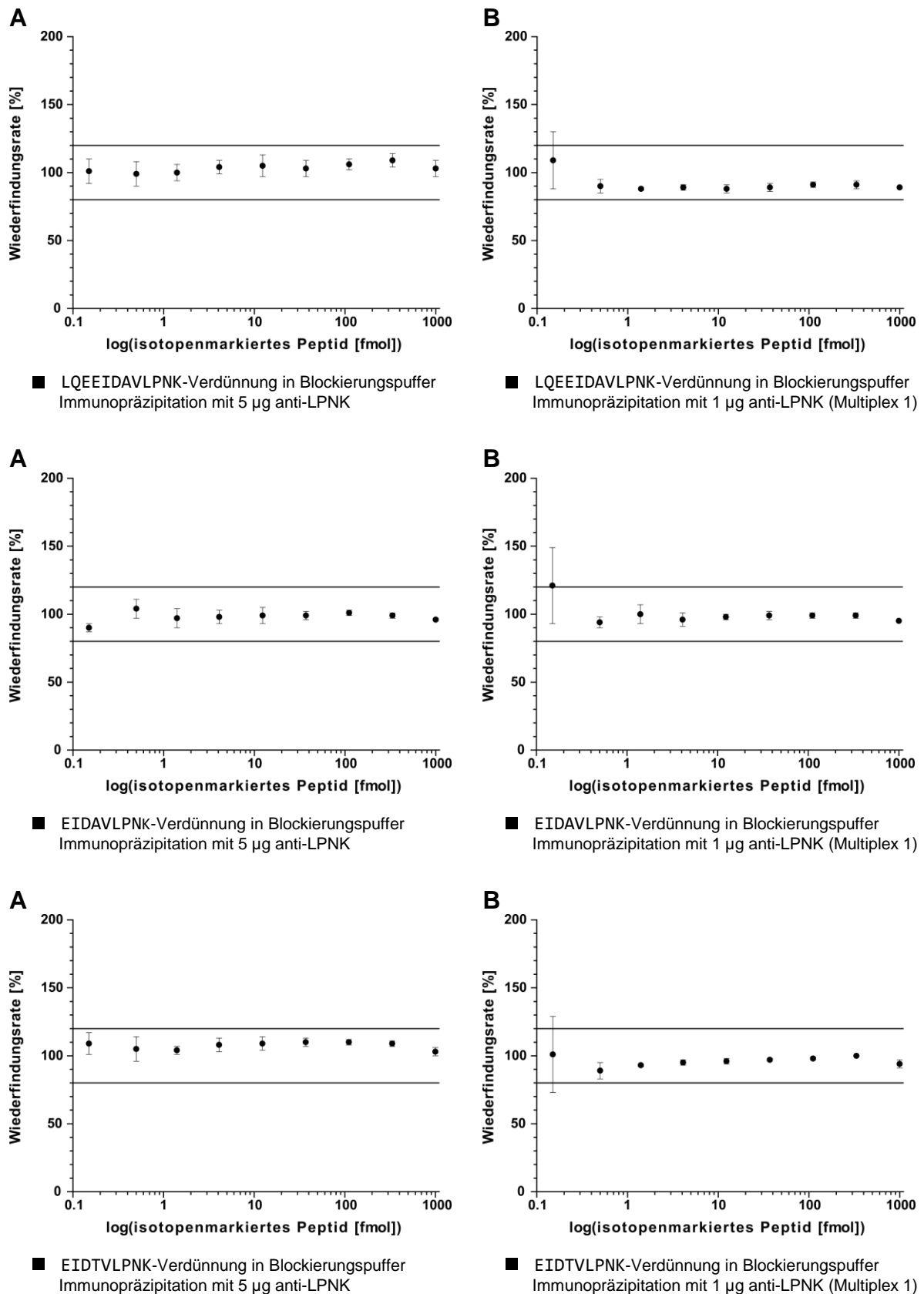


Abbildung 22 - Vergleich des linearen Messbereichs zweier CYP3A4-, CYP3A5- und CYP3A7-Testanordnungen. Es wurde die Größe des linearen Messbereichs zwischen einer monoplexen Anreicherungsstrategie, bei der ausschließlich anti-LPNK in einer Menge von 5 µg eingesetzt wurde (A), und einer auf 1 µg anti-LPNK basierenden multiplexen Versuchsanordnung (B) verglichen, in der mehrere verschiedene TXP-Antikörper zum Einsatz kamen.

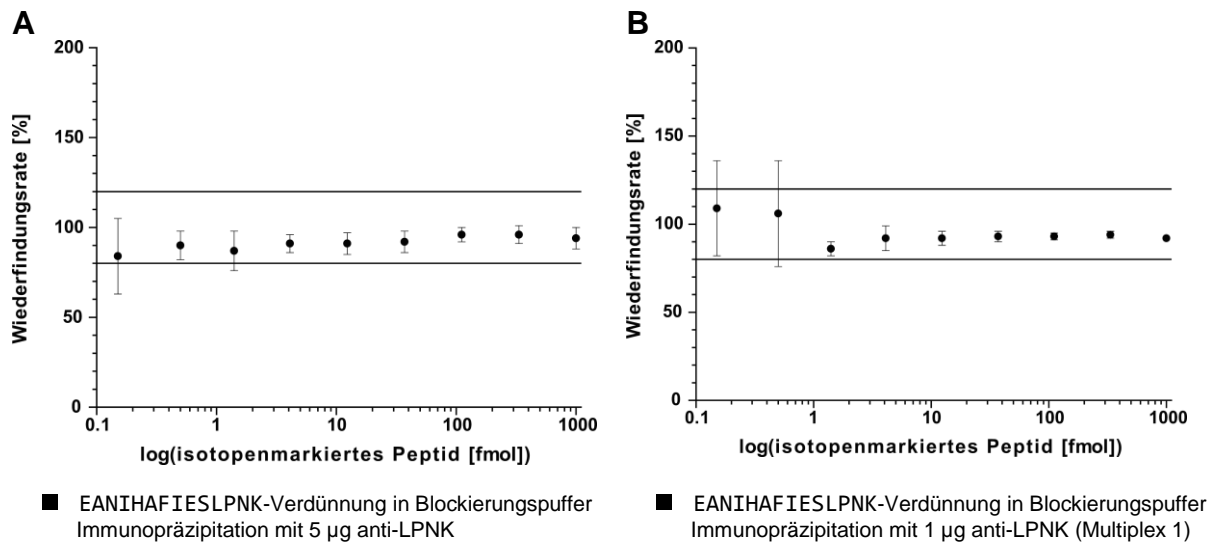


Abbildung 23 - Vergleich des linearen Messbereichs zweier MDR1-Testanordnungen. Es wurde die Größe des linearen Messbereichs zwischen einer monoplexen Anreicherungsstrategie, bei der ausschließlich anti-LPNK in einer Menge von 5 µg eingesetzt wurde (A), und einer auf 1 µg anti-LPNK basierenden multiplexen Versuchsanordnung (B) verglichen, in der mehrere verschiedene TXP-Antikörper zum Einsatz kamen.

Es sollte hierbei untersucht werden, ob sich die Antikörper gegenseitig im Immunopräzipitationsprozess beeinflussen. Des Weiteren galt es zu untersuchen, welche Auswirkungen die Bindekapazität der TXP-Antikörper auf Immunopräzipitationen hat, die unter Verwendung niedriger Antikörpermengen durchgeführt werden. Beispielhaft wurde der lineare Messbereich der vier „LPNK“-Zielpeptide für die Immunopräzipitation mit 5 µg anti-LPNK in monoplexer und 1 µg anti-LPNK in multiplexer Anordnung (TXP-Multiplex 1: anti-LPNK, anti-LAER, anti-FIAK, anti-NGER, anti-SVLK und anti-FVEK) dargestellt.

Die Immunopräzipitation mit 5 µg anti-LPNK wies für die zu entwickelten CYP3A4-, CYP3A5-, CYP3A7- und MDR1-Tests einen linearen Messbereich auf, der vier Größenordnungen umspannte. Die Verwendung desselben Antikörpers in einer multiplexen Anordnung zeigte keine Kreuzreaktionen auf und ermöglichte einen linearen Messbereich von 3 bis 3,5 Größenordnungen.

4.2.6.4. Zusammenfassung des linearen Messbereichs der 18 entwickelten TXP-Tests

Die linearen Messbereiche aller entwickelten Tests wurden unter Einbezug der von Ohtsuki et al. in mikrosomalen Fraktionen über LC-MS bestimmten Konzentrationen (blau markiert) aufgeführt [110]. Die Markierung bezieht sich auf die Annahme, dass 1 µg Lysat in die Immunopräzipitation eingesetzt worden wäre. Der auf Peptidverdünnung in Blockierungspuffer basierende Immunopräzipitationstest wurden unter Verwendung von jeweils 1 µg Antikörper in zwei multiplexen Anordnungen (TXP-Multiplex 1 & 2) vermessen.

Tabelle 22 - Aufbau der zwei entwickelten multiplexen TXP-Testanordnungen

Multiplexe Anordnung 1 (jeweils 1 µg Antikörper)	# Analyte	Multiplexe Anordnung 2 (jeweils 1 µg Antikörper)	# Analyte
anti-LPNK	4	anti-FSGR	6
anti-LAER	2	anti-VIGR	3
anti-NGER	1	anti-ENLR	1
anti-FAIK	1		
anti-SVLK	1		
anti-FVEK	1		

Die für anti-LPNK entwickelten Tests weisen einen linearen Messbereich von 3 bis 3,5 Größenordnungen auf. Der von Ohtsuki et al. ermittelten minimalen und maximalen Proteinmengen liegen bei allen vier entwickelten Tests im linearen Messbereich.

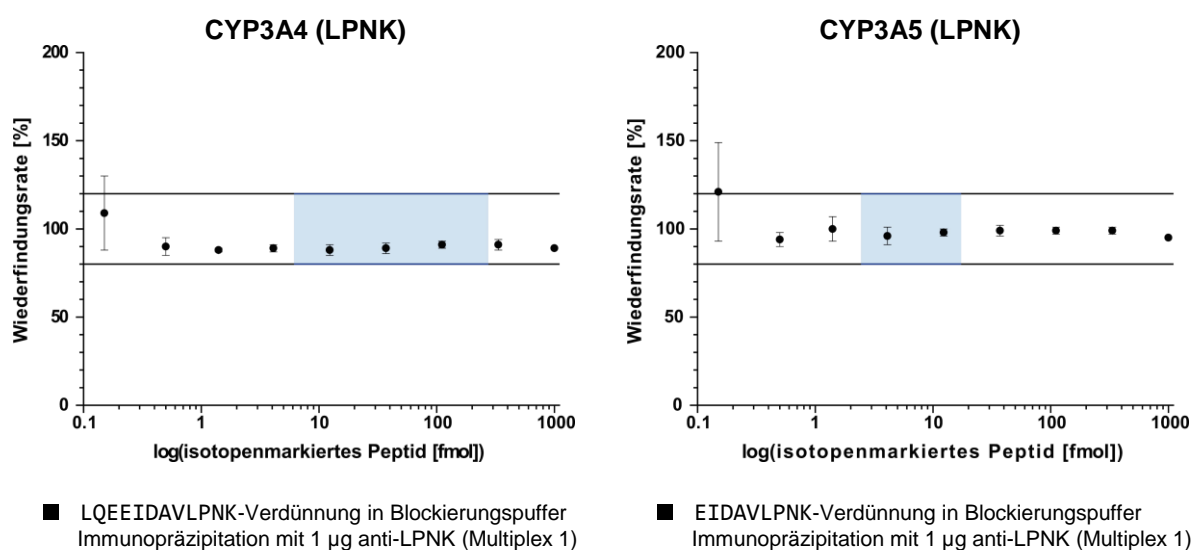


Abbildung 24 - Linearer Messbereich der für CYP3A4 und CYP3A5 entwickelten TXP-Tests. Von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereiche wurden für die Analyten blau hinterlegt.

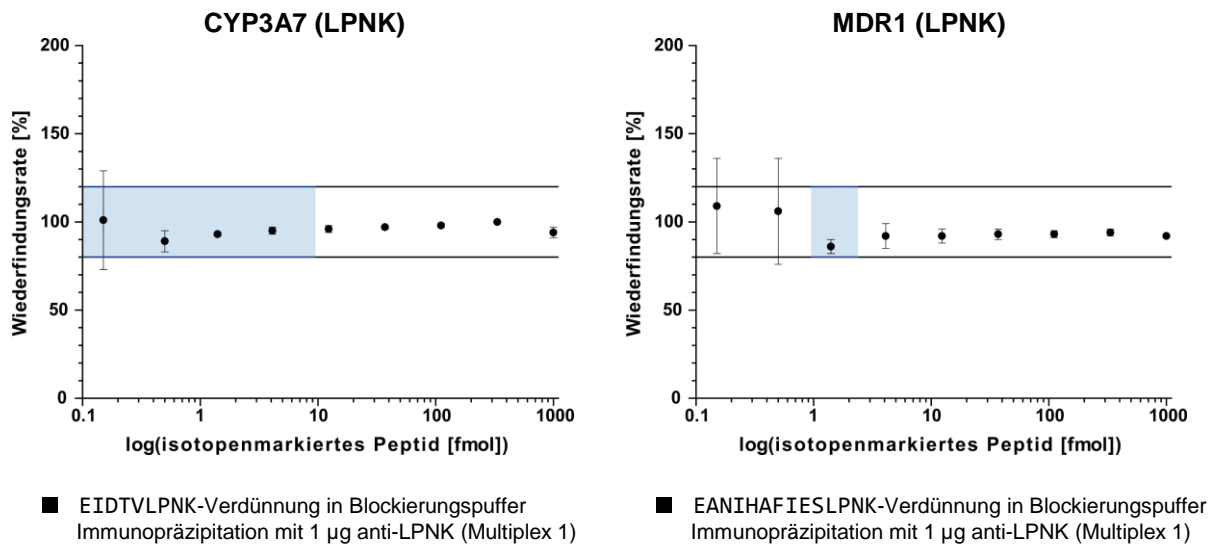


Abbildung 25 - Linearer Messbereich der für CYP3A7 und MDR1 entwickelten TXP-Tests. Von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereiche wurden für die Analyten blau hinterlegt.

Die für CYP2C9 und CYP2C19 entwickelten Tests besitzen einen drei Größenordnungen umfassenden linearen Messbereich. Die in mikrosomalen Fraktionen für CYP2C9 von 50 bis 100 fmol und für CYP2C19 von 2 bis 20 fmol variierenden Mengen liegen im linearen Testbereich.

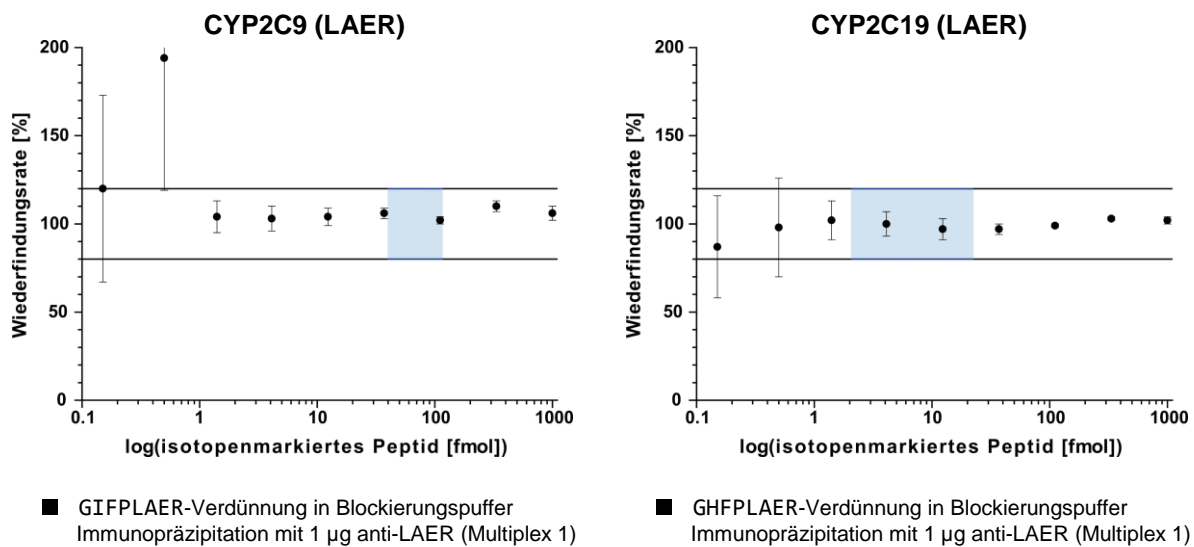


Abbildung 26 - Linearer Messbereich der für CYP2C9 und CYP2C19 entwickelten TXP-Tests. Von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereiche wurden für die Analyten blau hinterlegt.

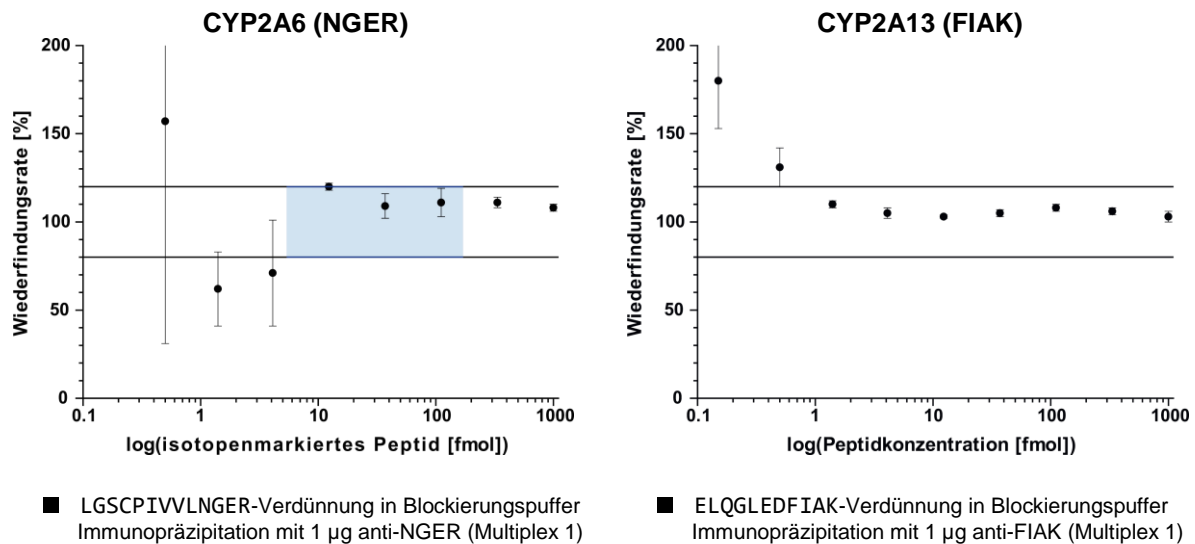


Abbildung 27 - Linearer Messbereich der für CYP2A6 und CYP2A13 entwickelten TXP-Tests. Der von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereich wurden, sofern bestimmt, für die Analyten blau hinterlegt.

Der für die CYP2A6-Quantifizierung entwickelte TXP-Test besitzt einen linearen Messbereich, der zwei Größenordnungen und die zwischen 10 und 100 fmol variierenden Analytkonzentrationen einschließt. Der CYP2A13-Test weist über drei Größenordnungen ein lineares Verhalten auf. Das Enzym CYP2A13 wurde in der Testanordnung von Ohtsuki et. al nicht vermessen.

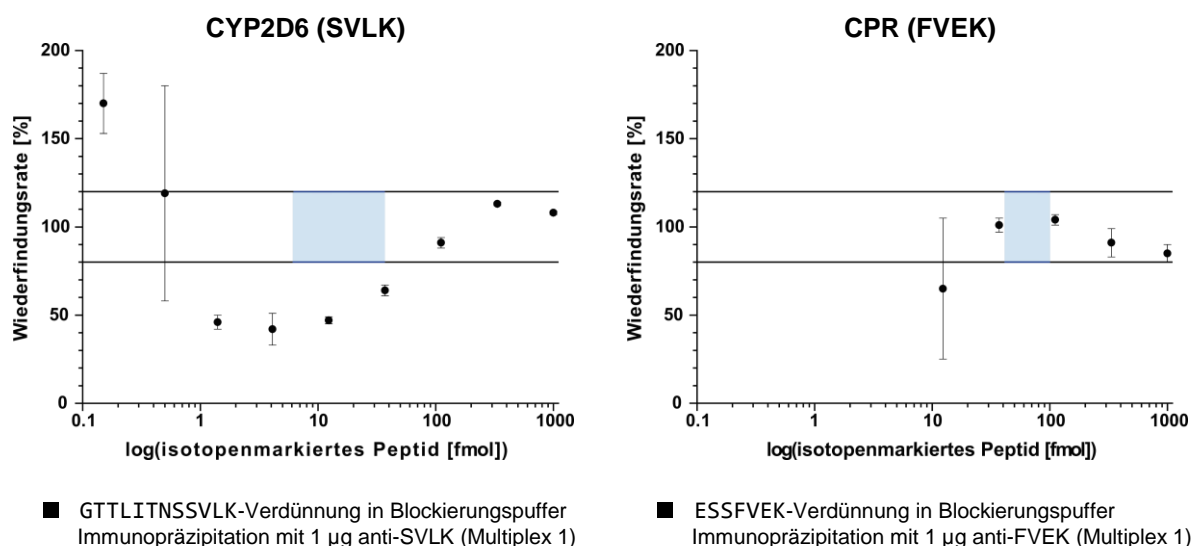
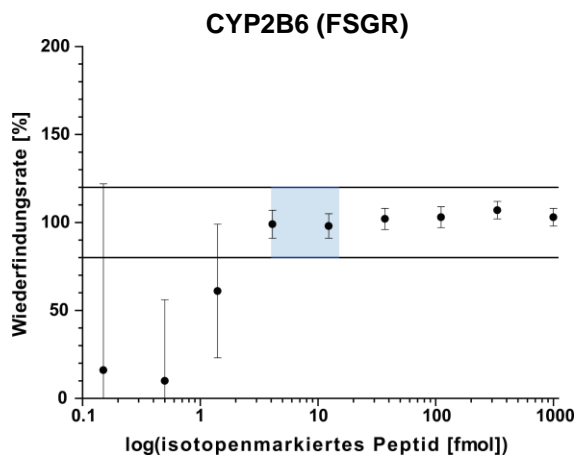


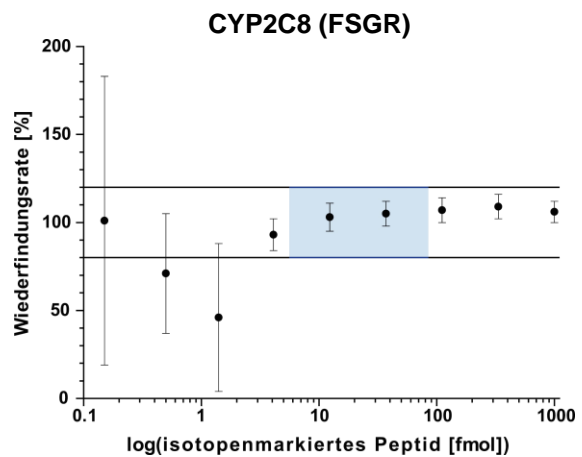
Abbildung 28 - Linearer Messbereich der für CYP2D6 und CPR entwickelten TXP-Tests. Von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereiche wurden für die Analyten blau hinterlegt.

Ergebnisse |

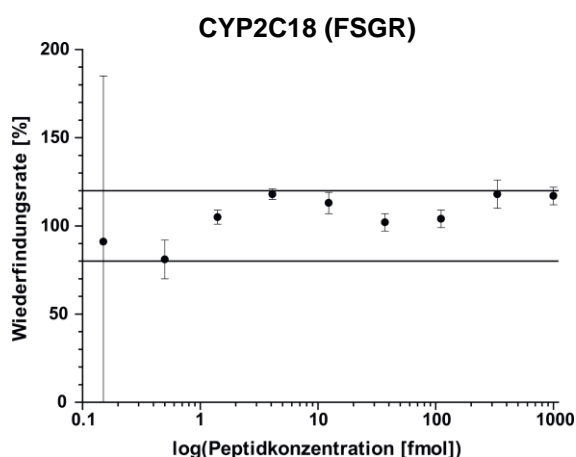
Der auf der Vermessung des GTTLITNSSVLK-Peptids beruhende CYP2D6-Test konnte nur über eine Größenordnung linear vermessen werden. Der Einsatz von isotopenmarkiertem und nicht markiertem Peptid musste hierbei äquimolar gehalten sein. Für eine robuste Vermessung der zwischen 5 und 30 fmol in mikrosomalen Fraktionen vorherrschenden Peptidmengen müsste die zehnfache Lysatmenge in die Immunopräzipitation eingesetzt werden. Das für die Quantifizierung der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase verwendete Peptid war unter einer Einsatzmenge von 10 fmol nicht mehr zu detektieren. Der Test besitzt einen 1,5 Größenordnungen umspannenden linearen Messbereich. Die in 1 µg Lysat erwartete CPR-Menge von 50 bis 100 fmol wird vom Messbereich umfasst.



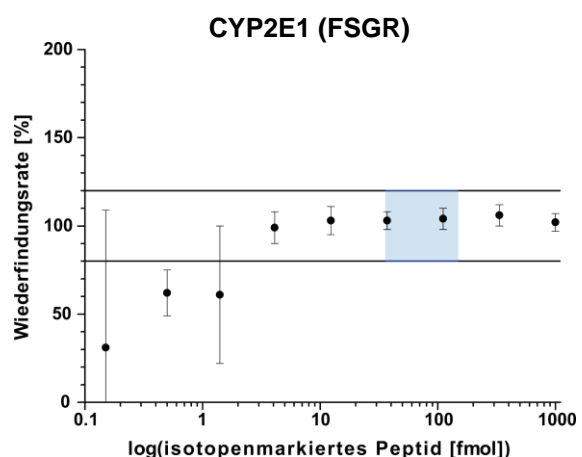
■ AEAFFSGR-Verdünnung in Blockierungspuffer
Immunopräzipitation mit 1 µg anti-FSGR (Multiplex 2)



■ EALIDNGEEFSGR-Verdünnung in Blockierungspuffer
Immunopräzipitation mit 1 µg anti-FSGR (Multiplex 2)



■ EALIDHGEEFSGR-Verdünnung in Blockierungspuffer
Immunopräzipitation mit 1 µg anti-FSGR (Multiplex 2)



■ DEFSGR-Verdünnung in Blockierungspuffer
Immunopräzipitation mit 1 µg anti-FSGR (Multiplex 2)

Abbildung 29 - Linearer Messbereich der für CYP2B6, CYP2C8, CYP2C18 und CYP2S1 entwickelten TXP-Tests. Von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereiche wurden, sofern bestimmt, für die Analyten blau hinterlegt.

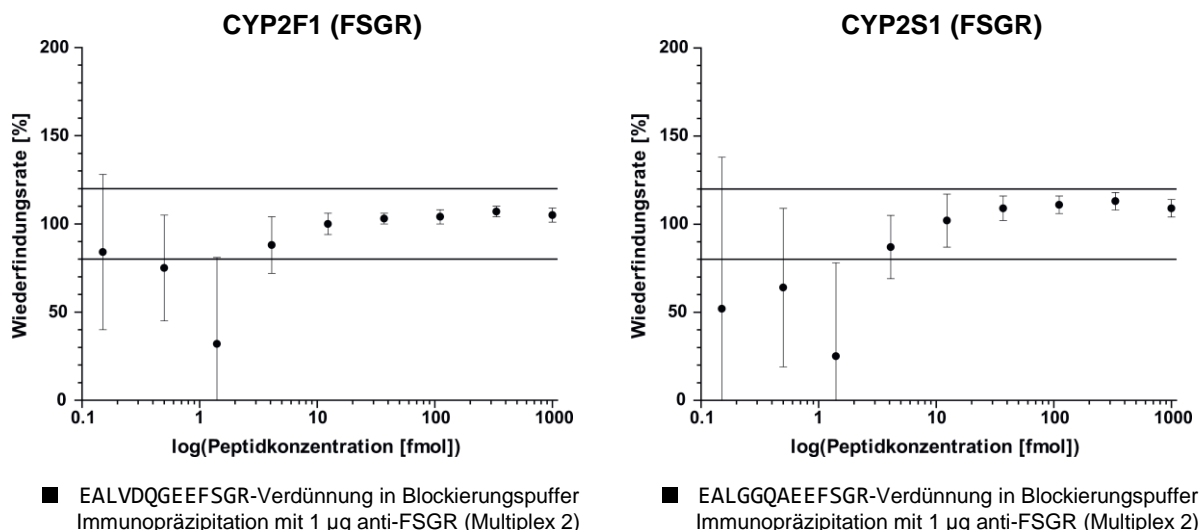


Abbildung 30 - Linearer Messbereich der für CYP2F1 und CYP2S1 entwickelten TXP-Tests. Von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereiche wurden, sofern bestimmt, für die Analyten blau hinterlegt.

Die für CYP2B6, CYP2C8, CYP2C18, CYP2E1, CYP2F1 und CYP2S1 entwickelten TXP-Tests weisen einen linearen Messbereich von 2 bis 2,5 Größenordnungen auf und lassen damit Quantifizierungen zwischen 5 und 1000 fmol bei einer bei 100 fmol liegenden Referenzpeptidmenge zu. Die für CYP2B6 zwischen 5 und 10 fmol, für CYP2C8 zwischen 5 und 100 fmol und CYP2E1 zwischen 40 und etwas über 100 fmol zu erwartenden Analytmengen liegen in den von den Tests abgedeckten linearen Bereichen.

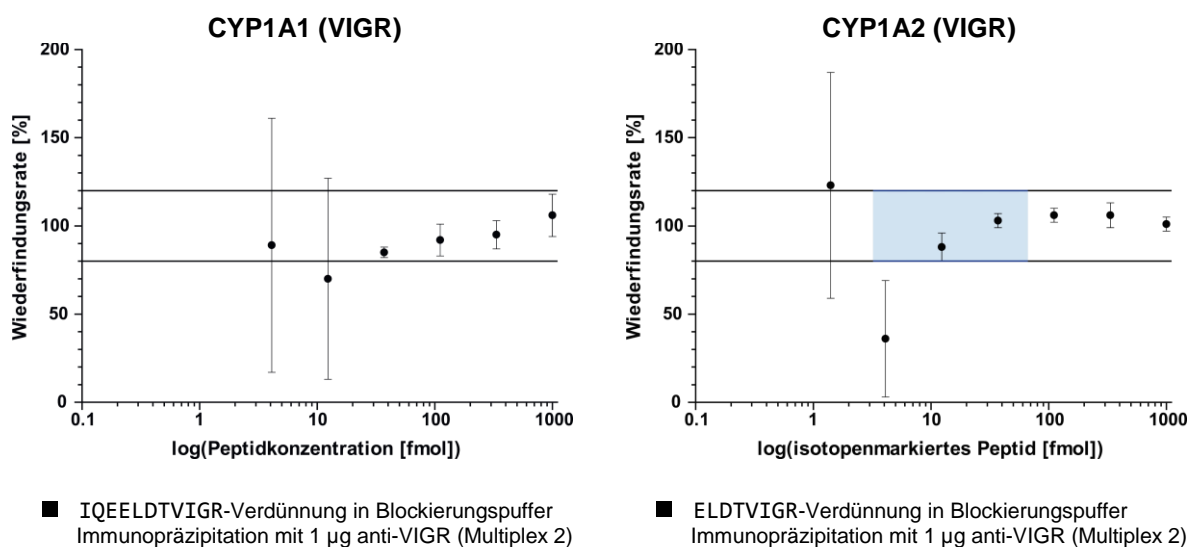


Abbildung 31 - Linearer Messbereich der für CYP1A1 und CYP1A2 entwickelten TXP-Tests. Von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereiche wurden, sofern bestimmt, für die Analyten blau hinterlegt.

Die zu Familie 1 des Fremdstoffmetabolismus zugehörigen Enzyme CYP1A1 und CYP1A2 weisen einen 1,5 bzw. 2 Größenordnungen umspannenden linearen Bereich auf.

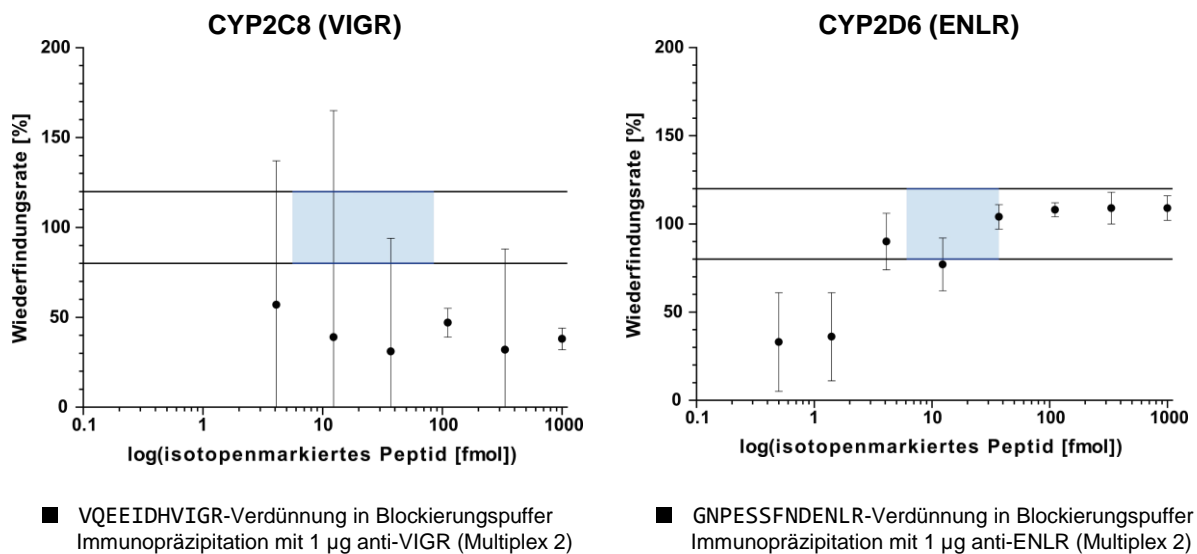


Abbildung 32 - Linearer Messbereich der für CYP2C8 und CYP2D6 entwickelten TXP-Tests. Von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen bestimmte Konzentrationsbereiche wurden für die Analyten blau hinterlegt.

Die angestrebte Testentwicklung für die über VIGR-Anreicherung adressierte CYP2C8-Quantifizierung musste verworfen werden, da sich die Wiederfindungsrate für alle Verdünnungen außerhalb der erwarteten $\pm 20\%$ -Marke befand und die Werte stark fehlerbehaftet waren.

Neben dem auf Anreicherung des Motivs „SVLK“ basierenden CYP2D6-Test wurde ein weiterer CYP2D6-Test entwickelt. Der auf Immunopräzipitation eines „ENLR“-Motivpeptides basierende Test weist einen linearen Messbereich von 2 bis 2,5 Größenordnungen auf.

4.2.7. Wahl geeigneter Referenzpeptideinsatzmengen für eine robuste Quantifizierung in komplexer Probe

Die Größe des Messbereichs, in dem ein TXP-Test ein lineares Verhalten aufweist, hängt von mehreren Faktoren ab. Einer der wichtigsten Bedingungen für eine robuste Quantifizierung stellt die ausreichende Intensität des Signals und damit Menge an Peptid dar, das im Massenspektrometer detektiert werden kann.

Je nach Peptidsequenz können während des Immunopräzipitationsprozesses aufgrund von materialbedingten Adsorptionseffekten Verluste auftreten. Des Weiteren hat die Bindekapazität des Antikörpers einen Einfluss darauf, wie viel Peptid über den gesamten Immunopräzipitationsprozess angereichert wird. Dabei ist sowohl die Anzahl der intakten Bindungsstellen bestimmend (Bindekapazität des Antikörpers - siehe 4.2.2), als auch die Stärke der ausgebildeten Bindung. Schwach gebundene Peptide können während der Waschschritte, die sich an die Immunopräzipitation anschließen, dissoziieren. Bei der Immunopräzipitation aus komplexer Matrix ist eine hohe Bindekapazität von großem Vorteil, da neben dem Referenzpeptid und der nicht markierten sequenzgleichen Variante noch viele weitere Peptide mit identischer oder ähnlicher Motivsequenz in unterschiedlichsten Konzentrationsbereichen um die Bindestellen des Antikörpers konkurrieren.

Für die Entwicklung der TXP-Tests war es wichtig, zu untersuchen, in welchem Konzentrationsbereich der zu quantifizierende Analyt in der biologischen Probe vorkommt und welche Menge an isotope markierten Peptid gewählt werden muss, um über einen möglichst großen Konzentrationsbereich robust quantifizieren zu können. Es wurden hierzu Immunopräzipitationen aus Hepatozytenlysat durchgeführt, bei denen unterschiedliche Mengen an isotope markierten Peptid in einer seriellen Verdünnung eingesetzt wurden.

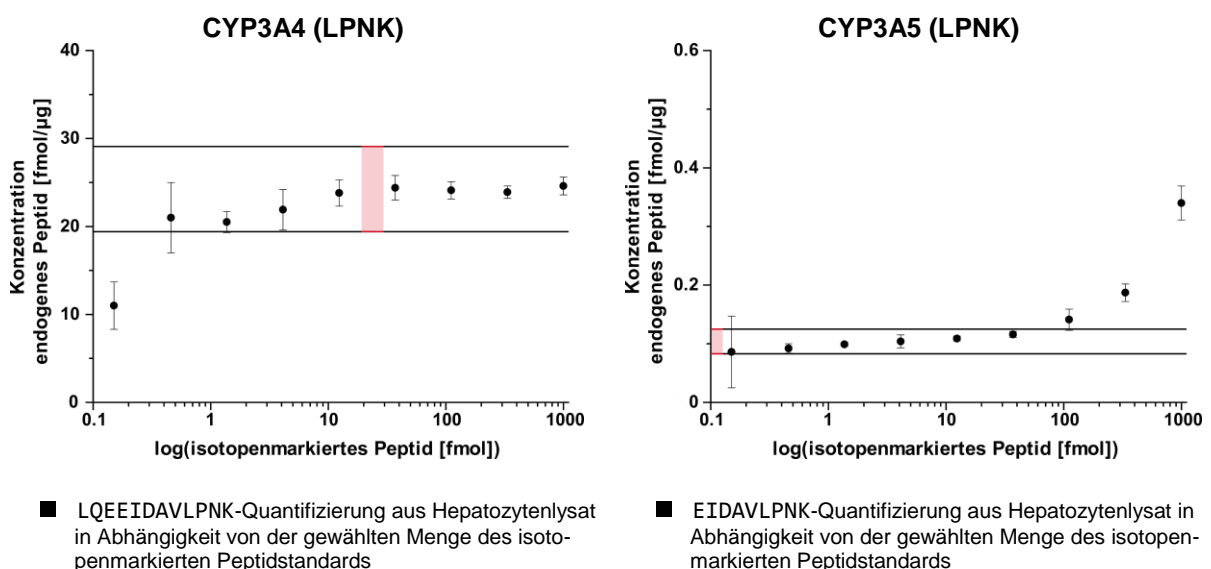


Abbildung 33 - Einfluss der gewählten Konzentration des isotope markierten Peptidstandards auf das Quantifizierungsergebnis am Beispiel von CYP3A4 und CYP3A5. Isotope markiertes Peptid wurde seriell in 10 μg verdautem Hepatozytenlysat verdünnt. Der Konzentrationsbereich, in dem das endogene, im Hepatozytenlysat befindliche Peptid und das zugegebene isotope markierte Peptid äquimolar vorhanden wären, wurde rot markiert.

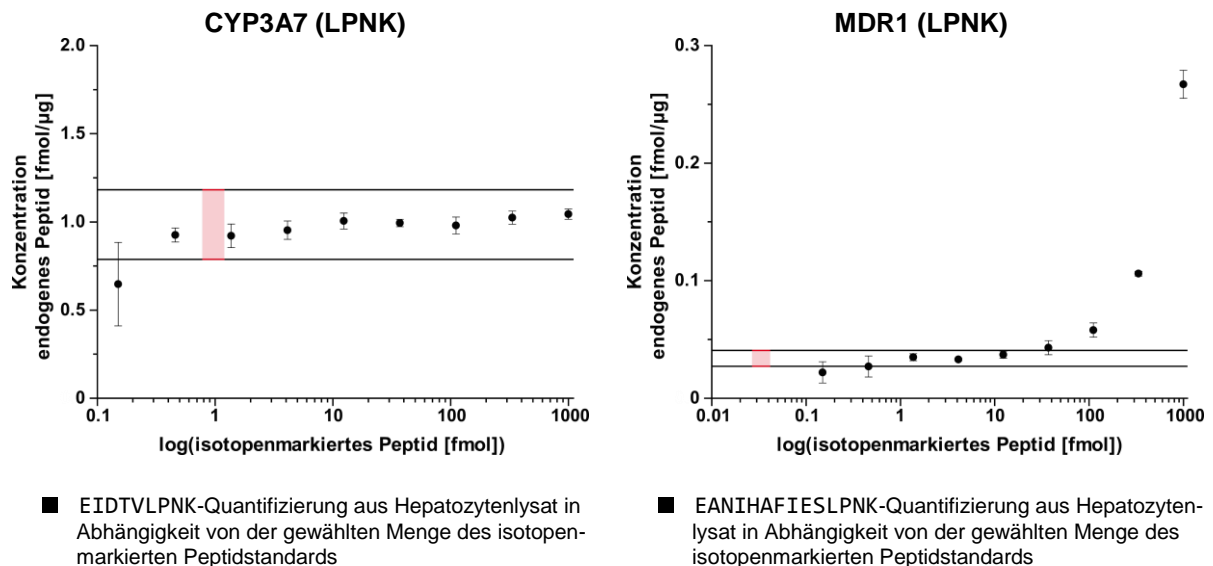


Abbildung 34 - Einfluss der gewählten Konzentration des isotopenmarkierten Peptidstandards auf das Quantifizierungsergebnis am Beispiel von CYP3A7 und MDR1. Isotopenmarkiertes Peptid wurde seriell in 10 µg verdautem Hepatozytenlysat verdünnt. Der Konzentrationsbereich, in dem das endogene, im Hepatozytenlysat befindliche Peptid und das zugegebene isotopenmarkierte Peptid äquimolar vorhanden wären, wurde rot markiert.

Für CYP3A4 war eine robuste Quantifizierung über annähernd 3,5 Größenordnungen möglich, ohne dass die Menge an isotopenmarkierten Standardpeptid einen größeren Einfluss auf das Quantifizierungsergebnis hatte. Ebenso verhielt es sich bei dem für CYP3A7 entwickelten TXP-Test. CYP3A5 und MDR1 waren in dem gewählten Hepatozytenlysat in einer sehr geringen Menge unter 100 amol vertreten. Eine robuste Quantifizierung war bis zu einer 1000fach höher gewählten Zugabemenge möglich. Für den Analyten MDR1 lieferte die am niedrigsten gewählte Zugabemenge (150 amol) fehlerbehaftete Werte. Obwohl die Menge an isotopenmarkierten Peptid sehr nah an der endogenen Peptidkonzentration lag, wurde eine leichte Unterquantifizierung errechnet.

4.2.8. Vergleich der TXP-Quantifizierungsstrategie mit der spektralen Quantifizierung von Cytochrom P450-Enzymen

Um die auf Immunopräzipitation mit TXP-Antikörpern basierende Quantifizierung mit anderen Quantifizierungsstrategien zu vergleichen, wurden 16 spektral bestimmte Cytochrom-P450-Enzyme und die nicht Häm-tragende NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase zugekauft.

Die Proteine wurden tryptisch verdaut und an den Herstellerangaben orientiert, mit 1 pmol in die Immunopräzipitation eingesetzt. Die TXP-Referenzpeptide wurden äquimolar hinzugegeben. Nach Immunopräzipitation wurden die ermittelten Peptidmengen mit den laut Herstellerangaben zu erwartenden Mengen ins Verhältnis gesetzt. Faktoren <1 beschreiben eine Unterquantifizierung durch Immuno-MS gegenüber der spektralen Quantifizierung, Faktoren >1 eine Überquantifizierung.

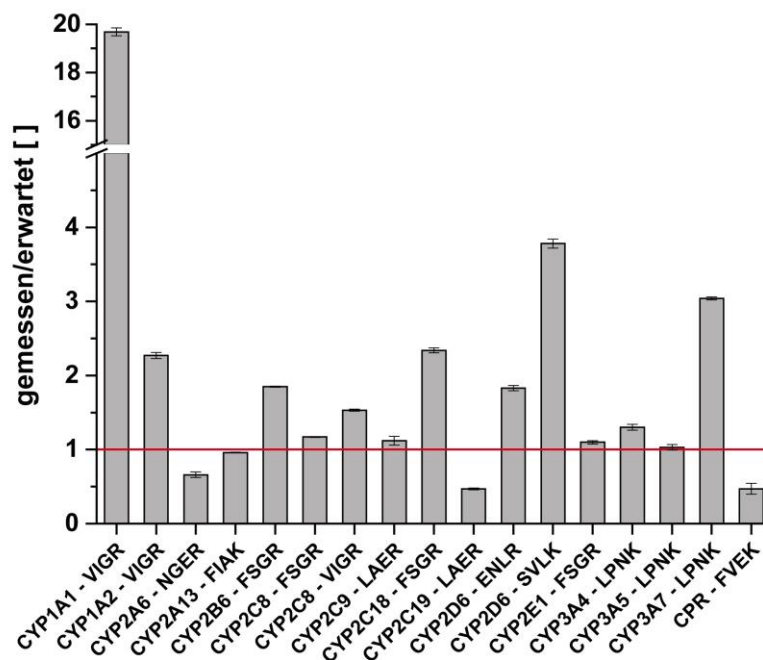


Abbildung 35 - Vergleich zweier Methoden zur Quantifizierung des Cytochrom P450-Systems. Spektral über die prosthetische Gruppe Häm quantifizierten Cytochrom P450 Enzyme wurden neben der mit gängigen Proteinbestimmungen ermittelten CPR-Menge nach tryptischer Fragmentierung mit TXP-Tests vermessen. Die mit der TXP-Strategie erzielten Ergebnisse wurden mit denen der Spektralanalyse und Proteinbestimmung ins Verhältnis gesetzt.

4.3. Anwendung der TXP-Quantifizierungsstrategie

4.3.1. MDR1-Expression in menschlichen Tumorzellen nach Xenotransplantation

Es wurde eine Studie zur Expression von MDR1 in Adriamycin-resistenten Tumoren durchgeführt. In Kooperation mit der Firma Merck KGaA wurden menschliche Ovarialkarzinomzellen (A2780) in Mausmodelle injiziert und diese nach Tumorausbildung entnommen und aufgeschlossen. Die vom Kooperationspartner zur Verfügung gestellten Tumorproben wurden lysiert und mit dem für MDR1 entwickelten TXP-Test in einer Immuno-MS-Prozedur vermessen.

Als Referenz zu den 22 gelieferten Tumorproben standen Kontrolllysate der Zelllinie in Wildtyp- und in Adriamycin-resistenter Form zur Verfügung. Sechs Tiere waren mit Wildtypzellen und weitere sechs Tiere mit Adriamycin-resistenten Zellen behandelt worden. Pro Tier wurden zwei Tumorproben entnommen. Bei beiden Versuchsanordnungen stand für jeweils zwei Tiere nur ein Tumor für eine Vermessung zur Verfügung.

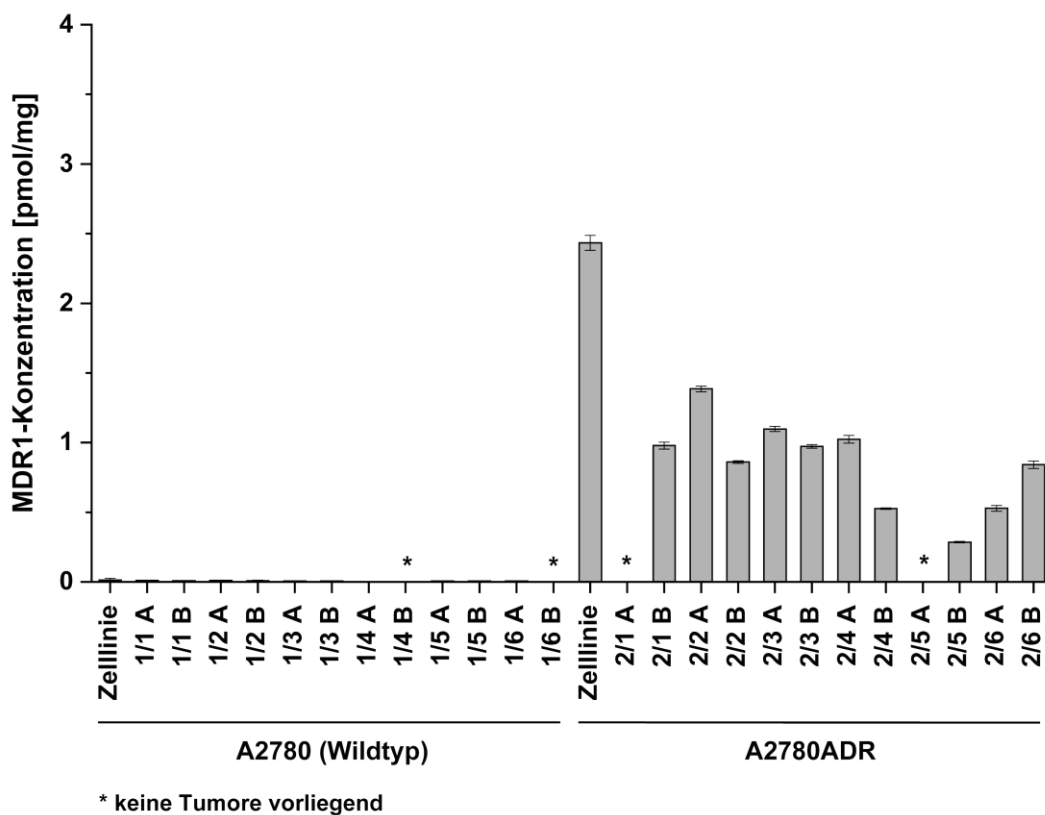


Abbildung 36 - MDR1-Quantifizierung in menschlichen Tumorzellen nach Xenotransplantation in Mausmodell. Adriamycin-sensitive und Adriamycin-resistente Tumore wurden bezüglich ihrer MDR1-Expression charakterisiert.

Tumore, die sich nach Injektion mit den in Wildtypform vorliegenden A2780-Zellen ausgebildet hatten, zeigten keine MDR1-Expression. In der Adriamycin-resistenten Zelllinie konnte MDR1 in einer Menge von 2,4 pmol/mg quantifiziert werden. Die ausgebildeten Tumore exprimierten MDR1 in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 1,4 pmol/mg.

4.3.2. Quantifizierungsstudie: Cytochrom P450-Enzymkonzentrationen in menschlicher Leber

4.3.2.1. Vergleich zweier Quantifizierungsstrategien: Cytochrom P450-Quantifizierung aus präparierten Mikrosomenfraktionen mittels Immuno-MS und Western Blot

In Kooperation mit dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (IKP Stuttgart) wurden die über die immunoaffinitätsbasierte TXP-LC-MS-Methode ermittelten Ergebnisse mit einer sich auf Western Blot stützenden Quantifizierungsstrategie verglichen. Zum Einsatz kamen Mikrosomenfraktionen von 18 Spendern. Es wurde festgestellt, dass sich die Ergebnisse zwischen den Methoden unterschieden, aber eine hohe Korrelation vorliegt.

Tabelle 23 - Vergleich der mit TXP-LC-MS und Western Blot ermittelten Quantifizierungsergebnisse für CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 und CYP2C19

	CYP3A4		CYP3A5	
	LC-MS [pmol/mg]	Western Blot [pmol/mg]	LC-MS [pmol/mg]	Western Blot [pmol/mg]
Median	6,4	120,6	0,2	2,5
Mittelwert	10,7	222,6	1,0	6,8
Min. Wert	0,6	5,8	0,1	0,2
Max. Wert	33,5	1034,4	3,0	24,4
Korrelation	0,892		0,957	

	CYP2C9		CYP2C19	
	LC-MS [pmol/mg]	Western Blot [pmol/mg]	LC-MS [pmol/mg]	Western Blot [pmol/mg]
Median	2,7	170,2	1,1	7,5
Mittelwert	2,8	219,1	1,4	14,3
Min. Wert	0,7	27,4	0,2	1,1
Max. Wert	5,6	774,5	3,7	53,6
Korrelation	0,577		0,740	

Tabelle 24 - Vergleich der mit TXP-LC-MS und Western Blot ermittelten Quantifizierungsergebnisse für CYP2A6, CYP2D6 und CPR

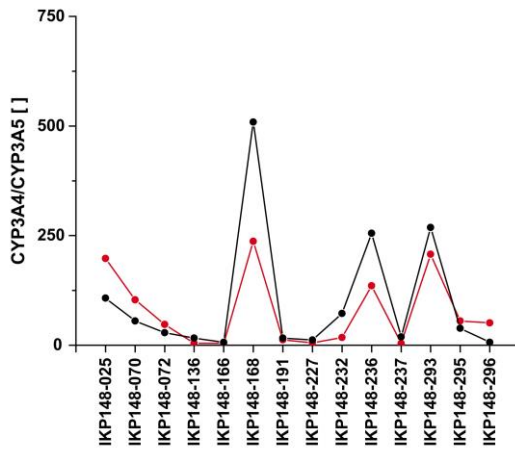
	CYP2A6		CYP2D6	
	LC-MS [pmol/mg]	Western Blot [pmol/mg]	LC-MS [pmol/mg]	Western Blot [pmol/mg]
Median	8,2	23,3	2,6	27,2
Mittelwert	9,5	29,9	3,5	38,4
Min. Wert	0,6	1,5	0,4	0,4
Max. Wert	20,1	114,4	9,7	120,2
Korrelation	0,818		0,856	

	CPR	
	LC-MS [pmol/mg]	Western Blot [pmol/mg]
Median	27,0	71,5
Mittelwert	27,9	67,7
Min. Wert	4,2	19,5
Max. Wert	48,7	139,0
Korrelation	0,355	

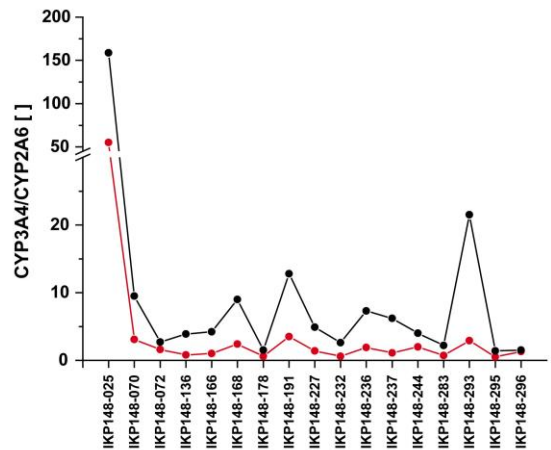
Um die Ergebnisse näher zu beleuchten, wurden die für CYP3A4 ermittelten Werte jeweils mit den für CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 quantifizierten Werten ins Verhältnis gesetzt.

Die Graphen stellen die innerhalb der einzelnen Methoden bestehenden Mengenverhältnisse zwischen dem am höchsten exprimierten CYP3A4 und weiteren einzelnen Analyten dar. Für die Analyten CYP3A5, CYP2C19, CYP2D6 und CPR kann eine Korrelation zwischen beiden Quantifizierungsmethoden ausgemacht werden. Für CYP2C9 ist diese nur bedingt zu erkennen.

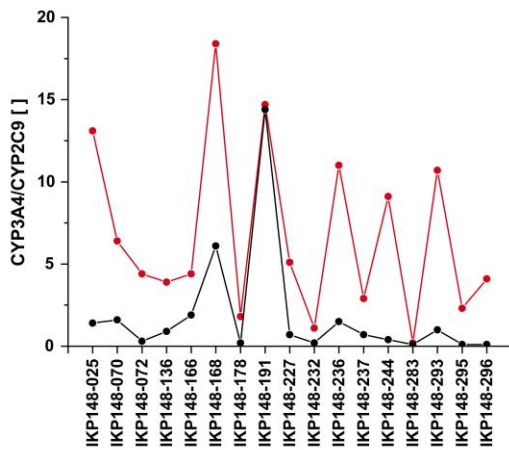
Allgemein wird deutlich, dass die Quantifizierung mittels Western Blot größere Abstände zwischen den einzelnen Werten ermittelt hatte. Die Profile der über die beiden Methoden erhaltenen Verhältnisse ähneln sich jedoch stark.



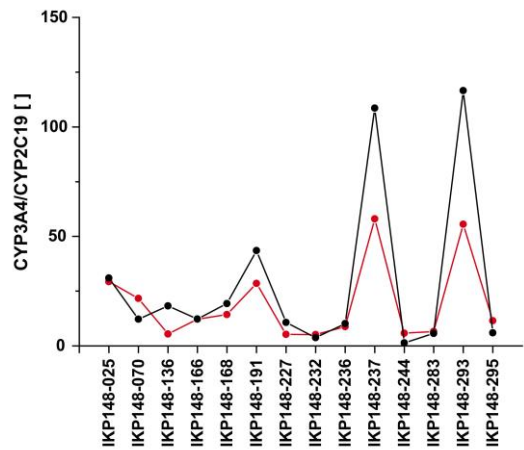
■ CYP3A4/CYP3A5 - Western Blot
■ CYP3A4/CYP3A5 - Immuno-MS



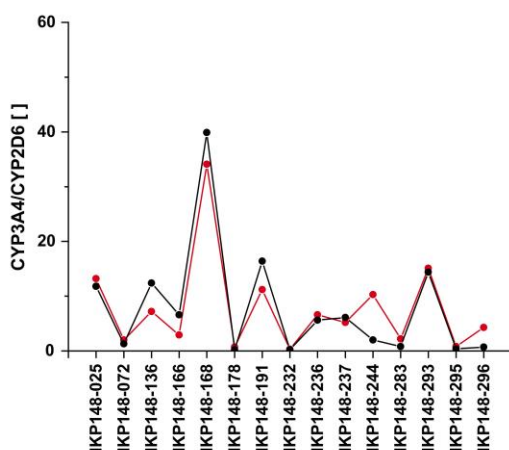
■ CYP3A4/CYP2A6 - Western Blot
■ CYP3A4/CYP2A6 - Immuno-MS



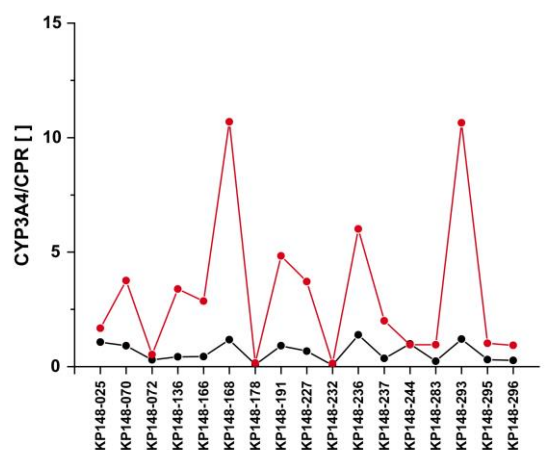
■ CYP3A4/CYP2C9 - Western Blot
■ CYP3A4/CYP2C9 - Immuno-MS



■ CYP3A4/CYP2C19 - Western Blot
■ CYP3A4/CYP2C19 - Immuno-MS



■ CYP3A4/CYP2D6 - Western Blot
■ CYP3A4/CYP2D6 - Immuno-MS



■ CYP3A4/CYP2D6 - Western Blot
■ CYP3A4/CYP2D6 - Immuno-MS

Abbildung 37 - Vergleich der über Western Blot und Immuno-MS quantifizierten Enzymkonzentrationen in Relation zur ermittelten CYP3A4-Konzentration

4.3.2.2. Anreicherung von membrangebundenen Cytochrom P450 Enzymen durch Präparation mikrosomaler Fraktionen

Für die über Immuno-MS aus präparierten Mikrosomenfraktionen und Lebergewebe ermittelten Cytochrom P450-Proteinmengen wurden Korrelationsfaktoren und, ausgehend vom Mittelwert der 18 zur Verfügung stehenden Proben, ein Anreicherungsfaktor berechnet.

Tabelle 25 - Vergleich der in Lebergewebe und präparierten Mikrosomenfraktionen quantifizierten CYP-Konzentrationen

	CYP3A4		CYP3A5	
	Mikrosomen [pmol/mg]	Lebergewebe [pmol/mg]	Mikrosomen [pmol/mg]	Lebergewebe [pmol/mg]
Median	6,4	1,6	0,2	0,04
Mittelwert	10,7	2,4	1,0	0,19
Min. Wert	0,6	0,1	0,1	0,02
Max. Wert	33,5	10,3	3,0	0,67
Korrelation	0,848		0,954	
Anreicherung	Mikrosomen/Lebergewebe: 4,5		Mikrosomen/Lebergewebe: 5,3	

	CYP2C9		CYP2C19	
	Mikrosomen [pmol/mg]	Lebergewebe [pmol/mg]	Mikrosomen [pmol/mg]	Lebergewebe [pmol/mg]
Median	2,7	2,1	1,1	0,18
Mittelwert	2,8	2,4	1,4	0,21
Min. Wert	0,7	0,8	0,2	0,03
Max. Wert	5,6	4,4	3,7	0,63
Korrelation	0,426		0,538	
Anreicherung	Mikrosomen/Lebergewebe: 1,2		Mikrosomen/Lebergewebe: 6,7	

	CYP2A6		CYP2D6	
	Mikrosomen [pmol/mg]	Lebergewebe [pmol/mg]	Mikrosomen [pmol/mg]	Lebergewebe [pmol/mg]
Median	8,2	unter Detektionsgrenze	2,6	1,0
Mittelwert	9,5		3,5	1,3
Min. Wert	0,6		0,4	0,4
Max. Wert	20,1		9,7	4,3
Korrelation	---		0,844	
Anreicherung	Mikrosomen/Lebergewebe: ---		Mikrosomen/Lebergewebe: 2,7	

	CYP	
	Mikrosomen [pmol/mg]	Lebergewebe [pmol/mg]
Median	27,0	2,9
Mittelwert	27,9	3,4
Min. Wert	4,2	1,5
Max. Wert	48,7	7,7
Korrelation	0,238	
Anreicherung	Mikrosomen/Lebergewebe: 8,2	

Die mit Immuno-MS aus Mikrosomenpräparationen und Lebergewebe ermittelten Ergebnisse korrelierten für CYP3A4, CYP3A5 und CYP2D6 sehr gut. CYP2C9, CYP2C19 und CRP wiesen im Gegensatz nur eine geringe Korrelation auf. Für CYP2A6 konnte weder Korrelation, noch ein Anreicherungsfaktor berechnet werden, da die Proteinkonzentration im Lebergewebe unter der Detektionsgrenze des Tests lag. Die Mikrosomenpräparation erbrachte für den Analyten CPR einen um den Faktor 8,2 und für CYP2C19 einen um den Faktor 6,7 gesteigerten Anreicherungsgrad. CYP3A5 war um das 5,3fache, CYP3A4 um das 4,5fache und CYP2D6 um das 2,7fache angereichert. Die Präparation führte bei CYP2C9 nur zu einer geringen Anreicherung.

4.3.2.3. Quantifizierungsstudie aus menschlichen Lebergewebe

Die 18 Lebergewebeproben wurden nach tryptischer Fragmentierung über den entwickelten TXP-Tests angereichert und vermessen. Da in den Gewebeproben weniger Proteingehalt als in präparierten Mikrosomenfraktion zu erwarten waren, wurde weniger isotopenmarkiertes Referenzpeptid (je nach Peptidsequenz zwischen 5,1-9,6 fmol – siehe Tabelle 8) eingesetzt. In den Anreicherungsprozess wurden für die TXP-Multiplex-anwendung 1 insgesamt 10 µg Lysat, für die Anwendung des TXP-Multiplex 2-Anwendung 7 µg Extrakt eingesetzt.

Tabelle 26 - Mediane der in einer Expressionsstudie aus 18 Lebergeweben ermittelten Proteinkonzentrationen. Die CYP2A6-, CYP2C18-, CYP2F1- und CYP2S1-Konzentrationen befanden sich unter der Quantifizierungsgrenze.

	Analyt	Median [pmol/mg]	Basis (# Werte)
1	CPR	2,90	18
2	CYP2C9	2,12	18
3	CYP1A2	1,66	18
4	CYP3A4	1,63	18
5	CYP2C8	1,29	18
6	CYP2D6	0,97	18
7	CYP2B6	0,72	16
8	CYP2E1	0,62	18
9	CYP2C19	0,18	18
10	CYP1A1	0,07	17
11	CYP3A5	0,04	17
12	CYP3A7	0,03	7
13	MDR1	0,02	14
14	CYP2A13	0,01	3

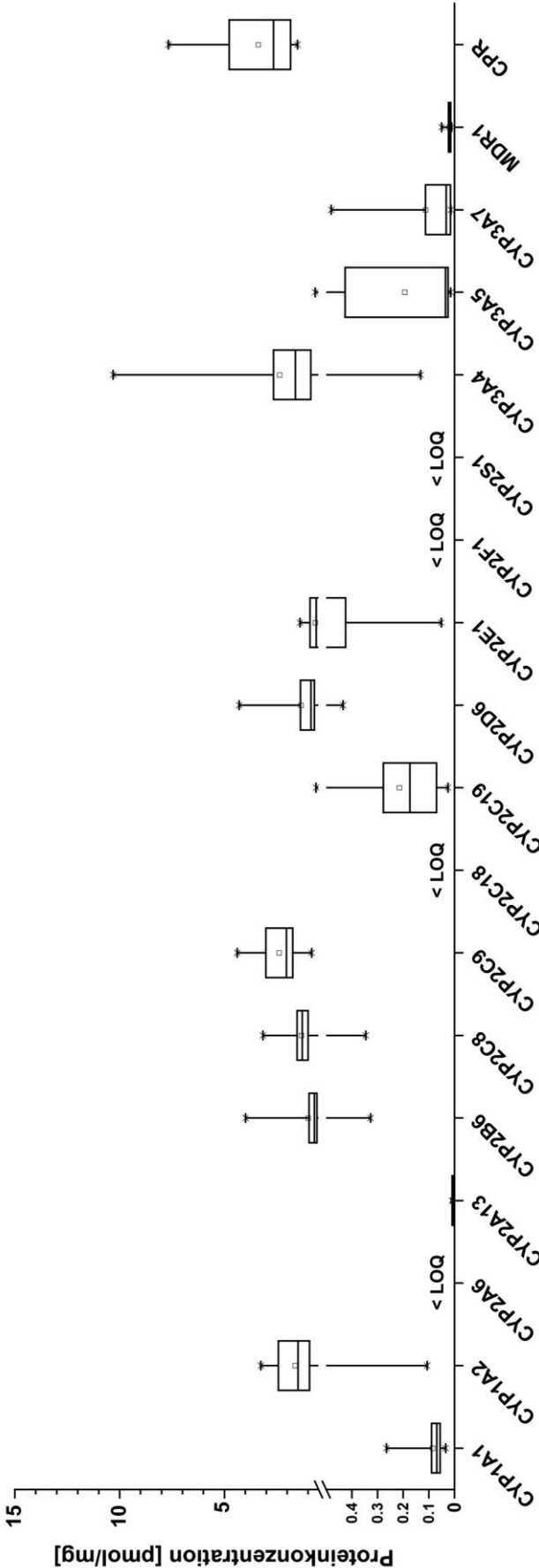


Abbildung 38 - Expression von Cytochrom P450-Enzymen in 18 verschiedenen Lebergeweben. Als Quantifizierungsgrenze wurden 2% der zugegebenen Referenzpeptidmenge festgesetzt. Dies entspricht für die Multiplex 1-Anordnung einer Quantifizierungsgrenze von 0,028 fmol/µg, für die Multiplex 2-Anordnung einer Quantifizierungsgrenze von 0,028 fmol/µg.

4.3.3. Induktionsstudien

Die entwickelten TXP-Tests eignen sich neben den in Geweben und mikrosomalen Fraktionen durchgeführten Studien ebenso zur Analyse von Induktionsprozessen. Hierzu wurden kryokonservierte Hepatozyten im 96-Well-Format ausplattiert und mit drei Induktoren behandelt. Die Hepatozyten gehen auf eine 55jährige Spenderin zurück (Life Technologies - HU8148), die an einem Hirntumor litt. Neben einer auf Steroiden beruhenden Medikation ist ein langjähriger Alkoholkonsum bekannt, der jedoch vier Jahre vor der Tumordiagnose eingestellt wurde.

Es kamen mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol Substanzen zum Einsatz, die über drei verschiedene rezeptorvermittelte Induktionswege, nämlich die beiden nukleären Rezeptoren PXR (Pregnan-X-Rezeptor) und CAR (Constitutive Androstane Rezeptor), sowie den cytosolischen Ah-Rezeptor (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor) auf die Expression der Cytochrom P450-Enzyme wirken. Die Expression der Cytochrom P450-Enzyme wurden an insgesamt vier Zeitpunkten bestimmt. Die kryokonservierten Hepatozyten wurden 24, 48 und 72 Stunden mit den drei Substanzen behandelt. Als Kontrolle zu jedem Zeitpunkt diente eine Zellbehandlung mit DMSO versetztem Medium. Um die Zellen möglichst wenig Stress auszusetzen, wurde davon abgesehen, einzelne Ansätze jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden zu lysieren. Aus diesem Grund wurden alle Ansätze nach der Anwachsphase 72 Stunden kultiviert. Die Behandlungen erfolgten zu Beginn der Induktionsphase (72h-Behandlung), nach 24 Stunden (48h-Behandlung) oder 48 Stunden (24h-Behandlung).

Zu Behandlungsbeginn wurde die nach 48stündiger Anwachsphase exprimierte Enzymkonzentration T₀ bestimmt. Dies diente dazu, den Einfluss einer 72stündigen, mit Erhaltungsmedium (ohne DMSO) erfolgenden Zellkultivierung auf die Hepatozyten zu ermitteln (T₇₂). Die bei T₇₂ gemessene Expression wurde als Stundenwert „0“ in den Induktionsgraphen herangezogen, da der Wert den Basalenzymspiegel der nur mit Erhaltungsmedium kultivierten Zellen beschreibt.

Für die Enzyme CYP2A6, CYP2A13, CYP2C19, CYP2F1, CYP2F1 und CYP3A7 lagen die Enzymspiegel sowohl bei allen Kontrollen, als auch bei Inkubationen mit den drei Substanzen unter der Detektionsgrenze der entwickelten TXP-Tests.

4.3.3.1. PXR-vermittelte Induktion der Cytochrom P450-Enzyme

Für CYP3A4 konnte bei Zugabe aller drei Induktoren ein Anstieg der Expression gemessen werden. Das Maximum der Expression war bei einer Behandlungsdauer von 48 Stunden zu verzeichnen. Die Behandlung mit Rifampicin ließ die CYP3A4-Konzentration über den Faktor 19 von anfänglich 2,6 fmol/μg auf 50,5 fmol/μg, die Behandlung mit Phenobarbital um den Faktor 16 von 2,6 fmol/μg auf 43,4 μg/fmol ansteigen. Omeprazol induzierte die 5fache Menge an CYP3A4. Über die Behandlungsdauer von 72 Stunden exprimierten die mit Standardmedium kultivierten Hepatozyten CYP3A4 in einer konstanten Konzentration zwischen 2,6 fmol/μg und 3,1 fmol/μg.

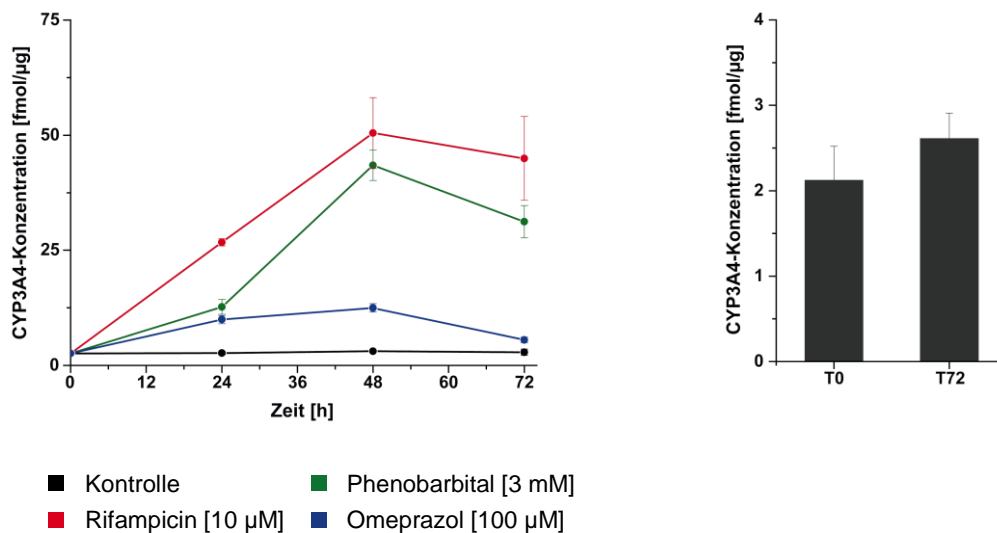


Abbildung 39 - CYP3A4-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol. Die Zellen wurden in Triplikaten 24, 48 und 72 Stunden mit den Substanzen behandelt. T0 beschreibt die Enzymmenge, die nach der Anwachphase zum Zeitpunkt des Induktionsbeginns in den Zellen exprimiert wurde. T72 beschreibt, ausgehend vom Zeitpunkt der Erstinduktion, den Einfluss der Kultivierungsdauer auf die mit Standardmedium inkubierten Zellen.

CYP3A5 konnte sowohl mit Rifampicin, als auch mit Phenobarbital induziert werden. Die Behandlung mit Omeprazol führte zu keiner Induktion. Der höchste Konzentrationsanstieg ging mit der Zugabe von Phenobarbital nach einer Inkubation von 72 Stunden einher. Die CYP3A5-Konzentration wurde von 0,12 fmol/μg um den Faktor 3,8 auf 0,45 fmol/μg induziert. Rifampicin bewirkte nach 72 Stunden die Expression der 2,8fachen Proteinmenge.

Die CYP3A5-Expression war ohne zugegebenen Induktor über 72 Stunden stabil zwischen 0,12 fmol/ μ g und 0,13 fmol/ μ g.

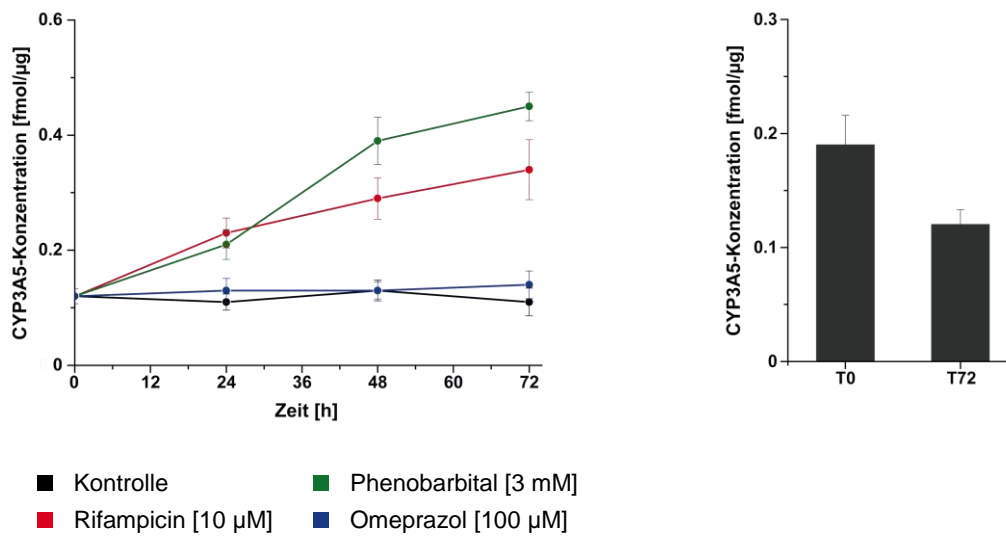


Abbildung 40 - CYP3A5-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

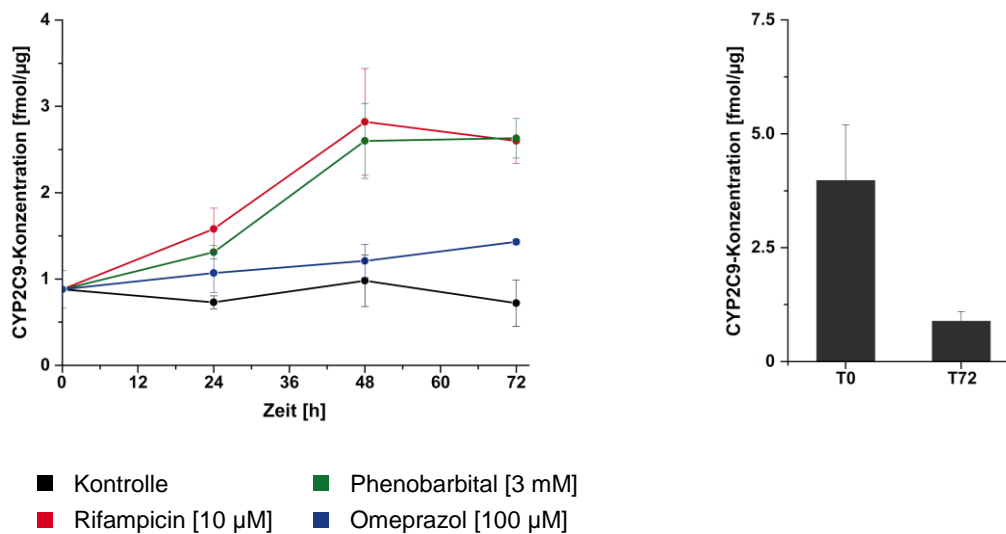


Abbildung 41 - CYP2C9-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

Während die Konzentration des Enzyms CYP2C19 unter der Nachweisgrenze lag, konnte für CYP2C9 bei Behandlung mit Rifampicin und Phenobarbital die 3,2fache bzw. 3,0fache Enzymmenge nach 48 Stunden Inkubation gemessen werden. Omeprazol führte nach 72 Stunden zu einem Anstieg der Enzymkonzentration um das 1,6fache. Zum Zeitpunkt T0 wurde eine CYP2C9-Konzentration von 3,97 fmol/ μ g bestimmt. Über die drei

Ergebnisse |

Behandlungstage war die Enzymkonzentration in den Kontrollen somit auf ein Viertel der ursprünglich bestehenden gesunken.

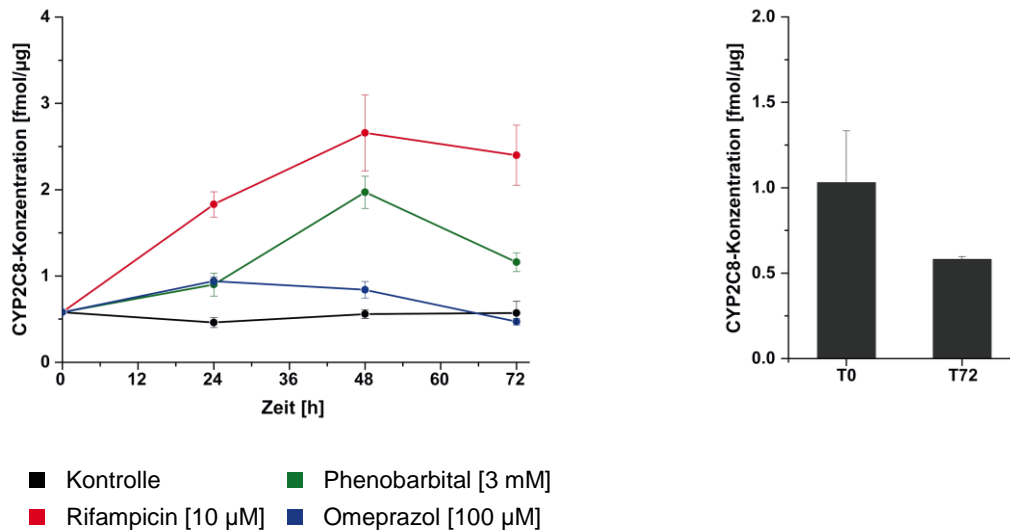


Abbildung 42 - CYP2C8-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

Die Konzentration des Enzyms CYP2C8 stieg durch Zugabe von Rifampicin auf die 4,6fache, durch Zugabe von Phenobarbital auf die 3,4fache Konzentration an. Während Rifampicin und Phenobarbital nach 48 Stunden die maximale Expression bewirkten, wurde dieses durch Zugabe von Omeprazol bereits nach 24 Stunden bei 1,6fach erhöhter Enzymkonzentration erreicht. Nach 72 Stunden war die CYP2C8-Konzentration auf das Niveau der Kontrollbehandlungen abgesunken.

Vergleicht man die CYP2C8-Konzentration nach 72 Stunden Kultivierung in Standardmedium mit der zu Induktionsstart gemessenen Anfangskonzentration T0, exprimierten die Zellen nur noch knapp die Hälfte der zuvor gemessenen Enzymmenge.

4.3.3.2. CAR-vermittelte Induktion der Cytochrom P450-Enzyme

Die Behandlung mit Phenobarbital bewirkte für das Enzym CYP2B6 den stärksten Expressionsanstieg. Ausgehend von einem Expressionspiegel von 0,67 fmol/µg konnte nach 48 Stunden die 5,2fache Menge quantifiziert werden.

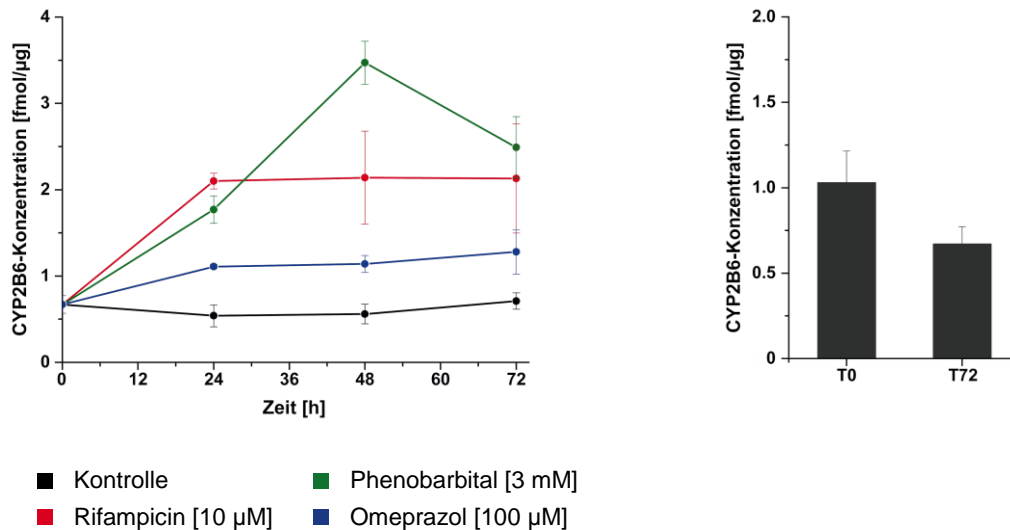


Abbildung 43 - CYP2B6-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

Auch Rifampicin und Omeprazol hatten Einfluss auf die CYP2B6-Expression. Nach 24 Stunden wurde durch die Zugabe von Rifampicin die 3,2fache, für Phenobarbital die 1,9fache Menge an Enzym exprimiert. Bei beiden Substanzen war die gesteigerte Expression über die weiteren zwei Zeitpunkte konstant.

4.3.3.3. Ah-Rezeptor-vermittelte Induktion der Cytochrom P450-Enzyme

Der CYP1A1-Spiegel lag für alle Kontrollen, sowie für die Zellbehandlungen mittels Rifampicin und Phenobarbital unter der Detektionsgrenze. Die Inkubation mit Omeprazol induzierte nach 24 Stunden mit 4,61 fmol/µg die höchste CYP1A1-Konzentration.

Die CYP1A2-Konzentration konnte durch Zugabe von Omeprazol auf das 11fache gesteigert werden. Die Behandlung mit Phenobarbital resultierte in einem um den Faktor 2,4 erhöhten CYP1A2-Spiegel. Die Zugabe von Rifampicin führte zu keiner Induktion. Die Kultivierung mit Standardmedium über 72 Stunden (T72) ergab für CYP1A2 eine im Vergleich zum Induktionsstart (T0) um den Faktor 3,2 gesteigerte Expression.

Ergebnisse |

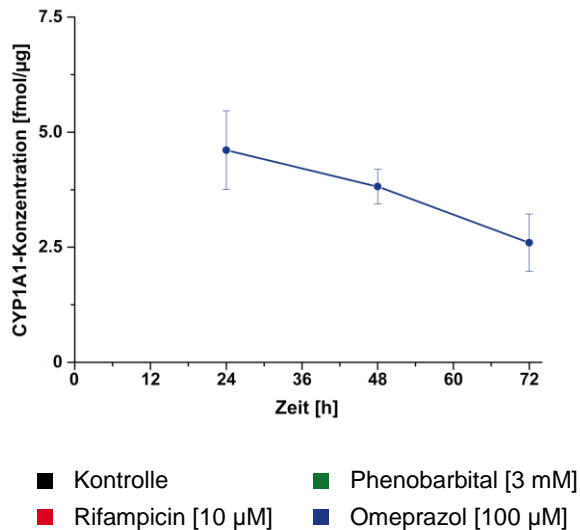


Abbildung 44 - CYP1A1-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol.

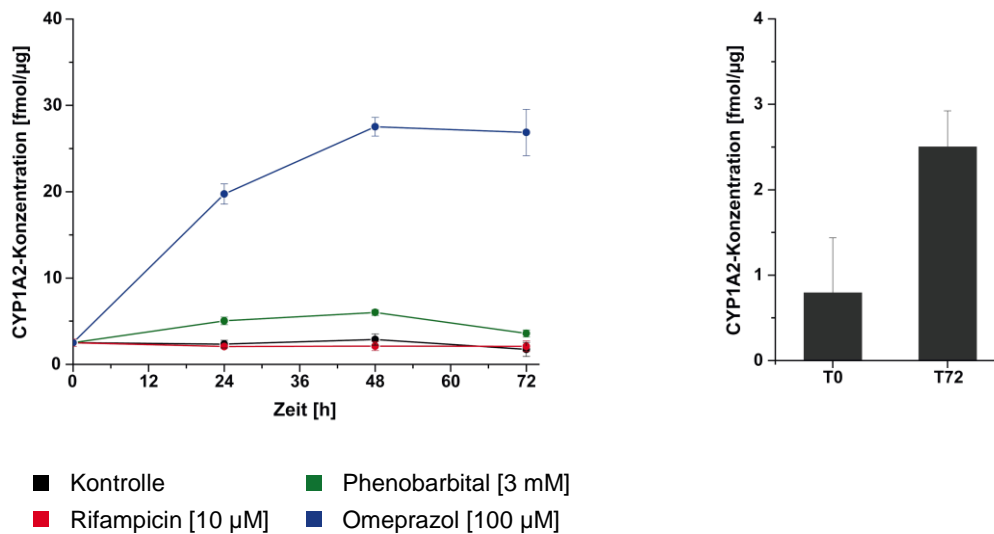


Abbildung 45 - CYP1A2-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

4.3.3.4. Induktionsmechanismen von CYP2C18, CYP2D6 und CYP2E1

Bei CYP2C18 konnte keine Induktion durch die Behandlung mit Rifampicin und Phenobarbital festgestellt werden. Die Zugabe von Omeprazol führte zu einer Repression des CYP2C18-Spiegels um den Faktor 2,8. Die Kontrollen, die mit Standardmedium inkubiert wurden,

zeigten nach 72 Stunden (T72) eine im Vergleich zum Induktionsbeginn (T0) verdoppelte CYP2C18-Konzentration.

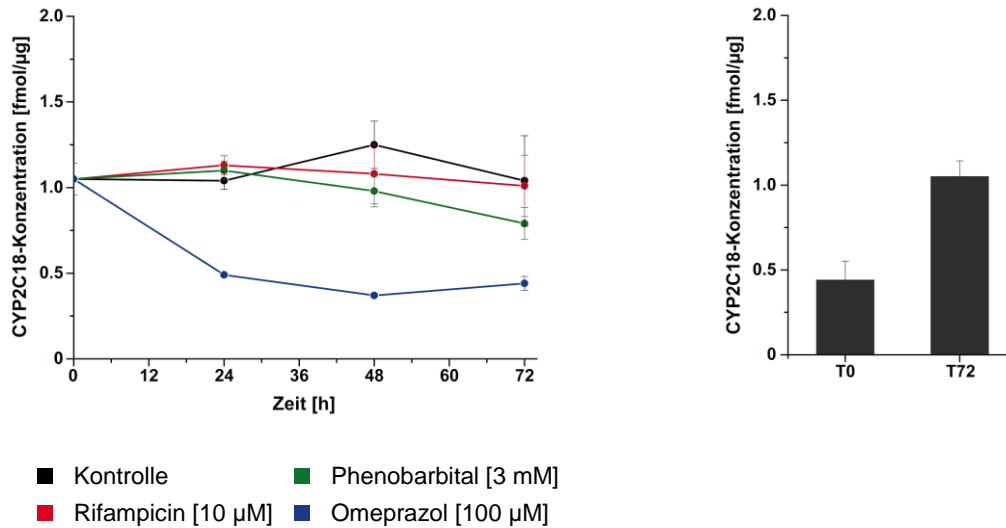


Abbildung 46 - CYP2C18-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

CYP2D6 war mit keiner der drei getesteten Substanzen zu induzieren. Die auf unterschiedlichen TXP-Motiven basierenden Anreicherungen führten zu annähernd gleichen Quantifizierungsergebnissen.

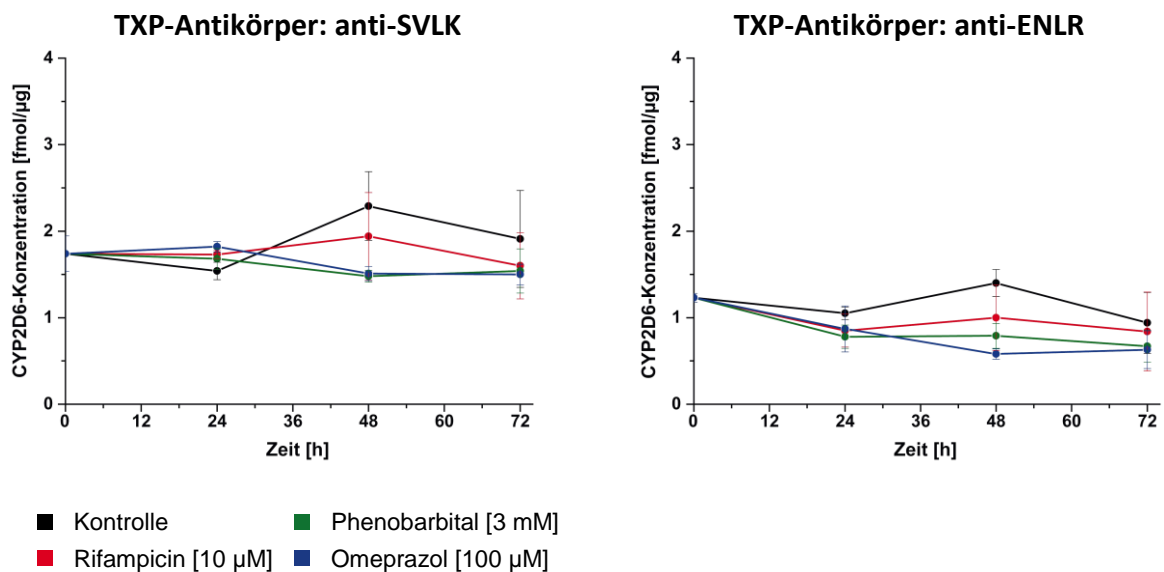


Abbildung 47 - CYP2D6-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol. Die Immunopräzipitationen wurde unter Verwendung der beiden TXP-Antikörper anti-SVLK und anti-ENLR durchgeführt.

Ergebnisse |

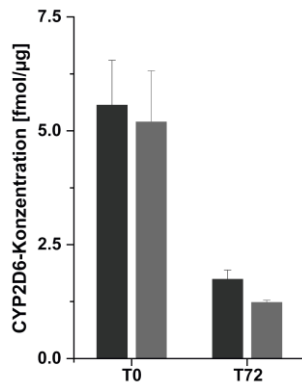


Abbildung 48 - Veränderung des CYP2D6-Basalniveaus in kryokonservierten Hepatozyten über 72 Stunden Kultivierung.

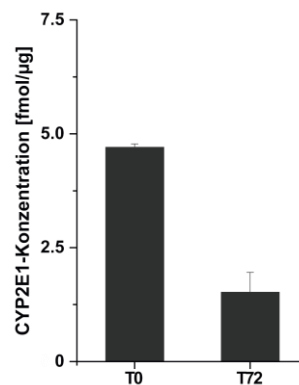
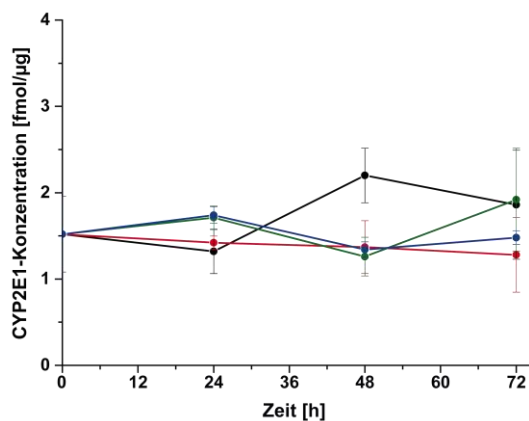
T0 beschreibt die Enzymmenge, die nach der Anwachphase zum Zeitpunkt des Induktionsbeginns in den Zellen exprimiert wurde.

T72 beschreibt, ausgehend vom Zeitpunkt des Induktionsbeginns, den Einfluss der Kultivierungsdauer bei Standardmedium auf die kryokonservierten Hepatozyten.

Die der Quantifizierung vorausgehende Immunpräzipitation wurde sowohl mit dem Motivantikörper anti-SVLK, als auch mit dem TXP-Antikörper anti-ENLR durchgeführt.

- IP mit Motiv "SVLK"
- IP mit Motiv "ENLR"

CYP2E1 wurde mit keiner der verwendeten Substanzen induziert. Der CYP2E1-Spiegel sank, ausgehend vom Zeitpunkt der ersten Behandlung, über 72 Stunden Inkubation in mit DMSO versetztem Medium auf 32% der zuvor quantifizierten Menge.



- Kontrolle
- Rifampicin [10 µM]
- Phenobarbital [3 mM]
- Omeprazol [100 µM]

Abbildung 49 - CYP2E1-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

4.3.3.5. Induktionsverhalten von MDR1 und CPR

Durch die Zugabe der drei Induktoren konnte ein Anstieg des MDR1-Spiegels induziert werden. Die Zugabe von Rifampicin und Phenobarbital führte bei allen Zeitpunkten zu einer annähernd gleich stark exprimierten Proteinmenge. Die MDR1-Konzentration stieg um den

Faktor 2 auf 0,81 fmol/µg. Die Behandlung mit Omeprazol bewirkte einen 1,6fachen Expressionsanstieg von MDR1.

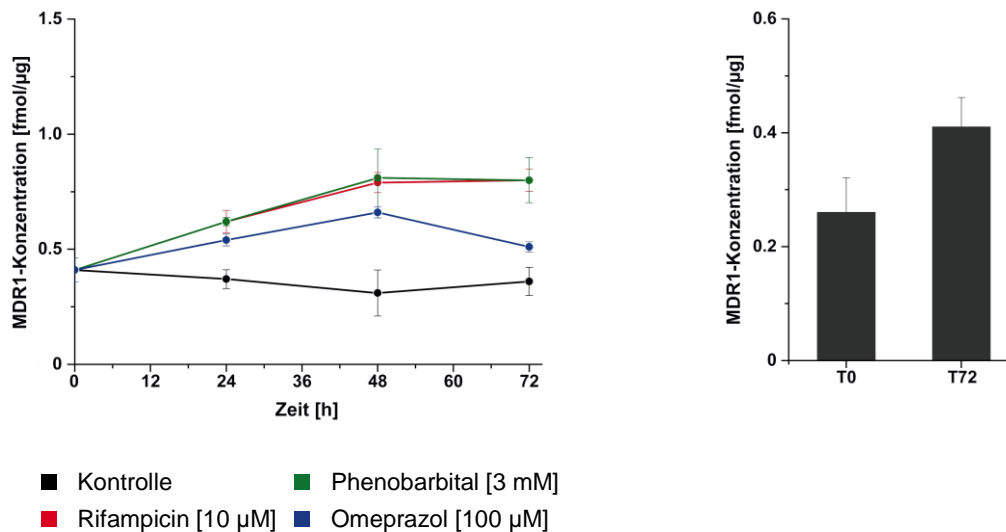


Abbildung 50 - MDR1-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

Ein Anstieg des NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase-Spiegels konnte bei allen drei Substanzbehandlungen detektiert werden. Phenobarbital induzierte die CPR-Konzentration auf die 1,8fache Menge, Omeprazol und Rifampicin bewirkten einen Anstieg um den Faktor 1,5 bzw. 1,4.

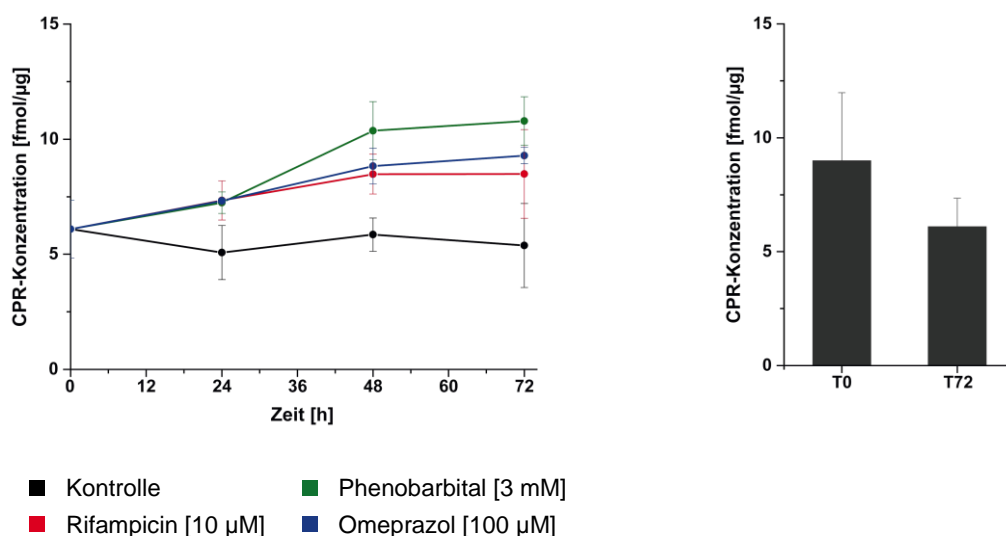


Abbildung 51 - CPR-Induktion in kryokonservierten Hepatozyten nach Behandlung mit Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol

4.3.3.6. Zusammenstellung der induktiven und repressiven Wirkungen von Rifampicin, Phenobarbital und Omeprazol auf das Cytochrom P450-System

Die über die 18 TXP-Tests ermittelten Proteinkonzentrationen wurden, nach Substanzbehandlung getrennt, in „Heatmaps“ dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit der unterschiedlichen Induktionsniveaus wurden die Werte als Logarithmus zur Basis 2 aufgetragen. Enzymkonzentrationen, die unter der Quantifizierungs- oder Detektionsgrenze der entwickelten TXP-Tests lagen, sind weiß gekennzeichnet.

In den mit Rifampicin behandelten kryokonservierten Hepatozyten wurden die Enzyme CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, MDR1 und CPR induziert. Den stärksten Einfluss auf die Expression konnte für CYP3A4 gemessen werden.

Auf die Expression von CYP1A2, CYP2C18 und CYP2D6 hatte Rifampicin keinen Einfluss. Für CYP2E1 wurde eine minimale Repression der Proteinmenge nach 48 Stunden detektiert. Diese kann jedoch auf einer Messungenauigkeit bei den niedrigen CYP2E1-Konzentrationsspiegeln in den Kontrollproben beruhen.

Tabelle 27 - Zusammenfassung der mit Rifampicin (10 µM) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „Heatmap“-Darstellung. Die Enzymkonzentrationen wurden zur Basis 2 logarithmiert dargestellt.

	Rifampicin [10 µM]			
	Kontrolle	24h	48h	72h
CYP1A1				
CYP1A2				
CYP2A6				
CYP2A13				
CYP2B6				
CYP2C8				
CYP2C9				
CYP2C18				
CYP2C19				
CYP2D6				
CYP2E1				
CYP2F1				
CYP2S1				
CYP3A4				
CYP3A5				
CYP3A7				
MDR1				
CPR				

	-1,00
	-0,45
	-0,10
	0,65
	1,20
	1,75
	2,30
	2,85
	3,40
	3,95
	4,50

Tabelle 28 - Zusammenfassung der mit Phenobarbital (3 mM) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „Heatmap“-Darstellung. Die Enzymkonzentrationen wurden zur Basis 2 logarithmiert dargestellt.

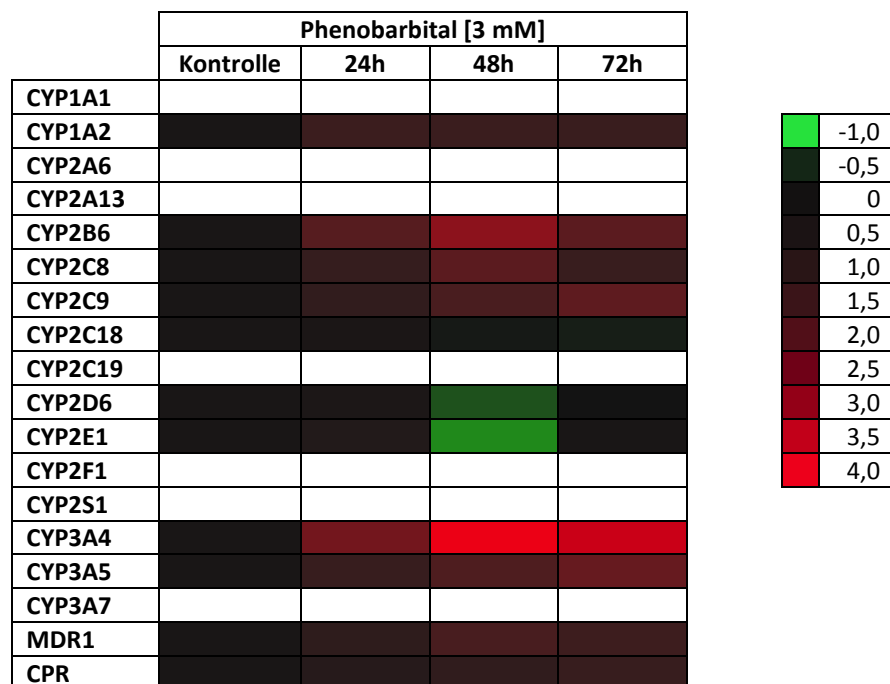
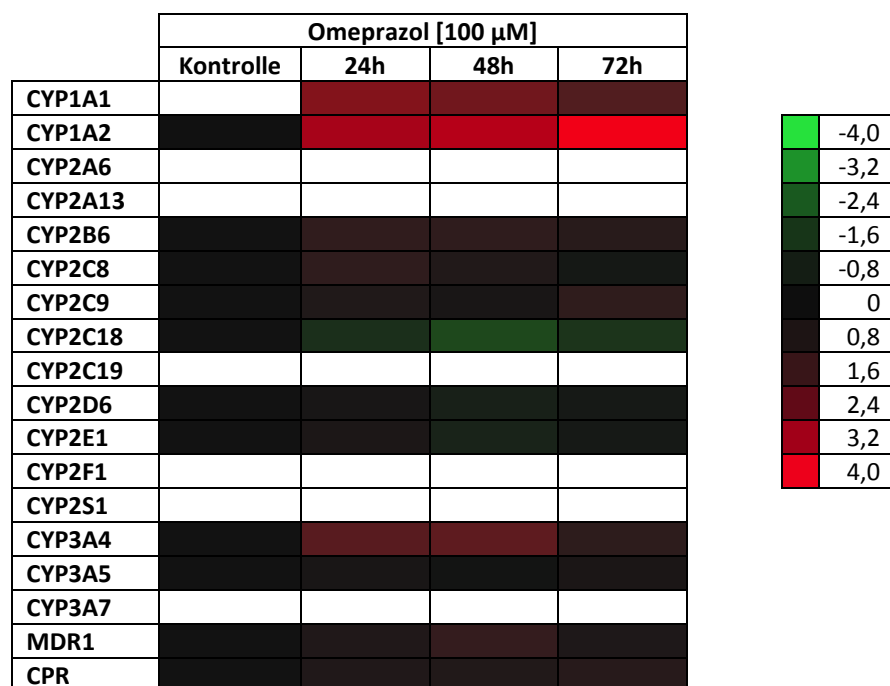


Tabelle 29 - Zusammenfassung der mit Omeprazol (100 µM) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „Heatmap“-Darstellung. Die Enzymkonzentrationen wurden zur Basis 2 logarithmiert dargestellt.



Ergebnisse |

Mit Phenobarbital wurden die Enzyme CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, MDR1 und CPR induziert. Die stärkste Induktion konnte bei CYP3A4 und CYP2B6 gemessen werden. Die Expression von CYP1A2, CYP2C18, CYP2D6, CYP2E1 war von der Substanzzugabe weitestgehend unbeeinflusst.

Mit Omeprazol konnten die über den Ah-Rezeptor induzierbaren Enzyme CYP1A1 und CYP1A2 deutlich hochreguliert werden. CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CPR und MDR1 zeigten einen kleinen Anstieg der Enzymspiegel. Auf die Konzentration von CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A5 hatte die Behandlung keinen Einfluss. Für CYP2C18 konnte eine Abnahme der Enzymexpression festgestellt werden.

5. Diskussion

5.1. Auswahl geeigneter TXP-Motive für proteinspezifische Peptide

Die Wahrscheinlichkeit, bei einer Auswahl von Proteinen nach tryptischer Fragmentierung möglichst viele Peptide mit gleichem TXP-Motiv vorzufinden, ist zumeist davon abhängig, wie stark Sequenzabschnitte unter den Proteinen ähnlicher biologischer Funktion oder Lokalisation konserviert sind.

Für die Wahl geeigneter Motive muss berücksichtigt werden, welche Peptide neben den definierten Analyten aufgrund desselben oder eines stark ähnelnden Motivs angereichert werden könnten. So gilt es zu beachten, dass bei der Immunopräzipitation aus Plasma möglichst Motive zu vermeiden sind, die Peptide aus hoch abundanten Proteinen teilen. In Plasma weisen die Proteine Konzentrationsunterschiede von bis zu zehn Größenordnungen auf [24]. Ein niedrig konzentriertes Peptid, das mit hoch abundanten Peptiden ein Motiv teilt, würde nur in sehr geringem Maße angereichert werden können, da der Antikörper vorwiegend mit Peptiden der hoch abundanten Proteine gesättigt sein würde. Die Detektion des niedrig konzentrierten Zielpeptides wäre dadurch erschwert.

Die für die Quantifizierung des Cytochrom P450 Systems ausgewählten TXP-Motive sind primär für die Quantifizierung aus Hepatozytenkulturen und menschlichem Lebergewebe ermittelt worden. Jedoch muss aufgrund der hohen Durchblutung des Lebergewebes davon ausgegangen werden, dass motivgleiche Peptidsequenzen von Plasmaproteinen um die Bindungsstellen der TXP-Antikörper konkurrieren würden. Außerdem werden hochabundante Proteine wie Serumalbumin und Transferrin in Hepatozyten als Exportproteine hergestellt [111].

Des Weiteren gilt im Falle von isobaren Peptide zu beachten, dass für eine Unterscheidung auf Basis der Elternionen eine ausreichend gute chromatographische Trennung nötig ist. Eluieren zwei isobare Peptide zeitgleich, muss eine Unterscheidung der Peptide zumindest auf Ebene der nach Fragmentierung entstehenden Tochterionen möglich sein. Als Beispiel können die auf dem Motiv „EEWK“ basierenden proteotypischen Nachweispeptide von CYP3A4 (SAISIAEDEEWK) und CYP3A5 (SAISLAEDEEWK) herangezogen werden:

Die zwei Peptidsequenzen setzen sich aus gleich vielen Aminosäuren zusammen und unterscheiden sich lediglich an einer Sequenzposition. Die an der 5. Position (Zählung ausgehend vom N-Terminus) vorliegenden Aminosäuren Isoleucin und Leucin besitzen neben der gleichen Masse auch ähnliche physiko-chemische Eigenschaften. Aufgrund dieser Tatsache sind die beiden Peptide, obwohl proteotypisch, über herkömmliche chromatographische Verfahren nur schwer voneinander zu trennen. Eine Lösung stellt die Ionen-Mobilisations-Spektrometrie (IMS) dar, bei der die Peptide nicht etwa wie bei C18-Material über die Wechselwirkung mit den Seitenketten des Packungsmaterials, sondern über unterschiedliche Driftgeschwindigkeiten getrennt werden, die sich durch Kollision mit Gasmolekülen einstellen. Die Technik erlaubt es, selbst isomere Strukturen über unterschiedliche Stoßparameter zu trennen. Ebenso würden sich kapillarelektrophoretische Trennungsverfahren anbieten, um diese beiden sich ähnelnden Peptide zu trennen.

Ein Beispiel für eine erfolgreiche Unterscheidung zweier isobarer Peptide stellen die CYP-Sequenzen EALIDNGEEFSGR (CYP2C8) und EALVDQGEEFSGR (CYP2F1) dar.

Tabelle 30 - Nach Fragmentierung entstehende $y+2$ -Ionen zweier isobarer Elternpeptide. Die identische Masse der aus CYP2C8 (EALIDNGEEFSGR) und CYP2F1 (EALVDQEEFSGR) entstammenden Sequenzen lässt keine Unterscheidung auf MS1-Ebene zu. Die Elternpeptide können auf Basis leicht abweichender Retentionszeiten getrennt werden. Die Identifikation der Signale ist auf MS2-Ebene über die unterschiedlichen Massen der $y+2$ -Ionen 8 und 9 möglich.

CYP2C8		
Aminosäuresequenz	Position	$y+2$
E	13	---
A	12	654,31
L	11	618,80
I	10	562,25
D	9	505,71
N	8	448,20
G	7	391,18
E	6	362,67
E	5	298,15
F	4	233,62
S	3	160,09
G	2	116,57
R	1	88,06

CYP2F1		
Aminosäuresequenz	Position	$y+2$
E	13	---
A	12	654,31
L	11	618,80
V	10	562,25
D	9	512,72
Q	8	455,21
G	7	391,18
E	6	362,67
E	5	298,15
F	4	233,62
S	3	160,09
G	2	116,57
R	1	88,06

Die beiden Peptide besitzen dieselbe Anzahl an Aminosäuren und unterscheiden sich jeweils an den vom N-Terminus gezählten Aminosäurepositionen vier und sechs. Während das aus CYP2C8 entstammende Peptid an der 4. Position ein Isoleucin trägt, besitzt das CYP2F1-Peptid an dieser Position das um 14,03 g/mol leichtere Valin. An der 6. Position ist im CYP2C8-Peptid ein Asparagin zu finden, im CYP2F1-Peptid das um 14,03 g/mol schwerere Glutamin. Rechnerisch heben sich die Massenunterschiede auf Ebene der Elternpeptide auf. Die beiden Elternpeptide sind somit isobar; sie lassen sich jedoch aufgrund ihrer leicht unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften chromatographisch trennen und standen somit einer Testentwicklung nicht im Wege. Die Peptididentifizierung ist zudem über MS/MS-Spektren der unterschiedlich schweren γ -Ionen 8 und 9 möglich.

5.2. Vorteile der TXP-Quantifizierungsstrategie

Es konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung mit den Antikörpern anti-LPNK, anti-FSGR, anti-NGER und anti-FIAK gegenüber einer Vermessung ohne Immunopräzipitation deutlich höhere Signalintensitäten ermöglicht. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch die Immunopräzipitation Suppressionseffekte zwischen einer Vielzahl von Peptiden, die zeitgleich eluieren, vermieden werden [28, 112]. Suppressionseffekte würden entweder zu einer niedrigeren Signalintensität führen oder wie im Falle der aus MDR1 und CYP2A6 stammenden Peptide sogar gar keine Detektion zulassen.

Die Tatsache, dass nach Immunopräzipitation mit den Antikörpern anti-LAER, anti-VIGR, anti-SVLK und anti-ENLR geringere Signalintensitäten detektiert wurden, als es ohne Immunopräzipitation der Fall war, kann unterschiedliche Ursachen haben.

Eine Möglichkeit stellt eine schwache Antigen-Antikörper-Bindung dar. In diesem Fall werden während der Immunopräzipitation zum einen in der Ausgangslösung nicht alle Zielpeptide gebunden, zum anderen ist es möglich, dass während der Waschschrte eine schwache Bindung der Peptide zum Antikörper gestört wird und diese von dessen Binderegion dissoziieren. Ebenso können materialbedingte Adsorptionseffekte zu einem Verlust der Peptide geführt haben.

Ein wichtiges Kriterium stellt ebenso die Bindekapazität der TXP-Antikörper dar. Beispielsweise ist der Antikörper anti-LAER in der Lage, bei 1 µg Einsatz 111 fmol Motivpeptid zu präzipitieren (siehe Tabelle 15). Das Motiv „LAER“ teilen sich jedoch proteomweit 201 proteotypische Peptide (siehe Tabelle 12). Neben der theoretischen Bindung dieser Peptide steht dem Antikörper zusätzlich eine Vielzahl an nicht-proteotypischen Peptiden, die ebenso das Motiv „LAER“ besitzen, für eine Bindung zur Verfügung.

Zudem gilt es zu berücksichtigen, dass mehrere Motive identifiziert werden konnten, die von anti-LAER gebunden werden können. Bei der Immunopräzipitation mit 5 µg anti-LAER aus HEPG2-Lysat konnten Peptidsequenzen mit unterschiedlichen C-terminalen Motiven identifiziert werden. Statistisch signifikant konnten 12 verschiedene Motive unterschieden werden. Alle 12 Motive adressieren in Summe eine Peptidpopulation von 1615 proteotypischen Peptiden. Bei der Immunopräzipitation konkurrieren diese möglichen Bindungspartner um die Bindungsstelle von anti-LAER.

Den prozentualen Anteil, den ein einzelnes Peptid im Vergleich zu allen anderen gebundenen Peptiden einnimmt, soll anhand des CYP2C9-Motivpeptids beispielhaft erörtert werden:

Bei der Immunopräzipitation aus 10 µg Hepatozytenlysat konnte das CYP2C9-Motivpeptid GIFPLAER in zwei Läufen mit 5 und in einem Lauf mit 4 „*Peptide-Spectrum-Matches*“ (PSM) identifiziert werden. „*Peptide-Spectrum-Matches*“ beschreiben die Anzahl der im Massenspektrometer generierten Fragmentspektren, die zu einer eindeutigen Identifizierung des Analyten führten. Das CYP2C9-Peptid nimmt mit 14 PSMs im Triplikate im Vergleich zur Gesamtheit aller identifizierten Peptide (621 PSMs) einen Anteil von 2,3% ein. Vergleicht man diese Beobachtung mit der Gesamtbindekapazität des anti-LAER-Antikörpers (111 fmol/µg), ist zu erwarten, dass pro µg anti-LAER anteilig maximal 2,5 fmol GIFPLAER-Peptid gebunden worden sind.

Nach Immunopräzipitation mit anti-LAER wurden für das CYP2C9-Peptid verglichen mit der Messung ohne Immunopräzipitation ca. 50% Signalintensität detektiert. Ausgehend von der Annahme, dass das CYP2C9-Peptid bei Immunopräzipitation einen Anteil von 2,3% des

Epitops einnimmt und trotzdem zu 50% Signal führte, ist davon auszugehen, dass Ionensuppression die Detektion ohne Anreicherungsschritt deutlich vermindert hat.

Insgesamt waren alle TXP-Antikörper in der Lage, die für sie vorgesehenen Motivpeptide zu binden. Die Bindekapazitäten variieren jedoch stark. Dies kann mehrere Ursachen haben.

Auf der einen Seite besteht die Möglichkeit, dass die zwischen Motivpeptid und TXP-Antikörper ausgebildete Bindung nicht stark genug ist, um während der automatisierten Immunopräzipitation den Transfer des Peptid-Antikörper-Mikrosphären-Komplexes über mehrere Waschschriffe zu gewährleisten.

Auf der anderen Seite ist es möglich, dass bei der Antikörperaufreinigung die saure Elution (Citratpuffer, pH 2,5) bei einem Teil der Antikörper zu einer irreversiblen Veränderung des Paratops bzw. des Antikörpers geführt hat. In diesem Fall wäre die Bindung von Motivpeptiden nicht mehr möglich.

Allgemein kann festgehalten werden, dass TXP-Antikörper mit hoher Bindekapazität zu deutlich robusteren Signalen führen, als TXP-Antikörper mit vermindertem Bindevermögen. Der proteomweiten Häufigkeit der Bindemotive, sowie dem Grad der Expression motivgleicher Peptidsequenzen kommt hierbei ein großer Einfluss zu. So stellt bei einem proteomweit sehr selten auftretenden Motiv eine Bindekapazität von <1% nicht pauschal eine Einschränkung dar. Sofern der TXP-Antikörper ausschließlich dieses oder wenige ähnliche Motive bindet, wird in der Regel genügend Peptid gebunden, um eine genaue Quantifizierung mittels nano-LC-gekoppelter Massenspektrometrie durchführen zu können. Des Weiteren ist es möglich, bei verminderter Kapazität des Antikörpers die Einsatzmenge dieses um ein Vielfaches zu erhöhen. Dies stellt im Vergleich zu Anwendungen ohne Immunopräzipitation einen immensen Vorteil dar, da die Kapazität der Vorsäule keinen limitierenden Faktor darstellt. So konnte gezeigt werden, dass bei Immunopräzipitation mit anti-LPNK aus Hepatozytenlysat bei konstanter Einsatzmenge von isotoylenmarkierten Referenzpeptid gesteigerte Einsatzmengen an proteolysiertem Hepatozytenlysat bis zu einer Proteinmenge von 25 µg zu keiner Konkurrenz führten. Die Signalintensität des isotoylenmarkierten Peptides war nach Immunopräzipitation aus 1 µg, 5 µg, 10 µg und 25 µg nahezu gleich (Daten nicht gezeigt).

Für die Generierung funktionaler TXP-Antikörper stehen folgende Kernfragen im Mittelpunkt der Testentwicklung:

Tabelle 31 - Strategie zur Findung eines geeigneten TXP-Motivs

1	Wie viele proteotypische Peptidsequenzen werden über den TXP-Antikörper adressiert?
2	Wie viele nicht-proteotypische Peptidsequenzen werden zusätzlich adressiert?
3	In welchen Konzentrationen liegen Motivpeptide vor?
4	Teilen Peptide hoch abundanter Proteine das gleiche oder ein ähnliches Motiv?
5	Wie viele Einzelmotive werden signifikant über den Antikörper angereichert?
6	Wie hoch ist die Bindekapazität des Antikörpers?

5.3. Spezifität der TXP-Antikörper

Die für die Testentwicklung ausgewählten TXP-Antikörper binden neben dem Motivpeptid, gegen das sie immunisiert wurden, noch weitere Peptidsequenzen. Die Motive dieser Peptide ähneln in der Regel den Motiven, gegen die die Immunisierung durchgeführt wurde, sehr. Häufig kann die vermeintlich verminderte Selektivität des TXP-Antikörpers mit den ähnlichen chemischen Eigenschaften einzelner Aminosäuren begründet werden. So bindet beispielsweise anti-LAER an der ersten Motivposition neben Leucin auch Isoleucin und Valin. Alle drei Aminosäuren sind hydrophob. Isoleucin unterscheidet sich von Leucin über die Position einer Methylgruppe in der Seitenkette, Valin ist im Vergleich zu Leucin um eine CH₂-Gruppe verkürzt. Während an der zweiten Position des LAER-Motivs ausschließlich Alanin identifiziert wurde, lässt die dritte Position wiederum die Bindung mehrerer Aminosäuren zu. Neben Glutaminsäure werden Asparaginsäure und Glutamin gebunden. Es liegt die Vermutung nahe, dass die in allen drei Seitenketten vorliegende Carbonylgruppe einen Einfluss auf die Bindung des Peptides hat.

Die Tatsache, dass pro immunisierten Antikörper mehrere Motive gebunden werden können, kann den Einsatzbereich eines TXP-Antikörpers beträchtlich erweitern. Unter Berücksichtigung aller statistisch signifikant anreicherbaren Motive könnten beispielsweise mit anti-LPNK 0,4% des menschlichen Genoms adressiert werden. Alle neun für die Testentwicklung vorgesehenen TXP-Antikörper würden in der Theorie die Detektion von ca. 3,5% aller bekannten menschlichen Proteine ermöglichen. Alle theoretischen Berechnungen

setzen jedoch die Existenz von TXP-Antikörpern mit ausreichend hoher Bindekapazität voraus.

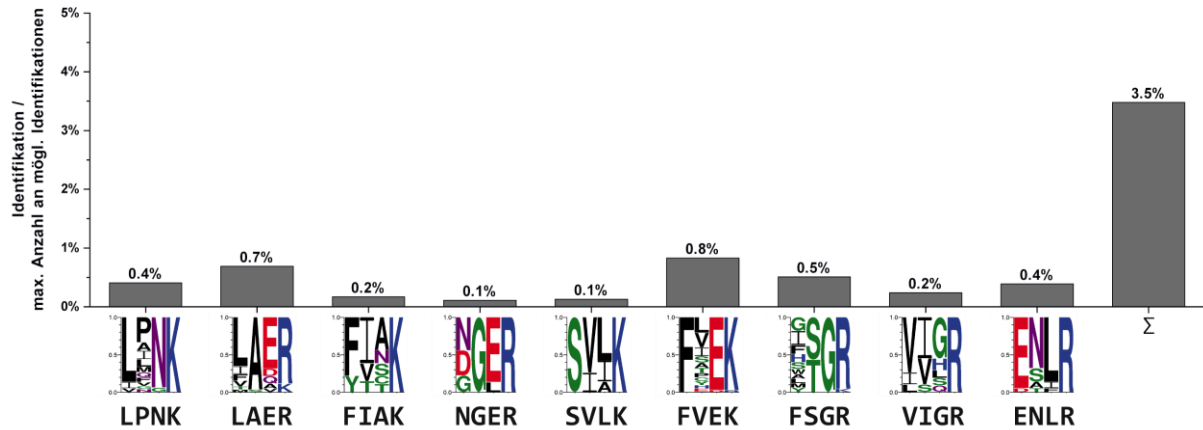


Abbildung 52 - Anzahl nach Immunpräzipitation aus HEPG2-Lysat identifizierter und als statistisch signifikant angereichert erachteter Peptide im Verhältnis zur theoretisch proteomweit existierenden Anzahl an Peptiden gleichen Motivs.

5.4. Linearer Messbereich der TXP-Tests

Es wurden insgesamt 19 TXP-Tests entwickelt, die für die Quantifizierung des Fremdstoffmetabolismus verwendet werden können. Die Höchstgrenze der zu vermessenden Analyten ist bei der Untersuchung des linearen Funktionsbereichs auf 1000 fmol festgelegt worden. Limitierender Faktor stellt hierbei die Wahrscheinlichkeit dar, mit der bei hoch konzentrierten Proben Überträge nicht eluierter Peptide zwischen den einzelnen Chromatographieläufen die Messergebnisse verfälschen würden. Bei theoretisch vollständiger Bindung von 1000 fmol Peptid durch den TXP-Antikörper und einem Standardinjektionsvolumen von 5 μ L (von insgesamt 20 μ L Elutionsvolumen) werden 250 fmol Analyt Einzelpeptid auf die Vorsäule aufgetragen und anschließend chromatographisch getrennt. Mehrere Waschprozeduren am Ende des Gradienten gewährleisten eine möglichst vollständige Elution.

Da übertragsfreie Auftrennungen bei höheren Einzelanalytmengen nicht ohne zusätzliche Waschläufe zu gewährleisten sind, wurde die obere Quantifizierungsgrenze für die Immunpräzipitation auf 1000 fmol Analyt festgelegt (ULOQ - Upper Limit of Quantification). Bei höher konzentrierten Analytmengen ist eine Verdünnung der Probe vorzunehmen.

Eine Detektion der Peptide mittels tSIM, bei der die Quantifizierung des Peptides auf Ebene des Elternions erfolgt, zeigte gegenüber tMS2 (Quantifizierung auf Ebene der Fragmentionen) für den Großteil der Peptide einen größeren dynamischen Messbereich. Gallien et al. vergleichen diese beiden Methoden auf Basis von Verdünnungsreihen dreier unterschiedlicher Peptidsequenzen in einem Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer (Q Exactive™ - Thermo Scientific) [113]. Dabei gelang es Gallien et al., unter Verwendung von tSIM zwei Peptide mit deutlich höherer Sensitivität zu quantifizieren, als sie für das gleiche Peptid mit tMS2 erzielen konnten. Für das dritte Peptid stellte tMS2 die sensitivere Analyse­methode dar.

Acht Tests besitzen einen Funktionsbereich, der drei bis vier Größenordnungen umspannt (CYP2A13, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, MDR1). Zehn weitere Tests haben einen Funktionsbereich über zwei bis drei Größenordnungen (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6 (ENLR), CYP2E1, CYP2F1, CYP2S1, CPR). Lediglich der auf dem Motiv „SVLK“ basierende CYP2D6-Test weist einen linearen Messbereich von nur einer Größenordnung auf.

Der TXP-Test für CYP2D6 (Motiv: SVLK) weist von allen 19 entwickelten Tests den kleinsten linearen Funktionsbereich auf. Die zu erwartenden CYP2D6-Analytkonzentrationen bewegen sich in der menschlichen Leber nach Präparation mikrosomaler Fraktionen zwischen 5 und 40 fmol/μg [110]. Der isotopenmarkierte Standard ermöglichte bei einer Einsatzmenge von 100 fmol nur bei endogenen Peptidmengen zwischen 100 und 1000 fmol eine Wiederfindungsrate zwischen 80% und 100%.

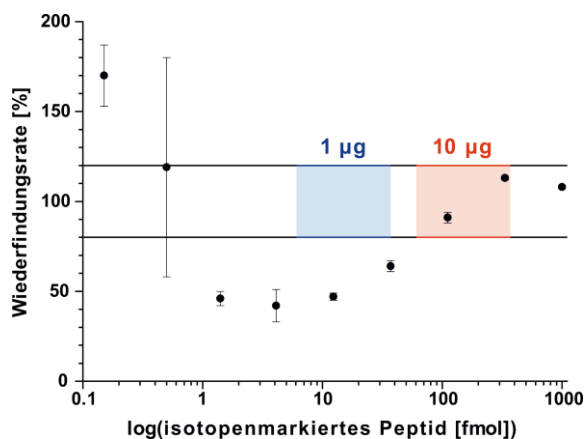


Abbildung 53 - Linearer Funktionsbereich des auf dem Motiv „SVLK“ beruhenden CYP2D6-TXP-Tests. Die in einer Studie von Ohtsuki et al. [110] in mikrosomalen Fraktionen quantifizierte CYP2D6-Mengen sind blau hinterlegt. Bei zehnfacher Einsatzmenge sind Konzentrationen im orange markierten Konzentrationsbereich zu erwarten. Dieser überschneidet sich mit dem linearen Funktionsbereich des TXP-Tests.

Eine möglichst genaue Quantifizierung kann über zwei Strategien erzielt werden. Zum einen ist es möglich, die Einsatzmenge des isotoopenmarkierten Standards der zu erwartenden Menge des Analyten anzupassen und diesen möglichst äquimolar zur Analytkonzentration einzusetzen. Kleinere Mengen Referenzpeptid bergen jedoch die Gefahr, dass keine ausreichende Robustheit des Tests gegeben ist. Eine Alternative bietet der Einsatz größerer Mengen biologischen Materials. So ist es möglich, durch Anreicherung aus 10 µg Probenmaterial die benötigte CYP2D6-Menge von 50-400 fmol/µg zu erreichen, um im linearen Funktionsbereich des TXP-Tests zu quantifizieren.

5.5. MDR1-Expression nach Xenotransplantation

Zellen sind in der Lage, gegen Fremdstoffe „Multiple Drug“-Resistenzen (MDR) auszubilden, die es ihnen erlauben, beispielsweise über eine erhöhte Expression des Transporters MDR1 (Multidrug-Resistance-Protein 1) Fremdstoffe mit einem erhöhten Efflux auszuschleusen. Die Entwicklung von Resistenzen stellt ein großes Problem in der Anwendung von Chemotherapeutika dar. Mechanismen, wie gesteigerter Efflux von Fremdstoffen unter gleichzeitig vermindertem Influx, eine Blockierung apoptotischer Mechanismen, sowie die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und des Fremdstoffmetabolismus ermöglichen es der Tumorzelle, sich „zu Wehr“ zu setzen [114, 115]. MDR1 besitzt zwölf Transmembransegmente und ist in der Lage, eine Vielzahl von Fremdstoffen ATP-getrieben ausschleusen zu können, darunter Adriamycin (ADR) [116, 117].

Der für die Quantifizierung von MDR1 entwickelte TXP-Test ermöglichte eine deutliche Unterscheidung zwischen Tumoren, die aus einer ADR-resistenten und einer ADR-sensitiven Ovarialkarzinomzelllinie entstanden sind [118]. Mit Proteinkonzentrationen zwischen 0,3 und 1,4 pmol/mg war MDR1 in den mit ADR-resistenten Tumoren sehr stark exprimiert, in den ADR-sensitiven Tumoren lag die Menge des Transporters unter der Quantifizierungsgrenze. Die Quantifizierungsgrenze lag, durch die Einsatzmenge an isotoopenmarkierten Referenzpeptid und die daraus vom Hersteller gewährleistete Isotoopenreinheit (>98%) bedingt, bei 0,1 pmol/mg. Die Tatsache, dass MDR1 in allen ADR-sensitiven Proben mit weniger als 0,02 pmol/mg quantifiziert wurde, lässt den Rückschluss zu, dass die isotoopenmarkierten Referenzpeptide eine sehr hohe Reinheit besitzen. Nimmt

man außer Acht, dass es sich bei 0,02 pmol/mg um nicht markierte Peptide und damit um eine Verunreinigung handeln könnte, ist davon auszugehen, dass MDR1 in den ADR-sensitiven Tumoren mindestens um den Faktor 20 niedriger exprimiert sein muss, als in der ADR-resistenten Tumorprobe mit der niedrigsten MDR1-Expression.

Der TXP-Test für MDR1 legt die Vermutung nahe, dass die durch Adriamycinbehandlung ausgebildete Resistenz auf der gesteigerten Expression des MDR1-Transporters beruht. Der MDR1-TXP-Test erlaubt es in Zukunft, die Wirkung weiterer Substanzen auf die MDR1-Expression zu studieren.

5.6. Cytochrom P450-Enzymkonzentrationen in menschlicher Leber

Die Vermessung mikrosomaler Fraktionen mit den beiden Methoden Immuno-MS und Western Blot führte zu voneinander abweichenden Quantifizierungsergebnissen. Korrelationsfaktoren $>0,7$ konnten für die Vermessung von CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19, CYP2A6 und CYP2D6 ermittelt werden. Für CYP2C9 und CPR konnten nur Korrelationsfaktoren unter 0,6 errechnet werden. Allgemein ist festzustellen, dass die absoluten Werte aller Proteine, die über Western Blot Analyse gewonnen wurden, über denen der mit Immuno-MS Analyse ermittelten lagen.

Exemplarisch sei die Problematik am Beispiel des Analyten CYP3A4 beschrieben. Während der Mittelwert aller CYP3A4-Bestimmungen über Western Blot 222,6 pmol/mg Protein ergab, lieferte die Immuno-MS Methode 10,7 pmol/mg. Ohtsuki et al. ermittelten über eine LC-MRM-basierte Vermessung von 17 mikrosomalen Fraktionen einen durchschnittlichen CYP3A4-Gehalt von 60,4 pmol/mg [110]. Kawakami et al. quantifizieren in vereinigten Mikrosomenfraktionen 65,3 pmol/mg CYP3A4 [119]. Schaefer et al. detektierten in Mikrosomenfraktionen dreier humaner Hepatozytenpräparationen durchschnittlich 13,01 pmol/mg CYP3A4 [102].

Die Unterschiede der über Immuno-MS und Western Blot Analyse sind höchstwahrscheinlich methodenbedingt. Da bei beiden Vermessungen die gleichen mikrosomalen Fraktionen zur Verfügung standen, sind spenderbedingte individuelle Unterschiede als Ursache auszuschließen. Es besteht die Möglichkeit, dass eine nicht ausreichende Spezifität des

Detektionsantikörpers bei der Western Blot Analyse durch Kreuzreaktivitäten zu einer Überquantifizierung geführt hat. Da jedoch über alle untersuchten Analyten hinweg im Mittel mehr quantifiziert wurde als mit Immuno-MS, stellt dies nur bedingt eine Erklärung dar.

Dass die Quantifizierungsergebnisse vor allem bei hohen Proteinkonzentrationen divergieren, könnte dem beschränkten dynamischen Bereich des Western Blots geschuldet sein. Ebenso ist es möglich, dass das Alter der Proben einen Einfluss auf die unterschiedlichen Messergebnisse hatte. Zwischen der Gewinnung der Leberbiopsien mit anschließender Western Blot-Analyse und der Quantifizierung über Immuno-MS lagerten die Proben einen Zeitraum von über drei Jahren.

Ergebnisse spektral quantifizierter Cytochrom P450 Enzyme bestätigen jedoch die Richtigkeit der Immuno-MS-Methode. Für CYP2A6 und CYP2C19 wurde mit Immuno-MS etwa die Hälfte der spektral quantifizierten Enzymmenge gemessen, was einer Unterquantifizierung um den Faktor 2 entspricht. Für CYP2A13, CYP2C8 (FSGR), CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 und CYP3A5 konnten äquimolare bis um den Faktor 1,5 höhere, bei CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8 (VIGR), CYP2C18, CYP2D6 (ENLR + SVLK) und CYP3A7 um den Faktor 2 bis 4 höhere Mengen detektiert werden. Die Tendenz, mit Immuno-MS bei einem Großteil der Proteine im Vergleich zur Spektralanalyse höhere Proteinmengen zu quantifizieren, kann der Tatsache geschuldet sein, dass im Falle der spektralen Vermessung nur intakte Proteine zu einem Signal führen. Cytochrom P450-Proteinfragmente ohne Häm sind zwar nicht funktionell, würden aber bei der Quantifizierung mittels Immuno-MS zum Ergebnis beitragen.

Ohtsuki et al., Kawakami et al. und Schaefer et al. verwenden MS-basierte Quantifizierungsmethoden, die minimal um den Faktor 3, maximal um den Faktor 17 geringere CYP3A4-Konzentrationen detektieren [102, 110, 119]. Die stark zwischen Individuen variierenden Konzentrationen von CYP-Enzymen lassen jedoch keinen absoluten Vergleich mit den in dieser Arbeit beobachteten Werten zu.

Vergleicht man mit Immuno-MS methodenintern die CYP-Enzymkonzentrationen in Mikrosomenfraktionen und Lebergewebe, bei dessen Aufarbeitung keine weitere Präparation durchgeführt worden ist, so lassen sich Faktoren berechnen, die den Grad der Anreicherung nach Mikrosomenpräparation beschreiben. Die Faktoren reichten von 1,2 bei

CYP2C9 bis zu 8,2 bei CPR. CPR und CYP2C19 waren mit einem 8,2- bzw. 6,7fachen Anreicherungsgrad in mikrosomalen Fraktionen um ein Vielfaches gegenüber der direkten Vermessung in Lebergewebe angereichert.

Für die Bewertung der über die zwei Präparationsformen generierten Ergebnisse wurden Korrelationsfaktoren errechnet. Die Datensätze der Analyten CYP3A4, CYP3A5 und CYP2D6 korrelierten zu einem hohen Maß (Korrelation $>0,8$), die der Analyten CYP2C9, CYP2C19 und CPR wiesen Korrelationswerte von $<0,6$ auf. Für CYP2A6 konnte keine Korrelation berechnet werden, da die Proteinmenge in Lebergewebe unter der Nachweisgrenze lag. Da nur für drei der sieben Analyten gute Korrelationen zwischen den beiden Aufbereitungsformen ermittelt werden konnten, ist davon auszugehen, dass die mikrosomale Präparation bei der anschließenden Quantifizierung für eine nicht unerhebliche Fehlerbehaftung der Ergebnisse verantwortlich ist.

Antikörper-basierte LC-MS-Tests machen es möglich, sehr niedrige Analytkonzentrationen zu quantifizieren. Aus diesem Grund kann bei dieser Quantifizierungsstrategie auf die Präparation von Mikrosomen verzichtet werden. Die Vermessung von 18 verschiedenen Lebergeweben lieferte für 14 von 18 Analyten Werte über der Quantifizierungsgrenze. Die kombinierten TXP-Tests stellen somit ein vielseitiges und umfassendes Werkzeug dar, um den Fremdstoffmetabolismus in der menschlichen Leber zu charakterisieren.

5.7. Die TXP-Quantifizierungsstrategie als Analysemethode für Induktionsstudien

Primäre Hepatozyten stellen für Induktionsstudien gewöhnlich den Goldstandard dar [120]. Kryokonservierte Hepatozyten weisen im Vergleich geringere Enzymaktivitäten auf und erfordern Optimierung bei der Generierung und Kultivierung [121, 122]. Technische Optimierungen ermöglichen jedoch die Nutzung kryokonservierter Hepatozyten für Induktionsexperimente und Toxizitätsstudien [123].

5.7.1. Rifampicin-vermittelte Induktion des Cytochrom P450 Systems

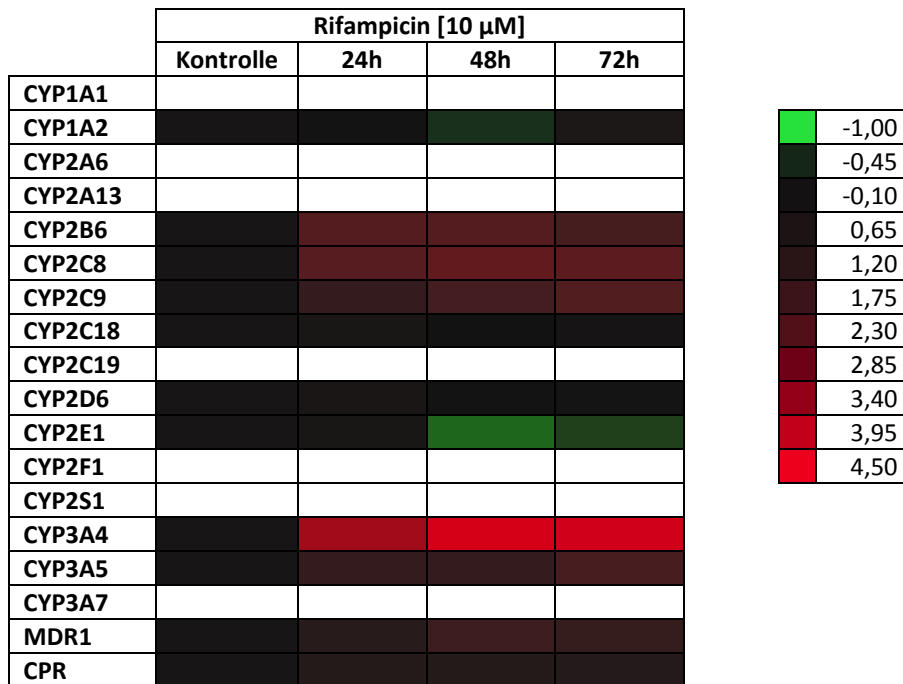
Rifampicin zählt zu den wirksamsten Induktoren des Cytochrom P450 Enzyms 3A4 [81, 124, 125]. Um den Nutzen der TXP-Quantifizierungsstrategie in einem biologischen System unter Beweis zu stellen, wurden kryokonservierte Hepatozyten mit 10 μM Rifampicin über 72 Stunden behandelt (siehe Tabelle 32). Nach 48 Stunden erreichte die Expression von CYP3A4 ihr Maximum. Die CYP3A4-Konzentration war zu diesem Zeitpunkt um das 16fache im Vergleich zur Kontrollbehandlung induziert worden. In einem Versuchsaufbau von Rae et al. konnte nach Behandlung mit 33 μM Rifampicin gezeigt werden, dass die mRNA von CYP3A4 in primären Hepatozyten auf die 55fache Menge induziert wurde [126]. In einer weiteren Studie von Schaefer et al. wurde eine Induktion von CYP3A4 durch die Behandlung frischer Hepatozyten mit 25 μM Rifampicin für 48 Stunden beobachtet. Nach mikrosomaler Fraktionierung wurde ein 8,9facher Anstieg der CYP3A4-Konzentration über LC-MS gemessen [102].

Der Umstand, unterschiedlich starke Induktionen zwischen biologischen Proben zu messen, kann verschiedenen Umständen geschuldet sein. Neben der Entscheidung, mit frischen primären Hepatozyten, die in der Regel höhere CYP-Aktivitäten als die kryokonservierten Hepatozyten besitzen [121, 122], lassen individuelle Unterschiede zwischen den Kulturen aufgrund von Prädisposition des Organismus mit Fremdstoffen oder genetischer Variabilität nur schwer direkte Vergleiche zu.

Folgenuntersuchungen mit unterschiedlichen Rifampicin-Konzentrationen können darüber Aufschluss geben, ob die maximale Induzierbarkeit bei der Behandlung mit 10 μM Rifampicin in den hier verwendeten kryokonservierten Hepatozyten bereits erreicht wurde oder ob der induktive Effekt noch gesteigert werden kann [127]. Des Weiteren gilt es zu berücksichtigen, dass eine Korrelation zwischen mRNA-Gehalt und Proteingehalt nicht immer gegeben ist [128, 129].

Ebenso wie bei CYP3A4 wurde auch der Gehalt von CYP3A5 durch die Behandlung mit Rifampicin erhöht. Nach 72 Stunden wurde die vierfache Proteinmenge gemessen. Burk et al. detektierten nach Rifampicinzugabe (10 μM) einen ähnlich starken induktiven Effekt auf mRNA-Ebene. CYP3A5 war spenderabhängig um das 2-6fache induziert [130].

Tabelle 32 - Zusammenfassung der mit Rifampicin (10 µM) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „Heatmap“-Darstellung. Die Enzymkonzentrationen wurden zur Basis 2 logarithmiert dargestellt.



Neben der PXR-vermittelten Induktion der CYP3A-Gene konnte für CYP2C9 nach 72 Stunden eine um den Faktor 3,6 induzierte Proteinmenge gemessen werden. Über die Bindung des PXR-Komplexes an ein PXR-empfindliches Element wird die PXR-vermittelte Induktion von CYP2C9 angetrieben [131, 132].

Ein Anstieg des Proteingehalts konnte ebenso für CYP2C8 verzeichnet werden. Nach 48 Stunden konnte mit einem um den Faktor 4,7 erhöhten Proteingehalt die maximale Expression bei dieser Behandlung bestimmt werden. CYP2C8 wird über die Bindung von PXR oder CAR im Beisein von RXR an eine distale PXR/CAR-Bindestelle induziert [133].

Die Induktion von MDR1 erreicht nach 48 Stunden ihr Maximum. Im Vergleich zur Kontrollbehandlung konnte die doppelte Proteinmenge gemessen werden. Die Induktion von MDR1 ist über die Bindung von PXR an ein DR4-Motif in der Nähe des MDR1-Gens zurückzuführen [84].

5.7.2. Phenobarbital-vermittelte Induktion des Cytochrom P450 Systems

Nach Behandlung der kryokonservierten Hepatozyten mit Phenobarbital konnte die CAR-vermittelte Induktion des Enzyms CYP2B6 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 33). Der höchste CYP2B6-Proteingehalt wurde nach 48 Stunden mit 3,47 fmol/ μ g gemessen. Dies entsprach der sechsfachen Menge der Basalkonzentration. Schaefer et al. quantifizierten mittels LC-MS einen 7,6fachen Anstieg von 0,3 fmol/ μ g auf 2,3 fmol/ μ g CYP2B6 nach Behandlung mit 1 mM Phenobarbital [102].

Neben CYP2B6 wurde ebenso CYP3A4 über eine Transaktivierung induziert. Dies geschieht über die Bindung des Heterodimers CAR/RXR an ein ER6/DR3-Element in der Promotorgegend des CYP3A4-Gens [85, 134]. Die CYP3A4-Expression war gegenüber der Kontrollbehandlung nach 48 Stunden um die 14fache Proteinmenge erhöht.

Die beobachtete Aktivierung des CYP2C9-Gens durch Phenobarbital konnte bereits von Gerbal-Chaloin et al. gemessen, von Ferguson et al. einem CAR-empfindlichen Element und von Chen et al. als PXR-vermittelt charakterisiert werden [131, 135, 136].

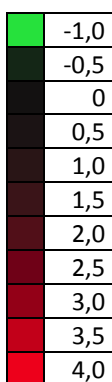
Phenobarbital induzierte nach 48 Stunden ebenso den 3,5fachen Anstieg der CYP2C8-Konzentration. Schaefer et al. detektierten die 3,1fache Induktion von CYP2C8, ausgehend von 8,4 fmol/ μ g auf 25,9 fmol/ μ g [102]. Die Induktion ist auf eine distale PXR/CAR-Bindestelle in der Umgebung des CYP2C8-Gens zu erklären [133].

Es konnte des Weiteren eine Induktion von MDR1 quantifiziert werden. Nach 48 Stunden konnte eine 2,6fach erhöhte Expression gemessen werden. Sahi et al. beschreiben diesen Effekt ebenfalls [137]. Mills et al. beobachteten, dass die Behandlung von Fa2N-4-Zellen mit 1 mM Phenobarbital einen 2,3fachen Anstieg der mRNA-Menge zur Folge hatte [138]. Schaefer et al. quantifizieren auf Proteinebene über LC-MS bei gleicher Behandlung eine 4,3fache Induktion [102].

Die Behandlung mit Phenobarbital führte ebenso zu einer Verdoppelung der CPR-Konzentration. Eine induktive Wirkung von Phenobarbital auf die NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR) gilt in der Literatur als gesichert [139, 140].

Tabelle 33 - Zusammenfassung der mit Phenobarbital (3 mM) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „Heatmap“-Darstellung. Die Enzymkonzentrationen wurden zur Basis 2 logarithmiert dargestellt.

	Phenobarbital [3 mM]			
	Kontrolle	24h	48h	72h
CYP1A1				
CYP1A2				
CYP2A6				
CYP2A13				
CYP2B6				
CYP2C8				
CYP2C9				
CYP2C18				
CYP2C19				
CYP2D6				
CYP2E1				
CYP2F1				
CYP2S1				
CYP3A4				
CYP3A5				
CYP3A7				
MDR1				
CPR				



Für CYP1A2 wurde nach Phenobarbitalzugabe eine gegenüber der Kontrollbehandlung um den Faktor 2,1 gesteigerte CYP1A2-Konzentration quantifiziert. Einen messbaren Effekt von Phenobarbital auf Enzyme der CYP1A-Familie ist in der Literatur nur wenig beschrieben. Zaher et al. messen einen induktiven Effekt auf CYP1A2 in Mäusen, deren AhR-Gen ausgeknockt ist [141]. Madan et al. beschreiben eine leichte induktive Wirkung anhand von Aktivitätsmessungen und Western Blot Analysen [142]. Schaefer et al. messen auf Proteinebene einen 2,5fachen Anstieg der CYP1A2-Konzentration von 6,2 fmol/µg auf 16,1 fmol/µg in mikrosomalen Fraktionen frischer humaner Hepatozyten [102].

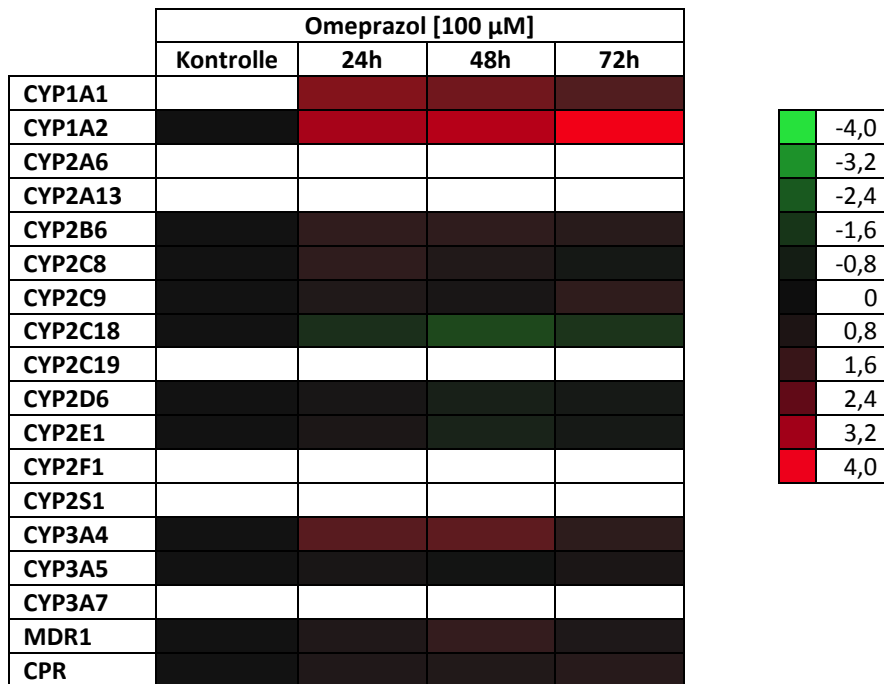
5.7.3. Omeprazol-vermittelte Induktion des Cytochrom P450 Systems

Omeprazol gilt neben den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen als Induktor für die Proteine CYP1A1 und CYP1A2 [120]. Während bei der Induktionsstudie (siehe Tabelle 34) in kryokonservierten Hepatozyten für CYP1A2 ein Basalniveau von 2,3 fmol/µg gemessen werden konnte, lag die CYP1A1-Proteinmenge unter der Quantifizierungsgrenze des

entwickelten Tests. Der entwickelte CYP1A1-Test besitzt bei der Zugabe von 111 fmol Referenzpeptid einen Funktionsbereich von jeweils einer Größenordnung ober- und unterhalb der zugegebenen Referenzpeptidmenge (siehe Abbildung 31). In der Induktionsstudie wurde die Cytochrom P450-Menge aus 6 µg Zelllysat bestimmt. 10 fmol isotopenmarkiertes Peptid wurden als Referenz eingesetzt. Die Quantifizierungsgrenze lag somit bei einer CYP1A1-Menge von 0,16 fmol/µg. Studien zur CYP1A1-Expression in menschlicher Leber weisen allgemein auf eine sehr geringe CYP1A1-Konzentration hin. Chang et al. wiesen in einem Teil ihrer Probanden CYP1A1-RNA nach, konnten aber kein CYP1A1-Protein in präparierten Mikrosomen nachweisen [143]. Drahashuk et al. beobachteten in mikrosomalen Fraktionen CYP1A1-Konzentrationen zwischen 0,4 und 5 fmol/µg [144]. Da in einer mikrosomalen Fraktion membranassoziierte Proteine wie die Cytochrom P450 Enzyme in angereicherter Form vorliegen, ist von einer Basalproteinmenge nahe der Quantifizierungsgrenze des CYP1A1-Tests auszugehen. Die Inkubation mit Omeprazol induzierte nach 24 Stunden eine messbare CYP1A1-Menge von 4,6 fmol/µg. Nach 48 Stunden betrug der Proteingehalt 3,8 fmol/µg, am Ende des Experimentes 2,6 fmol/µg.

Der CYP1A2-Gehalt konnte durch die Zugabe von 100 µM Omeprazol nach 24 Stunden auf die 8fache, nach 48 Stunden auf die 10fache und nach 72 Stunden auf die 15fache Proteinmenge induziert werden. Der Grad der CYP1A2-Induktion mittels Omeprazol findet in der Literatur sowohl unter Zuziehung von mRNA- und Aktivitätsmessungen, als auch bei Vergleich mit indirekten Proteinquantifizierungsstrategien Bestätigung. Shih et al. beobachteten auf mRNA-Ebene CYP1A2-Induktion nach Zugabe von 100 µM Omeprazol in vier menschlichen Primärkulturen. Nach 24 Stunden konnte spenderabhängig eine Induktion der mRNA um den Faktor 15 bis >60 gemessen werden [145]. Roymans et al. zeigen am Beispiel kryokonservierter Hepatozyten von vier unterschiedlichen Spendern die Induzierbarkeit von CYP1A2 nach Omeprazolzugabe (25 µM). Neben dem Beweis auf mRNA- und Proteinebene wurde ebenso die Aktivität von CYP1A2 gemessen. Die Enzymaktivität konnte zwischen 5,5- und 18,5-fach induziert werden, die mRNA-Expression um den Faktor 9,5 bis 78,4. Ebenso konnte eine Induktion auf Proteinebene verifiziert werden [123]. Schaefer et al. quantifizierten über LC-MS einen 19,1fachen Anstieg der CYP1A2-Konzentration. Ausgehend von 6,2 fmol/µg in der Kontrollbehandlung, konnte CYP1A2 nach 48stündiger Behandlung mit 50 µM Omeprazol auf 118,5 fmol/µg induziert werden [102].

Tabelle 34 - Zusammenfassung der mit Omeprazol (100 µM) in kryokonservierten Hepatozyten induzierten CYP-Enzyme in „Heatmap“-Darstellung. Die Enzymkonzentrationen wurden zur Basis 2 logarithmiert dargestellt.



Die in dieser Induktionsstudie gemessene induktive Wirkung von Omeprazol auf die Expression von CYP3A4 ist bisher selten beobachtet worden. Nach 48 Stunden konnte verglichen mit der Kontrollbehandlung die vierfache Menge an CYP3A4 quantifiziert werden; nach 72 Stunden war die CYP3A4-Expression auf etwa die doppelte Konzentration des Basalniveaus gesunken. Raucy et al. beschreiben diesen Effekt auf mRNA-Ebene als erste Forschungsgruppe [146]. Bestätigung finden die Erkenntnisse bei einer Studie von Moeller et al., bei der die Transkriptionsregulation von 18 ADME-Genen in menschlichen Hepatozyten untersucht wurden [147]. Schaefer et al. messen über LC-MS einen 6,4fachen Anstieg des CYP3A4-Gehalts, ausgehend von 9,2 fmol/µg auf schließlich 58,7 fmol/µg nach 48 Stunden Behandlung mit 50 µM Omeprazol [102].

Die CYP2B6-Proteinkonzentration war nach 24 Stunden Omeprazolbehandlung um den Faktor 2 erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden von Ning et al. in primären Hepatozyten von drei verschiedenen Donoren bei einem 3-8fachen Anstieg der mRNA erzielt, sowie bei Schaefer et al., die einen 2,3fachen Anstieg auf Proteinebene in frischen humanen Hepatozyten nach LC-MS-Analyse detektierten [102, 148]. Roymans et al. konnten diesen Effekt in kryokonservierten Hepatozyten nicht bestätigen [123].

Eine inhibierende Wirkung von Omeprazol auf das Enzym CYP2C18 ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Es ist jedoch bekannt, dass der mRNA-Gehalt sich im Vergleich zu anderen Varianten der CYP2C-Enzyme wie CYP2C8, CYP2C9 und CYP2C19 zwischen Individuen nur wenig unterscheidet [135]. Während bei Gerbal-Chaloin et al. CYP2C18 in Primärkulturen nach Präparation mikrosomaler Fraktionen auf Proteinebene nicht detektierbar war, konnte das Protein in der Induktionsstudie gemittelt mit 1,1 fmol/ μ g in allen Kontrollbehandlungen quantifiziert werden.

6. Zusammenfassung

Den Abbauprozessen von Fremdstoffen kommt vor allem in der pharmazeutischen Industrie großes Interesse zu. Die größtenteils auf mRNA-Expressionsstudien und Enzymaktivitätstest beruhende Erforschung des Fremdstoffmetabolismus kann durch die in dieser Arbeit entwickelte Quantifizierungsstrategie um die Information des Proteingehalts ergänzt werden. Die Konzentrationen der Cytochrom P450 Enzyme stellen einen wichtigen Baustein für die Untersuchung pharmakokinetischer Prozesse dar.

Die entwickelten CYP-TXP-Tests quantifizieren die im menschlichen Fremdstoffmetabolismus beteiligten Cytochrom P450 Enzyme spezifisch und sensitiv. Die Tests erlauben es, simultan in einem einzelnen LC-MS-Lauf mehrere Analyte zu vermessen. Die zwei entwickelten multiplexen Quantifizierungsaufbauten sind in der Lage, nach Immunopräzipitation die Quantifizierung aller 15 im Fremdstoffmetabolismus relevanten Cytochrom P450 Enzyme, sowie des ABC-Transporters MDR1 und der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase in 36 Minuten zu ermöglichen. Die verwendeten TXP-Antikörper wurden eingehend charakterisiert und validiert. Neben der Bestimmung der Dissoziationskonstanten und Bindekapazitäten wurde der lineare Messbereich der TXP-Tests bestimmt. Ein breiter linearer Messbereich ermöglicht es, stark variierende Konzentrationsspiegel ohne Anpassung des Probevolumens zu vermessen. Somit sind die TXP-Tests besonders für Induktionsstudien geeignet und werden gleichzeitig den in der Bevölkerung stark schwankenden Expressionsspiegeln der Cytochrom P450 Enzyme gerecht. In Induktionsexperimenten konnten hierbei in der Literatur beschriebene Induktionsprozesse bestätigt werden. In Adriamycin-resistenten Zellen wurde zudem eine gesteigerte Expression des MDR1-Transporters nachgewiesen.

Die hohen Sensitivitäten der TXP-Tests erlauben es, Cytochrom P450 Enzyme aus Lebergewebe ohne vorhergehende Mikrosomenpräparation zu quantifizieren. Die Quantifizierung der Cytochrom P450-Enzyme kann hierbei sowohl aus mikrosomalen Präparationen, als auch aus Gewebe erfolgen. Kleinste Gewebe- oder Zelllysatzmengen von weniger als 10 µg Gewebe reichen für eine robuste Quantifizierung aus. Die entwickelten CYP-TXP-Tests eignen sich somit für die Quantifizierung in miniaturisierten Zellkulturexperimenten im 96-Well-Format.

Quellenverzeichnis

1. Wilkins, M.R., et al., From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 1996. 14(1): p. 61-5.
2. James, P., Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys*, 1997. 30(4): p. 279-331.
3. Ghazalpour, A., et al., Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*, 2011. 7(6): p. e1001393.
4. Tyers, M. and M. Mann, From genomics to proteomics. *Nature*, 2003. 422(6928): p. 193-7.
5. Templin, M.F., et al., Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics*, 2003. 3(11): p. 2155-66.
6. MacBeath, G., Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet*, 2002. 32 Suppl: p. 526-32.
7. Phizicky, E., et al., Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, 2003. 422(6928): p. 208-15.
8. Aebersold, R., et al., Highlights of B/D-HPP and HPP Resource Pillar Workshops at 12th Annual HUPO World Congress of Proteomics: September 14-18, 2013, Yokohama, Japan. *Proteomics*, 2014. 14(9): p. 975-88.
9. Aebersold, R., et al., The biology/disease-driven human proteome project (B/D-HPP): enabling protein research for the life sciences community. *J Proteome Res*, 2013. 12(1): p. 23-7.
10. Issaq, H. and T. Veenstra, Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*, 2008. 44(5): p. 697-8, 700.
11. Sule, A., et al., Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. *Phytochemistry*, 2004. 65(12): p. 1853-63.
12. Mann, M. and O.N. Jensen, Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(3): p. 255-61.
13. Sze, S.K., et al., Top-down mass spectrometry of a 29-kDa protein for characterization of any posttranslational modification to within one residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(4): p. 1774-9.
14. Kelleher, N.L., Top-down proteomics. *Anal Chem*, 2004. 76(11): p. 197A-203A.
15. Aebersold, R. and M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003. 422(6928): p. 198-207.
16. Washburn, M.P., D. Wolters, and J.R. Yates, 3rd, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 2001. 19(3): p. 242-7.
17. Wolters, D.A., M.P. Washburn, and J.R. Yates, 3rd, An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*, 2001. 73(23): p. 5683-90.
18. Percy, A.J., et al., Multiplexed MRM with Internal Standards for Cerebrospinal Fluid Candidate Protein Biomarker Quantitation. *J Proteome Res*, 2014.
19. Percy, A.J., et al., Advances in multiplexed MRM-based protein biomarker quantitation toward clinical utility. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1844(5): p. 917-26.
20. Stemmann, O., et al., Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell*, 2001. 107(6): p. 715-26.
21. Gerber, S.A., et al., Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(12): p. 6940-5.
22. Janecki, D.J., et al., A multiple reaction monitoring method for absolute quantification of the human liver alcohol dehydrogenase ADH1C1 isoenzyme. *Anal Biochem*, 2007. 369(1): p. 18-26.
23. Kuzyk, M.A., et al., Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma. *Mol Cell Proteomics*, 2009. 8(8): p. 1860-77.
24. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*, 2002. 1(11): p. 845-67.
25. Domanski, D., et al., MRM-based multiplexed quantitation of 67 putative cardiovascular disease biomarkers in human plasma. *Proteomics*, 2012. 12(8): p. 1222-43.
26. Chen, Y.T., et al., Multiplexed quantification of 63 proteins in human urine by multiple reaction monitoring-based mass spectrometry for discovery of potential bladder cancer biomarkers. *J Proteomics*, 2012. 75(12): p. 3529-45.
27. Ebhardt, H.A., et al., Range of protein detection by selected/multiple reaction monitoring mass spectrometry in an unfractionated human cell culture lysate. *Proteomics*, 2012. 12(8): p. 1185-93.
28. Annesley, T.M., Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem*, 2003. 49(7): p. 1041-4.

29. Pieper, R., et al., Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics*, 2003. 3(4): p. 422-32.
30. Liu, T., et al., Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2006. 5(11): p. 2167-74.
31. Whiteaker, J.R., et al., Head-to-head comparison of serum fractionation techniques. *J Proteome Res*, 2007. 6(2): p. 828-36.
32. Pernemalm, M., et al., Evaluation of three principally different intact protein prefractionation methods for plasma biomarker discovery. *J Proteome Res*, 2008. 7(7): p. 2712-22.
33. Kuhn, E., 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(4): p. 1175-86.
34. Faca, V., et al., Contribution of protein fractionation to depth of analysis of the serum and plasma proteomes. *J Proteome Res*, 2007. 6(9): p. 3558-65.
35. Keshishian, H., et al., Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics*, 2007. 6(12): p. 2212-29.
36. Gygi, S.P., et al., Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags. *J Proteome Res*, 2002. 1(1): p. 47-54.
37. Anderson, N.L., et al., Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J Proteome Res*, 2004. 3(2): p. 235-44.
38. Anderson, N.L., et al., SISCAPA peptide enrichment on magnetic beads using an in-line bead trap device. *Mol Cell Proteomics*, 2009. 8(5): p. 995-1005.
39. Whiteaker, J.R., et al., An automated and multiplexed method for high throughput peptide immunoaffinity enrichment and multiple reaction monitoring mass spectrometry-based quantification of protein biomarkers. *Mol Cell Proteomics*, 2010. 9(1): p. 184-96.
40. Neubert, H., J. Gale, and D. Muirhead, Online high-flow peptide immunoaffinity enrichment and nanoflow LC-MS/MS: assay development for total salivary pepsin/pepsinogen. *Clin Chem*, 2010. 56(9): p. 1413-23.
41. Whiteaker, J.R., et al., Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. *Anal Biochem*, 2007. 362(1): p. 44-54.
42. Volk, S., et al., Combining Ultracentrifugation and Peptide Termini Group-specific Immunoprecipitation for Multiplex Plasma Protein Analysis. *Mol Cell Proteomics*, 2012. 11(7): p. O111 015438.
43. Jimenez, C.R., et al., Automated serum peptide profiling using novel magnetic C18 beads off-line coupled to MALDI-TOF-MS. *Proteomics Clin Appl*, 2007. 1(6): p. 598-604.
44. Schoenherr, R.M., et al., Multiplexed quantification of estrogen receptor and HER2/Neu in tissue and cell lysates by peptide immunoaffinity enrichment mass spectrometry. *Proteomics*, 2012. 12(8): p. 1253-60.
45. Whiteaker, J.R., et al., Evaluation of large scale quantitative proteomic assay development using peptide affinity-based mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2011. 10(4): p. M110 005645.
46. Whiteaker, J.R., et al., Sequential multiplexed analyte quantification using peptide immunoaffinity enrichment coupled to mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2012. 11(6): p. M111 015347.
47. Poetz, O., et al., Sequential multiplex analyte capturing for phosphoprotein profiling. *Mol Cell Proteomics*, 2010. 9(11): p. 2474-81.
48. Hoofnagle, A.N., et al., Quantification of thyroglobulin, a low-abundance serum protein, by immunoaffinity peptide enrichment and tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 2008. 54(11): p. 1796-804.
49. Kuhn, E., et al., Developing multiplexed assays for troponin I and interleukin-33 in plasma by peptide immunoaffinity enrichment and targeted mass spectrometry. *Clin Chem*, 2009. 55(6): p. 1108-17.
50. Nelson, R.W. and C.R. Borges, Mass spectrometric immunoassay revisited. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011. 22(6): p. 960-8.
51. Nelson, R.W., et al., Mass spectrometric immunoassay. *Anal Chem*, 1995. 67(7): p. 1153-8.
52. Krastins, B., et al., Rapid development of sensitive, high-throughput, quantitative and highly selective mass spectrometric targeted immunoassays for clinically important proteins in human plasma and serum. *Clin Biochem*, 2013. 46(6): p. 399-410.
53. Lopez, M.F., et al., Selected reaction monitoring-mass spectrometric immunoassay responsive to parathyroid hormone and related variants. *Clin Chem*, 2010. 56(2): p. 281-90.
54. Kiernan, U.A., et al., Quantitative mass spectrometry evaluation of human retinol binding protein 4 and related variants. *PLoS One*, 2011. 6(3): p. e17282.

55. Tubbs, K.A., et al., High-throughput MS-based protein phenotyping: application to haptoglobin. *Proteomics*, 2005. 5(18): p. 5002-7.
56. Neubert, H., et al., Sequential protein and peptide immunoaffinity capture for mass spectrometry-based quantification of total human beta-nerve growth factor. *Anal Chem*, 2013. 85(3): p. 1719-26.
57. Anderson, N.L., et al., A human proteome detection and quantitation project. *Mol Cell Proteomics*, 2009. 8(5): p. 883-6.
58. Hoeppe, S., et al., Targeting peptide termini, a novel immunoaffinity approach to reduce complexity in mass spectrometric protein identification. *Mol Cell Proteomics*, 2011. 10(2): p. M110 002857.
59. Planatscher, H., et al., Optimal selection of epitopes for TXP-immunoaffinity mass spectrometry. *Algorithms Mol Biol*, 2010. 5: p. 28.
60. Eisen, D., et al., G protein-coupled receptor quantification using peptide group-specific enrichment combined with internal peptide standard reporter calibration. *J Proteomics*, 2013. 90: p. 85-95.
61. Xu, C., C.Y. Li, and A.N. Kong, Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res*, 2005. 28(3): p. 249-68.
62. Jakoby, W.B. and D.M. Ziegler, The enzymes of detoxication. *J Biol Chem*, 1990. 265(34): p. 20715-8.
63. Borst, P., et al., The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1461(2): p. 347-57.
64. Guengerich, F.P., Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2008. 21(1): p. 70-83.
65. Rendic, S. and F.J. Di Carlo, Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev*, 1997. 29(1-2): p. 413-580.
66. Williams, J.A., et al., Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos*, 2004. 32(11): p. 1201-8.
67. Lin, J.H. and A.Y. Lu, Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev*, 1997. 49(4): p. 403-49.
68. Wienkers, L.C. and T.G. Heath, Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(10): p. 825-33.
69. Walsky, R.L. and R.S. Obach, Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos*, 2004. 32(6): p. 647-60.
70. Ayrton, J., et al., Application of a generic fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of cytochrome P450 probe substrates. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1998. 12(5): p. 217-24.
71. Black, W.C., et al., 2,3-Diarylcyclopentenones as orally active, highly selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Med Chem*, 1999. 42(7): p. 1274-81.
72. Chauret, N., et al., Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal Biochem*, 1999. 276(2): p. 215-26.
73. Gu, Y.Z., J.B. Hogenesch, and C.A. Bradfield, The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000. 40: p. 519-61.
74. Kumar, R. and E.B. Thompson, The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, 1999. 64(5): p. 310-9.
75. Kumar, R. and E.B. Thompson, Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*, 2003. 17(1): p. 1-10.
76. Waxman, D.J., P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*, 1999. 369(1): p. 11-23.
77. Ponting, C.P. and L. Aravind, PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol*, 1997. 7(11): p. R674-7.
78. Jones, S.A., et al., The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol*, 2000. 14(1): p. 27-39.
79. Watkins, R.E., et al., The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science*, 2001. 292(5525): p. 2329-33.
80. Goodwin, B., M.R. Redinbo, and S.A. Kliewer, Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. 42: p. 1-23.
81. Goodwin, B., E. Hodgson, and C. Liddle, The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol*, 1999. 56(6): p. 1329-39.
82. Vyhlidal, C.A., P.K. Rogan, and J.S. Leeder, Development and refinement of pregnane X receptor (PXR) DNA binding site model using information theory: insights into PXR-mediated gene regulation. *J Biol Chem*, 2004. 279(45): p. 46779-86.

83. Goodwin, B., et al., Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Mol Pharmacol*, 2001. 60(3): p. 427-31.
84. Geick, A., M. Eichelbaum, and O. Burk, Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem*, 2001. 276(18): p. 14581-7.
85. Xie, W., et al., Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev*, 2000. 14(23): p. 3014-23.
86. Pascussi, J.M., et al., Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol*, 2000. 58(2): p. 361-72.
87. Mutoh, S., et al., Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Sci Signal*, 2013. 6(274): p. ra31.
88. Honkakoski, P., et al., The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(10): p. 5652-8.
89. Honkakoski, P., T. Sueyoshi, and M. Negishi, Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR. *Ann Med*, 2003. 35(3): p. 172-82.
90. Sueyoshi, T., et al., The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem*, 1999. 274(10): p. 6043-6.
91. Smirlis, D., et al., Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics. *J Biol Chem*, 2001. 276(16): p. 12822-6.
92. Forman, B.M., et al., Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature*, 1998. 395(6702): p. 612-5.
93. Kawamoto, T., et al., Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene. *Mol Endocrinol*, 2000. 14(11): p. 1897-905.
94. Kazlauskas, A., et al., The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(7): p. 2594-607.
95. Probst, M.R., et al., Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Mol Pharmacol*, 1993. 44(3): p. 511-8.
96. Whitlock, J.P., Jr., Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999. 39: p. 103-25.
97. Denison, M.S., J.M. Fisher, and J.P. Whitlock, Jr., The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem*, 1988. 263(33): p. 17221-4.
98. Shimada, T., et al., Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 2002. 23(7): p. 1199-207.
99. Sun, Y.V., et al., Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(15): p. 4512-23.
100. Denison, M.S., et al., Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact*, 2002. 141(1-2): p. 3-24.
101. Nelson, D.R., et al., The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 1993. 12(1): p. 1-51.
102. Schaefer, O., et al., Absolute quantification and differential expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes, and UDP-glucuronosyltransferases in cultured primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 2012. 40(1): p. 93-103.
103. Code, E.L., et al., Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos*, 1997. 25(8): p. 985-93.
104. Aninat, C., et al., Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*, 2006. 34(1): p. 75-83.
105. LeCluyse, E., et al., Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol*, 2000. 14(4): p. 177-88.
106. Friguet, B., et al., Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*, 1985. 77(2): p. 305-19.
107. Nieba, L., A. Krebber, and A. Pluckthun, Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem*, 1996. 234(2): p. 155-65.
108. Kurzeder, C., et al., CD9 promotes adeno-associated virus type 2 infection of mammary carcinoma cells with low cell surface expression of heparan sulphate proteoglycans. *Int J Mol Med*, 2007. 19(2): p. 325-33.
109. Koch, I., et al., Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30(10): p. 1108-14.

110. Ohtsuki, S., 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*, 2012. 40(1): p. 83-92.
111. Gomez-Lechon, M.J., et al., Culture of human hepatocytes from small surgical liver biopsies. Biochemical characterization and comparison with in vivo. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990. 26(1): p. 67-74.
112. Buhrman, D.L., P.I. Price, and P.J. Rudewiczcor, Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1996. 7(11): p. 1099-105.
113. Gallien, S., et al., Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 2012. 11(12): p. 1709-23.
114. Goldstein, L.J., et al., Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 1989. 81(2): p. 116-24.
115. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(1): p. 48-58.
116. Gottesman, M.M. and I. Pastan, The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem*, 1988. 263(25): p. 12163-6.
117. Gottesman, M.M., et al., Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet*, 1995. 29: p. 607-49.
118. Minko, T., et al., HPMA copolymer bound adriamycin overcomes MDR1 gene encoded resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *J Control Release*, 1998. 54(2): p. 223-33.
119. Kawakami, H., et al., Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *J Pharm Sci*, 2011. 100(1): p. 341-52.
120. Pelkonen, O., et al., Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*, 2008. 82(10): p. 667-715.
121. Hengstler, J.G., et al., Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev*, 2000. 32(1): p. 81-118.
122. Li, A.P., et al., Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact*, 1999. 121(1): p. 117-23.
123. Roymans, D., et al., Expression and induction potential of cytochromes P450 in human cryopreserved hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 2005. 33(7): p. 1004-16.
124. Michalets, E.L., Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy*, 1998. 18(1): p. 84-112.
125. Schuetz, E.G., et al., Regulation of human liver cytochromes P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes. *Hepatology*, 1993. 18(5): p. 1254-62.
126. Rae, J.M., et al., Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 299(3): p. 849-57.
127. Lin, J.H. and A.Y. Lu, Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. 41: p. 535-67.
128. Anderson, L. and J. Seilhamer, A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 1997. 18(3-4): p. 533-7.
129. Maier, T., M. Guell, and L. Serrano, Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*, 2009. 583(24): p. 3966-73.
130. Burk, O., et al., The induction of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) in the human liver and intestine is mediated by the xenobiotic sensors pregnane X receptor (PXR) and constitutively activated receptor (CAR). *J Biol Chem*, 2004. 279(37): p. 38379-85.
131. Chen, Y., et al., Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. 308(2): p. 495-501.
132. Gerbal-Chaloin, S., et al., Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*, 2002. 277(1): p. 209-17.
133. Ferguson, S.S., et al., Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4alpha. *Mol Pharmacol*, 2005. 68(3): p. 747-57.
134. Luo, G., et al., CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30(7): p. 795-804.
135. Gerbal-Chaloin, S., et al., Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos*, 2001. 29(3): p. 242-51.

136. Ferguson, S.S., et al., Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstane receptor: discovery of a new distal binding site. *Mol Pharmacol*, 2002. 62(3): p. 737-46.
137. Sahi, J., et al., Avasimibe induces CYP3A4 and multiple drug resistance protein 1 gene expression through activation of the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. 306(3): p. 1027-34.
138. Mills, J.B., et al., Induction of drug metabolism enzymes and MDR1 using a novel human hepatocyte cell line. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. 309(1): p. 303-9.
139. Taira, Y., et al., Effects of phenobarbital, pregnenolone-16 alpha-carbonitrile, and 3-methylcholanthrene pretreatments on the distribution of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase within the liver lobule. *Mol Pharmacol*, 1980. 18(2): p. 304-12.
140. Waxman, D.J. and L. Azaroff, Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J*, 1992. 281 (Pt 3): p. 577-92.
141. Zaher, H., et al., Effect of phenobarbital on hepatic CYP1A1 and CYP1A2 in the Ahr-null mouse. *Biochem Pharmacol*, 1998. 55(2): p. 235-8.
142. Madan, A., et al., Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 2003. 31(4): p. 421-31.
143. Chang, T.K., et al., Real-time polymerase chain reaction analysis of CYP1B1 gene expression in human liver. *Toxicol Sci*, 2003. 71(1): p. 11-9.
144. Drahushuk, A.T., et al., Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture. *Carcinogenesis*, 1998. 19(8): p. 1361-8.
145. Shih, H., et al., Species differences in hepatocyte induction of CYP1A1 and CYP1A2 by omeprazole. *Hum Exp Toxicol*, 1999. 18(2): p. 95-105.
146. Raucy, J.L., Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. *Drug Metab Dispos*, 2003. 31(5): p. 533-9.
147. Moeller, T.B., C.; Muchow, M.; Yee, B., Transcript Regulation of 18 ADME Genes by Prototypical Inducers in Human Hepatocytes. Poster Presentation, 2012.
148. Ning, B., et al., Systematic and simultaneous gene profiling of 84 drug-metabolizing genes in primary human hepatocytes. *J Biomol Screen*, 2008. 13(3): p. 194-201.

Danksagung

Die Dissertation wurde am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI Reutlingen) in der Abteilung Biochemie angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović danke ich für die Annahme als Doktorand, Herrn Prof. Dr. Ulrich Rothbauer für die Erstellung des Zweitgutachtens zu dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Dr. Oliver Pötz für die professionelle Betreuung der vorliegenden Arbeit und die große Freiheit, die ich bei der Strategieentwicklung zur Testetablierung genießen durfte.

Ich danke Dr. Thomas Joos für die Möglichkeit, am NMI eine fundierte Ausbildung in Bereichen der anwendungsorientierten Forschung genießen zu können.

Hannes Planatscher danke ich für die bioinformatischen Hilfestellungen, Bart van den Berg für die Wissensteilung auf den Gebieten der Chromatographie und Massenspektrometrie und Cornelia Sommersdorf für den stetigen Nachschub an TXP-Antikörpern.

Meinen Kollegen in der Abteilung Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Curriculum Vitae

Frederik Weiß

geboren am 05. November 1984
in Laupheim

Akademische Ausbildung

05/2011 - 02/2015

Promotion am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI Reutlingen)

Betreuung: Prof. Dr. Stefan Stevanović, Dr. Oliver Pötz

Thematik: Etablierung eines Nachweissystems zur Quantifizierung von Cytochrom P450 Enzymen in der menschlichen Leber

10/2005 - 03/2011

Studium der Biochemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Abschluss: Diplom

Diplomarbeit am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI Reutlingen)

Betreuung: Dr. Oliver Pötz

Thematik: Entwicklung einer immunoaffinitätsbasierten Methode zur Analyse des Wnt-Signalweges

09/1995 - 06/2004

Abitur am Wieland-Gymnasium Biberach an der Riß
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

10/2004 - 06/2005

Arbeiter-Samariter-Bund Herne-Gelsenkirchen e.V.
Ausbildung zum Rettungshelfer NRW

Weiterbildung

10/2013 - 03/2014

Projektmanagement - Grundkurs zur Planung und Steuerung von Projekten
Abschluss: unbenotetes Klausur-Zertifikat
Fernuniversität in Hagen

Fachliches Engagement

04/2012 - 03/2015

Junior-Gruppe der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)
04/2012 - 07/2013: Gründung und Aufbau der Stadtgruppe Tübingen
12/2013 - 05/2014: Planung und Durchführung des jGBM-Sommersymposiums 2014
04/2014 - 03/2015: Bundessprecher der Junior GBM

Veröffentlichungen, Vorträge, Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

- 03/2015 Indirect protein quantification of drug-transforming enzymes using peptide group-specific immunoaffinity enrichment and mass spectrometry
Frederik Weiß, Anke Schnabel, Hannes Planatscher, Bart H. J. van den Berg, Bettina Serschnitzki, Andreas K. Nuessler, Wolfgang E. Thasler, Thomas S. Weiss, Matthias Reuss, Dieter Stoll, Markus F. Templin, Thomas O. Joos, Katrin Marcus & Oliver Poetz
 Status: veröffentlicht - Scientific Reports
- 07/2013 Identification of short terminal motifs enriched by antibodies using peptide mass fingerprinting
Hannes Planatscher, **Frederik Weiß**, David Eisen, Andreas Zell, Thomas Joos and Oliver Poetz
 Status: veröffentlicht - Bioinformatics
- 06/2013 Catch and measure - mass spectrometry-based immunoassays in biomarker research
Weiß F., van den Berg B.H., Planatscher H., Pynn C.J., Joos T.O., Poetz O.
 Status: veröffentlicht - Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics

Vorträge

- 06/2013 Quantification of the Cytochrome P450 system using TXP-antibodies
20. Arbeitstagung - Mikromethoden in der Proteinchemie, Bochum 2013

Posterpräsentationen

- 10/2014 Quantifying Cytochrome P450 enzymes involved in xenobiotic metabolism - screening of drug-induced protein expression by TXP-immunoaffinity mass spectrometry
F. Weiß, B.H.J. van den Berg, H. Hammer, H. Planatscher, T.O. Joos, O. Pötz
HUPO - 13th Annual World Congress, Madrid 2014
- 05/2014 Quantifying the entire cytochrome P450 system taking action in phase I of xenobiotic metabolism with MS-based TXP-immunoassays
Frederik Weiß, Bart van den Berg, Hannes Planatscher, Ulrich M. Zanger, Thomas Joos, Oliver Pötz
MDO 2014 - 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Stuttgart 2014
- 09/2013 MS-based TXP-immunoassays - Quantification of the entire cytochrome P450 system taking action in phase I of xenobiotic metabolism
F. Weiß, B. H. J. van den Berg, H. Planatscher, U. Zanger, T. O. Joos, O. Pötz
HUPO - 12th Annual World Congress, Yokohama 2013
- 06/2013 Monitoring drug metabolizing enzymes of the cytochrome P450 system - Immunoaffinity-MS analysis using TXP antibodies
F. Weiß, B. H. J. van den Berg, H. Planatscher, R. Zahedi, K. Marcus, T. O. Joos, O. Pötz
20. Arbeitstagung - Mikromethoden in der Proteinchemie, Bochum 2013

01/2013

Monitoring drug metabolizing enzymes - immuno-MRM analysis of the cytochrome P450 system using TXP antibodies

F. Weiß, H. Planatscher, R. Zahedi, K. Marcus, T. Joos, O. Poetz

Dechema - Functional Genomics and Proteomics - Applications, Molecular Diagnostics & Personalized Medicine, Frankfurt am Main 2013

08/2011

Quantification of the Cytochrome P450 enzyme system using peptide-group specific antibodies

F. Weiß, Anke Schnabel, Hannes Planatscher, K. Marcus, T. Joos, O. Poetz

5th European Summer School - Proteomic Basics, Brixen 2011