

PHARMAZEUTISCHE PROTEOMICS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
In Frankfurt am Main

von
Wolfgang Schlags
aus Mayen

Frankfurt (M) 2006
(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (14) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

| | |
|------------------------|--------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. H. Schwalbe |
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. C. R. Noe |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. D. Steinhilber |
| 3. Prüfer: | Prof. Dr. M. Karas |
| 4. Prüfer: | Prof. Dr. H. Stark |
| Datum der Disputation: | 28.07.2006 |

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. R. Noe für die Überlassung des interessanten Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung sowie die Möglichkeit zum eigenständigen Arbeiten. Auch für die Gelegenheit an zahlreichen Kooperationen in Österreich, Deutschland und Ungarn mitwirken zu dürfen, möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Durch die sehr breit ausgelegten Aktivitäten war die Zeit in Wien für mich sehr lehrreich.

Herrn Dr. Bodo Lachmann danke ich für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen sowohl inner- als auch außeruniversitär, gemeinsame Tagungsbesuche, Ungarnfahrten und die schöne Zeit in Wien. Für viele kurzweilige Abende und Heimfahrten möchte ich mich auch bei Frau Dr. Magin-Lachmann und Herrn Muhamed Jasic bedanken.

Herrn AO. Prof. Martin Kratzel danke ich für die zahlreichen kritischen Diskussionsbeiträge sowie für seine programmier- und elektrotechnischen Fähigkeiten, die in diesem Umfang eigentlich nicht an einem pharmazeutischen Institut zu vermuten sind. Herrn B. Richter danke ich für die Hilfe bei der Ausstattung des Wiener Labors.

Herrn Dr. Michael Walther danke ich für die Einführung in die Thematik und die gute Zusammenarbeit in Frankfurt, Herrn Mohammed Masree für die Zusammenarbeit im Frankfurter Proteom-Labor.

Ich danke allen, die im Rahmen Ihrer Diplomarbeit im Wiener Proteom-Labor mitgearbeitet haben, für Ihr uneingeschränktes Engagement: Niko Frick, Juraj Lenčo, Andrea van Treek und Kateřina Viktorová.

Bei Frau Dr. Messinger vom Nordwest Krankenhaus in Frankfurt möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Bence Jones Projektes bedanken.

Herrn Prof. Zavodszky und seiner Gruppe am Institut für Enzymology in Budapest danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen des ÖAD Projektes (wissenschaftlich technische Zusammenarbeit Ungarn – Österreich).

Herrn Prof. Pehamberger, Herrn Prof. Öhler und Dr. Trevor Lukas vom Allgemeinen Krankenhaus (AKH) in Wien danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung zahlreicher Proben, ebenso Herrn Prof. Müller vom veterinärmedizinischen Institut der Universität Wien.

Allen Frankfurter und Wiener Kollegen danke ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung.

Meiner Freundin Irina Tretiakova danke ich für die Hartnäckigkeit, nicht nur beim Korrekturlesen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die stete Unterstützung und Gewährung der erforderlichen Freiheit, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Implementierung, Validierung und Anwendung der 2-dimensionalen Gelelektrophorese und der MALD-TOF Massenspektrometrie unter pharmazeutischen Gesichtspunkten auseinander.

Es wurde ein breites Spektrum aus dem Bereich der Pharmazeutischen Proteomics bearbeitet, beginnend mit einer detaillierten Methodenentwicklung für 2-DE, um die Methode zu optimieren, ihre Robustheit zu evaluieren und die Grenzen der Methode kennen zu lernen. Daran schließt sich eine Validierung für 2-DE / Silberfärbung an. Der Validierungsansatz orientiert sich an den üblicherweise in der pharmazeutischen Industrie bei der Validierung analytischer Methoden untersuchten Parametern. Hierzu zählen Präzision, Linearität, Richtigkeit und Spezifität. Ferner wurden Untersuchungen angestellt, inwiefern Daten aus unterschiedlichen Labors zusammengefasst werden können.

Zur Dokumentation wurde ein auf MS Access[®] basierendes Laborinformationssystem erstellt. Hiermit können die von verschiedenen Mitarbeitern erzeugten Daten einheitlich und nachvollziehbar erfasst werden.

Nach der Etablierung der methodischen Grundlagen wurden unterschiedliche, pharmazeutisch relevante Fragestellungen mittels 2-DE und MALDI-TOF-MS bearbeitet. Proben unterschiedlicher Komplexität wurden untersucht, die Milch eines transgenen Kaninchens, welches bovines FSH exprimiert, wurde analysiert. Über diese Versuche wurde der Einstieg in die Analytik rekombinanter Arzneistoffe geschaffen. Die 2-DE eignet sich sehr gut um die bei posttranslational modifizierten rekombinanten Proteinen auftretende Mikroheterogenität abzubilden. 2-DE und MALD-TOF MS sind alternative Methoden zu denen, die im europäischen Arzneibuch für die Analytik rekombinanter Arzneistoffe beschrieben werden.

Erythropoietin, einer der weltweit umsatzstärksten rekombinanten Arzneistoffe, zu dem auch eine Monographie im EuAB existiert, wurde näher untersucht. Bei diesem Protein wurden die Zuckerseitenketten selektiv

abgespalten und es wurde untersucht, welche Auswirkung die Zucker auf das elektrophoretische Verhalten des Erythropoietins haben. Eine MALDI-TOF-MS Analytik von Erythropoietin war auch erst nach Abspaltung der Zuckerseitenketten möglich. Die Sequenzabdeckung konnte durch Verdauung mit unterschiedlichen Enzymen gesteigert werden. Eine Technologie zur Sequenzierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS wurde mit CAFTM für rekombinantes Chicken Annexin V etabliert. Weitere rekombinante Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind Interferon-alfa-2a, Interferon-alf-2b, rh-HCG, Trastuzumab und Rituximab.

Das anti-apoptotische Bcl-xL ist ein Zielprotein für den Einsatz von Antisense Oligonucleotiden in der Tumorthherapie. Für dieses Protein wurde eine 2-DE / Western blot-Methode entwickelt, die als *in vitro* Testsystem für das Screening von Oligonucleotiden genutzt werden kann.

Aus dem Bereich der klinischen Proteomics wurden Serum, CSF und Urinproben von Patienten mit Bence Jones Proteinämie untersucht und mit den üblicherweise in der Klinik verwendeten CE-Analysen verglichen. In einzelnen Fällen konnten in vermeintlich Bence Jones negativen Proben mittels 2-DE doch noch Bence Jones Proteine nachgewiesen werden.

Die Färbung der 2-DE-Gele ist eine recht zeitaufwendige und wenig anspruchsvolle Tätigkeit, sie stellt bezüglich des Probendurchsatzes einen der limitierenden Schritte dar. Aus diesem Grund wurde zur Automation ein computergesteuerter Färbeautomat entwickelt, gebaut und getestet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass 2-DE und MALDI-TOF-MS vielseitig in der Pharmazie angewendet werden können. Die Komplexität eines jeden Proteoms und die physikochemische Heterogenität von Proteinen muss beachtet werden. In komplexen Proteinmischungen sind aufgrund sehr unterschiedlicher Konzentrationen, Löslichkeiten und der Heterogenität durch posttranslationale Modifikationen viele Proteine einem globalen 2-DE Ansatz nicht zugänglich, nichtsdestotrotz ist die 2-DE derzeit eine der leistungsfähigsten Methoden in der Proteomanalytik.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| 2-DE | Zweidimensionale Gelelektrophorese |
| 4-HCCA | α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure |
| A | Ampere |
| ACN | Acetonitril |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Bis | N,N'-Methylenbisacrylamid |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C | Crosslinking Faktor [%] |
| CHAPS | 3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure |
| Da | Dalton |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Feldstärke [V/m^{-1}] |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| I | Stromfluss [A] |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| IPG | Immobilized pH gradient |
| kDa | Kilodalton |
| MS | Massenspektrometrie |
| MALDI | Matrix assisted laser desorption ionization |
| O.D. | Optical Density |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PTM | Posttranslationale Modifikation |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |

| | |
|-------|------------------------------------|
| T | Totale Acrylamid Konzentration [%] |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tof | Time of flight |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminoethan |
| U | Spannung [V] |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| DANKSAGUNG..... | III |
| KURZFASSUNG..... | V |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | VII |
| INHALTSVERZEICHNIS..... | 1 |
| ALLGEMEINER TEIL..... | 7 |
| PROTEOMICS IN DER PHARMAZIE | 7 |
| GRUNDLAGEN DER ZWEIDIMENSIONALEN GELELEKTROPHORESE | 11 |
| GENOM UND PROTEOM | 12 |
| PROBENFLUSS | 13 |
| <i>Aufschluß des Probenmaterials</i> | 13 |
| PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DER ELEKTROPHORESE | 15 |
| ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG – 1. DIMENSION | 16 |
| SDS-PAGE - 2. DIMENSION | 17 |
| UNSPECIFISCHE FÄRBE-METHODEN | 21 |
| <i>Coomassiefärbung</i> | 21 |
| <i>Silberfärbung</i> | 21 |
| <i>Radioaktive Markierung</i> | 22 |
| <i>Inverse Färbemethoden</i> | 22 |
| <i>Anfärben mit Fluoreszenz-Farbstoffen</i> | 23 |
| <i>Massenspektrometrische Detektion</i> | 23 |
| SPEZIFISCHE METHODEN..... | 24 |
| <i>Western Blot</i> | 24 |
| DIFFERENTIELLE METHODEN | 25 |
| SOFTWARE ZUR AUSWERTUNG VON 2-DE-GELEN | 27 |
| ENZYMATISCHER VERDAU VON PROTEINEN | 27 |
| MASSENSPEKTROMETRIE | 28 |
| <i>MALDI-TOF</i> | 29 |
| <i>Sequenzierung mittels MALDI-MS</i> | 32 |
| GENOTYP UND PHÄNOTYP..... | 34 |
| MRNA PROTEIN KORRELATION | 35 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN | 36 |
| PROTEIN-PROTEIN WECHSELWIRKUNGEN..... | 36 |
| MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER 2-DE | 38 |
| PROBLEMSTELLUNG..... | 41 |
| ERARBEITUNG DER METHODISCHEN GRUNDLAGEN..... | 43 |
| METHODENENTWICKLUNG..... | 43 |
| <i>Qualitätskriterien für 2-DE-Gele.....</i> | <i>44</i> |
| <i>Die verwendeten Proben.....</i> | <i>44</i> |
| <i>Zur Dokumentation der Methodenentwicklung</i> | <i>45</i> |
| <i>Versuche zur Untersuchung der Robustheit der Methode und zur Reduktion des Hintergrunds.....</i> | <i>51</i> |
| <i>Vergleich von linearen und nicht linearen IPG-Strips</i> | <i>57</i> |
| <i>Coomassie Färbung nach Neuhoff⁴⁴</i> | <i>58</i> |
| <i>Optimierung der 2. Dimension</i> | <i>59</i> |
| <i>Versuche zur Fraktionierung.....</i> | <i>60</i> |
| <i>Häufiges Einfrieren und Auftauen einer Probe</i> | <i>62</i> |
| <i>2. Dimension ohne Sammelgel.....</i> | <i>65</i> |
| <i>Narrow IPG Strips.....</i> | <i>66</i> |
| <i>Weitere Erkenntnisse</i> | <i>69</i> |
| <i>Fazit zur Methodenentwicklung.....</i> | <i>69</i> |
| <i>Spezifische Färbemethoden -Western blots</i> | <i>70</i> |
| ERSTELLUNG EINER ACCESS [®] DATENBANK ZUR DOKUMENTATION..... | 74 |
| <i>Warum eine Datenbank zur Dokumentation?</i> | <i>74</i> |
| <i>Microsoft Access 2000[®]</i> | <i>74</i> |
| <i>Aufbau der Datenbank 2-D-Doc.....</i> | <i>76</i> |
| <i>Umsetzung der Datenbank 2D-Doc.....</i> | <i>78</i> |
| VALIDIERUNG | 96 |
| <i>Einleitung zur Validierung</i> | <i>96</i> |
| <i>Definitionen einer Validierung:.....</i> | <i>96</i> |
| <i>Ziel der Validierung.....</i> | <i>97</i> |
| <i>Versuche zu den Validierungsparametern.....</i> | <i>103</i> |
| <i>Systemsuitability</i> | <i>103</i> |
| <i>Leerwert und Reinigungsvalidierung.....</i> | <i>110</i> |
| <i>Richtigkeit.....</i> | <i>113</i> |

| | |
|---|------------|
| <i>Präzision</i> | 115 |
| <i>Wiederholpräzision</i> | 119 |
| <i>Zusammenfassung der Ergebnisse zur Wiederholpräzision:</i> | 124 |
| <i>Laborpräzision</i> | 125 |
| <i>Vergleichspräzision</i> | 131 |
| <i>Linearität</i> | 135 |
| <i>Bewertung der Versuche zur Linearität</i> | 144 |
| <i>Versuche zur Optimierung der Proteinbeladung</i> | 146 |
| <i>Selektivität und Spezifität</i> | 148 |
| <i>Nachweis- und Bestimmungsgrenze</i> | 150 |
| <i>Arbeitsbereich</i> | 155 |
| <i>Robustheit</i> | 157 |
| <i>Fehlerabschätzung</i> | 160 |
| <i>Empfehlung für die Anzahl an Wiederholungen</i> | 160 |
| <i>Fazit zur Validierung</i> | 162 |
| PROTEINANALYTIK GENTECHNISCH MODIFIZIERTER ORGANISMEN..... | 163 |
| EINLEITUNG TRANSGENESIS | 163 |
| VERSUCHE ZUR 2-DE ANALYTIK VON REKOMBINANTEM BOVINEN FSHA/B AUS DER MILCH | |
| TRANSGENER KANINCHEN..... | 166 |
| <i>Charakterisierung des Probenmaterials</i> | 166 |
| <i>Aufgabenstellung</i> | 167 |
| <i>Aufarbeitung der Kaninchenmilchproben</i> | 168 |
| <i>Erhöhung der Auflösung</i> | 171 |
| <i>Verwendung von Tricine-Gelen nach Schägger</i> | 171 |
| <i>Fehlersuche</i> | 173 |
| <i>FSH als Referenzsubstanz</i> | 174 |
| <i>Nachweis von r-hFSH mittels 1-DE Silberfärbung</i> | 176 |
| <i>Vergleich zwischen 1-DE und 2-DE getrenntem r-hFSH</i> | 177 |
| <i>Zuordnung der α- und β-Untereinheit</i> | 178 |
| <i>Gezielte Suche nach r-boFSH Spots</i> | 180 |
| 2-DE ANALYTIK VON BCL-xL | 183 |
| <i>Funktion von Bcl-xL - Strategien der Tumorthherapie</i> | 183 |
| <i>Physikalisch chemische Eigenschaften des Bcl-xL</i> | 185 |
| <i>Ziel der 2-DE Analytik</i> | 185 |
| <i>Probenaufarbeitung und 2-DE Vergleich von Juso_Bcl-xL mit Juso_neo</i> | 186 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| <i>Erhöhung der Spezifität - 2-DE Western blot</i> | 190 |
| <i>Fazit zur 2-DE Analytik von Bcl-xL</i> | 192 |
| ANALYTIK REKOMBINANTER ARZNEISTOFFE MITTELS 2-DE | 193 |
| DEFINITION REKOMBINANTE ARZNEISTOFFE..... | 193 |
| EINLEITUNG | 193 |
| GEWINNUNG REKOMBINANTER ARZNEISTOFFE..... | 194 |
| VORTEILE REKOMBINANTER ARZNEISTOFFE | 195 |
| ÜBERSICHT DER REKOMBINANTEN ARZNEISTOFFE | 196 |
| QUALITÄTSSICHERUNG UND ANALYTIK REKOMBINANTER ARZNEISTOFFE | 204 |
| <i>1-DE und 2-DE Analytik von Interferon</i> | 204 |
| <i>Interferon alfa 2a (Roferon®)</i> | 204 |
| <i>Interferon alpha 2b (Intron A®)</i> | 206 |
| <i>Tryptischer Verdau und MALDI-MS von Interferon alfa 2</i> | 211 |
| <i>Rekombinantes humanes Follikel-stimulierendes Hormon (rh-FSH Gonal F®)</i> | 213 |
| <i>Erythropoietin</i> | 216 |
| <i>Analytik von Erythropoietin</i> | 218 |
| <i>Die ersten Versuche zur 2-DE von Erythropoietin</i> | 221 |
| <i>Optimierungsversuche</i> | 223 |
| <i>Deglycosylierung von rh-EPO</i> | 224 |
| <i>Bewertung der rh-EPO Deglycosylierungsversuche</i> | 227 |
| <i>MALDI-MS von rh-EPO</i> | 229 |
| <i>MALDI-MS nach tryptischem Verdau von deglycosyliertem rh-EPO</i> | 231 |
| <i>Tryptischer Verdau von rh-EPO mittels Lys-C</i> | 233 |
| <i>CAF-MALDI</i> | 236 |
| <i>CAF-MALDI zur Sequenzierung von ChANX V</i> | 238 |
| <i>Immunglobuline</i> | 242 |
| <i>2-DE von Immunglobulinen</i> | 243 |
| <i>Venimmun®</i> | 243 |
| <i>Mabthera®</i> | 246 |
| <i>Herceptin® (INN Trastuzumab)</i> | 247 |
| <i>Bewertung und Ausblick zu 2-DE-MS rekombinanter Arzneistoffe</i> | 249 |
| <i>Rekombinante Wirkstoffe als Generika</i> | 249 |
| KLINISCHE PROTEOMICS | 251 |
| BENCE JONES PROTEINE | 252 |

| | |
|--|------------|
| ANALYTIK VON GAMMOPATHIEN..... | 253 |
| 2-DE VON GAMMOPATHIEN | 254 |
| VERGLEICHE CE MIT 2-DE VON PATIENTEN MIT GAMMOPATHIE | 258 |
| UNTERSUCHUNG VON URINPROBEN MITTELS 2-DE AUF GAMMOPATHIEN..... | 261 |
| VERSUCHE ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG MITTELS MALDI-MS | 263 |
| FAZIT ZUR 2-DE VON BENCE JONES PROTEINEN..... | 267 |
| AUTOMATION - PROTEOMAT | 268 |
| PROTEOMAT | 269 |
| EXPERIMENTELLER TEIL..... | 273 |
| VERWENDETE CHEMIKALIEN | 273 |
| VERWENDETE GERÄTE..... | 275 |
| PROBENAUFSCHLUß UND PROTEINSOLUBILISIERUNG | 277 |
| MICRODIALYSE | 278 |
| PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD ¹⁶¹ | 280 |
| TCA-ACETON-FÄLLUNG | 284 |
| ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG..... | 284 |
| PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE IEF | 285 |
| STANDARD PROTOKOLLE FÜR DIE FOKUSSIERUNG..... | 287 |
| WEITERBEARBEITUNG DER IPG STRIPS NACH DER IEF | 290 |
| <i>Reinigung der Stripholder</i> | 290 |
| <i>Acrylamid Trenngele</i> | 290 |
| <i>Gießen der Sammelgele</i> | 293 |
| <i>Reequilibrieren der IPG Strips</i> | 294 |
| 2. DIMENSION – SDS PAGE..... | 295 |
| <i>1-D Gele</i> | 298 |
| <i>Beenden der 2. Dimension</i> | 298 |
| SILBERFÄRBUNG NACH BLUM ¹²¹ | 299 |
| COOMASSIE FÄRBUNG NACH NEUHOFF ET AL ⁴⁴ | 300 |
| DIGITALISIEREN DER GELE UND SOFTWAREAUSWERTUNG | 301 |
| KONSERVIERUNG DER GELE..... | 302 |
| TRYPTISCHER VERDAU MALDI-MS | 303 |
| MALDI-MS MESSUNG | 305 |
| CAF-MALDI..... | 305 |
| DEGLYCOSYLIERUNG VON RH-EPO | 310 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| WESTERN BLOT BCL_xL..... | 311 |
| TRICINE-GELE ¹³¹ | 313 |
| VERÖFFENTLICHUNGEN ZU DIESER ARBEIT | 323 |
| LITERATUR-VERZEICHNIS..... | 326 |
| LEBENS LAUF | 341 |

Allgemeiner Teil

Proteomics in der Pharmazie

Der Begriff Pharmazeutische Proteomics deckt ein weites Spektrum sowohl an Fragestellungen als auch an zur Verfügung stehenden Technologien ab. Hierunter fallen differentielle Proteom-Untersuchungen, bei denen gesundes mit pathologisch verändertem Gewebe verglichen wird, hier kann zum Einen nach Biomarkern für das Krankheitsgeschehen bzw. dessen Verlauf gesucht werden oder aber nach der Ursache einer Erkrankung, welche wiederum zu einem potentiellen Arzneistofftarget führen kann. Hieran schließen sich Untersuchungen zur Pharmakologie und Toxikologie an, mit der Fragestellung, welche Veränderung auf Proteinebene durch Arzneistoffe herbeigeführt werden. Im Bereich der Herstellung rekombinanter Arzneistoffe kann Proteomics sowohl zur In-Prozess-Kontrolle als auch im Rahmen der qualitätssichernden Endkontrolle Anwendung finden. Die Anwendung einer analytischen Methode in der Pharmazie impliziert, dass man sich mit der Validierung dieser Methode auseinandersetzt, dies ist somit ein weiterer Aspekt der Pharmazeutischen Proteomics. Hinzu kommen Dokumentation und nach Möglichkeit eine Automation um den Prozess effizienter und reproduzierbarer zu machen.

Da in der Literatur keine allgemeingültige Definition des Begriffes Pharmazeutische Proteomics aufzufinden war, im Folgenden der Versuch einer eigenen Definition.

Pharmazeutische Proteomics:

Anwendung von validierten Proteomics Methoden in der pharmazeutischen Forschung, Entwicklung und Produktion, zur Aufklärung pathologischer

Prozesse, zur Auffindung neuer Arzneistofftargets bzw. diagnostischer Markerproteine, zur pharmakologischen und toxikologischen Charakterisierung von Arzneistoffen und zur Analytik komplexer Proteinarzneistoffe.

An der Universität Utrecht (NL) gibt es ein Institut für Pharmaceutical Proteomics unter der Leitung von Prof. Ian Humphery-Smith. Unter dem Titel „Pharmaceutical Proteomics“ wurde im Jahr 2000 von Steiner und Anderson¹ ein Übersichtsartikel veröffentlicht, in dem Möglichkeiten der pharmazeutischen Anwendung von Proteomics insbesondere bei der Arzneistoffsuche und Selektion Erfolg versprechender Substanzen sowie deren toxikologischer Charakterisierung herausgestellt werden.

Im Prozess der Arzneistoffentwicklung gibt es eine Vielzahl an Anknüpfungspunkten für den Einsatz von Proteomics. Die meisten namhaften, global tätigen Pharmafirmen verfügen über eigene Proteomics Forschungsabteilungen (Pfizer AG, GSK AG, Novartis AG, Aventis AG, Roche AG, Bayer AG, Merck AG, um nur einige zu nennen).

Noch vor etwa 30 Jahren war Pharmaforschung dadurch gekennzeichnet die Wirksamkeit von Substanzen in Testsystemen nachzuweisen, ohne den Wirkmechanismus zu kennen (Black-Box). Ein Wirkstoff-Target zu finden, dieses möglichst genau zu charakterisieren und eine Leitstruktur daran zu profilieren, ist heute ein zentrales Element der Arzneistoffentwicklung (rational drug design).

Die Verpflichtung der Hersteller von Arzneimitteln gegenüber den Behörden Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels nachzuweisen, umfasst auch die Auseinandersetzung mit der Aufklärung des Wirkmechanismus eines Arzneistoffs.

Die meisten Arzneistofftargets sind Proteine. Weiß man, in welchen Zellen und in welcher Menge sie vorkommen und hat zudem Informationen über ihre Aktivität, bzw. weiß wie sie aktiviert werden und kennt die Interaktionen, die dieses Protein mit anderen Proteinen eingeht, oder sogar zu welchen Proteinkomplexen das Protein gehört, kann man weit reichende Aussagen zu möglichen unerwünschten Wirkungen treffen. Etwa 75 % der Gesamtkosten, die für Arzneistoffentwicklung aufgewendet werden, fließen in die Entwicklung von Arzneistoffen, die niemals zugelassen werden². Dass es nicht ohne Fehlschläge geht, steht außer Frage, jedoch könnten durch gezieltes Aussortieren von Substanzen mit einer erhöhten Ausfallwahrscheinlichkeit die Gesamtkosten gesenkt werden.

Neben der Suche nach neuen Targets³ kommt Proteomics bei der Aufklärung von Wirkmechanismen⁴ und insbesondere bei präklinischen Toxizitätsuntersuchungen zum Einsatz^{5,1,6}.

Ein weiteres, der Pharmazie nahe stehendes Einsatzgebiet, ist die klinische Proteomics zur Auffindung von krankheitsspezifischen Biomarkern. Hier bieten sich insbesondere in der Tumorthherapie Ansatzpunkte^{7,8}. Biomarker sollen zum Einen verwendet werden um eine frühzeitige und exaktere Diagnose durchführen zu können und eine entsprechend abgestimmte Therapie einzuleiten, zum Anderen können charakteristische Biomarker auch mögliche Targets für die Entwicklung neuer Arzneistoffe sein. Die Technik der 2-DE ist für einen klinischen Routine-Einsatz zu zeit- und kostenintensiv⁹, hat man jedoch mittels 2-DE / MS einen oder mehrere Biomarker identifiziert, so können basierend auf diesen Ergebnissen schnellere und kostengünstigere immunologische Methoden entwickelt werden.

Die Zahl der rekombinant hergestellten Proteinwirkstoffe steigt stetig an. Die analytische Charakterisierung ist insbesondere für posttranslational modifizierte rekombinante Proteine aufgrund der daraus resultierenden Mikroheterogenität problematisch. Mittels 2-DE lässt sich diese

Mikroheterogenität abbilden. Hieraus resultiert ein weiteres Anwendungsgebiet in der Pharmazeutischen Analytik. Darüber hinaus muss auch das Verunreinigungsprofil eines Arzneistoffs bekannt sein, insbesondere bei komplexen rekombinant gewonnenen Proteinarzneistoffen ist dies sicherlich keine triviale Aufgabe.

Angesichts der enormen Komplexität des Proteoms, der physiko-chemischen Heterogenität der Proteine, der Tatsache, dass Proteine in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen und unterschiedliche kinetische Eigenschaften aufweisen, ist es unwahrscheinlich eine Methode zu finden, mit der sich rasch und möglichst in einem Versuchsansatz alle Proteine eines Organismus, eines Gewebes oder einer Zelle identifizieren lassen. Dieser Wunschvorstellung kann auch die Verwendung von 2-DE in Kombination mit Massenspektrometrie nicht nachkommen. Sie ist aber dennoch eine der wesentlichen Methoden im Bereich Proteomics und wurde als Methodik der hier vorliegenden Arbeit ausgewählt.

Verwendet man 2-DE zur Analytik von Proben mit reduzierter Komplexität in einem differentiellen Ansatz mit funktioneller Fragestellung, kann sie sicherlich einen Beitrag zur Charakterisierung des Proteoms leisten¹⁰⁻¹². Das Proteom ist nicht endlich und somit nicht greifbar, die Erforschung des Proteoms kann daher lediglich ein immer weiter zu verfeinerndes mehrdimensionales Mosaik sein. Diesem Konstrukt aus Zeit – Raum – Identität – Konzentration – Funktion – Interaktion kann sich nur durch das Zusammenwirken verschiedener Techniken angenähert werden.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es die Methode der 2-DE in Kombination mit Massenspektrometrie unter einer pharmazeutischen Betrachtungsweise zu etablieren und verschiedene pharmazeutisch relevante Fragestellungen unterschiedlicher Komplexität mit dieser Methode zu bearbeiten. Diese Arbeit ist demnach auch Grundlage für weitere Arbeiten und stellt eine Evaluierung der Methode für pharmazeutische Applikationen dar.

Grundlagen der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Das Prinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) beruht auf der Trennung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Diese Methode findet breite Anwendung zur Analyse komplexer Proteinmischungen. Zwei voneinander unabhängige, physikalisch-chemische Eigenschaften der Proteine werden hierbei genutzt. In einem ersten Schritt, respektive der ersten Dimension, findet eine Trennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt statt. In der 2. Dimension werden die so vorgetrennten Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte separiert. Im Anschluss daran können die Proteine durch verschiedene Färbetechniken oder vorher eingeführte Markierungen sichtbar gemacht und hinsichtlich ihrer Identität weiter analysiert werden.

Als Matrix wird in der Regel das 1959 durch Raymond und Weintraub¹³ eingeführte Polyacrylamid verwendet, im Idealfall korrespondiert jeder Proteinspot mit einem einzelnen Protein, wobei die Signalintensität Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration zulässt.

Die 2-DE wurde im Jahr 1975 durch O'Farrell¹⁴ und Klose¹⁵⁻¹⁷ eingeführt. Die anfangs für die isoelektrische Fokussierung verwendete Trägerampholyt-Technik wurde mittlerweile weitestgehend durch die reproduzierbareren und einfacher zu handhabenden immobilisierten pH-Gradienten ersetzt^{18,19}. Eine ständige Weiterentwicklung der erforderlichen Geräte, Reagenzien sowie der zur Auswertung benötigten Software hat dazu geführt, dass die 2-DE in vielen Labors etabliert wurde. Dies wird eindrücklich durch die Vielzahl an Publikationen belegt.

Die Entwicklungen im Bereich der Massenspektrometrie gaben einen wesentlichen Impuls zur weiteren Verbreitung der 2-DE. Mittels MALDI und ESI-MS lassen sich sehr geringe Proteinmengen identifizieren und charakterisieren.

Genom und Proteom

Durch die Verfügbarkeit genomischer Daten ist es möglich charakteristische Peptidfingerprints eines Proteins nicht nur mit Proteindatenbanken sondern auch mit cDNA Datenbanken abzugleichen und auf diese Weise Proteine zu identifizieren. Nachdem im Jahr 2001 die Sequenz des menschlichen Genoms veröffentlicht wurde^{20,21} stellt sich die ungleich größere und komplexere Aufgabe, das menschliche Proteom zu entschlüsseln^{22,23}.

Der Begriff Proteom wurde 1994 von Williams und Willkins auf der 2-DE Tagung in Siena geprägt²⁴. Das Proteom kann definiert werden als die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus, eines Gewebes oder einer Zelle, einschließlich zeitlicher, räumlicher sowie quantitativer Änderungen der Proteinexpression. Im Gegensatz zum statischen Genom ist das Proteom höchst dynamisch, die genomische Information ist in allen Zellen identisch, die Proteinausstattung hingegen kann von Zelle zu Zelle sehr stark variieren. Insbesondere bei Eukaryoten wird die Komplexität des Proteoms gegenüber der des Genoms durch mögliche Splice-Varianten, posttranslationale Modifikationen, Protein-Protein Interaktionen und die Ausbildung von Protein-Komplexen^{25,26} um ein Vielfaches gesteigert. Die Entschlüsselung des Proteoms kann lediglich auf eine Aneinanderreihung von Momentaufnahmen, die unter definierten Bedingungen erstellt wurden, abzielen. Das Proteom ist nicht endlich und somit schwer zu greifen. Proteine spielen als Rezeptoren, Enzyme, Transporter, Transkriptionsfaktoren, Hormone und strukturgebende Elemente bei fast allen physiologischen Vorgängen eine wesentliche Rolle, demnach manifestieren sich auch die meisten pathophysiologischen Vorgänge auf Proteinebene. Hieraus ergeben sich wichtige Implikationen für Diagnostik und Therapie.

Es wurden bereits mehrere Initiativen zur Untersuchung des humanen Proteoms gestartet: HUPO (Human Proteome Organisation)²⁷, HPI (Human Proteome Index)²³. Neben dem Begriff Proteom wurde auch der Begriff

Proteomics geprägt, dieser beschreibt die Anwendung unterschiedlicher Analysenverfahren zur Untersuchung des Proteoms. Die Kombination aus 2-DE und anschließender Massenspektrometrie ist derzeit als Proteomics Ansatz am weitesten verbreitet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in erster Linie 2-DE und MALDI-MS verwendet, im Folgenden sollen Probenfluss und die zugehörigen Methoden sowie die technischen und physikalischen Grundlagen kurz erläutert werden.

Probenfluss

Aufschluß des Probenmaterials

Die Untersuchung einer komplexen Proteinmischung beginnt mit der Probenaufarbeitung, je nach Probe muss ein geeignetes Aufschlußverfahren gewählt werden. In Tabelle A-1 sind einige Aufschlußverfahren aufgelistet.

| Methode | geeignet für |
|-------------------------------------|--|
| Hypoosmotische Lyse | Blutzellen, Zellkulturmaterial |
| Freeze-thaw in flüssigem Stickstoff | Bakterienzellen, Zellkulturmaterial |
| Detergentien Zusatz | Zellkulturmaterial |
| Enzymatische Lyse | Pflanzenzellen, Bakterien, Pilze |
| Ultraschall | Zellsuspensionen |
| Ultraturrax | Festes Gewebe, Pflanzenmaterial |
| Zellmörser | Festes Gewebe |
| French Press | Mikroorganismen (z. B. E. coli), Hefen |
| Kugelmühle | Festes Gewebe, Pflanzenmaterial |

Tab. A-1: Zellaufschlußverfahren²⁸

Um Abbauprozesse zu vermeiden muss unter Zusatz von Proteaseinhibitoren und unter ständiger Kühlung gearbeitet werden.

| Bezeichnung | Konzentration | Inaktivierung von | Kommentar |
|------------------|---------------|-----------------------------|---|
| PMSF | < 0,1 mM | Cystein und Serin Proteasen | Sehr toxisch, in wässrigen Lösungen instabil |
| EDTA | 0,5 - 1 mM | Metalloproteasen | |
| Pepstatin | 2-20 µg/ml | Aspartyl Proteasen | Teuer, da diese Proteaseinhibitoren Peptide sind, können sie auf dem 2-DE-Gel sichtbar werden |
| Leupeptin | 2-20 µg/ml | Cys und Ser Proteasen | |
| Aprotinin | 2-20 µg/ml | Serin Proteasen | |
| Bestatin | 2-20 µg/ml | Aminopeptidasen | |
| TLCK TPCK | 0,1-0,5 mM | Cys und Ser Proteasen | |
| AEBSF (Pefabloc) | < 4 mM | Cys und Ser Proteasen | Weniger toxisch und besser löslich als PMSF |

Tab. A-2: Proteaseinhibitoren²⁹

Nach dem Aufschluß sollten etwaige Zellreste sowie unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernt werden. Je nach Fragestellung kann das Probenmaterial auch gezielt fraktioniert werden²⁸. Es gibt auch die Möglichkeit Proteine zu fällen und hierdurch störende Bestandteile abzutrennen: TCA-Fällung, Aussalzen mit Ammoniumsulfat, Acetonfällung oder eine Kombination aus TCA-Aceton-Fällung²⁹. Die Probenaufarbeitung sollte so einfach wie möglich gehalten werden, jede zusätzliche Manipulation kann zum Verlust oder zur Modifikation von Proteinen führen³⁰.

Physikalische Grundlagen der Elektrophorese

Die elektrophoretische Beweglichkeit, die Mobilität, bestimmt letztendlich die Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens im elektrischen Feld. Im Folgenden soll kurz der physikalische Hintergrund beleuchtet werden. Auf ein geladenes Teilchen wirkt zum Einen die beschleunigende Kraft F_e , diese ist abhängig von der Ladung des Teilchens q sowie der Feldstärke E . Dem entgegen wirkt eine bremsende Reibungskraft F_{fr} . Diese ist abhängig vom Reibungskoeffizienten f_c und der Wanderungsgeschwindigkeit v . Das Teilchen wird solange beschleunigt bis die beschleunigende Kraft F_e gleich der Reibungskraft F_{fr} ist, befinden sich diese beiden Kräfte im Gleichgewicht bewegt sich das Teilchen mit konstanter Geschwindigkeit (Gleichung 1).

$$\begin{aligned} \text{Gl. 1:} \quad F_e &= q \cdot E \\ F_{fr} &= f_c \cdot v \\ v &= \frac{q \cdot E}{f_c} \end{aligned}$$

Der Quotient aus Ladung q und Reibungskoeffizient f_c entspricht der Mobilität μ , diese ist eine substanzspezifische Größe und hängt von der Viskosität η der Matrix ab. Unter der Annahme eines kugelförmigen Teilchens käme das Stoke'sche Gesetz zum tragen (Gleichung 2). Wobei z die Ladungszahl und e die Elementarladung in Coulomb ist.

$$\text{Gl. 2:} \quad \frac{q}{f_c} = \mu = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

Für nicht-kugelförmige Teilchen wie Proteine folgt die Mobilität einem empirischen Zusammenhang aus Ladung und Molekulargewicht (Gleichung 3).

Gl. 3:
$$\mu \approx \frac{q}{M^{2/3}}$$

Ein weiterer Effekt, der bei der Elektrophorese eine Rolle spielt, ist der sog. Retardationseffekt: Das geladene Zentral-Ion ist von einer Wolke an Gegenionen umgeben, die sich im elektrischen Feld entgegengesetzt zum Zentral-Ion bewegen und diese Kraft auch auf die umliegenden Lösungsmittelmoleküle übertragen. Demnach bewegt sich das Zentral-Ion nicht in einer statischen Lösung, sondern durch eine Lösung, die in Gegenrichtung fließt. Beim Anlegen des elektrischen Feldes „hinkt“ die Wolke aus Gegenionen dem Zentral Ion hinterher, dies wird als Relaxationseffekt bezeichnet und führt durch Ausbildung eines lokalen elektrischen Feldes ebenfalls zur Verlangsamung des Zentral-Ions.

Die Ionenstärke der Lösung hat einen wesentlichen Einfluss auf die Elektrophorese, je höher die Ionenstärke desto geringer der Widerstand. Es muss demnach mehr Strom fließen um eine Spannung, resp. Feldstärke [U/m], aufzubauen. Je höher der Stromfluss, desto mehr Wärme wird frei, diese wiederum führt zu Diffusion und damit zu unscharfen Banden oder Spots.

Isoelektrische Fokussierung – 1. Dimension

Aminosäuren sind amphotere Moleküle, ihr Ladungszustand ist abhängig vom pH-Wert. Als isoelektrischer Punkt wird der pH-Wert bezeichnet, bei dem das Molekül eine Nettoladung von null aufweist, positive und negative Ladungen gleichen sich aus. Gleiches gilt für Peptide und Proteine, deren isoelektrischer Punkt wird durch die pKs-Werte der sauren und basischen Seitenketten der einzelnen Aminosäuren bestimmt. Bei Proteinen spielt auch die dreidimensionale Konfiguration eine Rolle, außerdem können post-translationale Modifikationen den isoelektrischen Punkt eines Proteins

beeinflussen. Proteine finden sich im 2-DE Muster nicht immer an der Stelle, an der man sie aufgrund ihrer Aminosäuresequenz erwarten würde³¹.

Bei der isoelektrischen Fokussierung wird eine Proteinmischung in einen pH-Gradienten eingebracht und unter Spannung getrennt. Die Proteine erhalten in Abhängigkeit des jeweiligen pH-Wertes eine Ladung und wandern in Richtung ihres isoelektrischen Punktes, sobald sie diesen erreichen, fällt die Nettoladung des Proteins auf null und das Protein kommt zum Stillstand.

Im Gegensatz zu den mit Trägerampholyten erzeugten pH-Gradienten sind die heute üblichen, immobilisierten pH-Gradienten kovalent mit der Gelmatrix verknüpft. Acrylamidderivate mit schwach sauren und schwach basischen Seitenketten werden zu einem Puffersystem zusammengefügt, mit Acrylamid gemischt und auf Trägerfolien aufpolymerisiert. Um Katalysatoren und andere störende Substanzen zu entfernen, müssen die Gele ausgiebig gewaschen werden, anschließend werden sie getrocknet und in Streifen geschnitten. Durch mischen unterschiedlicher Polymerisationslösungen können pH-Gradienten über beliebige pH Stufen hergestellt werden. Diese sogenannten IPG-Strips gibt es in unterschiedlichen Längen von 7, 11, 13, 17, 18 und 24 cm zu kaufen. Die Gradienten erstrecken sich von pH 2,5 bis 12, wobei auch IPG-zoom-Strips im Handel sind, die lediglich eine pH Stufe abdecken.

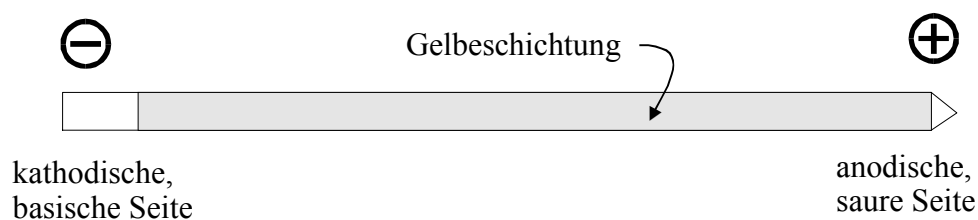


Abb. A-1: Schematische Darstellung eines IPG-Strips

SDS-PAGE - 2. Dimension

Grundlage bildet die 1964 von Ornstein und Davis^{32,33} eingeführte diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Das Gel wird in ein

Sammel- und ein Trenngel unterteilt, im Sammelgel werden die Proteine entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität gereiht und treten als scharfe Banden vom Sammelgel ins engporigere Trenngel über, hier findet die eigentliche Auftrennung statt. Entscheidend ist der pH-Unterschied zwischen Sammelgel (pH 6,8) und Trenngel (pH 8,8) sowie die Zusammensetzung des Kathodenpuffers, dieser enthält ein Tris-Glycin System. Wird eine Spannung angelegt, so wandern die negativgeladenen Ionen in Richtung Anode, Glycin tritt aus dem Kathodenpuffer ins Sammelgel ein. Bei pH 6,8 ist das Glycin (pI 5,97) annähernd ungeladen und hat somit eine sehr geringe elektrophoretische Mobilität. Die Chlorid Ionen, die ein Bestandteil des Sammelgels sind, haben eine sehr hohe elektrophoretische Mobilität und wandern als Leit-Ionen vorne weg, Glycin als Folge-Ion hinterher. Alle übrigen Protein-Ionen, deren elektrophoretische Mobilität zwischen Leit- und Folge-Ion liegt, reihen sich entsprechend ihrer Mobilität. Es kommt zur Isotachophorese, sprich alle Ionen wandern mit gleicher Geschwindigkeit. Ursache dafür ist die Ausbildung eines Feldstärkegradienten, vom Leit- in Richtung Folge-Ion nimmt die Feldstärke auf Grund der geringer werdenden Anzahl an Ladungsträgern zu. Fällt ein Ion hinter Ionen gleicher Mobilität zurück, so kommt es in einen Bereich höherer Feldstärke und wird solange beschleunigt bis es die Ionen gleicher Mobilität wieder erreicht hat. Dadurch kommt es zur Reihung entsprechend der Mobilitäten. Beim Übertritt vom Sammel- ins Trenngel kommt es aufgrund des erhöhten Reibungswiderstands zu einem Stau und damit zu einer weiteren Aufkonzentrierung der Banden. Das engporige Trenngel führt für das niedermolekulare Glycin nicht zu einer Erhöhung des Reibungswiderstandes, Glycin überholt die Proteine und wird im Trenngel bei pH 8,8 deprotoniert und in Richtung Anode beschleunigt. Die Proteine befinden sich jetzt in einem homogenen Puffer, die Isotachophorese ist beendet und die Proteine können entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität getrennt werden.

Die Verwendung von SDS (Sodiumdodecylsulfat) zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen wurde 1967 von Shapiro, Viñuela und Maize³⁴ eingeführt. SDS ist ein negativ geladenes Detergens, welches sehr effektiv die Eigenladung von Proteinen maskiert, um diese eine Micelle bildet und zu einer gleichmäßigen Beladung von etwa 1,4 g SDS pro 1 g Protein führt. Die negativ geladenen SDS-Protein-Micellen wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode, dabei ergibt sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Laufstrecke und dem Logarithmus des Molekulargewichts. In der Praxis erfolgt die Bestimmung des Molekulargewichts über Zugabe von Molekulargewichtstandards.

Im Allgemeinen wird die von Lämmli³⁵ eingeführte Kombination aus SDS-PAGE mit einem diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem verwendet.

Kombiniert man die isoelektrische Fokussierung unter Verwendung der immobilisierten pH Gradienten mit der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Lämmli, so erhält man die 2-DE, wie sie heute üblicherweise angewendet wird. Bleibt noch zu ergänzen, dass die Zusammensetzung der sogenannten Rehydrierlösung, mit der die Proteinmischung in den IPG-Strip eingebracht wird, einen wesentlichen Einfluss auf das Gelingen der 2-DE hat. Die Proteine müssen während des gesamten Vorgangs in Lösung gehalten werden und dürfen nicht aggregieren. Hierzu können nur nichtionische oder zwitterionische Detergentien³⁶⁻³⁸ verwendet werden. Desweiteren werden Harnstoff und Thioharnstoff³⁹ als Chaotrope zugesetzt. Disulfidbrücken müssen durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie DTT gespalten werden. Die Beladung der Proteine mit SDS findet durch Reequilibrieren zwischen 1. und 2. Dimension statt^{19,40-42}.

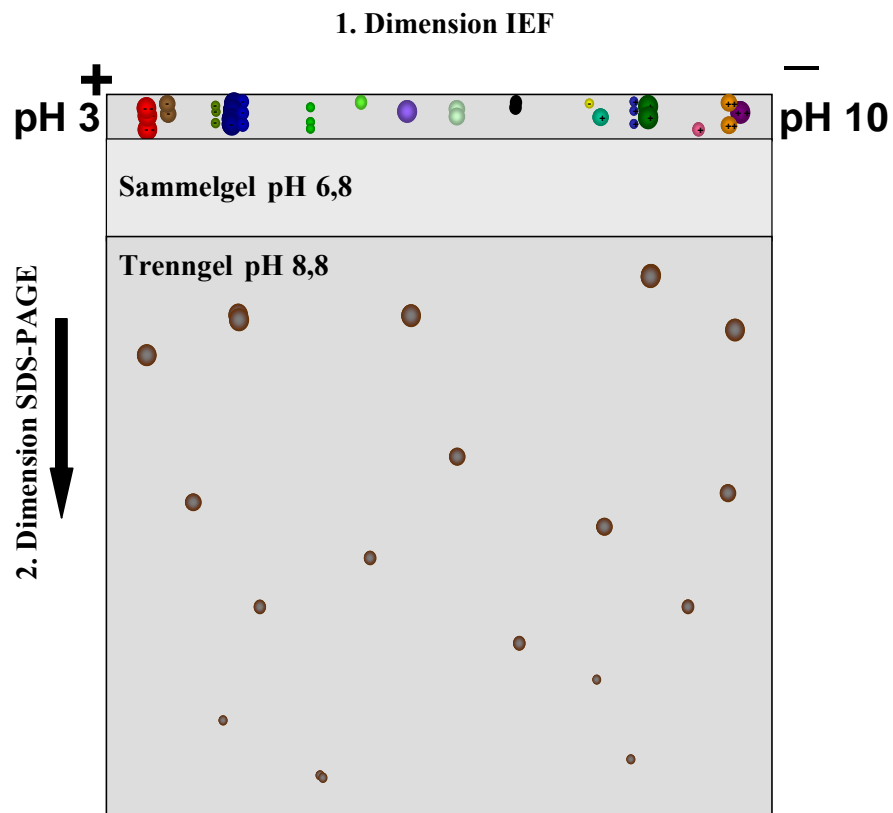


Abb. A-2: Schematische Darstellung eines 2-DE-Gels

Visualisierung

Es gibt eine Vielzahl an Möglichkeiten Proteine sichtbar zu machen, eine umfassende Übersicht hierzu gibt der Artikel von Patton⁴³. Wesentliche Aspekte für die Auswahl einer Färbemethode sind die Empfindlichkeit, der linear dynamische Bereich, die Reproduzierbarkeit, die Kompatibilität mit der weitergehenden Charakterisierung der Proteine mittels Massenspektrometrie und nicht zuletzt die Kosten.

Die Färbemethoden lassen sich in drei Kategorien einteilen: unspezifische, spezifische und differentielle.

Unspezifische Färbemethoden

Coomassiefärbung

Proteine werden mit einem organischen Farbstoff angefärbt, meist Coomassie Blau R-250. Die Affinität zwischen Farbstoff und Proteinen ist deutlich höher als zwischen Farbstoff und Acrylamid Matrix. Eine preisgünstige und einfache Färbemethode, die mit massenspektrometrischen Untersuchungen weitestgehend kompatibel ist. Zu empfehlen ist das Färbeprotokoll nach Neuhoff⁴⁴. Mit dieser kolloidalen Färbetechnik lässt sich ein Detektionslimit von 8-10 ng erreichen, der lineare Bereich erstreckt sich über eine etwa 10-30-fache Proteinkonzentration. Schwachpunkte sind die trotz allem geringe Empfindlichkeit sowie der schmale lineare Bereich.

Silberfärbung

Die Silberfärbung basiert auf einer Sättigung des Gels mit Silberionen, auch hier ist die Affinität zu Proteinen und zur Matrix unterschiedlich, so dass sich die Silberionen aus der Matrix weitestgehend herauswaschen lassen⁴⁵. Die proteingebundenen Silberionen werden in der Folge zu elementarem Silber reduziert und somit sichtbar. Das Detektionslimit liegt bei etwa 1 ng, der lineare Bereich beschränkt sich auf eine etwa 10-fache Proteinkonzentration. Diese Methode ist ebenfalls relativ kostengünstig, im Vergleich zur Coomassie-Färbung zeitaufwendiger, dafür aber deutlich empfindlicher. Schwachpunkte sind der schmale lineare Bereich sowie die mäßige Reproduzierbarkeit. Nicht alle Silberfärbeprotokolle sind für eine anschließende massenspektrometrische Untersuchung der Proteine geeignet. Die Kombination Silberfärbung-MS wurde erstmals von Shevchenko⁴⁶ beschrieben⁴⁷. Durch Entfärben der Protein Spots nach Gharhdaghi et al.⁴⁸ lassen sich die Ergebnisse der Massenspektrometrie weiter verbessern.

Radioaktive Markierung

Für gewöhnlich werden ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P oder ^{125}I zur radioaktiven Markierung von Proteinen verwendet. Die Detektion kann für γ -Strahler über Belichtung eines Röntgenfilms oder über Autoradiographie erfolgen. Für β -Strahler werden in der Regel fluorographische Methoden angewendet, hierbei wird das Gel mit fluoreszierenden Chemikalien beschichtet, diese nehmen die radioaktive Strahlungseenergie auf und wandeln sie in Fluoreszenz um. Vorteile sind die hohe Empfindlichkeit und der große lineare Bereich. Nachteile sind die Kosten für radioaktives Material, dessen Entsorgung sowie teure Auswertegeräte (z.B. Phosphorimager).

Radioaktive Methoden eignen sich insbesondere für metabolische *in vivo* Experimente. Durch Zugabe radioaktiv markierter Aminosäuren zum Zellkulturmedium kann sehr genau verfolgt werden, welche Proteine aktuell synthetisiert werden.

Inverse Färbemethoden

In der Literatur werden eine ganze Reihe inverser Färbemethoden beschrieben, hierzu finden Kaliumchlorid, Kupferchlorid, Zinkchlorid, Kobaltacetat, Nickelchlorid und Zinkchlorid-Imidazol Verwendung^{43,49}.

Das Imidazol-Zink Färbeprotokoll weist unter den reversen Färbeprotokollen die höchste Empfindlichkeit auf, das Detektionslimit liegt bei 10-20 ng Protein. Der dynamische Bereich erstreckt sich von etwa 10-100 ng.

Die in der Matrix schwach gebundenen oder frei vorliegenden Zinkionen werden leicht als Imidazol-Zink gefällt, zwischen den Proteinen und den Zinkionen kommt es zu einer stärkeren Wechselwirkung derart, dass diese Zinkionen nicht ausfallen können. Dieses Färbeprotokoll weist eine gute Kompatibilität mit anschließender Massenspektrometrie auf.

Anfärben mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Fluoreszenz-Farbstoffe, wie beispielsweise SYPRO red[®] oder SYPRO orange[®], werden insbesondere bei Großprojekten vermehrt eingesetzt. Mit einem Detektionslimit von 4-8 ng Protein liegt die Empfindlichkeit im Bereich der Silberfärbung, der lineare Bereich ist jedoch mit einem Faktor 1000 um ein Vielfaches größer. Die Färbung erfolgt mit SYPRO red[®] in einem Schritt und dauert lediglich 30-60 min. Da es sich um eine Endpunkt Färbemethode handelt können die Gele auch über Nacht in der Färbelösung belassen werden, ohne dass es zu einer Überfärbung kommen kann. Kompatibilität der Fluoreszenz-Farbstoffe mit massenspektrometrischen Methoden ist gegeben.

Den hier aufgezeigten Vorteilen gegenüber stehen die immer noch sehr hohen Kosten für die SYPRO Farbstoffe. Eine Alternative bietet das Protokoll nach Rabilloud, hier wird beschrieben wie man kostengünstig ein Ruthenium Derivat herstellen kann, welches ähnliche Eigenschaften wie SYPRO red[®] zeigt^{50,51}.

Massenspektrometrische Detektion

Eine Möglichkeit virtuelle 2-DE-Gele zu erzeugen bietet die Massenspektrometrie direkt vom IPG-Strip. Dieser Ansatz wurde von Loo et al.^{52,53} verfolgt. E. coli Proteine im Massenbereich von 2.000 bis 130.000 Da konnten auf diese Weise mittels MALDI-TOF-MS bestimmt werden. Es wurde auch eine Kombination aus IEF und ESI-MS verwendet.

Einen weiteren Ansatz verfolgt die Firma CIPHERGEN mit der Entwicklung des SELDI-TOF MS. SELDI steht für surface-enhanced laser desorption ionisation. Hierzu werden Protein-Chips verwendet, die über bestimmte Beschichtungen (hydrophobe, hydrophile, ionische, Antikörper, DNA-Fragmente, Enzyme oder Rezeptoren) einzelne Proteine bzw. Proteinklassen aus einem komplexen Gemisch binden. Unspezifisch anhaftende Proteine werden vom Protein Chip herunter gewaschen und die Massen der

verbleibenden Proteine werden mittels MALDI-MS bestimmt. Man erhält ein charakteristisches Muster, die Methode eignet sich, um sehr rasch Proben zu vergleichen und nach spezifischen Unterschieden zu suchen. Diese Kombination aus Chromatographie und Massenspektrometrie wird in erster Linie angewendet um nach Biomarkern zu suchen^{54,55}.

Den Versuch alle mittels 2-DE getrennten Proteine einer komplexen Probe zu identifizieren stellt der in der Gruppe um Denis Hochstrasser entwickelte Molekular Scanner dar⁵⁶. Die mittels 2-DE getrennten Proteine werden alle gleichzeitig im Gel verdaut und durch Elektroblothing auf eine Membran transferiert, die gesamte Membran wird mittels MALDI-TOF-MS gescannt. Man erhält somit Peptid-Fragmente, die dem *pI* und dem Molekulargewicht der zugehörigen Proteine zugeordnet werden können, in der Folge wird versucht über Datenbanksuchen die Identität der Proteine zu bestimmen. Im Idealfall erhält man eine 2-DE Abbildung der Proteinmischung inklusive ihrer Identität.

Spezifische Methoden

Western Blot

Eine effiziente und weit verbreitete Methode zum spezifischen Proteinnachweis ist das Western blotting⁵⁷.

Die Phage display Technologie ist ein relativ neues Verfahren um hochspezifische monoklonale Antikörper zu erzeugen. Hierzu wird eine Bibliothek, die viele Tausend Phagen mit unterschiedlichen Oberflächenproteinen enthält, auf spezifische Bindung an zuvor gereinigten Proteinen durchsucht. Die so gewonnenen Phagen können in *E. coli* amplifiziert werden. Liu und Marks beschreiben wie man mittels 2-DE und Phage Display monoklonale Antikörper gewinnen kann⁵⁸, diese können dann zum spezifischen Proteinnachweis mittels Western blotting eingesetzt werden.

Unter den spezifischen Färbemethoden finden sich auch Protokolle um post-translational modifizierte Proteine nachzuweisen. So lassen sich beispielsweise Glycoproteine durch Einführung ^3H - oder ^{14}C -markierter Zucker gezielt nachweisen. Daneben gibt es auch colorimetrische Verfahren und Fluoreszenz-Farbstoffe zum Nachweis von Glycoproteinen, wobei die colorimetrischen Methoden eine geringere Empfindlichkeit als Coomassie Färbung aufweisen und die Fluoreszenzmethoden nicht direkt im Gel angewendet werden können, die Proteine müssen vor der Färbung auf eine PVDF-Membran transferiert werden.

Phosphoproteine können ebenfalls durch radioaktive Markierung nachgewiesen werden, außerdem gibt es Antikörper mit denen Phosphotyrosin nachgewiesen werden kann⁴³.

Differentielle Methoden

Proteomics Untersuchungen zielen meist darauf ab Unterschieden zwischen zwei Zuständen (z. B. krank / gesund, Zellen unter Zusatz einer Substanz / Kontrolle) aufzuzeigen, dabei lässt sich die Aussagekraft der Ergebnisse enorm steigern, wenn man beide Zustände in einem einzigen Versuchsansatz miteinander vergleichen kann.

Eine Möglichkeit hierzu bietet das DIGE-Verfahren (differential gel electrophoresis), hierbei stehen drei verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffe Cy2, Cy3 und Cy5 zur Verfügung. Jeder dieser Farbstoffe hat eine spezifische Anregungs- und Emissionswellenlänge. Bis zu drei unterschiedliche Proben können mit je einem der Farbstoffen über eine kovalente Verknüpfung markiert werden, die Proben werden dann gemischt und mittels 2-DE in einem Lauf getrennt. Je nach Anregungswellenlänge können nun die einzelnen Proben sichtbar gemacht werden. Überlagert man die resultierenden Bilder so sieht man genau bei welchen Proteinen Unterschiede zwischen den Proben vorliegen. Ein Anwendungsbeispiel des DIGE Verfahrens gibt Alban et al.⁵⁹.

Das sogenannte Dual channel imaging wurde von Bernhardt et al. entwickelt⁶⁰, hierbei werden Autoradiographie und Silberfärbung kombiniert. Dem Zellkultur-Medium wird ³⁵S-Methionin zugesetzt, dann wird die Zellkultur durch Zugabe oxidativer Agentien oder Hitze gestresst. Die Synthese von Stressproteinen wird somit induziert, nach 2-DE zeigt die Autoradiographie die Proteine, die während der Stresssituation exprimiert wurden. Die Silberfärbung zeigt den Gesamtproteinbestand der Zelle. Die Abbildungen der unterschiedlichen Visualisierungstechniken werden auf den roten bzw. grünen Farbkanal reduziert, die beiden Farbkanäle können nun übereinander gelegt werden. Man erhält ein differentielles Bild aus roten, grünen und gelben Spots, hieraus lässt sich ableiten, welche Proteine vermehrt durch Stress induziert werden. Die Analyse von Stressproteinen ist lediglich ein Beispiel für die Anwendung des Dual Channel Images.

Als multiplexed proteomics (MP) wird ein ähnlicher Ansatz bezeichnet, es wird eine spezifische mit einer unspezifischen Färbetechnik kombiniert, Steinberg et al.⁶¹ nutzten SYPRO ruby und eine spezifische Fluoreszenzfärbung auf Glycoproteine um in einem Gel die Gesamtprotein-expression und Proteine mit einer speziellen posttranslationalen Modifikation abzubilden.

Beim sog. ICAT - Verfahren (Isotope-coded affinity tagging)⁶² werden die Cysteinreste zweier unterschiedlicher Proben mit einem leichten und einem um 8 Da schwereren, deuterierten Reagens kovalent verknüpft. Die Proben werden gemischt und mittels 2-DE aufgetrennt. Dabei co-migrieren die Proteine im 2-DE-Gel, die Proteine werden angefärbt, ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels Massenspektrometrie analysiert. Das Verhältnis der Signalintensität der um 8 Da auseinander liegenden Peptid-Derivat Massen lässt Rückschlüsse auf die relative Konzentration der Proteine in den beiden Proben zu.

Software zur Auswertung von 2-DE-Gelen

Die Komplexität der Proben und damit auch die Komplexität der Analyseergebnisse macht es praktisch unmöglich 2-DE-Gele ohne Softwareunterstützung auszuwerten. Zudem lassen sich beim visuellen Vergleich von 2-DE-Gelen kaum quantitative Aussagen treffen. Es gibt verschiedene Programme wie PD-Quest, Melanie oder Z3, um nur einige zu nennen. Allen gemein ist, dass sie in der Lage sind das Hintergrundrauschen eines Gels zu subtrahieren, die Spots zu detektieren und diesen einen quantitativen Wert zuzuordnen, aus 2-DE-Gele der gleichen Probe ein statistisches Mittel zu bilden und dies mit 2-DE-Gelen weiterer Proben zu vergleichen und etwaige Unterschiede aufzuzeigen. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten die so erhaltenen Ergebnisse graphisch aufzuarbeiten und mit entsprechenden Texten zu unterlegen.

Die Entwicklungen im Bereich der Software gehen dahin, den gesamten Probenfluß von der Probengewinnung, -aufarbeitung bis hin zur Identifizierung der Proteine über Massenspektrometrische Methoden und die Auswertung der Funktionalität eines Proteins zusammenzufassen. Hierzu gibt es bereits Laborinformations-Managementsysteme (LIMS), die das gesamte Spektrum abdecken. Diese Systeme werden in der Regel in Kombination mit einer möglichst weitreichenden Automation installiert, sind dementsprechend teuer und verlangen einen hohen Probendurchsatz.

Enzymatischer Verdau von Proteinen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung und Anfärbung von Proteinen können einzelne Spots oder auch Banden ausgeschnitten und enzymatisch in einzelne Peptide zerlegt werden. Hierzu gibt es eine Reihe von Enzymen, die gezielt Proteine verdauen, Tabelle A-3 gibt eine Übersicht über die verfügbaren Enzyme und deren Schnittstellen.

Zu jedem Protein gibt es einen charakteristischen peptide-mass-fingerprint (PMF), mittels Massenspektrometrie kann der PMF eines Proteins sehr genau bestimmt werden. Gleicht man die Massendaten des PMF's mit Protein oder cDNA Datenbanken ab, so kann man bei entsprechender Übereinstimmung das zugehörige Protein identifizieren. Zur Absicherung der auf diese Weise bestimmten Identität können einzelne Peptide massenspektrometrisch ansequenziert werden.

| Enzym | Spaltungs-Stelle | N- oder C-terminal |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| Trypsin | Lys, Arg | C-term. |
| Lys-C | Lys | C-term. |
| Arg-C | Arg | C-term. |
| Glu-C (Bicarbonatpuffer) | Glu | C-term. |
| Glu-C (Phosphatpuffer) | Glu, Asp | C-term. |
| Chymotrypsin | Phe, Tyr, Trp, Leu | C-term. |
| Asp-N | Asp | N-term. |

Tab. A-3: Enzyme zum Verdau von Proteinen⁶³

Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie beruht auf der exakten Bestimmung des Verhältnisses aus Masse und Ladung eines Teilchens. Wesentliche Fortschritte hinsichtlich der Meßgenauigkeit, des Meßbereiches der Ionisierungsverfahren sowie Möglichkeiten zur gezielten Fragmentierung, haben dazu geführt, dass die Massenspektrometrie mittlerweile breite Anwendung in der Bioanalytik findet. Im Bereich der Proteinanalytik werden in erster Linie ESI (electrospray ionisation) und MALDI-TOF (matrix assistet laser desorption ionisation time of flight) Massenspektrometrie verwendet. Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit MALDI-TOF-MS gearbeitet wurde, wird im Folgenden

auch nur diese Technik näher erläutert. Eine detaillierte Erklärung zu ESI-MS und Nanospray-ESI-MS findet sich bei Lottspeich und Zorbas²⁸.

MALDI-TOF

Bereits in den 70er Jahren wurden Laser zur Desorption von organischen Molekülen, die auf Metalloberflächen aufkondensiert wurden, eingesetzt. Die so erzielten Massenspektren waren jedoch von geringer Intensität und es kam zu einer ausgeprägten Fragmentierung der Moleküle. Das von Koichi Tanaka bei Shimadzu entwickelte Verfahren zur Laserdesorptions Massenspektrometrie wurde 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Sein Verfahren, das auf einer Vermischung von Analytmolekülen mit Glycerol und Laserlicht absorbierenden "Nanopartikeln" beruht, wird jedoch in der Praxis nicht genutzt. Tanaka konnte die Massen von Proteinen wie beispielsweise Chymotrypsinogen (25,717 Da), Carboxypeptidase-A (34,472 Da) und Cytochrome C (12,384 Da) bestimmen, dies wurde in den Jahren 1987-1988 publiziert⁶⁴⁻⁶⁶.

Karas und Hillenkamp führten gegen Ende der 80er Jahre organische Matrices in die Massenspektrometrie ein⁶⁷. Durch Einbetten der Analyte in eine niedermolekulare Matrix, welche die Energie eines gepulsten UV-Lasers aufnehmen und an die Umgebung wieder abgeben kann, wurde erstmals die Möglichkeit geschaffen Makromoleküle unfragmentiert zu ionisieren und deren Masse zu bestimmen⁶⁸. In der Protein- und Peptidanalytik häufig verwendete Matrices sind: α -Cyano-4-hydroxymizsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure und Sinapinsäure⁶³.

Proteine und Peptide erhalten unter Verwendung der oben beschriebenen Matrices in der Regel eine positive Ladung, durch eine Beschleunigungsspannung, die bei vielen Geräten variabel ist (5-20 kV), werden die Kationen aus der Matrix extrahiert und in Richtung des Flugrohrs beschleunigt. Dabei wirkt auf die Kationen in Abhängigkeit von der

Allgemeiner Teil

Ladungszahl (z) und der Beschleunigungsspannung (V_0) eine kinetische Energie derart, dass die Kationen entsprechend der unten aufgeführten Gleichung mit einer definierten Geschwindigkeit (v) in das Flugrohr eintreten. Das Quadrat der Geschwindigkeit ist umgekehrt proportional dem Verhältnis aus Masse (m) zu Ladung (z), sprich ein einfach geladenes leichtes Peptid fliegt schneller als ein einfach geladenes schwereres Peptid. Die Länge des Flugrohrs (L) ist eine bekannte Größe, demnach muss lediglich die Zeit (t) bestimmt werden, die ein Teilchen benötigt um das Flugrohr zu durchqueren. Die experimentell ermittelte Flugzeit lässt sich somit unschwer in einen Masse-Ladungsquotienten umrechnen.

$$\frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot V_0$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot V_0}{v^2}$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot V_0}{\left(\frac{L}{t}\right)^2}$$

In der folgenden Abbildung wird der schematische Aufbau eines MALDI-MS mit Reflektronanalysator, Delayed-Extraction und Ion-Gate dargestellt. Die Erläuterung zu den einzelnen Elementen folgt im Text.

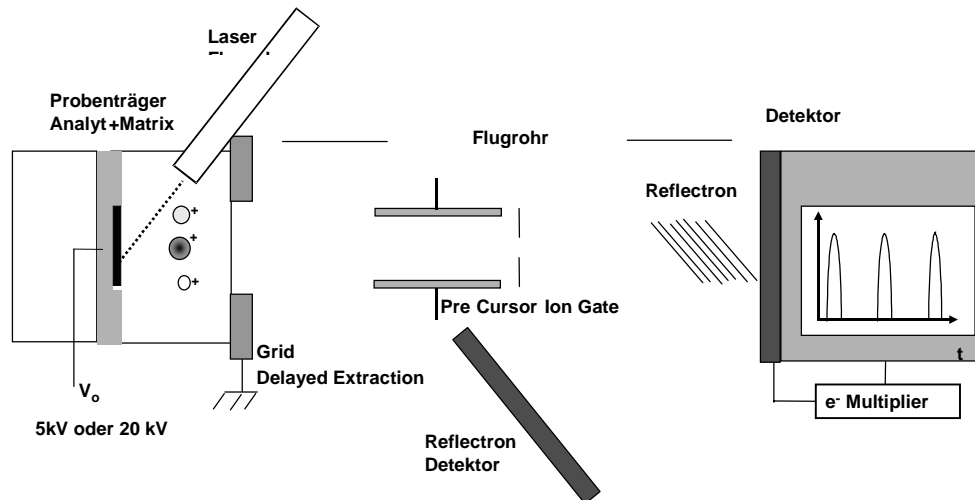


Abb. A-3: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-MS (Kompac seq®)

Auflösung des MALDI-TOF-MS

Das Auflösungsvermögen R (für engl. resolution) eines Massenspektrometers wird definiert als der Quotient der Masse eines Ions geteilt durch die Massendifferenz zu einem zweiten Ion, welches ein vom ersten eindeutig getrenntes Signal ergibt. Zwei Signale gelten dann als voneinander getrennt, wenn das Tal zwischen den beiden eine Intensität von höchstens 50 % der Intensität des schwächeren Signals aufweist. Für sehr hochauflösende Massenspektrometer darf die Intensität des Tals bei maximal 10 % liegen. Für MALDI-TOF-MS wird im Allgemeinen ein Tal mit einer Intensität von max. 50 % als Kriterium für die Bestimmung der Auflösung herangezogen, moderne MALDI-TOF-MS erreichen bis etwa 5.000 Da eine Auflösung von 15.000²⁸.

Eine Einschränkung der Auflösung bei der MALDI-TOF-MS resultiert aus der Energie-, Zeit und Ortsunschärfe bei der Ionisierung. Die Ionen gehen bei der Ionisierung nicht alle gleichzeitig in die Gasphase über, außerdem erfahren die Ionen bereits bei der Ionisierung eine gewisse ungerichtete Beschleunigung. Dabei kann sich die Energieaufnahme der einzelnen Ionen voneinander unterscheiden. Somit kann es passieren, dass Ionen gleicher Masse und gleicher Ladung durch Kumulation der Ionisierungseffekte und der

Beschleunigungsspannung eine ungleiche kinetische Energie aufnehmen und daher auch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ins Flugrohr eintreten.

Zwei gerätetechnische Weiterentwicklungen des MALDI-MS wirken dieser Ungenauigkeit entgegen. Als erstes wurden Reflektronanalysatoren entwickelt⁶⁹, am Ende des Flugrohrs befindet sich ein elektrisches Gegenfeld, dies kehrt die Flugrichtung der Ionen um. Die Flugstrecke wird hierdurch ohne Abänderung der Geräteabmessungen deutlich verlängert und es kommt zudem zu einer Fokussierung der Ionen. Ionen, die eine erhöhte kinetische Energie besitzen, dringen tiefer in des Gegenfeld ein, dort erfahren sie wiederum eine Beschleunigung entsprechend ihrem Masse-Ladungsverhältnis, durch die längere Verweilzeit im Gegenfeld treten sie zeitgleich und mit Ionen, die das gleiche Masse-Ladungsverhältnis haben, aus dem Gegenfeld heraus.

Eine zweite Neuerung, die zu einer erheblichen Verbesserung der Genauigkeit führte, war die Entwicklung der sogenannte *delayed extraction* (DE)⁷⁰. Desorption und das Anlegen der Beschleunigungsspannung erfolgen zeitversetzt (etwa 0,1 μ s). Ionen, die bei der Ionisierung eine höhere Energie aufgenommen haben, bewegen sich während der Verzögerungszeit bereits in Richtung des Flugrohrs, beim Anlegen der Beschleunigungs-Spannung ist somit die Beschleunigungsstrecke kürzer, dies resultiert in einer geringeren Beschleunigung, ohne die DE wären diese Ionen in Relation zu ihrer Masse zu schnell. Außerdem werden durch die DE die Kollisionen zwischen den Molekülen, die meist mit einem Verlust der kinetischen Energie einhergehen, vermindert.

Sequenzierung mittels MALDI-MS

Auch wenn mittels MALDI-MS eine sehr sanfte Ionisierung vorgenommen wird, kann es doch zur Fragmentierung von Ionen kommen. Hierbei muss man zwischen prompter Fragmentierung, bei der es direkt bei der Ionisierung zu einer Fragmentierung kommt, und metastabiler Fragmentierung unterscheiden.

Bei letzterer Zerfallen die Ionen erst nachdem sie die Quelle verlassen haben, sprich im Flugrohr, diese Art der Fragmentierung wird auch als post-source-decay (PSD) bezeichnet. Misst man lediglich im Linear-Mode, so fällt die metastabile Fragmentierung nicht weiter auf. Auch wenn die Ionen im Flugrohr in ein geladenes und ein ungeladenes Teichen zerfallen, behalten sie doch die Geschwindigkeit, auf die sie ursprünglich (als ein Teilchen) beschleunigt wurden. Anders verhält es sich im Reflektron-Modus, hier kann das ungeladene Fragment im Gegenfeld nicht zurückgeworfen werden, das geladene Fragment erfährt hingegen eine stärkere Beschleunigung, da es bei gleicher Ladung an Masse verloren hat. Diesen Effekt macht man sich bei der Strukturaufklärung von Peptiden mittels MALDI-MS zu nutze. Durch gezielte Erhöhung der Laserintensität werden metastabile Fragmente erzeugt. Um die PSD-Spektren auswertbar zu halten, müssen einzelne Ionen aus dem Gesamtionenstrom gefiltert werden. Dies geschieht über ein Ion-Gate, durch anlegen von Spannung können nur Ionen aus einem bestimmten Masse / Ladungsbereich das Ion-Gate durchtreten. Nachdem man einzelne „Massen“ gefiltert hat, können nun die geladenen Fragmente im Reflektron Modus detektiert werden. Meist findet die Fragmentierung entlang des Peptidrückgrates statt, zur Bezeichnung der Peptidfragmente siehe Abbildung A-4. Die Fragmentierung lässt sich durch chemische Derivatisierung der Peptide begünstigen, dieser Ansatz wird als CAF-MALDI (chemically assisted fragmentation) bezeichnet⁷¹.

Die Sequenzierung von Peptiden ist zwar keine angestammte Domäne der MALDI-MS, sondern wird typischerweise mittels ESI-MS durchgeführt, nichtsdestotrotz bietet auch MALDI-MS Möglichkeiten weitreichende Strukturinformation zu erhalten. Die Entwicklung der MALDI Technik wird rasch vorangetrieben, Geräte neuerer Bauart verfügen zum Teil über ein zweites Flugrohr (MALDI-TOF-TOF) oder eine Kombination aus Quadrupol und TOF (MALDI-Q-TOF).

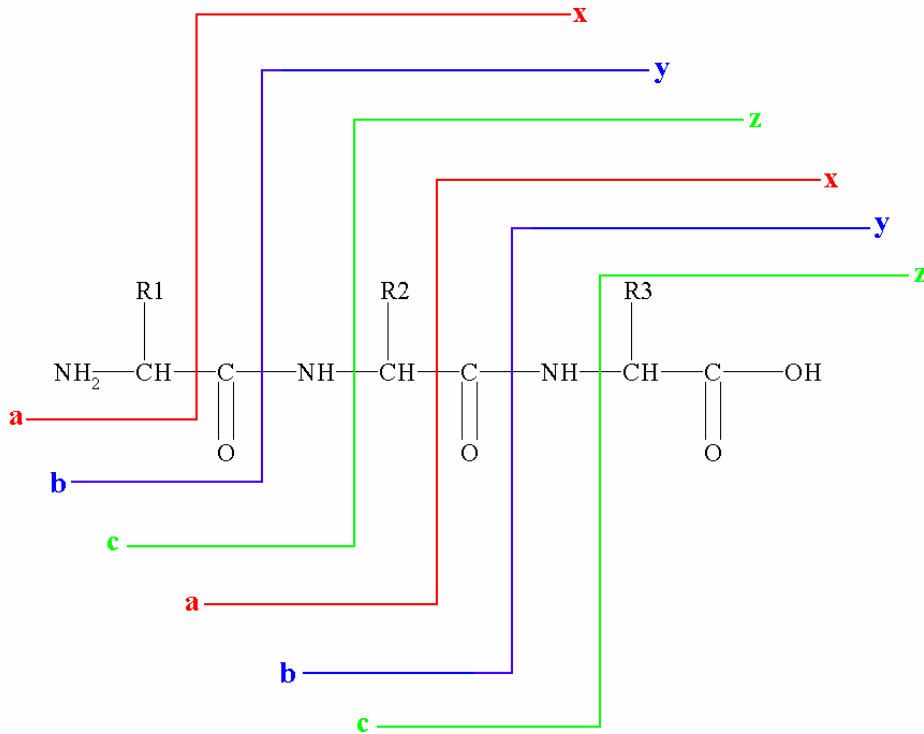


Abb. A-4.: Bezeichnung der Fragmente a,b,c und x,y,z.

Genotyp und Phänotyp

Das vielleicht eindringlichste Beispiel, wie sehr Genotyp und Phänotyp sich unterscheiden können, bringt der Vergleich zwischen einer Insekten Larve und dem ausgewaschenen Insekt, beide verfügen über einen identischen Genotyp, der Phänotyp ist jedoch völlig unterschiedlich. Das statische Genom repräsentiert den Genotyp, die Produkte der Genexpression, die Proteine bilden den Phänotyp. Man sollte nicht außer Acht lassen, dass zwischen dem bereits sehr gut erforschten Genotyp und dem weniger gut erforschten Phänotyp, ein hohes Maß an komplexer Regulation liegt, dessen Funktionsweise sich weitestgehend unserer Kenntnis entzieht.

Die genomische Information ermöglicht es uns vorherzusagen, welche Proteine potentiell exprimiert werden, aber nicht in welchen Zellen, in welchem

Entwicklungsstadium oder in welcher Menge. Die enorme strukturelle Diversität aufgrund alternativen Splicings, Gen-Deletionen, Insertionen oder Rekombinationen ist ebenfalls nicht direkt in den Genen enthalten. Darüber hinaus ist die genetische Information hinsichtlich der physiologischen Funktionalität der resultierenden Proteine wenig aussagekräftig, da co- und posttranslationale Modifikationen nicht aus der DNA-Sequenz ableitbar sind. Selbst wenn all diese strukturelle Proteininformation sowie die zugehörige zeitliche, räumliche und quantitative Verteilung vorlägen, wäre immer noch offen, welche Proteine wie interagieren und damit die Funktionalität einer Zelle gewährleisten, dieser ermöglichen mit anderen Zellen zu kommunizieren, Gewebe, Organe und letztlich einen funktionierenden Organismus zu bilden⁷². Der zahlenmäßige Vergleich zwischen Genom, Anzahl der Gene, und Proteom, Anzahl der Proteine, spiegelt nicht die tatsächlichen Zuwachs an Komplexität wieder. Die tatsächliche Anzahl der humanen Gene ist noch nicht bekannt, Schätzungen schwanken zwischen 30.000 und 70.000⁷³, hinzukommen durchschnittlich 2-3 mögliche Splicevarianten^{73,74} und 3-6 mögliche PTM's⁷², so dass man für das humane Proteom auf etwa 180.000 bis 1.260.000 Proteine kommt.

mRNA Protein Korrelation

Untersuchungen zur Korrelation zwischen mRNA und Proteinbestand einer Zelle haben gezeigt, dass Aufgrund der unterschiedlichen Kinetik sowohl auf Seiten der Proteine, als auch bei der mRNA, kaum eine korrelierbare Aussage gemacht werden kann⁷⁵. Eine hohe mRNA Konzentration in der Zelle heißt nicht zwingend, dass auch eine große Menge des Proteins vorliegt. Umgekehrt gilt, die Abwesenheit einer mRNA heißt nicht, dass kein oder nur sehr wenig des zugehörigen Proteins in der Zelle vorhanden ist. Auf der Ebene der mRNA

ist ebenfalls keine Information über co- und posttranslationale Modifikationen enthalten.

Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen spielen oft eine wesentliche Rolle für die Funktionalität eines Proteins. Häufig werden Peptide am N- oder C-terminus eines Proteins nach der Translation abgespalten und hierdurch das Protein aktiviert. Die häufigsten posttranslationalen Modifikationen sind Phosphorylierung, Sulfatierung, Acetylierung, Methylierung, Glycosylierung und die Verknüpfung von Proteinen mit Lipiden. Durch Vorhalten inaktiver oder weniger aktiver Proteinvorstufen kann die Zelle sehr rasch auf Umwelteinflüsse reagieren ohne die Proteinsynthese-Maschinerie in Gang setzen zu müssen. Ebenso kann durch posttranslationale Modifikation die Aktivität eines Proteins herabgesetzt oder komplett ausgeschaltet werden. PTM's bieten komplexen Organismen eine effiziente Möglichkeit zur Feinsteuerung physiologischer Prozesse. Es gibt insgesamt mehr als 400 unterschiedliche PTM's⁷⁶.

Protein-Protein Wechselwirkungen

Physiologische Abläufe einer Zelle werden in den seltensten Fällen von einzelnen Proteinen ausgeführt, vielmehr treten mehrere Proteine für derartige Aufgaben in Wechselwirkung. Beim Zusammenschluss von Proteinen entsteht mehr als lediglich die Summe der einzelnen Moleküle, es entsteht eine Funktion⁷⁷.

Das *two-hybrid-system* ermöglicht Protein-Protein Wechselwirkungen zu bestimmen, es wurde erstmals 1989 von Fields und Song beschrieben⁷⁸. Dieses System basiert auf der modularen Funktionsweise eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Eine DNA-Bindungsdomäne (Protein I) bindet in der

Nähe des Gens an die DNA, eine Aktivierungsdomäne (Protein II) bildet mit der DNA-Bindungsdomäne einen Proteinkomplex. Sobald Protein I und Protein II die richtige Position und Konformation eingenommen haben, kann die Transkription ablaufen. Beim two-hybrid-system werden durch DNA-Rekombination Fusionsproteine hergestellt. Es soll untersucht werden, ob ein Protein-X mit einem Protein-Y in Wechselwirkung tritt. Es werden die Fusionsproteine Protein-I-Protein-X und Protein-Y-Protein-II hergestellt. Binden Protein-X und -Y, so kann ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor an die DNA binden und ein entsprechendes Reportergen wird repliziert. Die Adaption dieses Systems an ein high-throughput Verfahren zur Bestimmung von Proteininteraktionen in *Saccaromyces cervisiae* wurde 2000 von Uetz et al. veröffentlicht⁷⁹.

Eine Weiterentwicklung dieses Systems zum Auffinden von Proteinkomplexen in Hefezellen wird von Ho et al.²⁶ und Gavin et al.²⁵ beschrieben. Ein Hefe-Protein wird durch DNA-Rekombination mit einem Linker versehen, dieser ermöglicht das Protein an eine Affinitätssäule zu binden. Anschließend werden Hefezell-Lysate über die Säule gegeben, Proteine mit einer hohen Affinität zum „Köderprotein“ werden gebunden, diese wiederum können andere Proteine binden, derart, dass ganze Proteinkomplexe auf der Säule zurückgehalten werden. In der Folge werden die Protein Komplexe eluiert, mit SDS-PAGE getrennt, die einzelnen Proteinbanden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI-MS / Datenbanksuche identifiziert. Durch Schnittmengen zwischen den Proteinkomplexen ergeben sich Netzwerke aus Proteinkomplexen. Mit diesem System wurden auch humane Protein-Komplexe identifiziert²⁵.

Möglichkeiten und Grenzen der 2-DE

Um nicht den in den Hochglanz-Broschüren der im Bereich Proteomics tätigen Firmen hinsichtlich der scheinbar grenzenlosen Möglichkeiten zu erliegen, sollen im folgenden Abschnitt die Limitierungen der 2-DE aufgezeigt werden.

Der *pI*-Bereich, der mit kommerziell verfügbaren IPG-Strips abgedeckt wird, erstreckt sich von 3–12⁴¹, wobei sich im basischen Bereich durch endosmotische Effekte Probleme bei der Auflösung ergeben. Sehr basische Proteine sind somit schlecht zugänglich.

Den erfassbaren Molekulargewichtsbereich kann man durch Variation der Acrylamidkonzentration bzw. des Systems (z.B. Tricine statt Glycine) für die 2. Dimension beeinflussen. In einem Standardsystem lassen sich Proteine zwischen 200 und 10 kDa abbilden, 350 bis 5 kDa können durch Modifikationen erreicht werden.

Membranproteine stellen nach wie vor eine schlecht zugängliche Proteinklasse dar, die unternommenen Anstrengungen neue Detergentien zu entwickeln^{37,80-82}, die in der Lage sind Membranproteine zu solubilisieren und während des gesamten Vorgangs der 2-DE in Lösung zu halten, haben noch nicht zu den erwünschten Ergebnissen geführt. Eine umfassende Übersicht zu den 2-DE Protokollen für Membranproteine findet man bei Molloy⁸³. Schätzungen gehen davon aus, dass etwa 30 % aller Proteine membranständig sind¹⁰.

Proteine sind hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften äußerst heterogen, es ist somit schwierig alle auf einmal zu erfassen. Insbesondere hydrophobe Proteine, zu denen auch die Membranproteine zählen, lassen sich schlecht durch 2-DE abbilden.

Eine komplexe Proteinmischung ist nicht nur hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften äußerst heterogen, auch was die Konzentrationen der einzelnen Spezies angeht, erstreckt sich diese über mehrere 10er Potenzen. Es ist problematisch gering exprimierte Proteine neben hoch exprimierten Proteinen, wie beispielsweise Enzymen oder Strukturproteinen, nachzuweisen.

Es kommt zum Einen zu Überlagerungen und zum Anderen liegen viele niedrig exprimierte Proteine unterhalb des Detektionslimits. Schätzungen von Vuong et al.⁸⁴ zufolge lassen sich bei einer Proteinbeladung von 100 µg mittels Silberfärbung Proteine nachweisen, die mit mehr als 10.000 Kopien pro Zelle exprimiert werden⁸⁴. Berücksichtigt man die Anzahl der möglichen Proteine, so liegen etwa 75 % der Proteine unterhalb des Detektionslimits.

Es stellt sich die Frage, wie viele Proteine in einem Lauf mittels 2-DE getrennt werden können? Dies ist abhängig von der verwendeten Probe, dem *pI*-Bereich und der Länge des IPG-Strips. Wählt man eine komplexe eukaryotische Probe, einen *pI*-Bereich von 3-10 sowie eine kommerziell verfügbaren IPG-Strip von 18 oder 24 cm und eine sensitive Färbemethode, so lassen sich 3.000 bis 5.000 Spots auflösen. Mit speziellen Apparaturen wurden auch schon 10.000 Spots auf einem Gel getrennt⁸⁵. Nicht jeder Spot entspricht einem „neuen“ Protein, posttranslationale Modifikationen können dazu führen, dass einer Aminosäuresequenz 50 und mehr Spots zuzuordnen sind^{31,86}, demnach korrespondieren die 3.000 – 5.000 Spots mit 500 bis 2.000 Proteinen.

Auch wenn die aufgezeigten physikalisch-chemischen cutt-offs und das Auflösungsvermögen der 2-DE vor dem Hintergrund der Komplexität des Proteoms und dem Interesse die funktionellen Proteine ausfindig zu machen, ernüchternd erscheint, gibt es doch eine Vielzahl Ansätze dieser Problemstellung zu begegnen. Allesamt zielen darauf ab die Komplexität der Probe zu reduzieren und sich den funktionell interessanten Proteinen zu nähern:

- gezielte Auswahl von Zellen durch fluorescence-assisted-cell-sorter (FACS)
- lasergestützte Zellexcision „laser-capture-microdissection“^{87,88}
- fraktionieren der Zellen in einzelne Kompartimente durch Zentrifugation⁸⁹
- Fraktionierung aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten von Proteinen^{89,90}
- Vortrennung mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung^{91,92}

Allgemeiner Teil

- Kombination aus Affinitätschromatographie und 2-DE oder Immunoprecipitation und 2-DE^{93,94}
- Verwendung von IPG-Strips mit nur einer pH-Stufe⁹⁵
- Anwendung spezifischer oder sensitiverer Färbemethoden⁸⁴

Um einen synergistischen Effekt bei der Reduktion der Komplexität zu erzielen werden die hier beschriebenen Ansätze häufig kombiniert.

Problemstellung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es die Methodik der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese sowie der MALDI-TOF Massenspektrometrie an einem Pharmazeutisch Institut und unter pharmazeutischen Aspekten zu etablieren. Demnach war es Aufgabe Standard-Arbeitsanweisungen (SOP's) zu erstellen. Im Anschluß an eine Methodenentwicklung wurden Versuche zur Validierung angestellt und dokumentiert. Um ein rationelles Arbeiten zu ermöglichen sollte nach Prozessen gesucht werden, die automatisierbar sind, und entsprechende Automations-Konzepte sollten erarbeitet werden. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Erstellung einer Datenbank, die zum Einen das Know-how der Arbeitsgruppe in Form von SOP's und Protokollen speichert und zum Anderen von mehreren Mitarbeitern zu einer projektbezogenen Dokumentation der Versuche genutzt werden kann. Dieser, in Anlehnung an die Vorgehensweise zur Etablierung einer neuen Methode in der pharmazeutische Industrie gewählte Ansatz, wurde auch gewählt um ein inter-institutionelles Arbeiten zu ermöglichen, bzw. zu evaluieren.

Es sollten verschiedene pharmazeutisch relevante Proben unterschiedlicher Komplexität mittels der erarbeiteten Methodik analysiert werden. Rekombinante Proteine und hier insbesondere posttranslational modifizierte, wurden untersucht, um zu zeigen, ob die 2-D Gelelektrophorese in der Lage ist die charakteristische Mikroheterogenität abzubilden, und damit für die Qualitätssicherung rekombinanter Arzneistoffe geeignet ist. Es stellte sich die Frage, ob 2-DE und MALDI-MS als alternative Methoden zu den in den Arzneibüchern beschriebenen Methoden Anwendung finden können. Ebenso sollte die 2-DE als Methode zur Inprozess-Kontrolle insbesondere bei der Aufreinigung rekombinater Proteine angewendet werden.

Problemstellung

Es sollte ein 2-DE Testsystem für die Untersuchung von Antisense-Oligonucleotiden erstellt werden, welches dann in der Dissertation von Johannes Winkler⁹⁶ zur *in vitro* Testung der von ihm synthetisierten 2'-Aminomodifizierten Antisense-Oligonucleotide angewendet wurde.

Desweiteren sollten verschiedene Proben mit unterschiedlich komplexen Matrices analysiert werden, wie z. B. Serum, Urin, Cerebrospinalfluid, Milch oder Zellkulturmaterial. Unter dem Begriff „differentielle klinische Proteomics“ sollte die Proteinexpression von pathologisch verändertem mit der von gesundem Zellmaterial verglichen werden, um so die krankheitsrelevanten Proteine zu ermitteln. Diese können dann in weiterer Folge entweder zu diagnostischen Zwecken verwendet werden oder aber als potentielle Targets einer rationellen Arzneistoffentwicklung dienen. Untersuchungen zum Proteom des menschlichen Uterus wurden in der Dissertation von Mohammed Masree angestellt⁹⁷.

Die hier vorliegende Arbeit soll als Grundlage für weitere Arbeiten im Bereich der pharmazeutischen Proteomics dienen. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden 3 Diplomarbeiten⁹⁸⁻¹⁰⁰ mit pharmazeutischen Fragestellungen co-betreut und fertiggestellt.

Erarbeitung der methodischen Grundlagen

Methodenentwicklung

Die Technik der 2-dimensionalen Gelelektrophorese umfasst eine Vielzahl an Arbeitsschritten, dementsprechend gibt es eine Vielzahl an Parametern, die im Rahmen der Methodenentwicklung variiert werden können. Ausgangspunkt für die hier beschriebene Methodenentwicklung waren die Arbeiten von Rabilloud et al. sowie Görg et al.^{19,36,39,42,63}. Hierdurch wurde zumindest ein Teil der variierbaren Parameter bereits zu Beginn festgeschrieben. Um eindeutige Aussagen treffen zu können, dürfen von einem Versuch zum Anderen nicht zu viele Parameter gleichzeitig verändert werden. Es ist auch zu beachten, dass die Methode der 2-DE, bedingt durch die vielen Handarbeitsschritte, hinsichtlich der Qualität der 2-DE-Gele einer gewissen Schwankung unterliegt. Die Fertigkeit und Erfahrung dessen, der die Versuche durchführt, wirkt sich ebenfalls auf die Qualität der Gele aus. Vor diesem Hintergrund ist die gesamte, im folgenden beschriebene Methodenentwicklung, nicht nur als Sequenz aufeinander aufbauender Versuche, sondern insgesamt als Etablierung der Methode zu sehen.

Ziel war es eine Methode für die zweidimensionale Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine aus embryonalem Hühnerhirngewebe zu entwickeln. Dabei war die Vorgabe möglichst viele Proteine über den gesamten pI- und Molekulargewichtsbereich in hoher Auflösung aufzutrennen. Außerdem sollten während der Methodenentwicklung Erfahrungen über die Robustheit der Methode gesammelt werden sowie kritische Arbeitsschritte aufgedeckt und später in Form einer Standardarbeitsanweisung (SOP) so detailliert beschrieben werden, dass ein Maximum an Reproduzierbarkeit erzielt werden kann. An die Methodenentwicklung schließen sich die Versuche zur Validierung an.

Qualitätskriterien für 2-DE-Gele

Zu Beginn der Methodenentwicklung stand noch keine Auswertungssoftware zur Verfügung, so dass die Bewertung der Gele visuell vorgenommen wurde. Um die Subjektivität des Betrachters einzugrenzen, wurden für ein qualitativ hochwertiges, hochauflösendes Gel, gewisse Kriterien festgesetzt:

- Weder horizontale noch vertikale Streifen zeigt und möglichst gleichförmige Spots, mit einer homogenen Verteilung der Spots über dem gesamten Gel aufweist.
- Insbesondere hochmolekulare und auch basische Proteine sollten gut aufgelöst sein.
- Es sollen möglichst viele Spots, auch Proteine, die in geringer Konzentration vorliegen, sichtbar sein.
- Ein gleichmäßiger Verlauf der 2. Dimension sollte erkennbar sein, sprich keine wellenförmige Front, keine Unregelmäßigkeiten zu den Seiten des Gels hin.

Vorab noch eine Anmerkung: Nicht alle Unschärfen (Streifen) können auf die Unzulänglichkeit der Methode zurückgeführt werden, posttranslationale Modifikationen können dazu führen, dass Proteine statistisch Verteilt in vielen verschiedenen Variationen vorliegen. Diese lassen sich nicht immer sauber trennen und führen demnach zu einer vermeintlichen Unschärfe der Spots.

Die verwendeten Proben

Wie bereits erwähnt, wurde für die Methodenentwicklung embryonales Hühnerhirngewebe verwendet. Bei diesen Proben handelt es sich um komplexe Proteinmischungen, deren 2-DE Auftrennung relativ wenig durch Matrix-Effekte gestört werden. Die Proben entstammen einer eigens am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt durchgeführten Bebrütung. Bei den verwendeten Eiern handelte es sich um weiße Leghorn der Fa. LSL. Die Bebrütung wurde in einem befeuchteten Trockenschrank bei 37°C

durchgeführt, die Eier wurden zweimal täglich von Hand gedreht. Die im Laufe der Bebrütung entnommenen Embryonen wurden in kalte Vogelringer Lösung (0,6 % NaCl) überführt. Anschließend wurden die Gehirne unter dem Mikroskop präpariert, gewogen und in Eppendorf Caps bei -20°C eingefroren. Die Bestimmung des Entwicklungszustands erfolgte nach Carnegie oder Hamburger und Hamilton unter Zuhilfenahme von Farbtafeln¹⁰¹. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben in einem Lysispuffer (Methodenteil) mittels einer Ultraschall Sonotrode homogenisiert, die Homogenisierung erfolgte unter Kühlung im Eisbad. Ein Teil des so gewonnenen Homogenisates wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Bradford Micro-Assays (Methodenteil) verwendet. Um die Vergleichbarkeit der 2-DE-Gele zu gewährleisten wurden die meisten Gele mit der gleichen Probe durchgeführt. Eine Tabelle der durch die Bebrütung gewonnenen Proben findet sich im Experimentellen Teil.

Zur Dokumentation der Methodenentwicklung

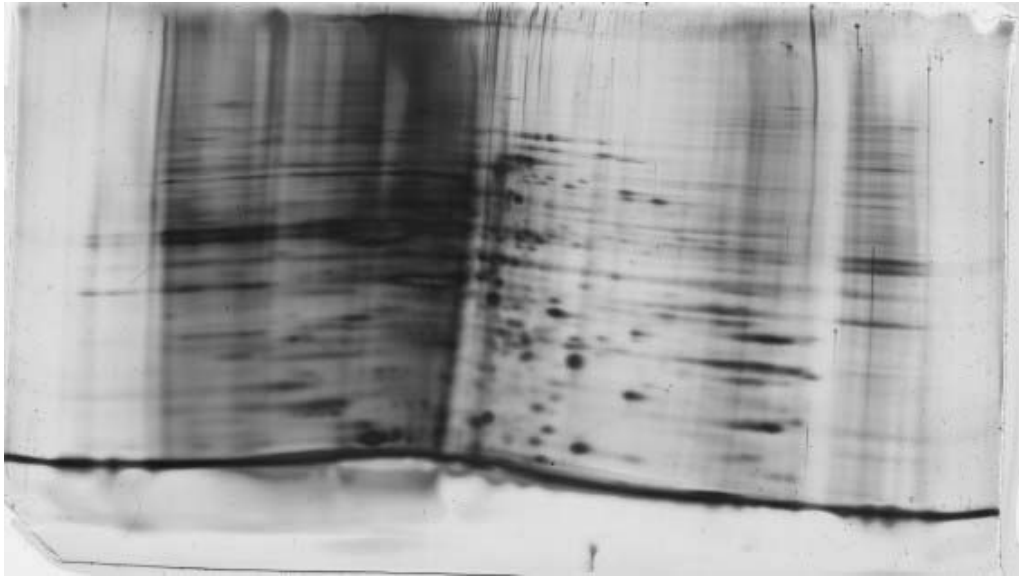
Sämtliche im Rahmen der Methodenentwicklung angefertigten Gele wurden nachträglich in die mit MS Access[®] erstellte Datenbank zur Dokumentation von 2-DE-Gelen eingegeben. Die Nummern der im folgenden gezeigten Abbildungen stimmen mit den durch die Datenbank vergebenen Codes überein. Zu Beginn der Arbeiten stand noch kein Scanner zur Verfügung, bei der Qualität der Abbildungen sollte berücksichtigt werden, dass die bereits in Cellophan eingepackten Gele nachträglich eingescannt wurden.

Vergleich von IPG-Strips verschiedener Hersteller

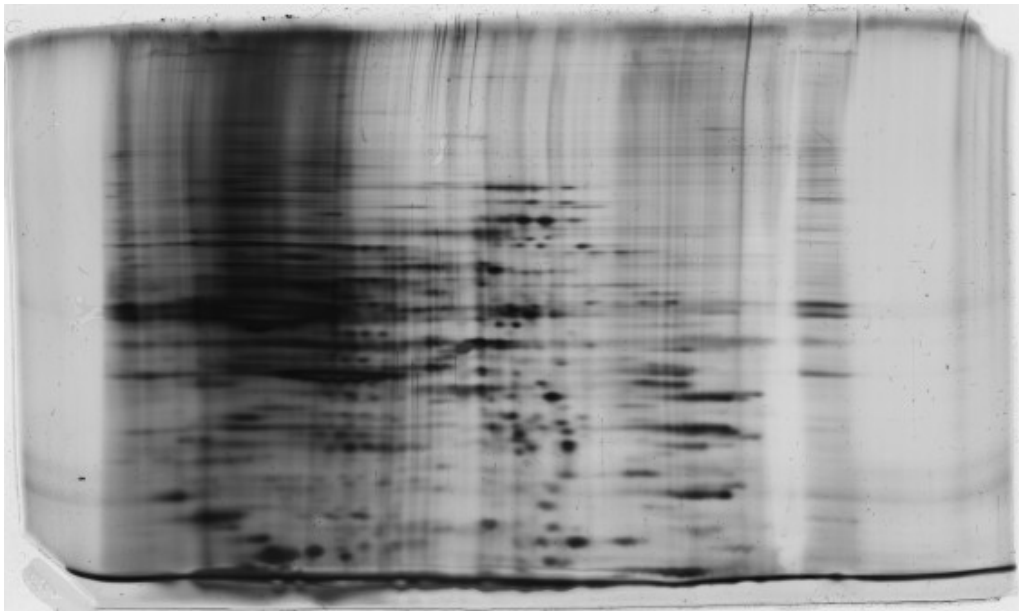
Als erstes wurde ein 7 cm Strip 3-10 L der Fa. Amersham mit einem 7 cm Strips 3-10 L von Biorad verglichen, bei der verwendeten Probe handelt es sich um eine Diencephalon Präparation eines embryonalen Hühnerhirns. Es wurden jeweils 7,5 μg Protein aufgetragen. Die Rehydrierung erfolgte über 11 h (ohne

Methodenentwicklung

Spannung), anschließend wurde bei graduellem Spannungsanstieg insgesamt 8.750 Vhrs fokussiert. Beide Gele wurden mit der Silberfärbung nach Blum¹²¹ angefärbt. In der 2. Dimension wurden 10 % T Acrylamid Gele verwendet. Gel WS-1 zeigt den IPG-Strip von Biorad, in Gel WS-2 ist der IPG-Strip von Amersham zu sehen.



Gel WS-1: pI 3-10 L, 7 cm, 10 %T, 7,5 µg Protein, IPG-Strip Fa. Biorad



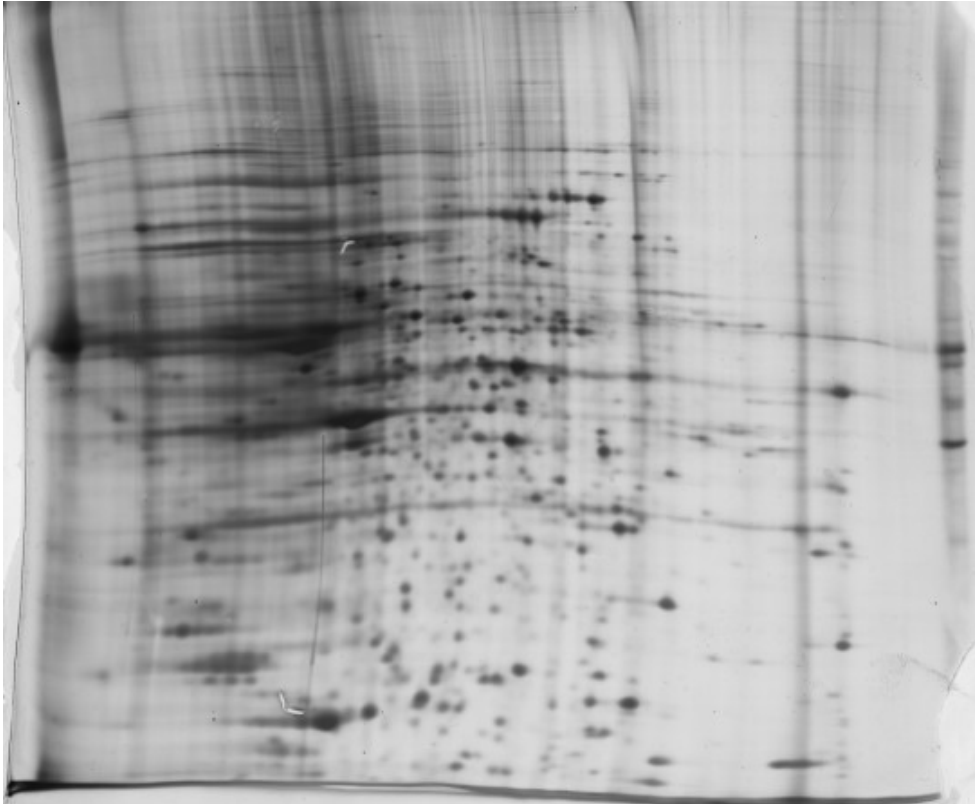
Gel WS-2: pI 3-10 L, 7 cm, 10 %T, 7,5 µg Protein, IPG-Strip Fa. Amersham

Beide Gele zeigen insbesondere im sauren Bereich eine deutliche Hintergrundfärbung. Hochaufgelöste Spots finden sich nur im mittleren Teil der Strips, was auf eine unzureichende Fokussierung hindeutet. Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse kann keinem der Hersteller ein Vorzug gegeben werden.

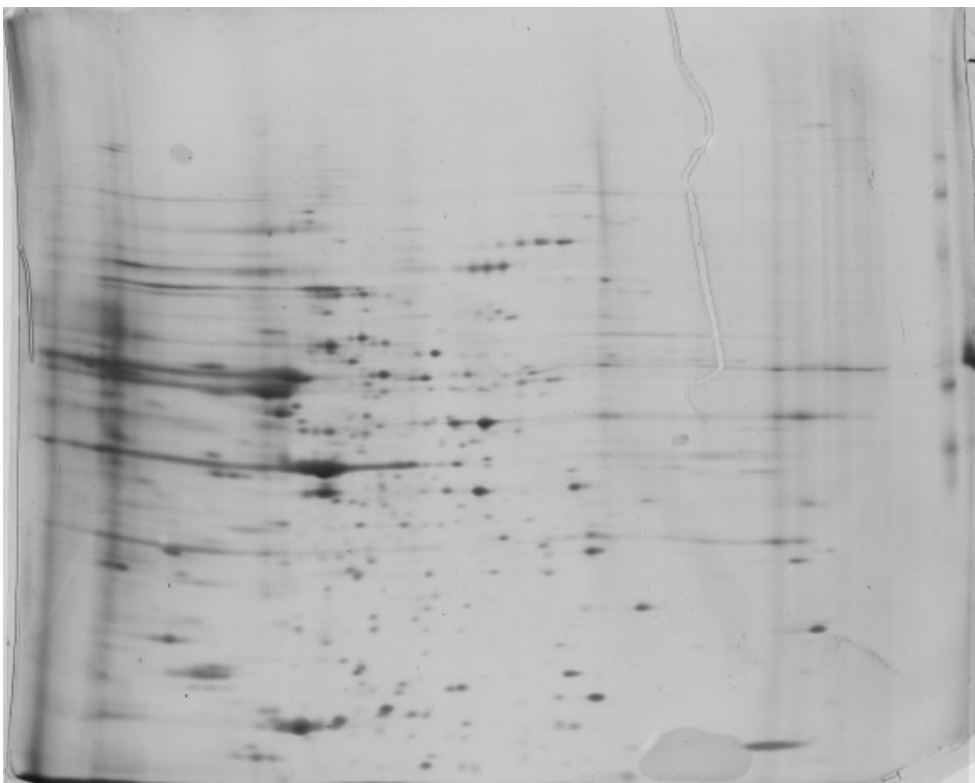
Im nächsten Versuch wurden erstmals 18 cm IPG-Strips verwendet mit einem *pI*-Bereich 3-10 linear. Zusätzlich wurde ein Vergleich angestellt zwischen einer TCA-Aceton gefällten (WS-4) und einer unbehandelten Probe (WS-3). Es wurden jeweils 51 µg Protein einer Resthirnprobe, dies entspricht dem Gesamthirn ohne Diencephalon, aufgetragen. Die Probe wurde am Tag 8 der Bebrütung entnommen (Carnegiestage 19). Nach der TCA-Aceton-Fällung wurde keine erneute Proteinbestimmung durchgeführt. Die Fokussierungsparameter wurden der Amersham Betriebsanleitung für die IPG-phor entnommen, es wurde insgesamt 32,8 kVhrs fokussiert.

Ziel dieses Versuches war es zu evaluieren, inwiefern sich störende Matrixbestandteile durch die TCA-Aceton-Fällung abtrennen lassen, ohne dabei Proteine zu verlieren.

Methodenentwicklung



Gel WS-3: pI 3-10 L, 18 cm, 10 %T, 51 µg Protein

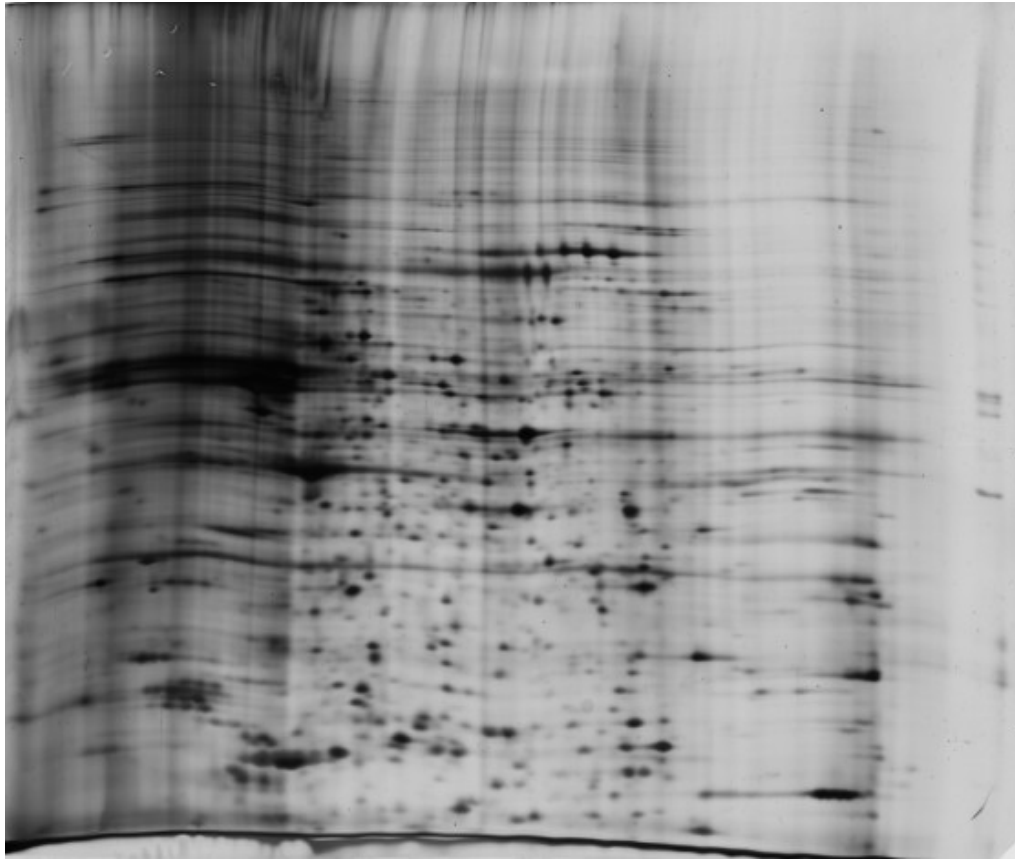


Gel WS-4: pI 3-10 L, 18 cm, 10 %T, 51 µg Protein, TCA-Aceton-Fällung

Man erkennt, dass sich durch die TCA-Aceton-Fällung der Hintergrund, insbesondere im sauren Bereich, deutlich reduzieren lässt. Schwache Spots, die man auf dem Gel der unbehandelten Probe sieht, gehen jedoch verloren. Hierzu muss man anmerken, dass das Pellet nach der Fällung nicht wieder zu 100 % in Lösung gegangen ist. Zu WS-3 wäre noch anzumerken, dass bei diesem Gel der erste Test auf Robustheit der Methode durchgeführt wurde. Nach unbeabsichtigtem Transfer des IPG-Strips auf den Laborfußboden (mit der Gelseite nach unten) konnte nach Waschen mit Elektrodenpuffer keine nachteilige Auswirkung dieser Manipulation festgestellt werden.

Im nächsten Versuch wurde die aufgetragene Proteinmenge erhöht (68 µg). Zudem wurde die Voltstundenzahl der isoelektrischen Fokussierung erhöht, und die 2. Dimension etwas beschleunigt (von 35 mA auf 40 mA pro Gel). Es wurden erneut zwei Resthirnproben nach Acetonfällung vom gleichen Bebrütungstag wie bei den Gelen WS-3 und WS-4 verwendet, jedoch von unterschiedlichen Hühnerembryonen. Nach der TCA-Aceton-Fällung wurden die Pellets mit einer Pinzette zerkleinert und mittels Ultraschall in Lösung gebracht.

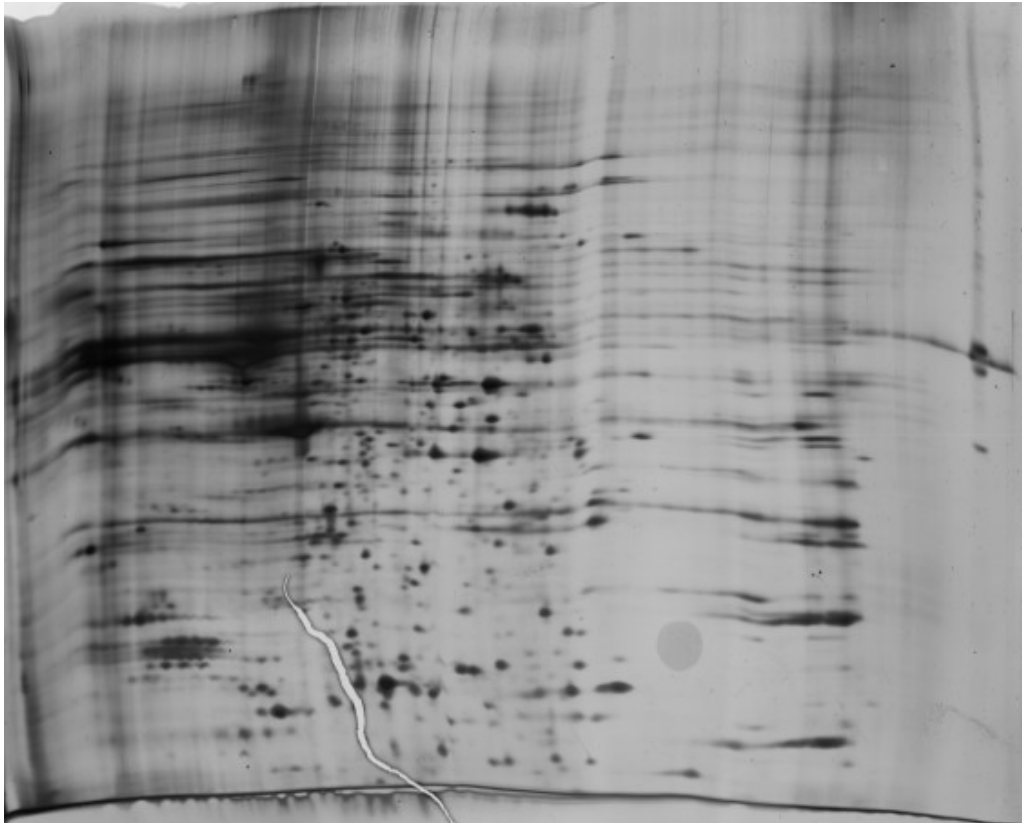
Der visuelle Vergleich der beiden Proben zeigt in gut aufgelösten Bereichen keine signifikanten Unterschiede, die darauf schließen lassen würden, dass sich die Expression der auf den 2-DE-Gelen sichtbaren Proteine der beiden Hühnerembryonen unterscheiden würde. Vergleicht man WS-5 und WS-6 (Abbildung nicht gezeigt) mit WS-3 und WS-4 sieht man, dass die spots schärfer fokussiert sind, dies ist auf die höhere Voltstundenzahl zurückzuführen. Es fällt aber auch auf, dass man im sauren Bereich wieder einen deutlicheren Hintergrund sieht, dies ist wahrscheinlich auf die intensivierte Resolubilisierung der Probe zurückzuführen, bei der auch störende Matrixbestandteile wieder in Lösung gebracht wurden.



Gel WS-5: pI 3-10 L, 18 cm, 10 %T, 68 µg Protein TCA-Aceton-Fällung

Auf einer Fortbildungsveranstaltung der Fa. Amersham wurde uns in einem Gespräch mit Herrn Dr. Westermaier von einer Proteinfällung, wenn nicht unbedingt erforderlich, abgeraten, da dies immer zu einer Ungewissheit hinsichtlich der Reproduzierbarkeit führt und es fraglich ist, ob man durch die Fällung nicht wesentliche Proteine verliert.

Die folgenden Gele wurden mit Ganzhirn-Homogenaten und ohne TCA-Aceton-Fällung angefertigt (siehe WS-8).



Gel WS-8: pI 3-10 L, 18 cm, 10 % T, 60 µg Protein ohne Fällung

Versuche zur Untersuchung der Robustheit der Methode und zur Reduktion des Hintergrunds

Um die Methodenentwicklung zu beschleunigen wurden für die folgenden Gele 7 cm IPG verwendet, sowohl die Fokussierzeit als auch die Zeit der 2. Dimension verringert sich deutlich.

In der Literatur wird beschrieben¹⁰², dass es einen Zusammenhang zwischen der Konzentration an Polymerisationsstartern (APS und TEMED) und der Hintergrundfärbung gibt. Demnach wurde die zugesetzte Menge an APS 10 % von ursprünglich 150 µl / 15 ml Trenngel auf 50 µl reduziert und die TEMED Menge von 15 µl / 15 ml Trenngel auf 7,5 µl halbiert.

Die bei den 18 cm IPG-Strips gewonnene Erfahrung, dass sich eine gegenüber den Standardparametern erhöhte Voltstundenzahl positiv auf die Fokussierung

Methodenentwicklung

auswirkt, wurde auch auf die 7 cm IPG-Strips übertragen. Die Voltstundenzahl wurde auf 12625 Vhrs erhöht. Es wurden IPG-Strips der Fa. Amersham verwendet.

Die folgende Tabelle gibt die wesentlichen Parameter zur Robustheit der Methode wieder. Es wurden insbesondere Veränderungen von pH, Ionenstärke sowie der Detergenzien untersucht.

| Gel-Code | Proteinmenge | Acrylamid T % | sonstige Variation |
|----------|--------------|---------------|--|
| WS-9 | 7,5 µg | 10 % | 20 mM Essigsäure (pH ~ 3,2) 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-10 | 7,5 µg | 10 % | 20 mM Tris 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-11 | 7,5 µg | 12,5 % | pH 6,05 0,5 % Triton-X 100 APS und TEMED reduziert |
| WS-12 | 7,5 µg | 12,5 % | 5 mM K ₂ CO ₃ (pH 8,07) 0,5 % Triton-X 100 APS und TEMED reduziert |
| WS-13 | 7,5 µg | 12,5 % | 5 mM NaCl 0,5 % Triton-X 100 APS und TEMED reduziert |
| WS-14 | 7,5 µg | 12,5 % | 20 mM H ₃ PO ₄ 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-15 | 7,5 µg | 11 % | Ohne Sammelgel 0,5 % Triton-X 100 |

Tab. M-1: Übersicht; Variation der Versuchsparameter pI 3-10 I, 7 cm

| Gel-Code | Proteinmenge | Acrylamid T % | sonstige Variation |
|----------|--------------|---------------|---|
| Ws-16 | 7,5 µg | 11 % | Ohne Sammelgel 20 mM Essigsäure (pH ~ 3,2) 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-17 | 7,5 µg | 11 % | 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-18 | 7,5 µg | 11 % | Probe in Rehydrierlösung mit Ultraschallsonotrode behandelt 3 x 10 s auf Eis 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-21 | 3,75 µg | 11 % | 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-22 | 15 µg | 11 % | 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-31 | 10 µg | 11 % | 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-32 | 10 µg | 11 % | 2 mM Tributylphosphin (TBP) anstelle von DTT in der Rehydrierlösung 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-33 | 10 µg | 11 % | 1,5 % SB 3-10 0,5 % Triton-X 100 |
| WS-34 | 10 µg | 11 % | 10 mM TBP in der RHS, 1. Schritt der Reequilibrierung mit 10 mM TBP 1,5 % SB 3-10 0,5 % Triton-X 100 |

Forts. Tab. M-1: Übersicht; Variation der Versuchsparameter pI 3-10 l, 7 cm
Die folgende Abbildung zeigt, wie sich die in der obigen Tabelle aufgeführten Variationen auf die mit 2-DE Silberfärbung erzielbaren Ergebnisse auswirken.

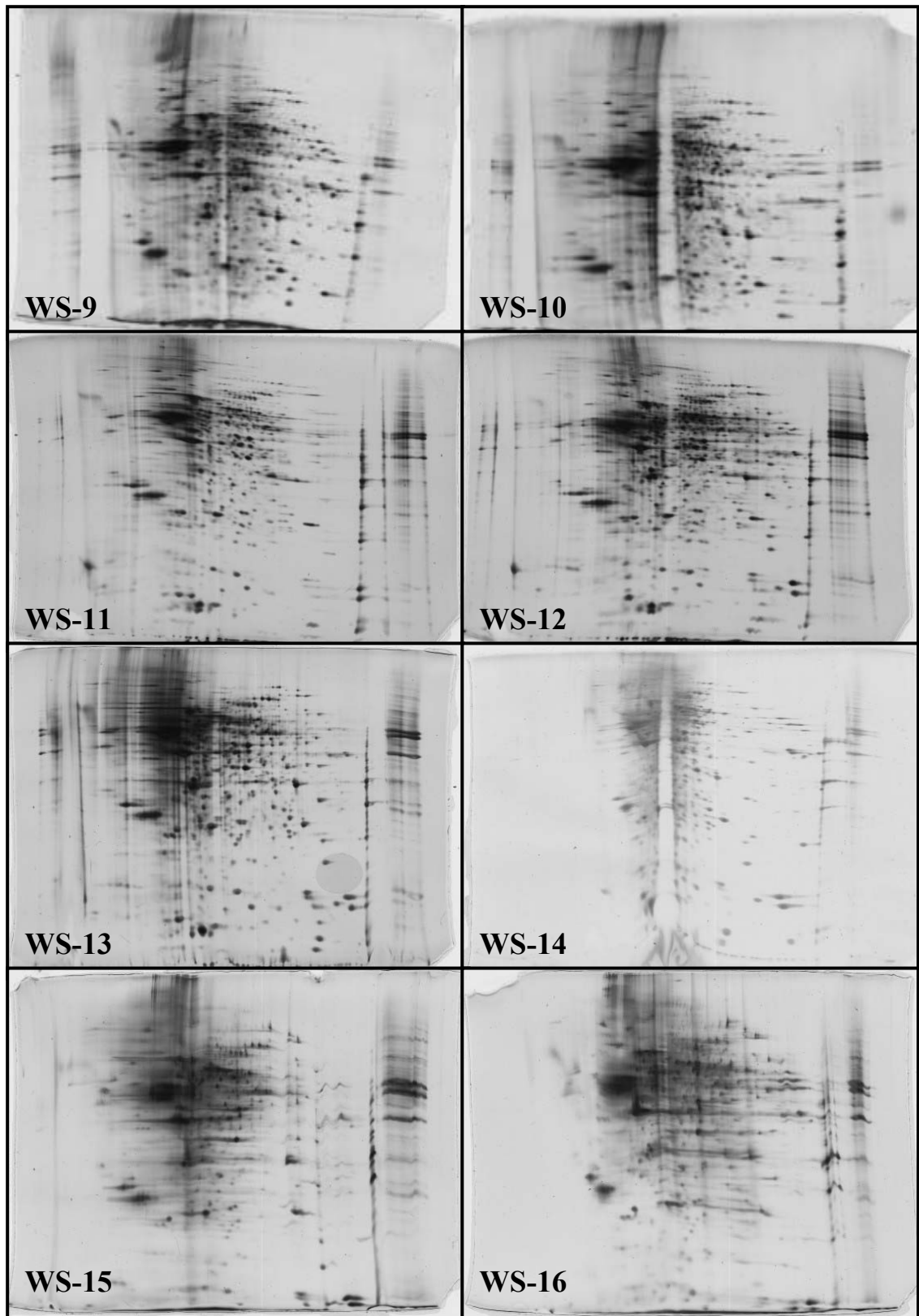


Abb. M-1: Gegenüberstellung der Minigele; Versuche zur Robustheit

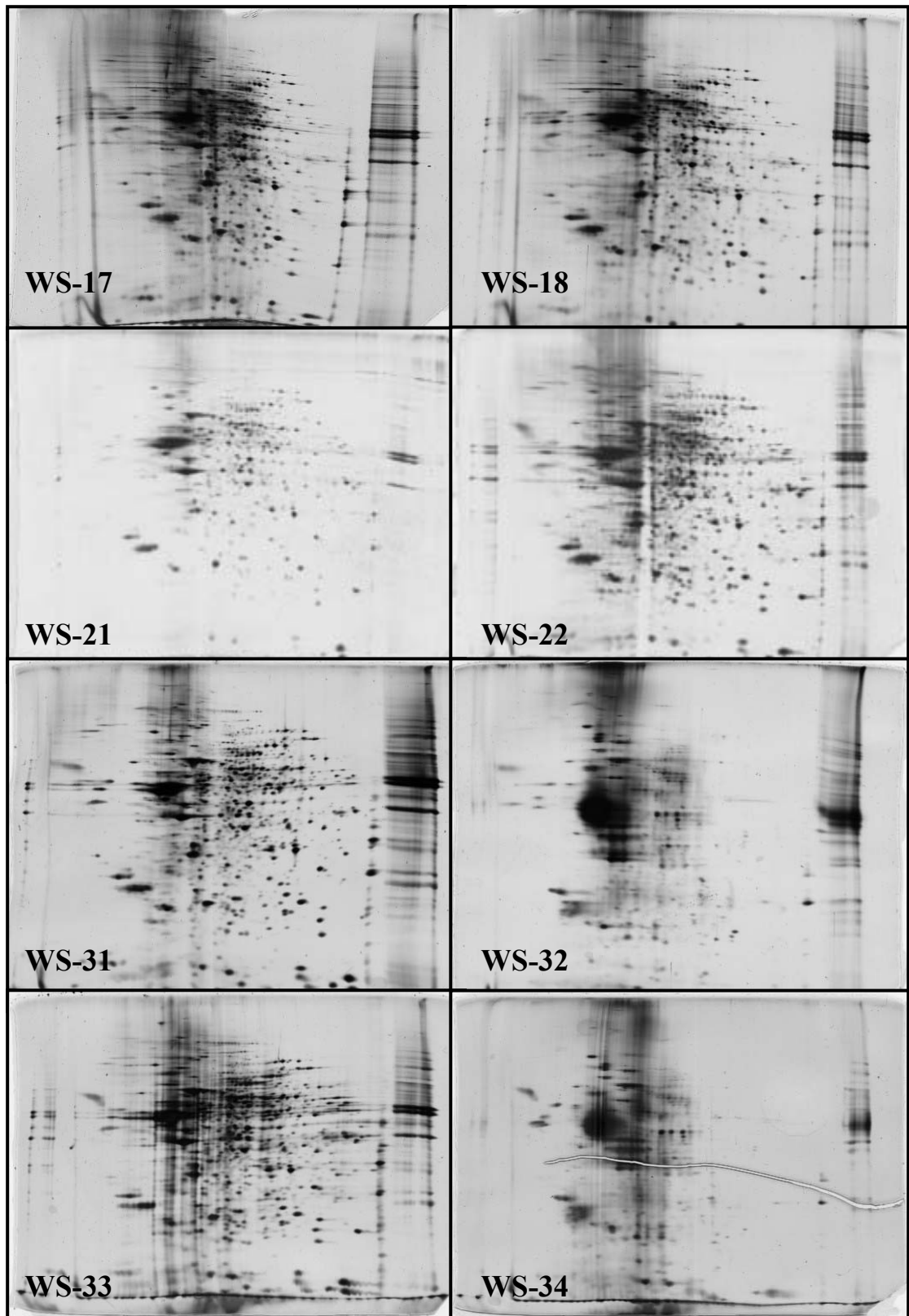


Abb. M-2: Forts. Gegenüberstellung der Minigele; Versuche zur Robustheit

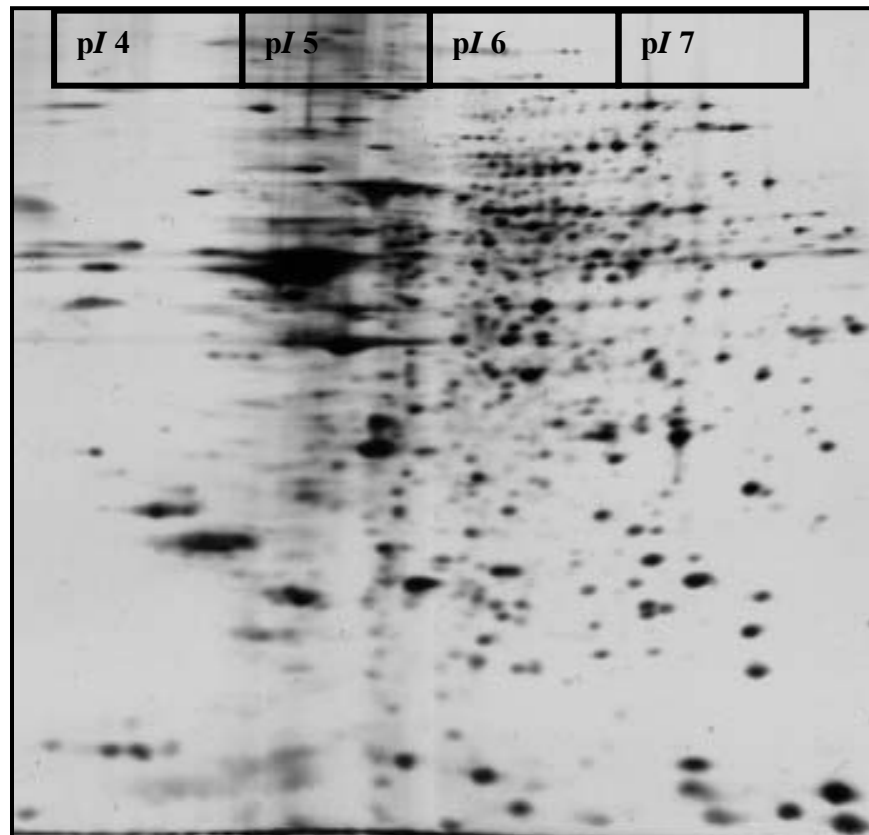


Abb. M-3: Ausschnitt aus Gel WS-31 (pI 4-8)

Die Versuche zur Robustheit (WS-9 –WS-14) zeigen, dass die Methode eine gewisse pH-Schwankung der Rehydrierlösung toleriert, der Zusatz von 20 mM H_3PO_4 führt jedoch zu einem sehr schlechten Ergebnis. Die Löslichkeit von Proteinen ist in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes am niedrigsten, die Hoffnung, dass man mit einer basischen Rehydrierlösung vermehrt saure und mit einer sauren vermehrt basische Proteine in Lösung bringen kann, konnte nicht bestätigt werden. Auch der Zusatz von 5 mM NaCl (WS-13) wird gut toleriert.

WS-15 und WS-16 zeigen, dass unter den gewählten Bedingungen die Verwendung eines Sammelgels unabdingbar ist. Es wurden verschiedene Acrylamidkonzentrationen verglichen mit dem Ergebnis, dass man bei der hier gewählten Probe am besten 11 % T Gele verwendet. Durch die Reduktion der zugesetzten APS- und TEMED-Menge konnte die Hintergrundfärbung nicht

signifikant vermindert werden. Der Zusatz von 20 mM Tris zur Rehydrierlösung bringt ebenfalls keine Verbesserung und wurde daher nicht übernommen. Gleiches gilt für den Zusatz von SB-3-10 als weiterem Detergens (Vergleiche). TBP wurde als Alternative zu DTT getestet, dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen ausgetestet, TBP hat sich jedoch nicht als vorteilhaft erwiesen.

Der Zusatz von Triton-X 100 bringt deutliche Vorteile, insbesondere im basischen Bereich.

Es macht keinen Unterschied, ob man die Probe während der einstündigen Reduktion in Rehydrierlösung lediglich mittels eines Vortexers schüttelt oder mit einer Ultraschallsonotrode beschallt.

Vergleich von linearen und nicht linearen IPG-Strips

Um den Bereich zwischen pH 5 bis 7, in dem die meisten Proteine zu finden sind, etwas aufzuspreiten, wurden nicht lineare IPG-Strips getestet. Zudem wurden wieder 18 cm Strips verwendet. Die unten aufgeführten Abbildungen zeigen Ausschnitte der Gele WS-23 und WS-24 sowie die Breite der einzelnen pH-Stufen. Die Daten für die Breite der pH-Stufen wurden der Amersham Broschüre 18-1140-60 entnommen. Man sieht, dass es im pH-Bereich 5-7 zu einer deutlichen Aufspreitung kommt. Für die hier verwendete Probe ergibt sich bei Verwendung der nicht linearen IPG-Strips eine deutlich bessere Auftrennung der Proteine.

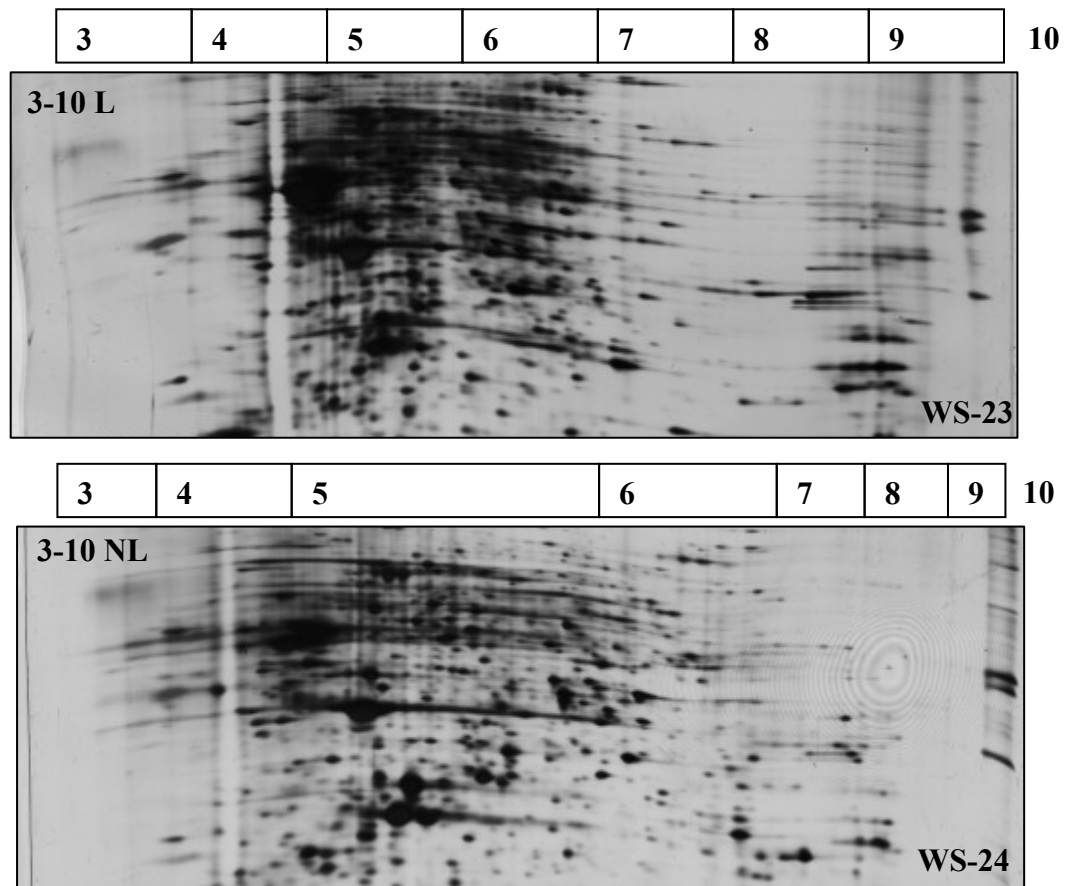


Abb. M-4: Vergleich linearer vs. nicht linearer IPG-Strip

Coomassie Färbung nach Neuhoff⁴⁴

Da in der Folge die mittels 2-DE getrennten Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden sollen, wurde eine zweite Färbetechnik etabliert. Die Coomassie Färbung nach Neuhoff⁴⁴ zu verwenden, war eine Empfehlung von Herrn Dr. Sigmund (Bayer AG Leverkusen). Im Vergleich zur Silberfärbung ist die Coomassiefärbung weniger empfindlich, dafür aber besser für einen anschließenden tryptischen Verdau und MS geeignet. Eine detaillierte Beschreibung des Protokolls findet sich im Experimentellen Teil.

Für den ersten Test dieses Färbeprotokolls wurden 18 cm 3-10 L IPG-Strips mit 75 µg Protein (WS-25) und 250 µg Protein (WS-26) beladen, für die 2. Dimension wurden 12,5 % T Gele verwendet. Die Gele zeigen, dass 75 µg

nicht ausreichen, um Proteine mittels Coomassie sichtbar zu machen. Mit 250 μg konnte bereits ein recht gutes Ergebnis erzielt werden. Spätere Versuche haben gezeigt, dass man 400 – 600 μg Gesamtprotein auftragen sollte. Abbildung M-5 zeigt einen Ausschnitt aus WS-26. Da das Gel nach dem Trocknen eingescannt wurde, ist die Qualität der Abbildung schlechter als das eigentliche Ergebnis.

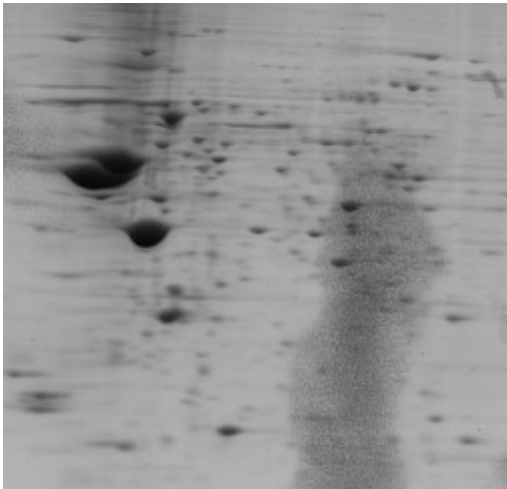


Abb. M-5: Ausschnitt WS-26, pI 3-10 NL, 18 cm, 12,5 % T, 250 μg Protein Coomassie Färbung

Optimierung der 2. Dimension

Durch Variation der Acrylamidkonzentration kann die Laufstrecke der Proteine beeinflusst werden. Um auch hier eine möglichst homogene Verteilung der Spots zu erzielen wurden verschiedene Acrylamidkonzentrationen ausgetestet. Neben linearen Gelen gibt es auch die Möglichkeit Acrylamidgradienten zu gießen. Bei solchen Gelen wird die Acrylamidkonzentration des Trenngels successiv von oben nach unten erhöht. Abbildung M-6 zeigt den Vergleich zwischen einem linearen 12,5 % T Gel, einem Gradientengel 10-15 % T und einem Gradientengel 9-16 % T. Es wurden jeweils 60 μg Gesamtprotein der gleichen Probe auf 18 cm 3-10 NL IPG-Strips fokussiert.

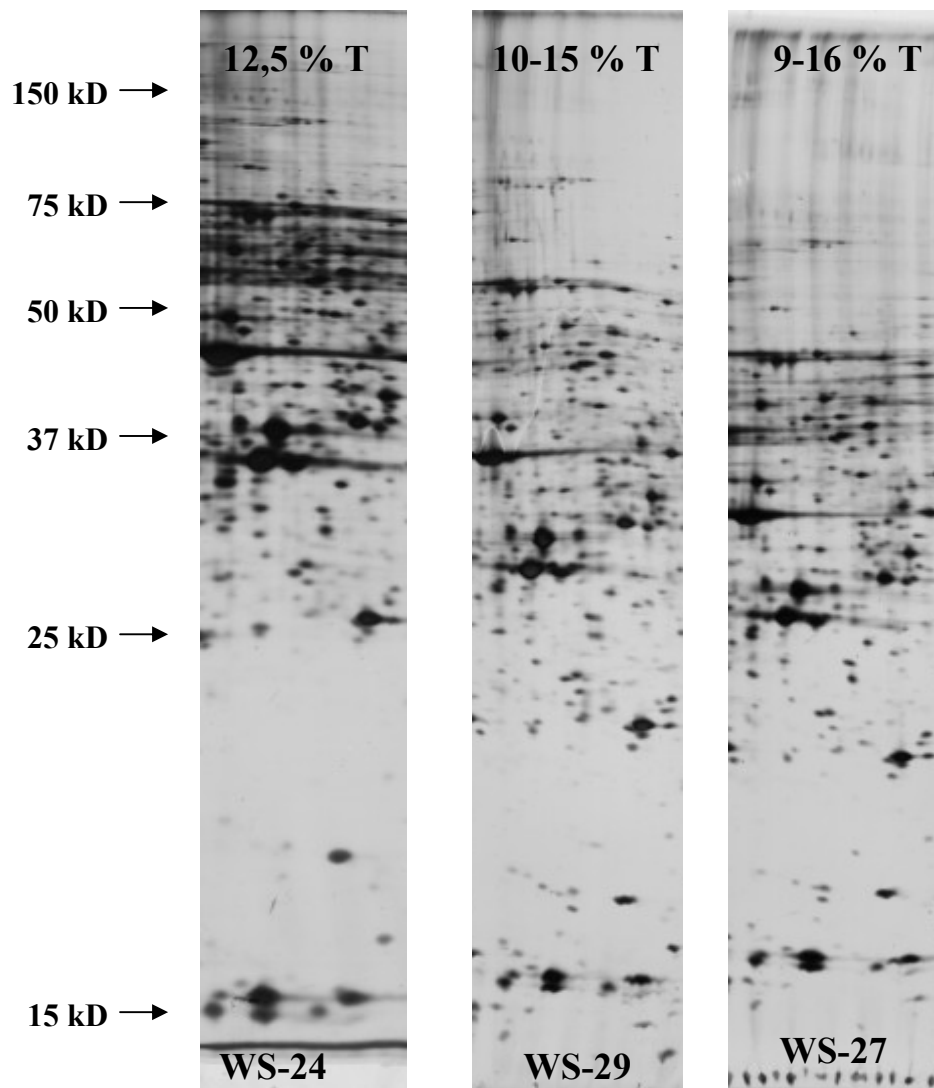


Abb. M-6: Die angegebenen MW beziehen sich nur auf das 12,5 % T Gel.

Man erkennt, dass die Gradientengele eine deutlich bessere Auflösung insbesondere im Bereich von 100 – 25 kDa ergeben. Für die weiteren Arbeiten wurden 10 – 15 % T Gele gewählt.

Versuche zur Fraktionierung

Ziel dieser Versuche war es durch Zentrifugation und Fällung einzelne Fraktionen zu gewinnen und zu untersuchen inwiefern sich die Proteinmuster

unterscheiden. Vorversuche haben gezeigt, dass eine TCA-Aceton-Fällung in diesem Fall einer Acetonfällung vorzuziehen ist.

200 µl der Probe P1-130799 (etwa 3 mg Gesamtprotein) wurden mit Lysispuffer ad 500 µl aufgefüllt und 10 min bei 1000 g zentrifugiert, das resultierende Pellet wurde verworfen und der Überstand anschließend 30 min bei 50.000 g zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden weiter verarbeitet, wobei ein Aliquot von 20 µl des Überstandes mittels TCA/Aceton gefällt und in 350 µl Rehydrierlösung resolubilisiert wurde. Das Pellet wurde 2 mal mit Milli-Q Wasser gewaschen, dann mit 500 µl Lysispuffer versetzt. Anschließend wurden 5 µl 1 N NaOH zugesetzt und diese Mischung 10 min geschüttelt, dann wurden 10 µl 1 N HCl zugesetzt und wiederum für 10 min geschüttelt, in einem dritten Extraktionsschritt wurden 90 mg NaCl und weitere 5 µl NaOH (zur Neutralisation) zugesetzt und erneut für 10 min geschüttelt. Danach erfolgte wie oben beschrieben eine TCA-Aceton-Fällung, nach dem Trocknen wurde das gesamte Pellet in Rehydrierlösung aufgenommen und fokussiert. Durch Änderung des Lysispuffer-pH's sowie durch den Salzzusatz sollten die Membranaggregate aufgeschlossen werden. Die Variation des pH-Wertes sollte insbesondere Proteine, deren *pI* im neutralen Bereich liegt, in Lösung bringen.

Das Gel der löslichen Proteine (WS-36) zeigt etwa 1300 Spots, aufgrund der höheren Proteinbeladung ist die Anzahl der Spots des Gel der Membranfraktion (WS-35) schwer zu ermitteln. Es konnte aber deutlich gezeigt werden, dass sich durch die oben angegebene Vorgehensweise eine Vielzahl an Proteinen in den beiden Fraktionen an- bzw. abreichern lässt (vergleiche Abbildung M-7).

Anmerkung: Falls verfügbar, sollte mit einer Ultrazentrifuge für mindestens 30 min, besser 1 h, bei 100.000 g zentrifugiert werden. Da ein solches Gerät nicht zur Verfügung stand, wurde bei lediglich 50.000 g zentrifugiert.

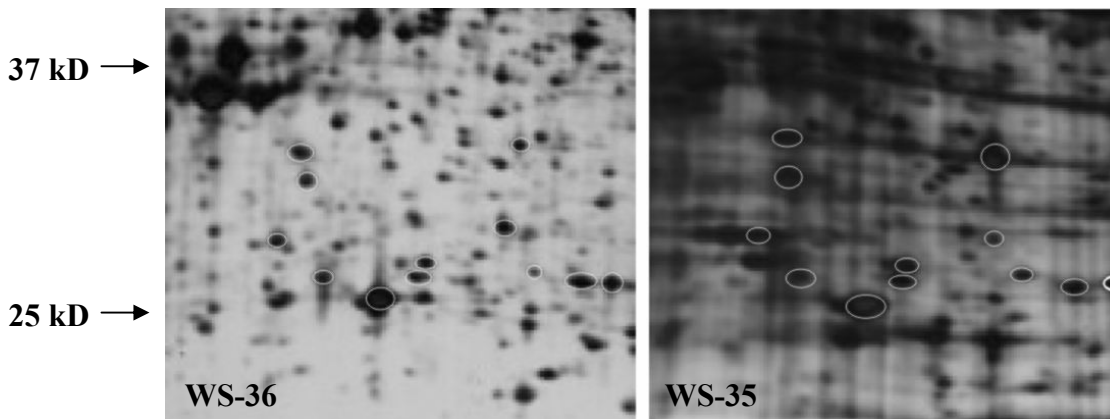
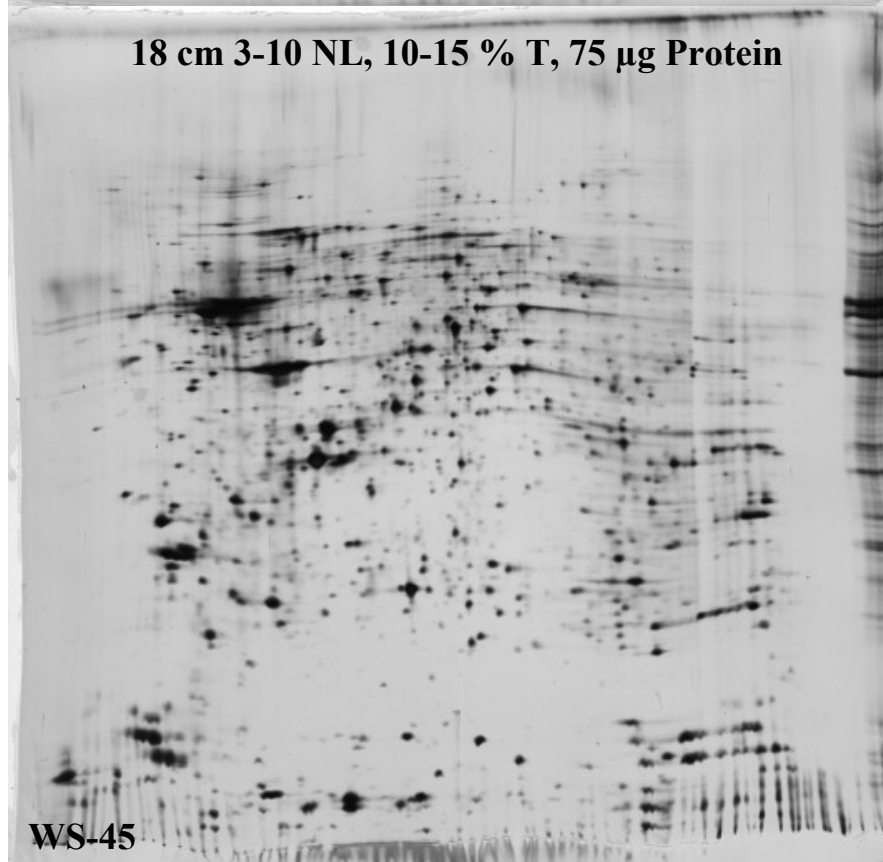
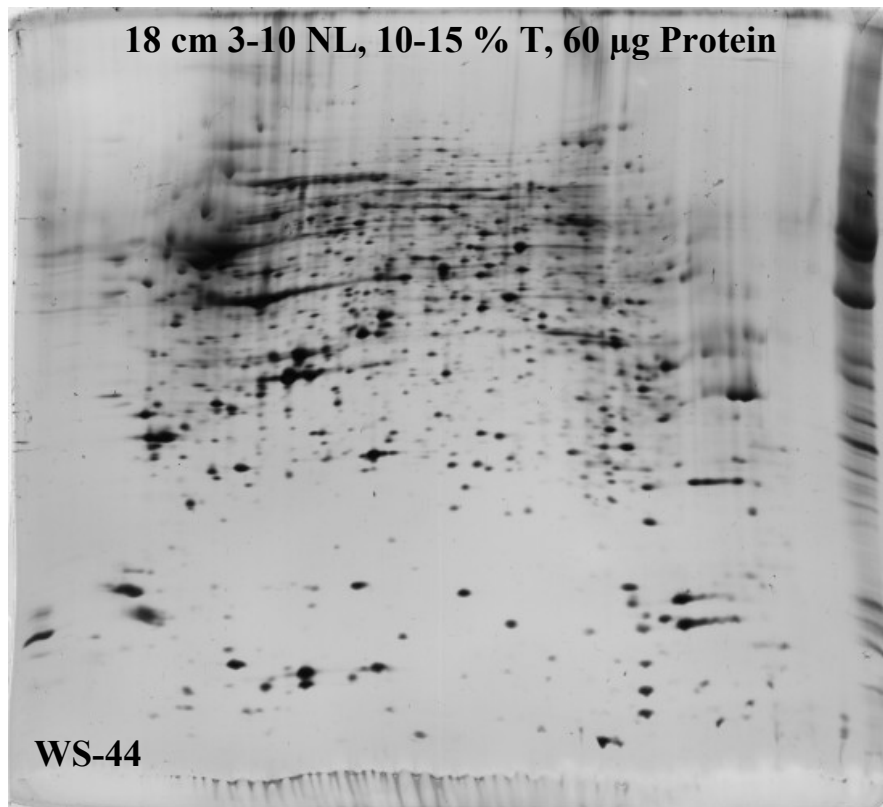


Abb. M-7: Ausschnitt aus dem pI Bereich 5-6, zur besseren Orientierung wurden einige der übereinstimmenden Spots eingekreist.

Häufiges Einfrieren und Auftauen einer Probe

Da zu Beginn der Versuchsreihe keine Aliquotierung vorgenommen worden war, wurde im Verlauf der Methodenentwicklung immer wieder die gleiche Probe verwendet. Betrachtet man die Gele WS-29, WS-44, WS-45, WS-47, so stellt man fest, dass im Laufe der Zeit die Anzahl der Spots auf den Gelen rückläufig ist. Diese Feststellung konnte erst rückblickend getroffen werden und dürfte darauf zurückzuführen sein, dass häufiges Auftauen und Einfrieren der Qualität der Probe schadet.

Die Versuche, auf denen die o. g. Feststellung basiert, wurden unternommen, um einen Weg zu finden, den Transfer der Proteine aus dem Strip ins Sammelgel zu verbessern und den IPG-Strip möglichst ohne Einschluß von Luftblasen auf die Oberfläche des Sammelgels zu bringen. Zudem wurde versucht die Rehydrierung der IPG-Strips unter Spannung vorzunehmen^{103,104} und die aufgetragene Proteinmenge wurde erhöht (von 60 µg auf 75 µg), jedoch alles, ohne dass eine signifikante Verbesserung sichtbar geworden wäre. Im Nachhinein betrachtet, wurden eventuelle Verbesserungen durch die im Laufe der Zeit immer schlechter werdende Probe überkompensiert.



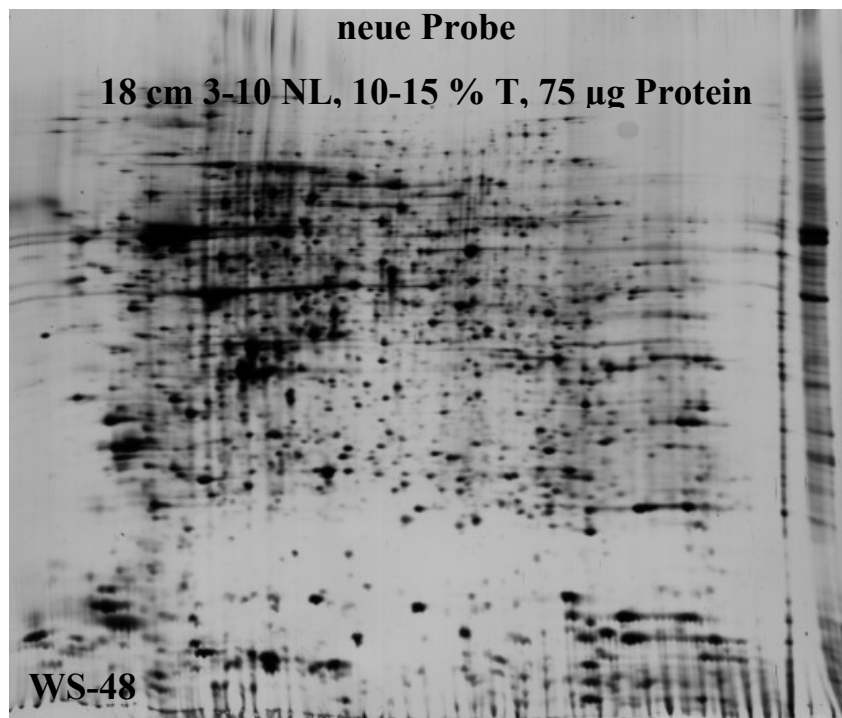
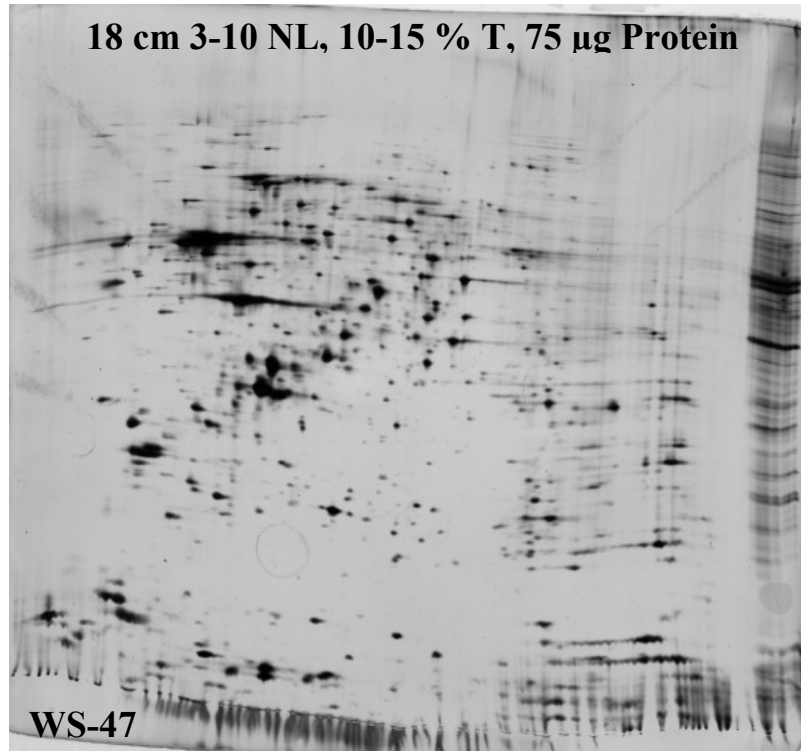


Abb. M-8: Gele WS 44,45,47 zeigen immer schlechter werdende Ergebnisse, da die verwendete Probe immer wieder aufgetaut und eingefroren wurde. WS-48 wurde mit einer frischen Probe hergestellt.

Für das Gel WS-48 wurde eine neue Probe (embryonales Hühnerhirn vom 09.07.99, Hamburger Hamilton Stage 36) verwendet.

Der Transfer des IPG-Strips nach der Equilibrierung auf das Sammelgel ist einer der kritischen Schritte, dies ohne Einschluß von Luftblasen zu erreichen bedarf einer gewissen Übung. Es hat sich gezeigt, dass man am besten mit zwei dünnen Spateln arbeitet, die Kunststoffunterseite des Strips darf nach der Equilibrierung und kurzem abwaschen in Elektrodenpuffer nicht ganz abgetrocknet werden, der Strip wird mit der Kunststoffseite an die hintere Glasscheibe geheftet und anschließend vorsichtig mit den beiden Spateln auf die Sammelgeloberfläche geschoben. Dabei sollte man darauf achten, dass der hintere Teil des IPG-Strips immer auf die Sammelgeloberfläche gedrückt wird. Die zum fixieren des IPG-Strips verwendete Agaroselösung sollte nicht zu heiß sein (40-50°C).

2. Dimension ohne Sammelgel

Es wurde ein erneuter Versuch unternommen ohne Sammelgel die 2. Dimension durchzuführen (Abb. M-9). Der Stromfluß zu Beginn der 2. Dimension wurde von 45 mA auf 20 mA / Gel reduziert, nachdem die Bromphenolblaufront komplett in das Trenngel gewandert war, wurde der Stromfluß auf 45 mA / Gel erhöht. Auch unter Reduktion der Stromstärke konnte kein brauchbares Ergebnis erhalten werden, so dass von dem Versuch 2-DE-Gele ohne Sammelgel anzufertigen endgültig Abstand genommen wurde.

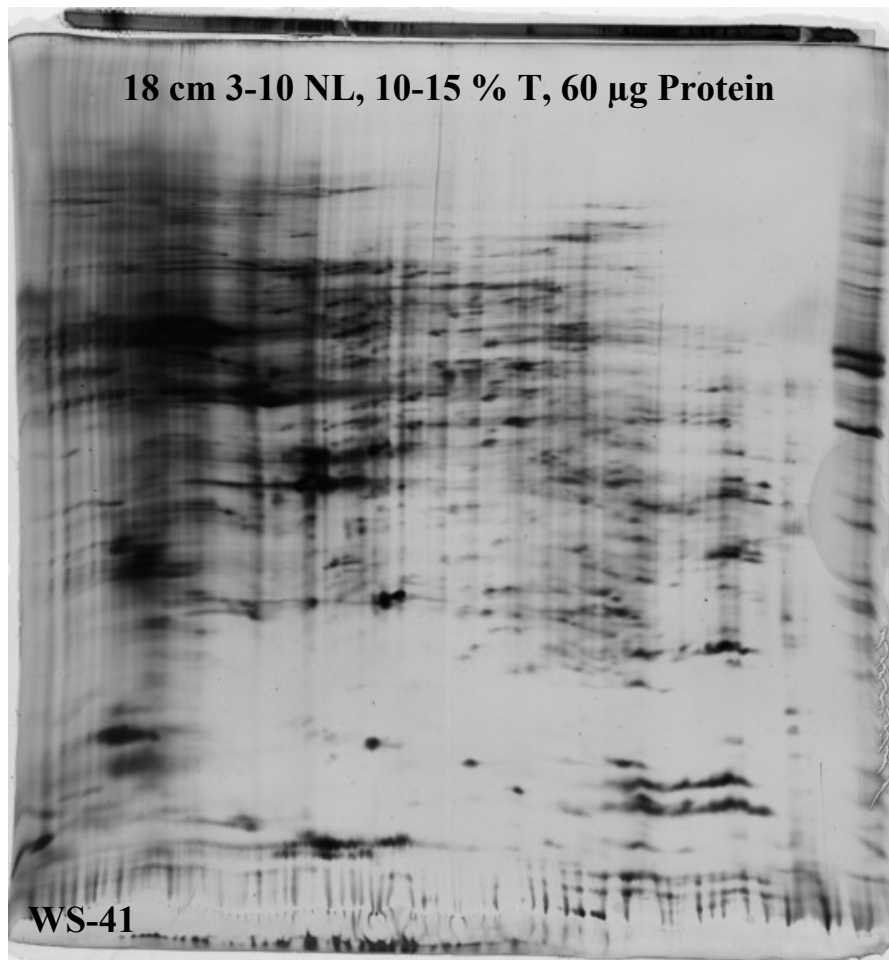


Abb. M-9: Gel WS-41, 2. Dimension ohne Sammelgel

Narrow IPG Strips

Neben den bisher verwendeten IPG-Strips (3-10) sind auch engere pH-Bereiche verfügbar, sowohl von Amersham als auch von Biorad. Im folgenden wurden 18 cm IPG-Strips 4-7 von Amersham (Gel WS-49, 10-15 % T) und 18 cm IPG-Strips 5-8 von Biorad (Gel WS-52, 12,5 % T) getestet. Auf den narrow Strips wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein aufgetragen, auf dem 3-10 NL Strip (WS-56, 10-15 % T) etwa 80 µg. Man erkennt, dass auf den narrow Strips einzelne Bereiche besser aufgelöst sind und diese für eine konkrete Fragestellung mit eingeschränktem pH-Bereich Vorteile

bringen können. Da aber ein möglichst breiter Ausschnitt der Proteine abgebildet werden sollte, wurden weiterhin 3 - 10 NL IPG-Strips verwendet.

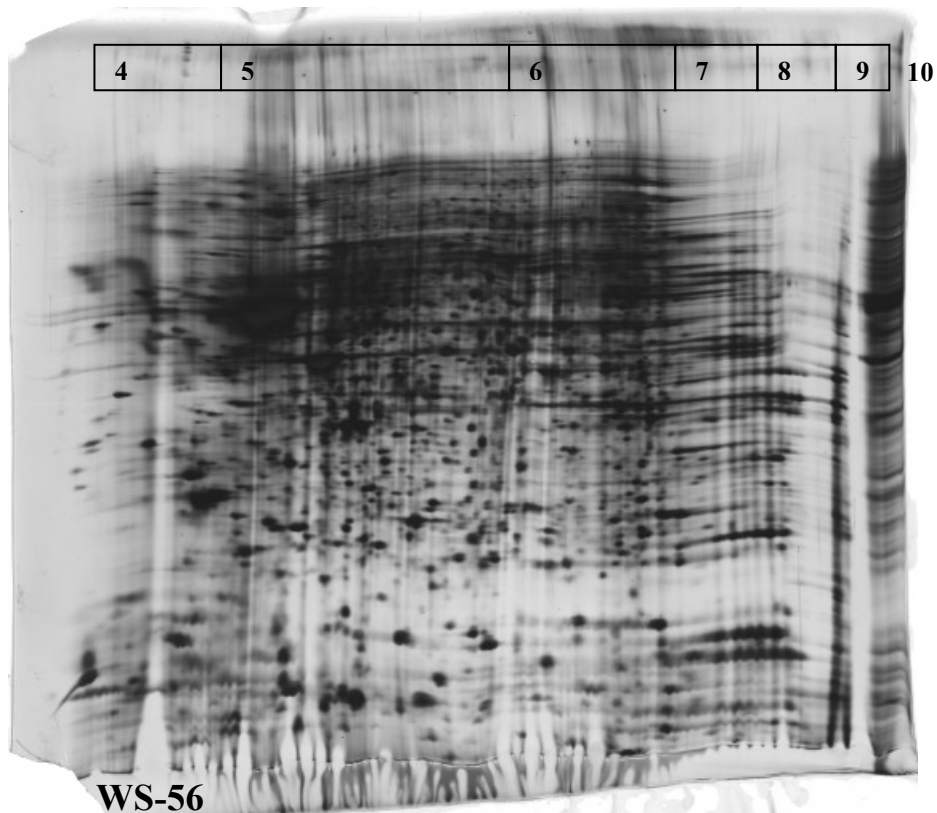


Abb. M-10: pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 78 µg Protein

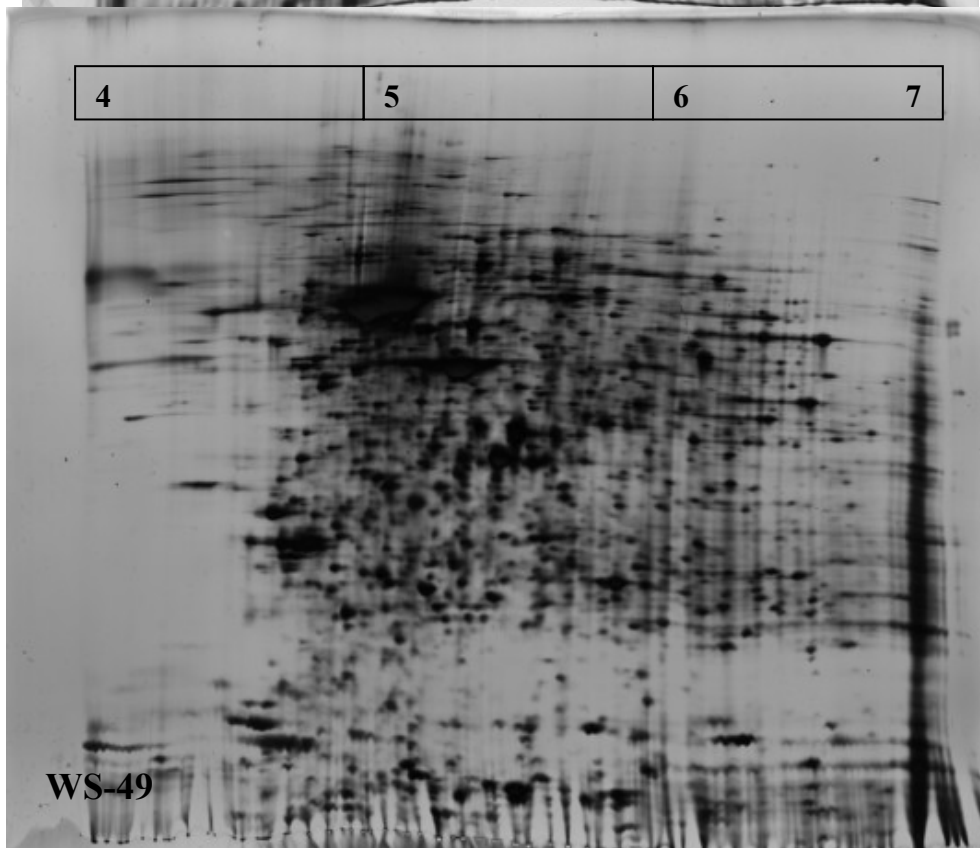
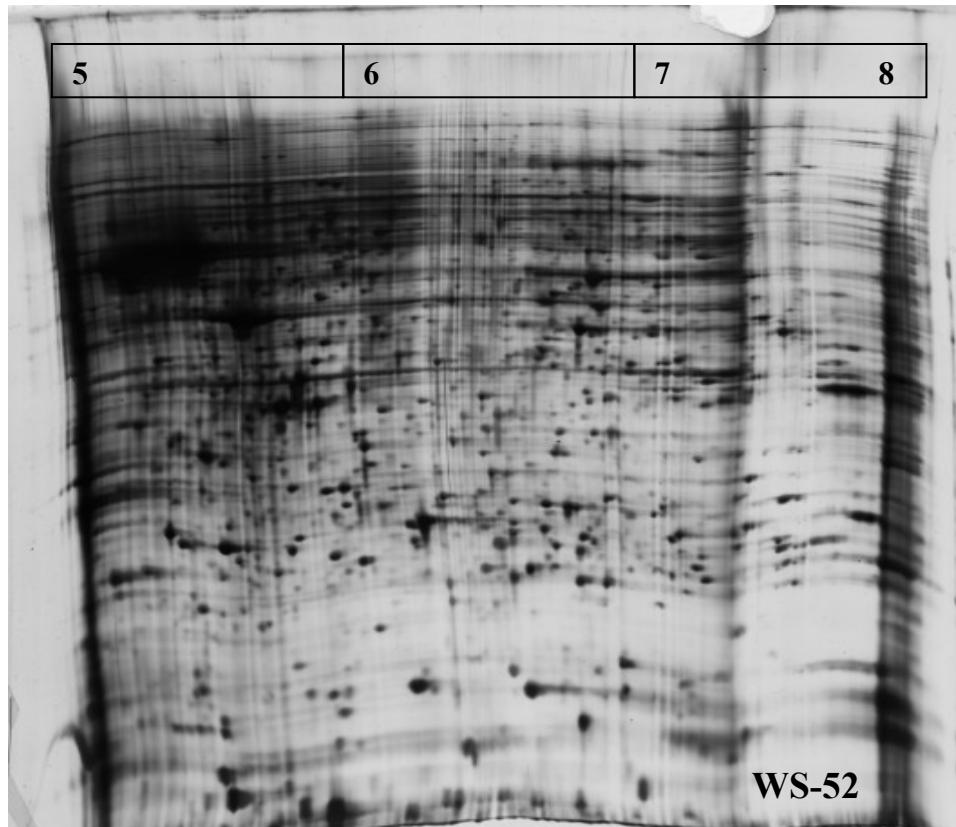


Abb. M-11: WS 52 pI 5-8 L , WS 49 pI 4-7 L

Weitere Erkenntnisse

Rückblickend sind einige weitere Tatsachen aufgefallen, deren Auffinden nicht auf einer gezielten Versuchsplanung beruht.

Das Einfrieren der IPG-Strips nach der isoelektrischen Fokussierung darf nicht bei -20°C erfolgen, hierbei gehen Proteine „verloren“, möglicherweise werden Proteine durch Kristallbildung aus dem Strip gedrängt. Diese Tatsache ist auch in der Literatur beschrieben. Das Einfrieren der IPG-Strips bei $< -78^{\circ}\text{C}$ hingegen führt nicht zu einem Qualitätsverlust⁴². Es ist daher empfehlenswert die IPG-Strips immer bei -80°C einzufrieren, auch dann, wenn sie unmittelbar nach der Fokussierung weiterverarbeitet werden sollen.

Mit Milli-Q Wasser überschichtete Trenngel sollte man nicht längere Zeit stehen lassen, es kommt zur Diffusion von Ionen aus dem Trenngel, dies verschlechtert den späteren Transfer der Proteine vom Sammelgel ins Trenngel. Man sollte entweder das Trenngel mit wassergesättigtem Butanol überschichten, oder etwa eine Stunde nach dem Überschichten des Trenngels mit Milli-Q Wasser, sprich nach dem Polymerisieren, einen Teil Trenngelpuffer zu 3 Teilen Milli-Q Wasser geben.

Fazit zur Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung zur 2-DE hat gezeigt, welche Möglichkeiten es gibt die Auflösung und den aufgelösten Bereich zu beeinflussen. Beginnend mit der Probenaufbereitung, einer etwaigen Fraktionierung, der Zusammensetzung der Rehydrierlösung hinsichtlich Detergenzien, Chaotropen, pH, Ionenstärke, der eingesetzten Proteinmenge, der Auswahl des IPG-Strips sowie der Fokussierungsparameter, der Acrylamidkonzentration in der 2. Dimension und nicht zuletzt der Auswahl eines geeigneten Färbeprotokolls. Ferner konnte die Robustheit der Methode evaluiert werden und praktische Erfahrung in der Herstellung von 2-DE-Gelen gewonnen werden, die letztendlich die Fertigkeit ausmacht, die man für eine reproduzierbare Anwendung der 2-DE benötigt.

Spezifische Färbemethoden -Western blots

Um gezielt einzelne Proteine nachweisen zu können, wurde eine Western blot Methode für funktionell interessante Proteine entwickelt. Da zum damaligen Zeitpunkt noch keine embryonalen Hühnerhirnproben zur Verfügung standen, wurde mit einem Hühner Telencephalon Homogenat gearbeitet (HTE: 7,5 µg/µl Gesamtprotein). Der unten abgebildete Western blot zeigt die hinsichtlich aufgetragener Proteinmenge sowie Verdünnung des Antikörpers optimierte Methode. Es wurden 7 % T Minigele angefertigt, SDS-PAGE nach Lämmli et al.³⁵ durchgeführt, der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte nach einem Protokoll von Khyse-Anderson¹⁰⁵, die anschließende Detektion wurde nach dem Amersham Protokoll zum ECL Kit durchgeführt. Neben Antikörpern, die gegen unterschiedliche Splicevarianten des NMDA Rezeptors NR2a und NR2b gerichtet sind, wurden Estrogen-Rezeptor Antikörper verwendet, α -ER (Santa Cruz SC-543, Lot F228, rabbit polyclonal IgG 200 µg/ml), β -ER (Santa Cruz SC-6820, Lot B179, goat polyclonal IgG 200 µg/ml) und ein Progesteron-Rezeptor Antikörper PR (Santa Cruz SC-539, Lot H117, rabbit polyclonal IgG 200 µg/ml).

| Slot Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Probe | MW | HTE | HTE | HTE | HTE | HTE | HTE | HTE | HTE | HTE |
| Vol [μ l] | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1,2 | 1,2 |
| Protein [μ g] | | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 10 | 10 |
| Verd NR2a | 1:1000 | 1:1000 | | | | | | | | |
| Verd NR2b | | | 1:1000 | 1:1000 | | | | | | |
| Verd PR | | | | | | | | | 1:1000 | 1:1000 |
| Verd β -ER | | | | | 1:300 | 1:300 | | | | |
| Verd α -ER | | | | | | | 1:300 | 1:300 | | |
| sek AK rabbit | | | | | | | 1:6000 | 1:6000 | 1:6000 | 1:6000 |
| sek AK goat | 1:6000 | 1:6000 | 1:6000 | 1:6000 | 1:6000 | 1:6000 | | | | |

Tab. M-2: Pipettierschema zur Abb. M-12

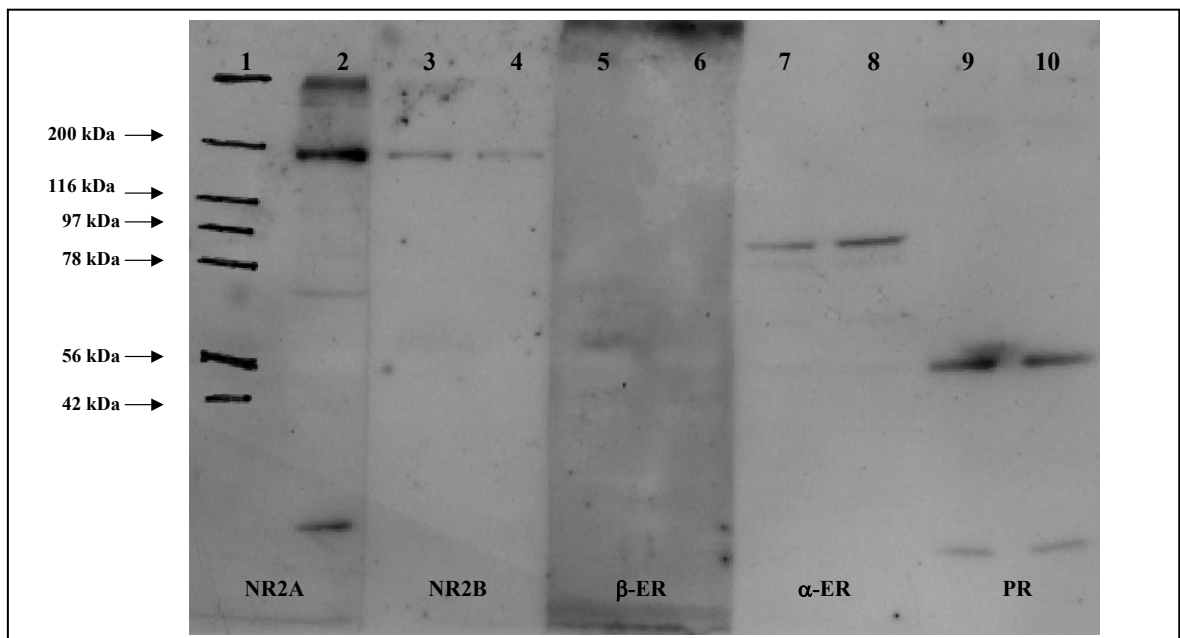


Abb. M-12: 1-DE SDS-PAGE, Western blot , Belichtungszeit 15 s

Der Progesteron-Rezeptor Antikörper ist sowohl gegen den humanen PR-A als auch gegen PR-B gerichtet. Kreuzreaktion mit Maus und Ratte wird in der Produktbeschreibung angegeben. Der Blot in Abbildung M-12 zeigt, dass das zur Herstellung des Antikörpers verwendete Peptid zwischen Mensch und Huhn eine ausreichende Konservierung aufweist, um zu einem selektiven Nachweis des chicken PR-A und PR-B zu führen¹⁰⁶. Gleiches gilt für den gegen ein humanes Peptid gerichteten α -ER Antikörper, der Western blot auf den β -ER (ebenfalls human) führte zu keinem auswertbaren Ergebnis.

2-DE Western blot auf Progesteron Rezeptor

Mit den im 1-DE Western blot optimierten Versuchsbedingungen wurde ein Versuch unternommen einen Western blot auf PR und α -ER nach 2-DE zu erhalten. Es wurden 7,5 μ g Protein aufgetragen, zum Vergleich wurde ein zweites 2-DE Minigel angefertigt und mit Silber gefärbt. Nach Western blot und Detektion mittels PR Antikörper / ECL wurde die PVDF-Membran nochmals über Nacht blockiert und eine zweite Detektion mittels α -ER Antikörper (1:500) versucht. Abbildung M13 zeigt die Detektion des PR im Vergleich zum silbergefärbten Gel. Der Western blot auf α -ER führte zu keinem signifikanten Ergebnis.

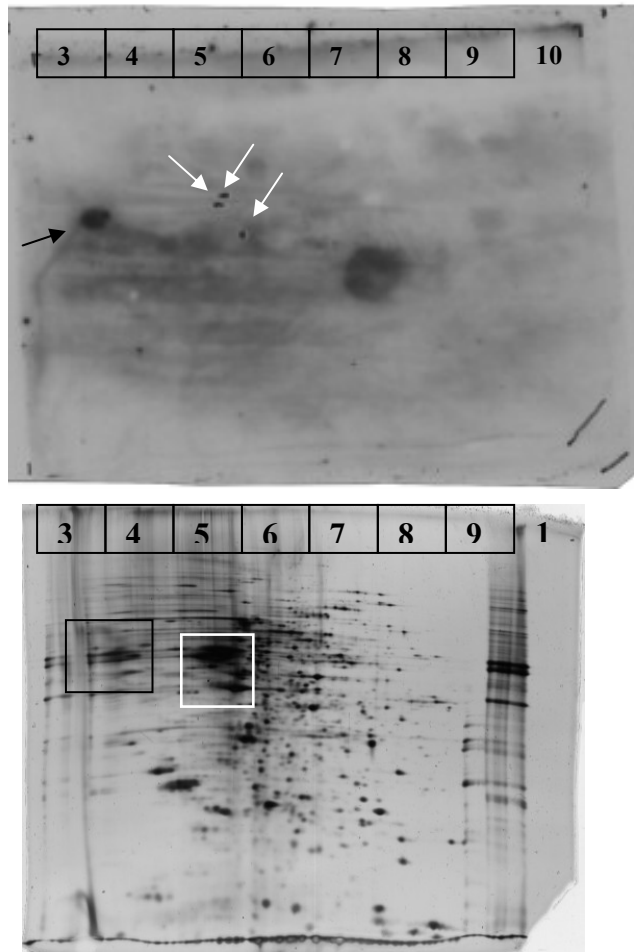


Abb. M-13: *pI* 3-10 L, 7 cm, 7,5 μ g Protein, Vergleich Silberfärbung (unten) Western blot auf PR (oben)

Zur Orientierung auf dem Western blot wurde die PVDF-Membran mit Indian Ink gefärbt und die kräftigsten Spots mit einem Bleistift markiert (weiße Pfeile), diese korrespondieren mit den 3 kräftigsten Spots des Silbergels (weiße Umrandung). Der mit dem schwarzen Pfeil markierte Spot auf dem PR Western blot passt sowohl dem Molekulargewicht als auch dem *pI* nach zum chicken PR-A' (47 kDa, *pI* 4,38). In der Swissprot Datenbank sind für den chicken Progesteron-Rezeptor (P07812) insgesamt 4 Splice Varianten beschrieben: PR-A (85,7 kDa, *pI* 5,07), PR-A' (47,8 kDa, *pI* 4,38), PR-B (71,8 kDa, *pI* 7,78) und PR-B' (33,9 kDa, *pI* 4,9).

Erstellung einer Access[®] Datenbank zur Dokumentation

Warum eine Datenbank zur Dokumentation?

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Techniken gibt es eine Vielzahl an redundanten Vorgängen, bzw. Vorgängen, die sich mit lediglich kleinen Modifikationen wiederholen. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass es Sinn macht, in einem Labor, in dem mehrere Mitarbeiter an verschiedenen Projekten arbeiten, eine einheitliche Basis für die Dokumentation zu schaffen.

Die Dokumentation an sich ist eine recht unbeliebte Tätigkeit und sollte daher so einfach wie möglich gemacht werden. In der pharmazeutischen Industrie wird die Dokumentation in einem rechtlich eng abgesteckten und von den Behörden kontrollierten Rahmen gefordert. Von einer Dokumentation, die allen Anforderungen an GLP (Good Laboratory Praxis) genügt, wurde aus Gründen der Einfachheit abgesehen. Dies in einem Forschungslabor mit einer hohen Fluktuation der Mitarbeiter (Diplomanden) zu implementieren und aufrecht zu erhalten dürfte schwierig sein und ist nicht erforderlich. Ein Beispiel für eine universitär erstellte Proteomics-Datenbank findet man bei Cho et al¹⁰⁷.

Microsoft Access 2000[®]

Es wurde MS Access 2000[®] verwendet, da bereits einige Erfahrung im Erstellen von Datenbanken mit dieser Software existiert. Access[®] ist als ein Baustein des Microsoft Office[®] Pakets eine weltweit eingesetzte Standardsoftware. Demnach ist es möglich, dass nicht nur der Ersteller der Datenbank spätere Modifikationen und Ergänzungen vornehmen kann. Die Struktur der Datenbank ist jedem anderen versierten Nutzer mit den entsprechenden Zugriffsrechten zugänglich.

Die folgenden allgemeinen Ausführungen zu Microsoft Access 2000[®] sollen lediglich dazu dienen, dass auch Leser, die nicht mit der Struktur von Access vertraut sind, die folgenden Abschnitte verstehen. Es wird nur das Gerüst der Software beschrieben, es gibt eine Vielzahl weiterer Funktionen und Möglichkeiten, von denen auch bei der Erstellung der Datenbank Gebrauch gemacht wurde, die hier aber nicht näher diskutiert werden.

Die wesentlichen Elemente einer Access Datenbank sind Tabellen, Abfragen, Formulare, Berichte und Makros.

In den Tabellen werden die Daten gespeichert, hier werden die Datenfelder definiert und deren Format vorgegeben. Beispiele für unterschiedliche Formate sind Datum, Zahl, Text, Memo (größerer Text), Ja/Nein – Feld, Autowert. Jede Tabelle verfügt über ein Schlüsselfeld, es ist nicht möglich innerhalb einer Tabelle mehrmals die gleiche Eingabe in dieses Schlüsselfeld zu machen. Über das Schlüsselfeld können Tabellen miteinander verknüpft werden. Redundante Information innerhalb der Datenbank wird so vermieden.

Abfragen dienen dazu Datensätze flexibel zusammenzustellen, aus einer oder mehreren verknüpften Tabellen können Datenfelder ausgewählt und nach Vorgabe des Erstellers gefiltert werden. Desweiteren lassen sich auf der Ebene der Abfragen Ausdrücke definieren, mit denen beispielsweise Berechnungen vorgenommen werden können.

Formulare bieten die Möglichkeit Datensätze aus Tabellen oder Abfragen anschaulich darzustellen. Über Formulare erfolgt in der Regel auch die Eingabe neuer Datensätze. Formulare sind außerdem sehr hilfreich bei der Erstellung einer bedienerfreundlichen und übersichtlichen Benutzeroberfläche, über Schaltflächen kann man von einem Formular zum nächsten gelangen und dabei zusätzlich Datensätze filtern.

In Berichten werden die Daten für einen Ausdruck aufbereitet. Berichte basieren genau wie die Formulare auf Tabellen oder Abfragen.

Makros dienen der Automation von Abläufen und können so gestaltet werden, dass Fehler durch den Benutzer weitestgehend ausgeschlossen werden. Mittels

Makros lassen sich beispielsweise komplexere Codes für Schlüsselfelder automatisch generieren.

Eine Access Datenbank kann in einem Netzwerk installiert werden und somit vielen Nutzern gleichzeitig zugänglich gemacht werden. Hinsichtlich der Datensicherheit kann der Administrator den Einzelnen Nutzern unterschiedliche Rechte zuweisen. Änderungen an der Struktur vorzunehmen ist dem Administrator vorbehalten, der Zugriff auf bestimmte Elemente der Datenbank kann Einzelnen komplett verweigert werden. Es gibt die Möglichkeit, dass Daten nur gelesen werden können oder dass Datensätze zwar angefügt, nicht aber modifiziert oder gelöscht werden können. Es lassen sich Gruppen von Nutzern mit identischen Rechten definieren. Personen, die sich beim Versuch die Datenbank zu öffnen, nicht als Mitglieder der Arbeitsgruppe identifizieren können, wird der Zugriff auf die Datenbank verweigert. Datensicherheit und Schutz vor Mißbrauch ist, soweit dies überhaupt möglich ist, gegeben.

Access Datenbanken lassen sich derart gestalten, dass selbst jemand, der nie zuvor mit Access gearbeitet hat, eine solche Datenbank nutzen kann.

Aufbau der Datenbank 2-D-Doc

Um auch ausländischen Mitarbeiter direkten Zugang zur Datenbank zu ermöglichen wurde als Sprache zur Erstellung Englisch gewählt. Für jeden Benutzer wird ein Benutzerkonto eingerichtet, die Zuteilung der Rechte erfolgt durch Zuordnung zu einer oder mehreren Benutzergruppen mit vordefinierten Rechten.

Abbildung D-1 gibt eine Übersicht zur Struktur der Datenbank, wesentliche Elemente sind eine Mitarbeiter- und Projekt-bezogene Dokumentation der 2-DE-Gele sowie die Dokumentation von Lösungen, die für die 2-DE benötigt werden, insbesondere solcher, die nicht zum unmittelbaren Verbrauch bestimmt sind. Abbildung D-1 zeigt die Hierarchie der Daten, die angegebenen Schlagwörter stehen für die einzelnen Tabellen.

Zur Erläuterung: Einem Projekt können mehrere Proben zugeordnet werden, zu jeder dieser Proben kann es mehrere 2-DE-Gele geben, wobei jedes Gel von einem bestimmten Mitarbeiter angefertigt wird.

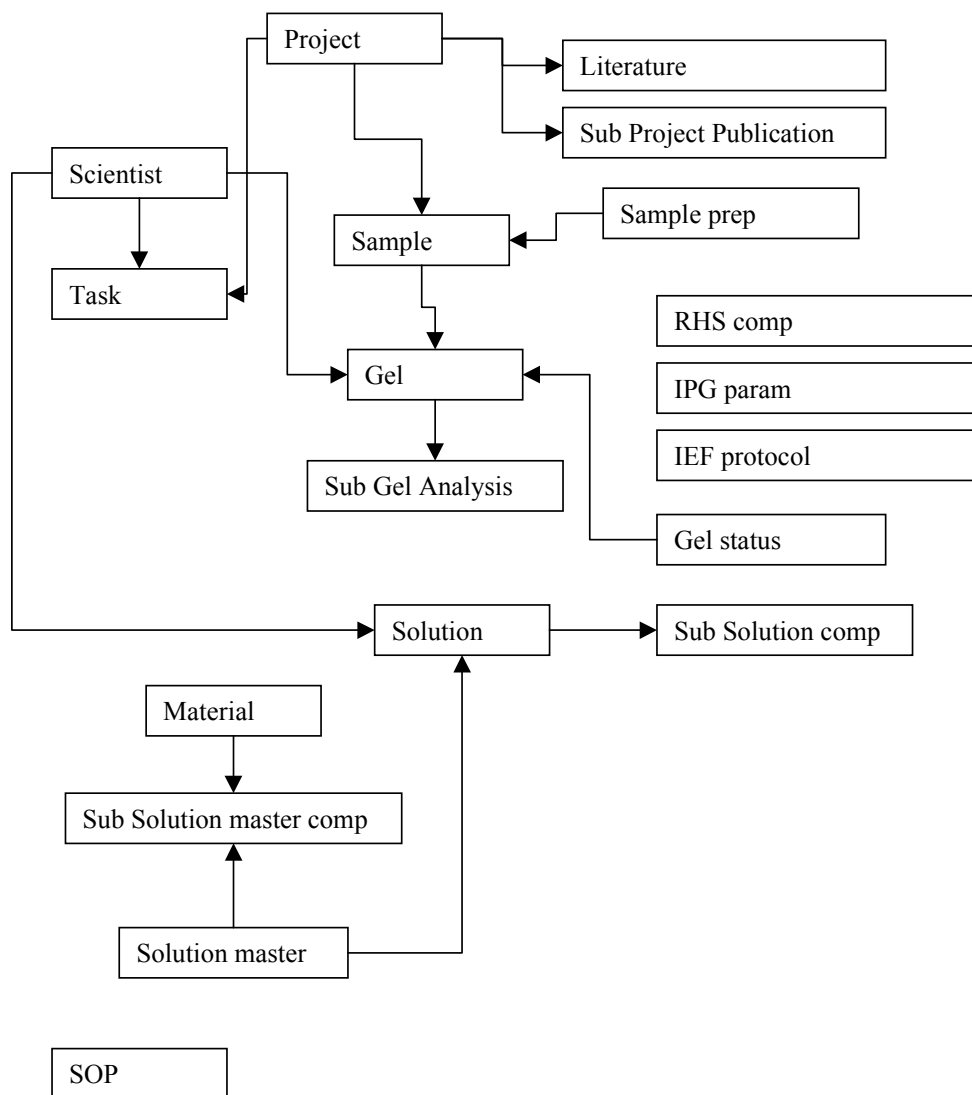


Abb. D-1: Struktur der Datenbank 2D-Doc

Umsetzung der Datenbank 2D-Doc

Über die Startseite (Abb. D-2), die automatisch beim Öffnen der Datenbank geladen wird, gelangt man durch anklicken der zentralen Grafik auf das sog. Switchboard_1 (Abb. D-3). Dies ist der Verteiler, von dem aus man zu sämtlichen Formularen und Berichten gelangt. Eine Umsetzung der oben gezeigten Struktur in eine Access Datenbank zeigt Abbildung D-4, hier werden die Tabellen der Datenbank mit den entsprechenden Verknüpfungen gezeigt.

Im Folgenden werden kurz die einzelnen Elemente der Datenbank in der Reihenfolge, wie sie sich auf Switchboard_1 (Abb. D-3) finden, besprochen. Alle grau-unterlegten Felder sind gesperrt, d. h. Daten in diesen Feldern können nicht geändert werden.

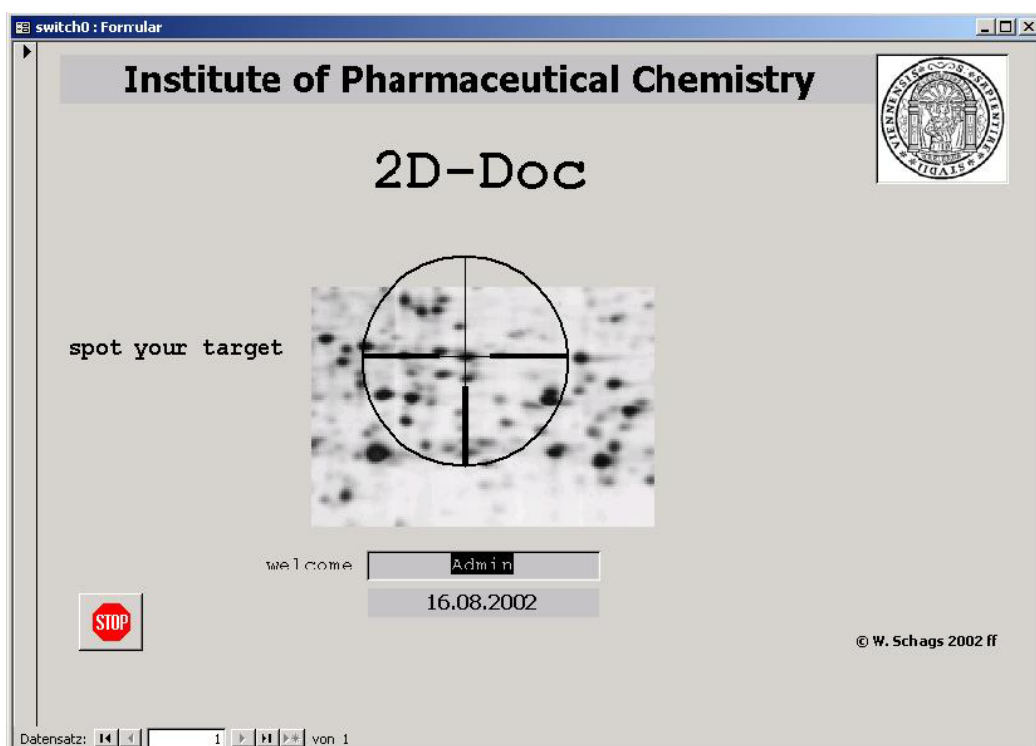


Abb. D-2: Startseite

The screenshot shows a software window titled "Organisation". On the left, there is a list of fields with corresponding text boxes: Lab Code (empty), Name (Institute of Pharmaceutical Chemistry), Street and No (Althanstr. 15), Zip and City (A-1090 Wien), Country (Austria), Head (Prof. C. R. Noe), Phone (0043-1-427755103), Fax (0043-42779551), and e-mail (christian.noe@univie.ac.at). On the right, there is a "Logo" field containing a circular seal of the University of Vienna. The seal features a central figure holding a scale and a sword, surrounded by the Latin text "VIENNENSIS * S * SEPTENTRIS * STUDI *". Below the logo is a small icon of a printer. At the bottom of the window, there is a status bar with the text "Datensatz: 1 von 1" and navigation buttons.

Abb. D-5: „Laboratory“ / Labor

„Laboratory“ / Labor

Hier werden die Daten zum Labor sowie das Logo gespeichert. Diese Daten können nicht über das Formular geändert werden, sämtliche Felder sind gesperrt. Änderungen können nur durch den Administrator vorgenommen werden. Die Switchboards sowie die Berichte greifen auf das Logo und die Bezeichnung des Labors zu. Werden diese Angaben geändert, passen sich Logo und Bezeichnung automatisch an. Dies hat den Vorteil, sollten sich Logo oder Bezeichnung ändern, muss diese Information lediglich an einer Stelle geändert werden.

„Scientists“ / Mitarbeiter

Neben den allgemeinen Daten zu den Mitarbeitern finden sich hier sogenannte Unterformulare. In Form von Registersteuerelementen werden Gele, Tasks und die hergestellten Lösungen des einzelnen Mitarbeiters gezeigt. Von hier aus gelangen die Mitarbeiter über die Buttons „go to your tasks“, „view your gels“ und „your gels overview“ zu Formularen, auf denen Eingaben vorgenommen werden können. Die Daten auf den Formularen, die man vom Formular Scientist (Abb. D-6) erreicht, werden so gefiltert, dass nur die für den entsprechenden Mitarbeiter relevanten Datensätze angezeigt werden.

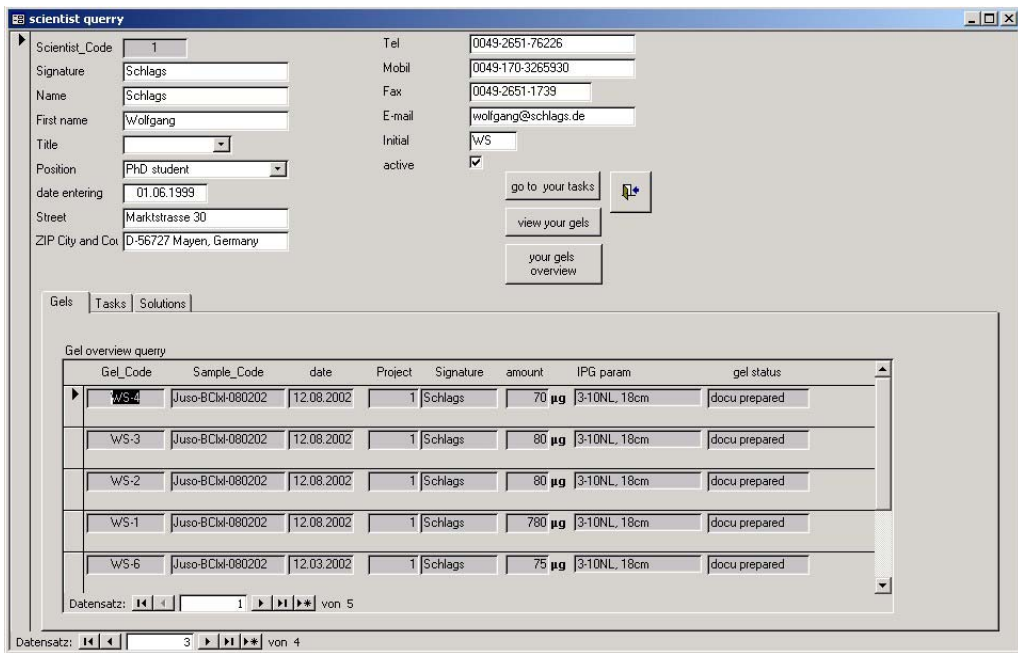


Abb. D-6: „Scientist“ / Mitarbeiter

„Tasks“ / Aufgaben

Aufgaben werden mit Datum und zugehörigem Projekt unter „Tasks“ angelegt. Es wird ein verantwortlicher Mitarbeitern ausgewählt, sobald die Aufgabe erledigt ist, wird kurz die Vorgehensweise dokumentiert und die Aufgabe als erledigt gekennzeichnet. Jeder Mitarbeiter kann sich ausgehend vom Formular Scientist seine „Tasks“ nach absteigendem Datum ansehen.

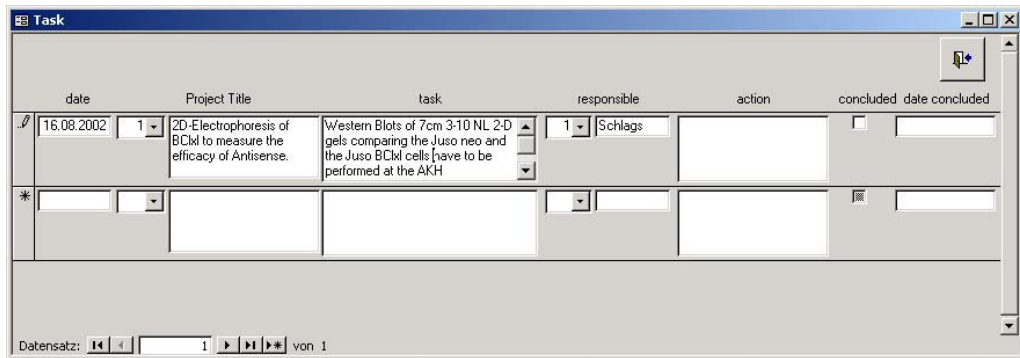


Abb. D-7: „Tasks“ / Aufgaben

„SOP’s“ / Standardarbeitsanweisungen

Standardarbeitsanweisungen werden hier verwaltet. Diese, beispielsweise in Word erstellten Anweisungen, können direkt mit der Datenbank verknüpft und von dem in Abbildung D-8 gezeigten Formular geöffnet werden.



Abb. D-8: „SOP’s“ / Standardarbeitsanweisungen

„Project“ / Projekt und „Samples“ / Proben

Nachdem die allgemeinen Daten zum Labor sowie die Daten der Mitarbeiter eingegeben wurden, müssen als nächstes die laufenden Projekte erfasst werden. Den Projekten werden die verfügbaren Proben zugeordnet. Es besteht eine Verknüpfung zwischen der Tabelle Projekte und der Tabelle Proben. Ein Projekt kann viele Proben enthalten, nicht aber umgekehrt (Verknüpfungsart 1 – ∞). Das Registersteuerelement „Samples“ / Proben kann zur Eingabe neuer Proben verwendet werden. Jede Probe erhält einen frei wählbaren Code, es gibt die Möglichkeit eine kurze Beschreibung der Probe zu hinterlegen sowie die Herkunft und Proteinkonzentration der Probe. Außerdem muss der Probe eine Probenaufarbeitungsmethode („Sample prep“) zugeordnet werden.

The screenshot shows a software window titled "Project query". It contains several input fields and buttons for managing project and sample data.

Project Information:

- Project Code: 1
- Project Title: 2D-Electrophoresis of BCkl to measure the efficacy of Antisense.
- Project started: 01.08.2001
- Project description: Aim of the project is to separate BCkl by 2-DE. A genetically modified Juso cell-line showing an overexpression of BCkl is available from the group of Prof Pehamberger. Furthermore other proteins which are co-regulated shall be revealed. Antisense Oligonucleotides shall be applied to the cell-line
- Project Partners: Prof. Pehamberger, Prof. Wacheck, Dr. T. Lukas
- Project concluded:
- Buttons: view project tasks, [Add]

Sample Query Information:

- Sample Code: Juso-BCkl-090202
- Project Code: 1 | 2D-Electrophoresis of BCkl
- Sample description: Genetically modified Juso cell-line showing an overexpression of BCkl.
- Source of sample: AKH Prof Pehamberger
- Sample prep Code: 1
- sample prep short: Juso Cells
- sample prep: The cells are centrifuged at 1500 g for 10 min, washed with
- sample prep date: 10.02.2002
- sample prep done by: Schlags
- Protein conc: 7,5 µg/µl
- docu of protein conc: Bradford Assay
- comment: [Empty field]
- link to prot conc det: [Empty field]
- store at: -80°C
- Buttons: view corresponding gels, [Add]

At the bottom, there is a status bar: Datensatz: 1 von 1

Abb. D-9: „Project“ / Projekt

Dokumentation

Unter dem Registersteuerelement „Gels“ / Gele finden sich alle im Laufe der Zeit zu dem gewählten Projekt angefertigten Gele, unabhängig davon wer sie hergestellt hat. Über den Button „view corresponding gels“ auf dem Registersteuerelement „Samples“ lassen sich alle Gele anzeigen, die mit dieser Probe angefertigt wurden.

„Gels further analysis“ zeigt alle weiteren Untersuchungen, die mit den 2-DE-Gelen zu diesem Projekt angefertigt wurden. Unter Literatur kann die für dieses Projekt relevante Literatur gespeichert werden, es besteht die Möglichkeit *.pdf – Dateien oder das Ergebnis einer Literatursuche in Form eines Endnote-files zu verknüpfen. Unter „Publications“ besteht die Möglichkeit Veröffentlichungen, die mit dem Projekt in Zusammenhang stehen, zu dokumentieren.

„Sample prep“ / Probenaufarbeitung

Wie bereits erwähnt, benötigt man zur Eingabe einer neuen Probe die zugehörige Probenaufarbeitungs-Methode. Diese wird unter „sample prep“ eingegeben.

IPG para / RHS comp / IEF prot

Diese drei Formulare bieten die Möglichkeit Parameter, die bei der Fokussierung der 2-DE-Gele immer wieder vorkommen, als Datensätze zu speichern. Im späteren Verlauf der Dokumentation der Gele kann auf diese Parameter zugegriffen werden. Unter „IPG param“ werden Informationen zu den IPG-Strips gespeichert, „RHS comp“ gibt die Zusammensetzung der Rehydrierlösung an und „IEF prot“ gibt die Parameter für die isoelektrische Fokussierung vor.

IPG param query

IPG param: 3-10NL, 18cm

strip length: 18cm

pH from: 3

pH to: 10

L or NL: NL

IPG Buffer: 3-10 NL

IPG Buffer conc: 5µl/ml

total Volume: 350µl

valid:

Datensatz: 1 von 1

Abb. D-10: "IPG param" / IPG parameter

RHS comp query

RHS Code: RHS-1

Chaotropes: Urea 8M / Thiourea 2 M

Detergents: Chaps 4% / Triton X 100 0,5%

reducing Agent: DTT 5mg/ml

additional component:

valid:

Datensatz: 1 von 1

Abb. D-11: „RHS comp“ / Zusammensetzung der Rehydrierlösung

IEF protocol Code: IEF-1
 date entered: 09.08.2002
 entered by: Schlags
 Rehydration time: 12h
 Rehydration temp: 20° C
 Rehydration volt: 0 V
 IEF temp: 20° C
 max current: 50 µA
 valid:

| Step | Mode | Voltage (V) | Time (h) |
|------|-------------|-------------|----------|
| S1 | Gradient | 1000 | 1 |
| S2 | Gradient | 2000 | 0,5 |
| S3 | Gradient | 4000 | 0,5 |
| S4 | Gradient | 8000 | 0,5 |
| S5 | Step-n-hold | 8000 | 7 |
| S6 | | 0 | |
| S7 | | 0 | |
| S8 | | 0 | |
| S9 | | 0 | |

Datensatz: 1 von 2

Abb. D-12: „IEF prot“ / Protokoll zur isoelektrischen Fokussierung

„Gel setup“ / Anlegen einer neuen Gel Dokumentation

Der Gel-Code wird automatisch durch Ausführung eines Makros erzeugt und hat folgendes Format: Initialen des Mitarbeiters – fortlaufende Nummer der Gele dieses Mitarbeiters. Beispiel: Gel-Code NF-27 entspräche Gel mit der laufenden Nummer 27 von Niko Frick. Um den Gel-Code erzeugen zu können müssen zuvor einige Parameter gesetzt werden: Als erstes wird der Mitarbeiter ausgewählt, beim verlassen des Feldes Mitarbeiter-Code werden über ein Makro automatisch zwei Abfragen geöffnet: Die eine zählt alle Gele, die dieser Mitarbeiter bis dato erstellt hat, die zweite zählt alle Gele, die im Labor erstellt wurden. Als zweites sollte dem Gel ein Titel vergeben werden, diese Eingabe ist jedoch nicht zwingend. Dann wird die Probe ausgewählt, es ist darauf zu

achten, dass der Probe der entsprechende Proteingehalt zugeordnet wurde, da dieser für die Berechnung des zu pipettierenden Volumens benötigt wird. Als Datum wird automatisch das Datum des aktuellen Tages eingesetzt (Abruf erfolgt über das Datum der Systemsteuerung), dieses Datum kann, für den Fall das die Eingabe retrospektiv erfolgt, beliebig geändert werden. Bevor der Code erzeugt werden kann, müssen jetzt noch die zu verwendende Rehydrierlösung, die IPG-Parameter sowie die Parameter zur isoelektrischen Fokussierung ausgewählt werden. Durch betätigen des Buttons „create Code and enter settings“ wird nun der Gel-Code erzeugt, das Proben Volumen berechnet, die Werte für die laufenden Gelnummern übertragen und die entsprechenden Werte für die Rehydrierlösung, IPG-Parameter und IEF-Parameter eingesetzt. Wie man auf der Abb. D-4 sieht, wurde bewusst keine Verknüpfung zu diesen Parametern erstellt. Kleinere Abweichungen von diesen Parametern können jetzt innerhalb des Datensatzes des neuen Gels vorgenommen werden, ohne die übergeordneten Parameter-Datensätze ändern zu müssen. Um das Anlegen einer neuen 2-DE-Gel-Dokumentation zu vereinfachen, wurde die Möglichkeit geschaffen, die Parameter einer bereits existierenden Dokumentation zu übernehmen. Häufig bauen die Versuche aufeinander auf, so dass sich nur wenige Parameter ändern. Im Feld „enter Gel-Code“ wird der Code des Gels eingegeben, von dem die Parameter übernommen werden sollen, durch betätigen des Funktionsfelds „set parameters“ wird ein Makro ausgeführt, das die Parameter des gewählten Gels in die neue Dokumentation einfügt. Jetzt müssen nur noch die Änderungen der aktuellen Dokumentation eingegeben werden. Von diesem Formular aus kann eine Dokumentationsseite ausgedruckt werden. Sind alle Parameter eingegeben, kann über den „Gel setup“ sehr rasch eine vollständige Dokumentation zu einem 2-DE-Gel erstellt werden.

The screenshot shows the 'Gel query' software interface with the following fields and values:

- Gel Code:** WS-8
- Scientist Code:** 1
- Gel Status:** 1
- Gel Title:** Gesamt Hirn (keine TCA_Ac Fällung)
- Sample Code:** Chick-1-G-130799
- Sample amount:** 60 µg
- Sample volume:** 40.00 µl
- Protein conc:** 1.5 µg/µl
- date started:** 21.08.2002
- Year:** 2002
- running no. lab:** 8
- running no. scientist:** 8
- Rehydrationsolution:** RHS-1_ohne
- IPG parameters:** 3-10 L, 18 cm
- IEF protocol:** Chicken-18cm
- second dim AA:** 10%T
- gel image:** (empty field)
- comment:** 2. Dimension 45 mA/Gel. Kypostat auf 12°C
- Buttons:** 'create Code and enter settings', 'print gel documentation', 'enter Gel Code', 'set parameters'

Rehydration time: 12

| Parameter | Value |
|--------------------|-------------------|
| Rehydration temp: | 20°C |
| Rehydration volt: | 0 |
| IEF temp: | 20°C |
| max current: | 50µA |
| S1 type: | Gradient |
| S1 voltage: | 500 |
| S1 value: | 1 |
| S1 value type: | h |
| S2 type: | Gradient |
| S2 voltage: | 1000 |
| S2 value: | 1 |
| S2 value type: | h |
| S3 type: | Gradient |
| S3 voltage: | 2000 |
| S3 value: | 1 |
| S3 value type: | h |
| S4 type: | Gradient |
| S4 voltage: | 4000 |
| S4 value: | 1 |
| S4 value type: | h |
| S5 type: | Step-n-hold |
| S5 voltage: | 90nm |
| S6 type: | S6 type |
| S6 voltage: | 0 |
| S6 value: | S6 value |
| S6 value type: | S6 value type |
| S7 type: | S7 type |
| S7 voltage: | 0 |
| S7 value: | S7 value |
| S7 value type: | S7 value type |
| S8 type: | S8 type |
| S8 voltage: | 0 |
| S8 value: | S8 value |
| S8 value type: | S8 value type |
| deviation from th: | deviation from th |
| total Vhrs: | total Vhrs |

Datensatz: 1 | 1000 | 1000 | von 1 (Gefiltert)

Abb. D-13: "Gel setup" / Anlegen einer neuen 2-DE-Gel

Die Abbildung D-14 zeigt wie eine solche Dokumentationsseite aussieht.


| Institut für Pharmazeutische Chemie | |  |
|-------------------------------------|--|---|
| Gel_Code: | WS-81 | |
| Gel Title: | Val1-03.00 Gel 50 C | |
| Project: | Validation | |
| IEF protocol | | |
| IEF-1 | | |
| Rehydration | | |
| 12h | 20° C | 0 V |
| IEF | | |
| 20° C | 50 µA | max. |
| S1 | Gradient | |
| 1000 v | 1 | h |
| S2 | Gradient | |
| 2000 v | 0,5 | h |
| S3 | Gradient | |
| 4000 v | 0,5 | h |
| S4 | Gradient | |
| 8000 v | 0,5 | h |
| S5 | Step-n-hold | |
| 8000 v | 7 | h |
| S6 | Gradient | |
| 2000 v | | |
| S7 | Gradient | |
| 0 v | | |
| S8 | Gradient | |
| 0 v | | |
| S9 | Gradient | |
| 0 v | | |
| total Vhrs | 0 | |
| deviation from prot. | | |
| Chaotropes: | Urea 8M / Thiourea 2 M | |
| Detergents: | Chaps 4% / Triton X 100 0,5% | |
| reducing agent: | DTT 5mg/ml | |
| RHS additional: | | |
| Sample: | P-1-12-07-99_1zu10 | |
| | 4,55 µl | 11 µg/µl 50 µg |
| strip length: | 18cm | |
| pH from: | 3 - 10 NL | |
| IPG Buffer: | 3-10 NL 5µl/ml | |
| total Volume: | 350µl | |
| Notes: | <input type="checkbox"/> strip stored at -80°C <input checked="" type="checkbox"/> second dim AA: 10-15% T" <input type="checkbox"/> cuploading: Staining protocol: silverstaining Blum <input type="checkbox"/> Proteomat used: day of sec. dimension: 29.03.2000 comment: 2. D 10-15% | |
| date started | 28.03.2000 | |
| Scientist_Code | 1 Schlags | |
| Sample description | die Probe wurde 1 zu 10 verdünnt | |
| running no lab | 158 | |
| Gel Status | 5 eval completed | |

Abb. D-14: Ausdruck einer Gel-Dokumentation

„Gel overview“ / Gel Übersicht

Über den Button „Gel overview“ gelangt man zu einem Formular, das alle Gele anzeigt. Jedem Gel wird ein Status zugeordnet, der mit fortschreitender Bearbeitung zu ändern ist. Folgende Stati wurden definiert:

| Gel status | gel status description |
|-------------------|-------------------------------|
| 1 | docu prepared |
| 2 | IEF completed |
| 3 | second dimension |
| 4 | sub analysis ongoing |
| 5 | eval completed |
| 6 | cancelled |

Die Änderung des Status erfolgt vom Formular „Gel overview“ aus (Abb. D-15), diese kann sowohl vom Switchboard_1 als auch vom Formular „Scientist“ erreicht werden. Von diesen Formularen aus gelangt man über den Button „details“ wieder zu den Formular „Gel“, wobei nur das ausgewählte Gel angezeigt wird. Jetzt können weitere Daten hinzugefügt werden. Es sollten Daten zur 2. Dimension, aber auch eine kurze Bewertung des Ergebnisses sowie die Implikationen für eventuell nachfolgende Versuche eingegeben werden. Das Feld Gel Image bietet die Möglichkeit entweder eine Grafik (nach Möglichkeit *.jpg) einzufügen oder aber direkt den Scan der Auswertesoftware zu verknüpfen. Vom Einfügen großer Bilddateien sollte aus Gründen des Speicherplatzes und der dadurch bedingten Verlangsamung der Datenbank abgesehen werden. Das Registersteuerelement Sub Analysis bietet die Möglichkeit weiterführende Analysen des 2-DE-Gels zu dokumentieren, hier können beispielsweise die Versuchsplanung und die Ergebnisse eines tryptischen Verdau mit anschließendem MALDI-MS abgelegt werden. Es bietet sich an dies in Form einer Power Point Präsentation zu dokumentieren und mit der Datenbank zu verknüpfen. Vergleiche hierzu Abbildung D-16.

Microsoft Access - [Gel]

File Edit View Database Tools Window Help

MS Sans Serif 8

| | Gel_Code | Scientist | Sample_Code | Sample amount | date started | Gel Status |
|--------------|----------|-----------|-----------------|---------------|--------------|---|
| view details | NF-5 | 2 | Juso-BCM-080202 | 120 µg | 14.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view details | NF-4 | 2 | Juso-BCM-080202 | 10 µg | 14.08.2002 | 3 second dimension completec gel status + gel status - |
| view details | NF-6 | 2 | Juso-BCM-080202 | 50 µg | 14.08.2002 | 3 second dimension completec gel status + gel status - |
| view details | NF-3 | 2 | Juso-BCM-080202 | 50 µg | 12.08.2002 | 2 IEF completed gel status + gel status - |
| view details | WS-1 | 1 | Juso-BCM-080202 | 780 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view details | WS-2 | 1 | Juso-BCM-080202 | 80 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view details | WS-3 | 1 | Juso-BCM-080202 | 80 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view details | JL-1 | 3 | Juso-BCM-080202 | 100 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view details | NF-2 | 2 | Juso-BCM-080202 | 230 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view details | NF-1 | 2 | Juso-BCM-080202 | 20 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view details | AT-1 | 4 | Juso-BCM-080202 | 760 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view details | JL-2 | 3 | Juso-BCM-080202 | 11 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared gel status + gel status - |
| view | JL-3 | 3 | Juso-BCM-080202 | 12 µg | 12.08.2002 | 1 docu prepared |


Datensatz: 1 von 16
generate automatically running no for year and scientist/scientist initials

Abb. D-15: Gel Overview

Gel query

Gel_Code: WS-6
 Scientist_Code: 1 | Schlags | WS
 Gel Status: 1 | docu prepared
 Gel Title:
 Sample_Code: Juso-BCM-080202 | Genetically modified Juso cell
 Sample amount: 75 µg
 Sample volume: 10.00 µl
 Protein conc: 7.5 µg/µl
 date started: 12.03.2002
 Year: 2002 | 2
 running no lab: 17
 running no scienti: 6
 Rehydrationsolution: RHS-1 | IPG parameters: 3-10NL, 18cm | IEF protocol: IEF-2
 RHS details | IPG details | IEF | Results and what's next | Sub Analysis

second dim AA: 12.5%T
 cuploading:
 strip stored at -80°C:
 Staining protocol: silverstaining Blum
 Proteomat:
 day of second dimension: 13.03.2002
 comment:
 create Code and enter settings | print gel documentation

gel image: 

sub gel analysis query

Sub Gel Analysis Code: AutoWert
 Gel Code: WS-6
 Type of sub Analysis:
 comment on Sub Analysis:
 Scientist:
 date started: 16.08.2002
 Plan for sub Analysis:
 Outcome of Sub Analysis:
 Datensatz: 1 von 1 (gefiltert)

Abb. D-16: Formular „Gel“ mit einem eingefügten Gel Image

„Materials“ / Ausgangsstoffe und „Solutions“ / Lösungen

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil von 2D-Doc ist die Möglichkeit die Zusammensetzung von Lösungen zu speichern und deren Herstellung zu dokumentieren. So sollten zum Beispiel die Herstellung der Rehydrierlösung und der Reequilibrierlösung dokumentiert werden, nicht aber die Herstellung von Lösungen zum sofortigen Verbrauch, wie beispielsweise für die Silberfärbung.

Gerade wenn mehrere Mitarbeiter in einem Labor zusammen arbeiten und Lösungen auf Vorrat hergestellt werden, ist eine ordentliche Dokumentation, die letztendlich auch die richtige Herstellung sicherstellt, erforderlich. Fehlt ein Bestandteil in einer solchen Lösung, so kann dies zum Mißlingen sämtlicher damit durchgeführter Ansätze führen, darüber hinaus wird die Fehlersuche sehr mühsam.

Die benötigten Materialien werden über das Formular „Materials“ eingegeben.

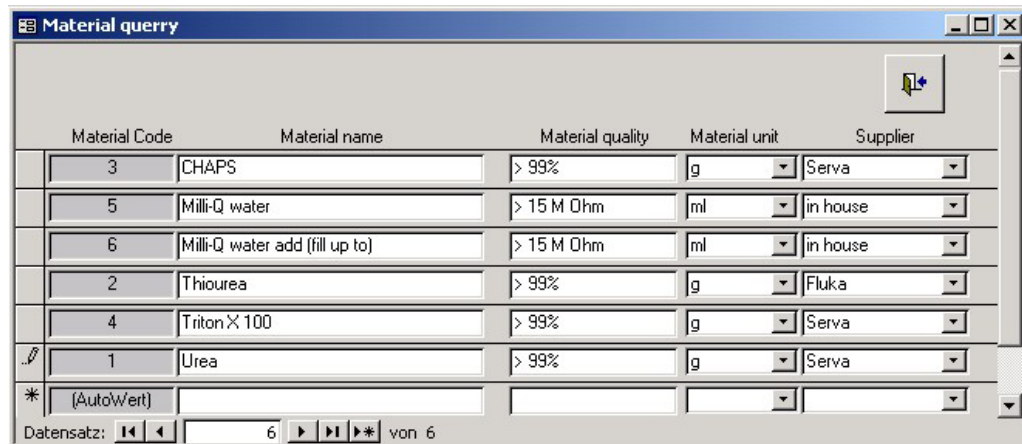


Abb. D-17: „Materials“ / Zur Verfügung stehende Materialien

„Solution master“ / Rezeptur der Lösungen

Das Formular „Solution“ dient dazu die Rezeptur für eine Lösung zu speichern. Die Bestandteile können aus den zuvor eingegebenen Ausgangsstoffen ausgewählt werden, die Mengen der einzelnen Bestandteile beziehen sich dabei auf die Standardmenge. Durch anklicken des Buttons „produce solution“

gelangt man zum Formular für die Erstellung eines neuen Ansatzes. Werden bei der Herstellung abweichende Mengen produziert, so dient das Verhältnis Standardmenge zur tatsächlichen Menge als Berechnungsgrundlage für die Einwaagen.

Solution master query

SolutionMaster Code: 1
 Solution abbrev: RHS-1
 Solution name: Rehydrationslösung 1
 source of composition: inhouse method development
 standard amount: 400 ml
 pH: not adjusted
 storage: -20°C
 aliquot size: 1 ml
 to be ad before use: 5 mg DTT/ml

produce new solution

Composition | Solutions overview

Sub solution composition master

| Solution Master Code | Material Code | Material name | Material quality | amount | Material unit |
|----------------------|---------------|--------------------------|------------------|--------|---------------|
| 1 | 1 | Urea | | 100 | g |
| 1 | 2 | Thiourea | | 40 | g |
| 1 | 3 | CHAPS | | 16 | g |
| 1 | 4 | Triton X 100 | | 2 | g |
| 1 | 6 | Milli-Q water add (fill) | | 400 | ml |
| * | | | | | |

Datensatz: 1 von 5

Abb. D-18: „Solution master“ / Rezeptur der Lösung

„produce new solution“ / Herstellung einer Lösung

Ähnlich wie beim „Gel-Code“ wird auch der „Solution Code“ automatisch über ein Makro erzeugt. Der Code hat folgendes Format: Solution abbrev / Initialen des Mitarbeiters / Datum / laufende Nummer.

Beispiel RHS-1/WS/16.08.2002/10. Bevor der Code erzeugt werden kann, muss der Mitarbeiter ausgewählt werden und die zu produzierende Gesamtmenge, die als Berechnungsgrundlage für den „size factor“ dient, muss

ebenfalls eingegeben werden. Nachdem der Code erzeugt wurde, wird durch betätigen des Buttons „add composition“ eine Anfügeabfrage ausgeführt, die entsprechend der Rezeptur („solution master“) die Bestandteile und entsprechend der eingegebenen Gesamt-Menge die Einwaagen anfügt. „Print protocol“ ruft das Herstellungsprotokoll auf, welches auszudrucken, auszufüllen, abzuzeichnen und abzuheften ist.

The screenshot shows the 'Solution query' window with the following fields and values:

- Solution Code: RHS-1/WS/16.08.2002/13
- Solution master Code: 1
- Solution abbrev: RHS-1
- Solution name: Rehydrationslösung 1
- source of composition: inhouse method development
- date of prep: 16.08.2002
- Scientist: 1 | Schlags | WS
- standard amount: 400 ml
- production amount for calculation only: 500.00 ml
- size factor: 1.25
- pH: not adjusted
- storage: -20°C
- aliquot size: 1 ml
- to be ad before use: 5 mg DTT/ml
- Buttons: generate code calculate size factor (checked), add composition (checked), print protocol

Below the fields is a table titled 'sub solution composition query' with the following data:

| Solution Code | Material Code | Material name | amount | Material unit |
|--------------------------|---------------|--------------------------------|--------|---------------|
| RHS-1/WS/16.08.2002/13 | 1 | Urea | 125 | g |
| RHS-1/WS/16.08.2002/13 | 2 | Thiourea | 50 | g |
| RHS-1/WS/16.08.2002/13 | 3 | CHAPS | 20 | g |
| RHS-1/WS/16.08.2002/13 | 4 | Triton X 100 | 2.5 | g |
| RHS-1/WS/16.08.2002/13 | 6 | Milli-Q water add (fill up to) | 500 | ml |
| * RHS-1/WS/16.08.2002/13 | | | | |

Navigation controls at the bottom show 'Datensatz: 1 von 5'.

Abb. D-19: Lösung nach Erstellung des Codes und Einfügen der Zusammensetzung

Beispiel für ein Makro „set gel-code“

Abbildung D-20 zeigt einen Ausschnitt des Makros, das beim Erstellen des Gel-Codes abläuft. Die ersten 7 Zeilen sind lediglich Bedingungen, die dazu führen, dass das Makro angehalten wird, wenn wesentlich Eingaben fehlen oder fehlerhaft sind. Das Makro wird erst dann ausgeführt, wenn die erforderlichen Eingaben gemacht wurden.

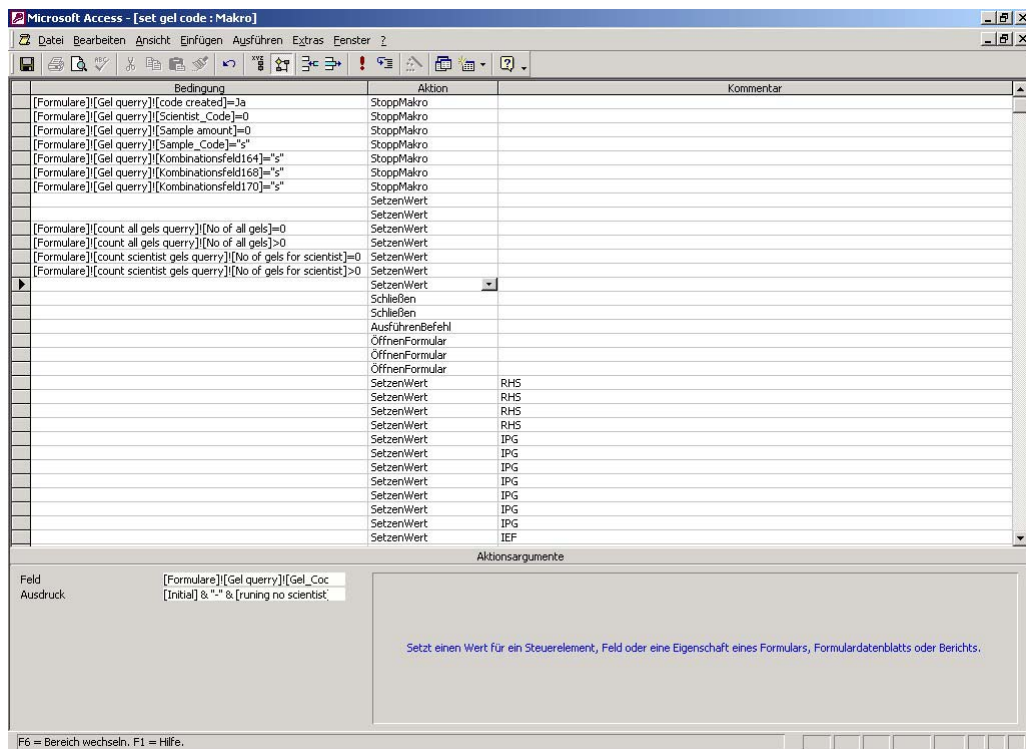


Abb. D-20: Makro zur Erzeugung des Gel-Codes

Die Datenbank umfasst mittlerweile 11 Mitarbeiter, 14 Projekte, 144 Proben, 28 Rezepte zur Herstellung von Lösungen und mehr als 450 Gele.

Validierung

Einleitung zur Validierung

Obwohl die 2-DE eine weit verbreitete und auch in der pharmazeutischen Industrie angewandte Technik ist, findet man zu 2-DE und Validierung in der Literatur nur sehr wenig Information, lediglich bei Tonge et al.¹⁰⁸ und bei Nishihara et al.¹⁰⁹ finden sich detaillierte Angaben zur Validierung von mittels Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten 2-DE-Gelen. Einzelne Validierungsparameter, wie beispielsweise Linearität¹¹⁰, Präzision¹¹¹ und Reproduzierbarkeit^{40,112-114} werden beschrieben. Eine Publikation, die den Versuch einer umfassenden Validierung der Methode beschreibt, konnte zumindest in den über Medline und Scifinder zugänglichen Journalen nicht gefunden werden.

Da die Methode der 2-DE in der Arbeitsgruppe neu war, erschien es sinnvoll sich mit der Validierung zu beschäftigen, um abschätzen zu können, wie zuverlässig die Methode arbeitet und wie die mit der Methode gewonnenen Daten zu interpretieren sind¹¹⁵.

Definitionen einer Validierung:

Nach USP <1225> ist Validierung der Prozess, durch den mittels Laborexperimenten gezeigt wird, dass die Leistungsmerkmale (Charakteristika) einer Methode den Forderungen für eine beabsichtigte Anwendung genügen¹¹⁶.

Eine sehr formalistische Definition findet sich in ISO 8402, 1994 §2.18. Hiernach ist Validierung die Bestätigung aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die besonderen Forderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt worden sind.

Grundlegendes zur Vorgehensweise

Vorab muss eindeutig definiert werden, was mit der Methode beabsichtigt wird. Es ist festzulegen, was und wie geprüft wird (Validierungsplan). Aus den ermittelten Zahlen sind Aussagen bezüglich der Methodeneignung zu treffen (Validierungsbericht). Alle Daten, die zu den gemachten Aussagen führen, müssen dokumentiert werden. Bezüglich des Umfangs einer Validierung heißt es in ISO 17025: „Die Validierung muss in dem Umfang durchgeführt werden, der zur Erfüllung der Erfordernisse der beabsichtigten Anwendung oder des betreffenden Anwendungsgebietes notwendig ist.“ Das heißt, es bleibt dem Labor überlassen einen sinnvollen Umfang festzulegen, der nach Möglichkeit alle kritischen Punkte im Zusammenhang mit der Methode in Betracht ziehen sollte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Folgenden der Validierungsplan und die entsprechenden Ergebnisse des Validierungsberichtes zusammengefasst.

Ziel der Validierung

Die Validierung soll die Frage nach der Eignung der gewählten Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse der Proteinexpression beantworten. Leistungsfähigkeit und Grenzen der Methode sind aufzuzeigen und Spezifikationen festzulegen, innerhalb derer sich statistisch gesicherte Aussagen treffen lassen. Allgemeine Ziele einer Validierung sind Reproduzierbarkeit, Richtigkeit, Präzision und nach Möglichkeit Robustheit einer Methode zu belegen. Inwieweit der gewählte Ansatz der

Validierung

2D-Gelelektrophorese diesen Anforderungen genügt oder genügen kann, gilt es mit der Validierung zu zeigen.

Da die 2-D Elektrophorese als neue Methode im Arbeitskreis eingeführt wurde, war es erforderlich vor der routinemäßigen Anwendung der 2-DE offene Fragen zu formulieren, die im Rahmen der Validierung geklärt werden sollten.

- Wie reproduzierbar sind die mit 2DE gewonnenen qualitativen und quantitativen Daten?
- Wie verhält sich die Methode bezüglich der gängigen Validierungsparameter: Präzision, Linearität, Richtigkeit und Robustheit?
- Wie viele Gele pro Probe sind mindestens erforderlich, um gesicherte Aussagen zu erhalten?
- Wie groß muss eine quantitative Änderung sein, damit sie mittels 2-DE-Silberfärbung nachweisbar ist?
- Welche Gesamtproteinmenge sollte man auftragen?
- Lassen sich Daten von verschiedenen Mitarbeitern und aus verschiedenen Labors zusammenfassen und ließe sich somit ein Intranet aus verschiedenen Labors bilden, deren Daten untereinander verglichen werden können?
- Welches Reinigungsprozedere sollte man für die Stripholder verwenden, um Cross-Kontaminationen auszuschließen?

Zur Komplexität des Proteoms respektive der Probe

Das Proteom unterliegt einem ständigen Wandel. Sowohl qualitative als auch quantitative Änderungen in der Proteinausstattung der einzelnen Zellen über der Zeit führen in Abhängigkeit des betrachteten Zeitintervalls zu einer unendlichen Komplexität.

Das dynamische Proteom ist, insbesondere unter Berücksichtigung der Vielzahl an möglichen posttranslationalen Modifikationen, ungleich komplexer als das statische und in jeder Zelle identische Genom.

Zerlegt man das Proteom eines Organismus sukzessive in kleinere Untereinheiten (Subproteome), so kommt man von Organen über Gewebe, Zellverbände bis hinunter auf die Stufe der kleinsten Lebenseinheit, zum Subproteom der einzelnen Zellen. Betrachtet man das gesamte Proteom als Summe aller Subproteome der Zellen eines Organismus, so wird die Komplexität noch einmal verdeutlicht.

Als Funktion der Zeit t ließe sich das Proteom (P) etwa wie folgt beschreiben:

$$P(t) = \sum_{i=1}^n (\text{Sub}P(t)_i) \text{ mit } n \text{ gleich der Anzahl aller Zellen des Organismus}$$

$$\text{Sub}P(t) = \sum_{i=1}^m c(\text{Prot}(t)_i)$$

m gleich der Anzahl aller Proteine einschließlich posttranslationaler Modifikationen im Subproteom (SubP). Jedes Subproteom, jede Zelle ist demnach die Summe aller Proteine (Prot) unter Berücksichtigung der Konzentrationsänderungen über der Zeit.

Demnach kann der hier gewählte Ansatz zur Validierung der Methode nicht mit einer für den Pharma-Bereich typischen HPLC Validierung zur quantitativen Bestimmung eines Arzneistoffes mit einer limitierten Anzahl an Verunreinigungen verglichen werden. Bei Verwendung einer komplexen, aus biologischem Material gewonnenen Probe ist die Anzahl der Analyte um ein vielfaches höher. Zudem variieren die Analyte über einen sehr großen Konzentrationsbereich (bis Faktor 10^6), und es stehen keine Referenzsubstanzen zur Verfügung. Es wäre demnach eine vergleichbare Aufgabe eine Mischung des gesamten World Drug Indexes (mit >58.000 Substanzen) willkürlich in Konzentrationen zwischen 1 ng und 1 g / 100 ml mittels HPLC-MS zu analysieren.

Validierung

Zur Methode der 2-DE

Detaillierte Angaben zu Probenaufarbeitung und Prozessierung finden sich im experimentellen Teil. Wie bereits erwähnt, wurde die Methode vor Beginn der Validierung in Form einer SOP festgeschrieben und während der Validierung nicht verändert.

Der Vollständigkeit halber eine Kurzfassung zur Vorgehensweise:

Das Zellmaterial wird homogenisiert und solubilisiert, unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt, die Probe wird aliquotiert und der Proteingehalt ermittelt. In der ersten Dimension erfolgt die Auftrennung entsprechend der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der Proteine, in der 2. Dimension verwendet man die SDS-PAGE zur Trennung nach Molekulargewicht. Die Proteine werden mittels Silberfärbung (oder Coomassie Blue) visualisiert, anschließend werden sie digitalisiert und gleichzeitig densitometrisch vermessen. Die Auswertung der Gele erfolgt mit einer speziellen Software (PD-Quest 6.1), die Gele werden mittels eines Densitometers eingescannt, qualitative wie quantitative Unterschiede zwischen einzelnen Gelen können mit der Software aufgezeigt werden. Somit liefert die Methode Aussagen über pI , Molekulargewicht und die Konzentration der aus einer Probe erfassten Proteine.

Post-Validierungs-Phase

Für die Validierung wurde exemplarisch eine komplexe Proteinmischung gewählt. Auch wenn im Verlauf der Arbeiten mit anderem Probenmaterial gearbeitet wurde, so wurde keine neuerliche Validierung vorgenommen.

Im Sinne einer On-Going-Evaluation wurden auch nach der Validierung die Qualitätsparameter der Methode regelmäßig und kritisch beobachtet. Es wurden beispielsweise auch mit pflanzlichem Material (*Dioscorea* spezies) Untersuchungen zu Linearität und Reproduzierbarkeit angestellt⁹⁸.

Validierung: Planung und Auswertung

Was soll die Methode leisten?

Die Methode zur Probenprozessierung mittels 2D-Gelelektrophorese soll statistisch abgesicherte, qualitative und quantitative Aussagen bezüglich einer differentiellen Proteinexpression ermöglichen.

Kritische Parameter

Alle Schritte der Methode, die nicht automatisiert sind, müssen besonders sorgfältig und entsprechend der Arbeitsanweisung durchgeführt werden. Hierzu zählt die Probenaufarbeitung, das Gießen der Trenn- und Sammelgele, der Transfer des Strips nach der 1. auf die 2. Dimension sowie die Silber- bzw. Coomassie-Färbung.

Die Qualität der verwendeten Chemikalien als kritischer Parameter ist in der Arbeitsanweisung zur Methode dokumentiert und findet sich im Methoden Teil dieser Arbeit. Alle Lösungen sind nach Möglichkeit frisch herzustellen oder aliquotiert bei $< -20^{\circ}\text{C}$ zu lagern.

Zur praktischen Durchführung

Als Probe für die Durchführung der Validierung wurde embryonales Hühnerhirngewebe gewählt. Alle im Rahmen der Validierung durchzuführenden Versuche mit Ausnahme der Blindproben wurden mit derselben Probe durchgeführt, d. h. interindividuelle Schwankungen, die beim Erstellen von Protein-Datenbanken eine Rolle spielen, werden nicht erfasst. Ebenso bleiben Schwankungen aufgrund der Probenaufarbeitung unberücksichtigt. Zur Probenaufarbeitung ist anzumerken, dass die Proben stets sauber, zügig, unter Kühlung und unter Zusatz von Proteaseinhibitoren aufgearbeitet werden.

Für die 1. Dimension werden grundsätzlich 18 cm IPG ready Strips pH 3-10 NL der Fa. Amersham verwendet (Ausnahme Versuch zur Selektivität und

Validierung

Spezifität). Die Proben werden in der 2. Dimension auf selbst gegossenen Polyacrylamidgelen (10 %-15 % Gradienten oder 12,5 % linear) aufgetrennt. Zwei grundsätzliche Probleme der Methode, nämlich die Erfassung von „low copynumber“ Proteinen und das Solubilisieren schwer löslicher Proteine insbesondere die basischen, hochmolekularen Proteine sind schwer zugänglich, werden in der Validierung nicht näher untersucht.

Zur Geräte-Qualifizierung

Da alle verwendeten Geräte, die für die Methode als kritisch zu bezeichnen sind (IPG-Phor, Protean XLII, Power Supplies, Biorad Densitometer GS 710, PD-Quest Software 6.1), von den Firmen Amersham / Biorad nach strengen Qualitätsstandards gefertigt und mit entsprechenden Konformitäts-Zertifikaten ausgeliefert wurden, wird von einer Qualifizierung der Geräte abgesehen. Von den Herstellern dieser Geräte sind auch keine aktiv durchzuführenden Qualifizierungsroutinen vorgegeben. Die IPG-Phor führt bei jedem Neustart automatisch einen Systemtest durch. Die Systemkomponenten Densitometer / PC / Software werden unter 2.6.1 einem Systemeignungstest unterzogen.

Versuche zu den Validierungsparametern

Systemsuitability

Systemeignungstest der Komponenten Biorad Densitometer GS 710 /

Auswerte-PC / PD-Quest 6.1 Software

Mit diesen Tests soll die maximale Reproduzierbarkeit der Quantifizierung mit den o. g. Komponenten bestimmt werden. Die Meßpräzision des Densitometers und die Qualität der Auswertesoftware werden untersucht. Desweiteren soll der Test Aufschluß darüber geben, ob eine Kalibrierung des Scanners vor jedem Scan sinnvoll ist.

- a) Ein repräsentativer Ausschnitt eines Scans wird 5 mal kopiert und die Spots dieser 6 Scans werden mittels PD-Quest detektiert. Anschließend wird ein Matchset erzeugt und die OD-Werte (optische Dichte) werden verglichen.
- b) Das gleiche Gel wird 6 mal naß eingescannt, vor Beginn der Sequenz wird der Scanner kalibriert. Alle Scans werden gleich bearbeitet und ein Matchset wird erzeugen. Die Spots werden „gematched“, qualitativ sowie quantitativ ausgewertet, anschließend werden die relativen Standardabweichungen der OD-Werte statistisch ausgewertet.
- c) Das gleiche Gel wird 6 mal naß eingescannt, vor jedem Scan wird der Scanner neu kalibriert. Weitere Vorgehensweise wie unter b).

PD-Quest arbeitet mit drei unterschiedlichen Datenformaten. Der „Scan“ entspricht den Rohdaten und kann nicht verändert werden. Mittels des „Spot detection wizards“ wird das sog. „Image“ erzeugt, dies entspricht dem Scan vermindert um den Hintergrund, zudem werden bei diesem Vorgang die

Validierung

Parameter für die Spot-Detektion festgelegt. Neben dem Image erhält man ein weiteres Format, das als „Spots“ bezeichnet wird und nur noch die Gaussoptimierten Spots enthält. Möchte man verschiedene Gele miteinander vergleichen, so erstellt man ein Matchset.

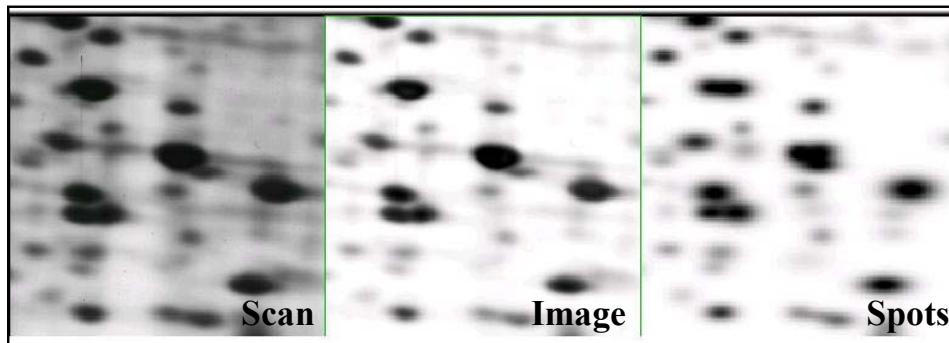


Abb. V-1: Zeigt die unterschiedlichen Datenformate

ad a) Als erstes wurde ein Test der Software, resp. des „Spot detection wizards“ durchgeführt. Die Daten eines Scan-Ausschnitts wurden 5 mal kopiert, die Spots wurden mittels des PD-Quest Spot detection wizards detektiert, anschließend wurde ein Matchset generiert. Für alle 351 Spots wurden identische OD-Werte erhalten, demnach entstehen bei den Rechenoperationen keinerlei Ungenauigkeiten, was nicht weiter überrascht.

ad b) Abbildung V-2 zeigt 6 Images des gleichen Gels, die unmittelbar nacheinander eingescannt wurden. Bei der Spot Detektion wurden die gleichen Parameter verwendet. Aus den daraus resultierenden Images / Spots wurde ein Matchset erzeugt und die Gele wurden auf Unterschiede durchsucht. In gut aufgelösten Bereichen, sprich Bereichen in denen sich keine überlappenden Spots finden, ist die qualitative Übereinstimmung nahe 100 %. In Bereichen, in denen sich Spots überlappen, findet man jedoch Unterschiede. Ebenso findet man Unterschiede bei Spots mit geringer Intensität, die bei den gewählten Detektionsparameter in der Nähe

des Detektionslimits liegen. Siehe hierzu die markierten Bereiche der Abbildung V-2.

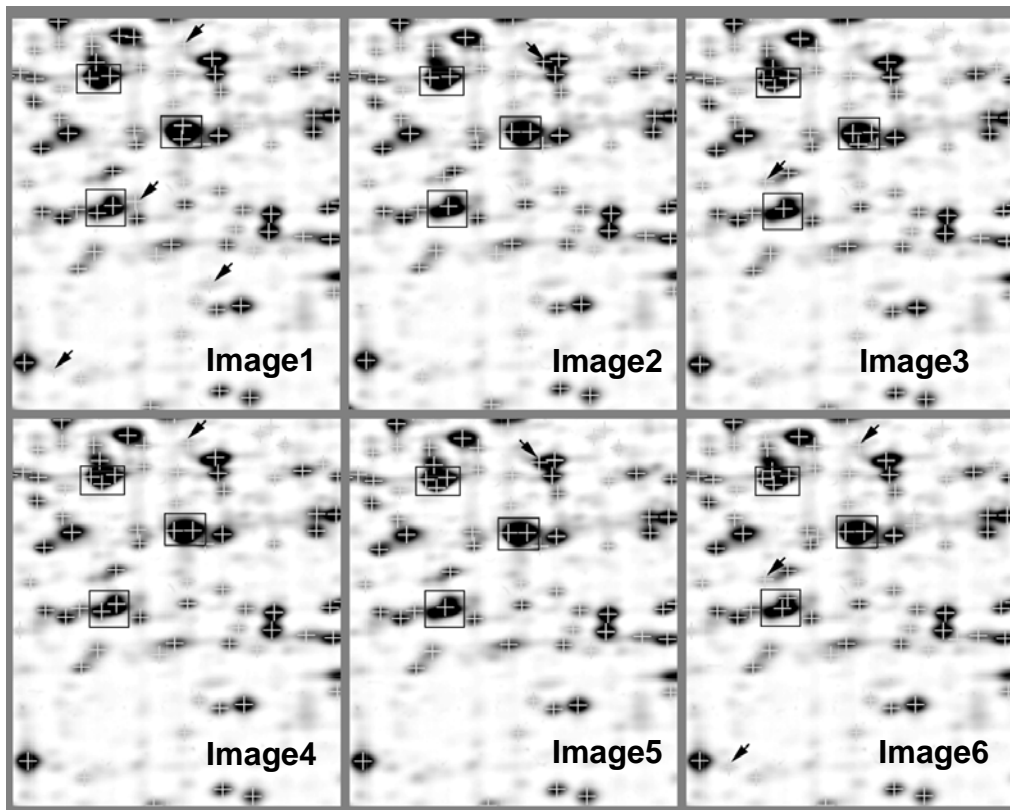


Abb. V-2: Zeigt vergleichbare Ausschnitt eines Gels, welches 6 mal gescannt wurde.

Für den quantitativen Vergleich wurde keine Nachbearbeitung der Gele vorgenommen. Es wurden nur OD-Werte von Spots für eine weitere Auswertung exportiert, die auf allen Images vorhanden waren. Insgesamt wurden 1254 Datensätze exportiert. In Tabelle V-1 sind exemplarisch zehn Datensätze wiedergegeben. Neben den Einzelwerten sind in der Tabelle der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (Stabw) sowie die relative Standardabweichung (RSD) ausgewiesen.

Validierung

| Image1 | Image2 | Image3 | Image4 | Image5 | Image6 | MW | Stabw | RSD |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| 18,82 | 21,98 | 23,92 | 24,46 | 25,14 | 24,89 | 23,20 | 2,42 | 10,45 |
| 71,65 | 67,66 | 80,1 | 67,11 | 72,69 | 67,01 | 71,04 | 5,07 | 7,13 |
| 70,86 | 72,32 | 76,84 | 75,64 | 76,32 | 76,4 | 74,73 | 2,51 | 3,35 |
| 46,97 | 48,49 | 50,45 | 48,44 | 50,18 | 49,08 | 48,94 | 1,28 | 2,61 |
| 156,33 | 148,32 | 152,59 | 150,48 | 145,83 | 148,52 | 150,35 | 3,71 | 2,47 |
| 113,74 | 113,4 | 109,58 | 108,28 | 107,94 | 108,76 | 110,28 | 2,61 | 2,36 |
| 9,35 | 9,34 | 9,33 | 9,26 | 9,25 | 9,19 | 9,29 | 0,06 | 0,68 |
| 133,81 | 149,39 | 146,22 | 143,67 | 144,08 | 145,24 | 143,74 | 5,27 | 3,67 |
| 212,42 | 221,95 | 219,17 | 181,13 | 171,84 | 209,07 | 202,60 | 20,95 | 10,34 |
| 67,78 | 56,84 | 55,03 | 70,21 | 81 | 48,65 | 63,25 | 11,88 | 18,78 |

Tab. V-1: Exemplarische Datensätze zufällig ausgewählt

Für den Mittelwert der RSD über alle Datensätze ergab sich ein Wert von 12,43 %, der Median der RSD lag bei 6,5 %. Die Abbildung V-3 zeigt die Verteilung der RSD, in diesem Diagramm wurden lediglich die Spots abgebildet die eine RSD kleiner als 15 % aufweisen.

Es wurden einzelne Spots aus den unterschiedlichen RSD-Bereichen überprüft, dabei stellte sich heraus, dass mit zunehmender Überlappung der Spots die RSD ansteigt. Gehen mehrere Spots ineinander über, wie beispielsweise Spot 6301 (die Nummern werden automatisch von PD-Quest vergeben), so kann es zu sog. mismatches kommen, damit lassen sich die zum Teil sehr hohen RSD-Werte erklären.

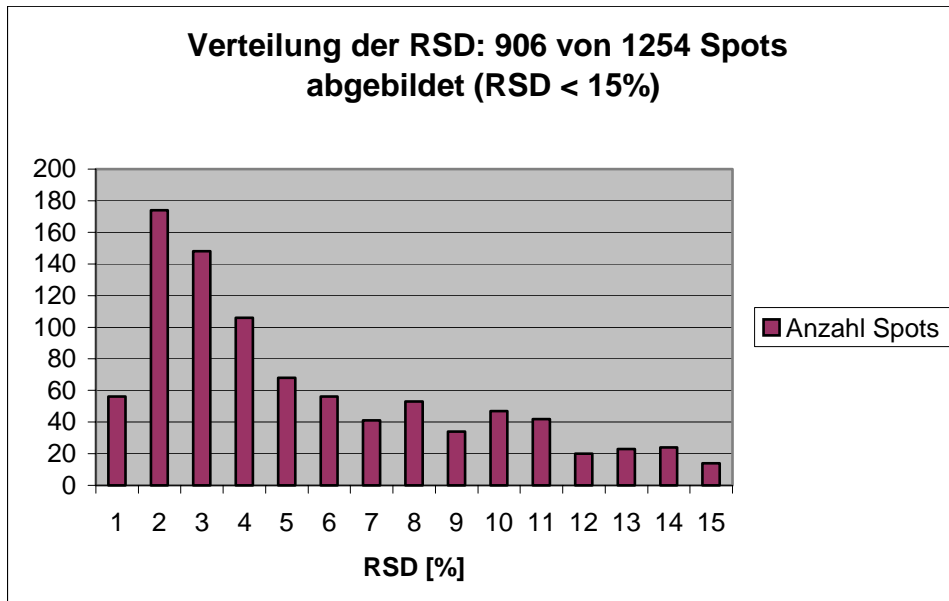


Abb. V-3: Verteilung der relativen Standardabweichungen der einzelnen Spots

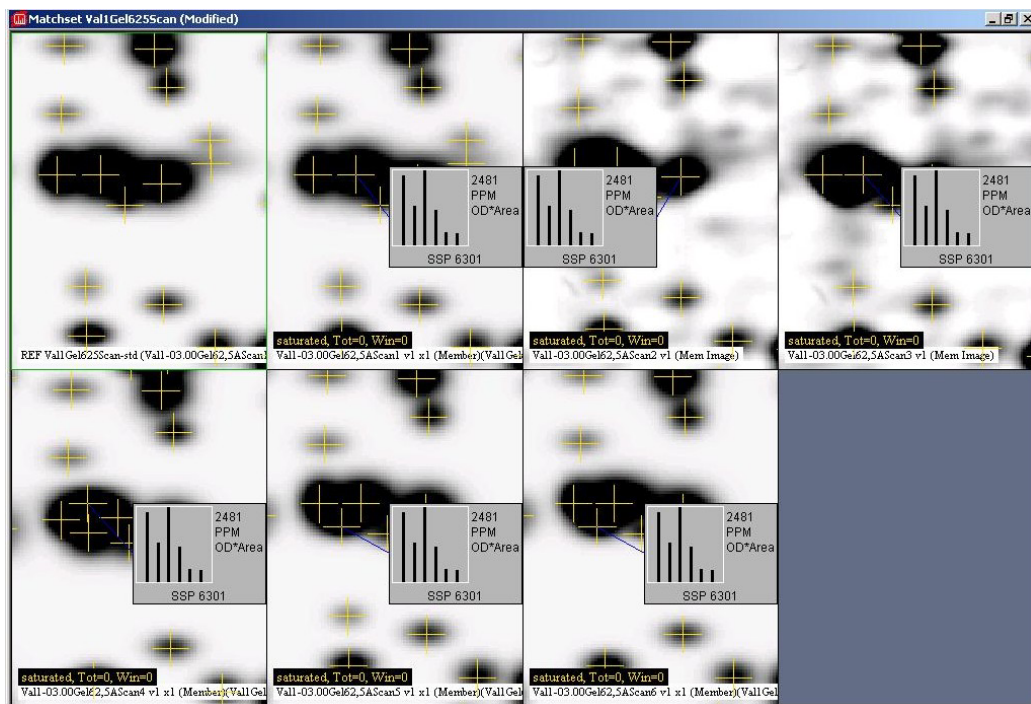


Abb.V-4: Spot Nr. 6301 (OD min/max. 50,32/254,62 ; RSD 82,66 %)

Validierung

Neben einem quantitativen Wert berechnet PD-Quest einen Wert für die Spot-Qualität. Die Skala für die Qualität geht von 0-100, wobei ein idealer Spot einen Wert von 100 erhalten würde.

Insgesamt 5 Parameter werden bei der Berechnung der Spot-Qualität berücksichtigt:

- Übereinstimmung der Spotform mit einer idealisierten Gaußform.
- Streifen in Richtung der x-Achse
- Streifen in Richtung der y-Achse
- Überlappung mit anderen Spots
- OD-Wert innerhalb oder außerhalb des linearen Bereichs des Scanners.

Abbildung V-5 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Mittelwert der Spot-Qualität und der RSD für die Spot-Quantität, die eingefügte Trendlinie zeigt, dass mit ansteigender Qualität der Spots auch die RSD der Quantität kleiner wird.

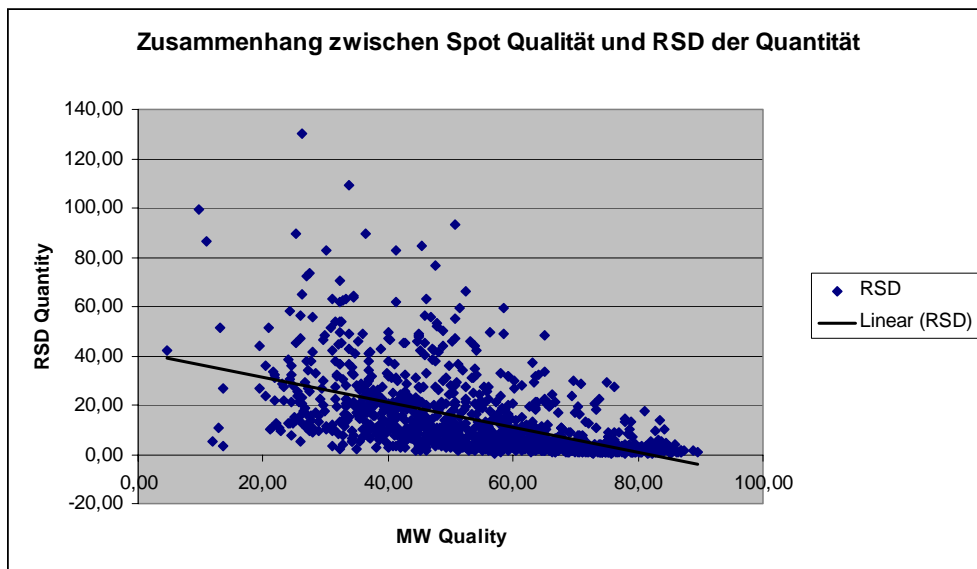


Abb. V-5: Die RSD der Quantität über dem Mittelwert der Spot-Qualität.

ad c) Vor jedem Scan eine erneute Kalibrierung des Scanners durchzuführen erbrachte eine leichte Verbesserung. Der Mittelwert der RSD aus insgesamt 1245 Datensätzen lag bei 11,55 % und der Median der RSD bei 6,16 %. In Relation zur Genauigkeit, mit der man mit diesem System quantifizieren kann, ist der mögliche Vorteil, den man durch eine Kalibrierung vor jedem Scan erhält, zu vernachlässigen. Daher wurde die Vorgehensweise den Scanner alle 90 min zu kalibrieren beibehalten.

Die in diesem Abschnitt der Validierung erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass PD-Quest und der verwendete PC fehlerfrei arbeiten. Beim wiederholten Einscannen des gleichen Gels kommt es jedoch zu Unterschieden, die insbesondere bei sich überlappenden oder sonst hinsichtlich Ihrer Qualität schlechten Spots zu teilweise sehr großen quantitativen Abweichungen führen. Die aufgezeigten mismatches belegen, dass es zwingend erforderlich ist, alle Spots, die man quantifizieren möchte, einer sorgfältigen Kontrolle zu unterziehen. Bei der hier angestellten Auswertung wurde bewußt von der Korrektur etwaiger mismatches abgesehen.

Das System Scanner / Software / PC ist durchaus geeignet eine Quantifizierung vorzunehmen, jedoch unter der Voraussetzung, dass die Spots gut aufgelöst sind. Die Präzision, mit der sich die Spots quantifizieren lassen, ist abhängig von der Spot-Qualität. Nimmt man den oben ermittelten Median der RSD, der bei etwa 7 % lag, als Anhaltspunkt, und lässt man „mismatches“ und die Spots schlechter Qualität außen vor, so dürfte für die mit dem System erzielbaren quantitativen Werte eine Genauigkeit von besser als +/- 4 % ein realistischer Wert sein. Hierbei ist nicht berücksichtigt inwiefern sich aus den vorhergehenden Prozessen Abweichungen ergeben, bzw. ob die Silberfärbung überhaupt eine Quantifizierung zulässt.

Leerwert und Reinigungsvalidierung

Die Erkenntnis, dass es sich bei der Reinigung der von uns verwendeten 7 und 18 cm Stripholder um einen kritischen Vorgang handelt, stammt aus einer Laborbeobachtung. Da in Frankfurt von verschiedenen Kollegen auch unterschiedliche Projekte mit entsprechend unterschiedlichen Proben bearbeitet wurden, kam es vereinzelt vor, dass sich charakteristische Spot-Muster einer Probe plötzlich auf einem Gel einer ganz anderen Probe wiederfanden. Es war naheliegend, dass Cross-Kontaminationen durch an den Stripholdern anhaftende Proteine, die Ursache waren. Bleibt noch anzumerken, dass dieses Problem bei den 24 cm Stripholdern der Fa. Amersham nicht mehr auftreten kann, da hier die Geloberfläche des IPG-Strips nicht mehr mit dem Keramik-Stripholder in Kontakt kommt.

Im Rahmen der Validierung wurden verschiedene Reinigungsprozeduren für die Stripholder getestet. Anschließend wurde der Stripholder für die Rehydrierung und Fokussierung jedoch ohne Zusatz einer Probe verwendet. Folglich sollte nach der 2. Dimension und der anschließenden Silberfärbung ein Gel ohne Spots erhalten werden.

Weder das von der Fa. Amersham vorgeschlagene Reinigungsprotokoll mit Verwendung eines speziellen Stripholder-Spülmittels, noch die einstündige Behandlung der Stripholder mit heißer 2 %iger SDS-Lösung, führten zu einem zufriedenstellenden Reinigungsergebniss.

Letztendlich konnte eine Reinigungsprozedur gefunden werden. Nach entfernen von Rehydrierlösungs- und Coverfluidresten, möglichst mit Detergens und Zahnbürste, müssen die Stripholder für mind. 2,5 Stunden bei 250°C in einem Trockenschrank oder einer ähnlichen Apparatur behandelt werden. Der entscheidende Schritt ist dabei das Erhitzen der Stripholder, auch wenn man die Stripholder lediglich mit Wasser ausspült und anschließend erhitzt (WS-135 und WS-136) können keine anhaftenden Proteine mehr nachgewiesen werden.

| Gel-Code | vorhergehende Probe | Stripholder Reinigungsprozedur | Ergebnis |
|----------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| WS-100 | Embryonales Hühnerhirn | Amersham Reinigungsanweisung | Spots bei ca. 40-70 kDa pI 4,5-6 |
| WS-101 | Embryonales Hühnerhirn | Mit heißer 2 % SDS Lsg. behandelt | Spots bei ca. 40-70 kDa pI 4,5-6 |
| WS-127 | Embryonales Hühnerhirn, 62,5 µg | Amersham Reinigungsanweisung | Spots bei ca. 40-70 kDa pI 4,5-6 |
| WS-128 | Embryonales Hühnerhirn , 62,5 µg | Amersham Reinigungsanweisung | Spots bei ca. 40-70 kDa pI 4,5-6 |
| WS-125 | Embryonales Hühnerhirn, 62,5 µg | Amersham Reinigungsanweisung + >2,5 h bei 250°C | Keine Spots |
| WS-126 | Embryonales Hühnerhirn, 62,5 µg | Amersham Reinigungsanweisung + >2,5 h bei 250°C | Keine Spots |
| WS-133 | Embryonales Hühnerhirn, 62,5 µg | Nur mit Wasser gespült | Spots bei ca. 40-70 kDa pI 4,5-6 |
| WS-134 | Embryonales Hühnerhirn, 62,5 µg | Nur mit Wasser gespült | Spots bei ca. 40-70 kDa pI 4,5-6 |
| WS-135 | Embryonales Hühnerhirn, 62,5 µg | Mit Wasser gespült + >2,5 h bei 250°C | Keine Spots |
| WS-136 | Embryonales Hühnerhirn, 62,5 µg | Mit Wasser gespült + >2,5 h bei 250°C | Keine Spots |

Tab. V-3: Übersicht der zur Reinigungsvalidierung angefertigten Gele.

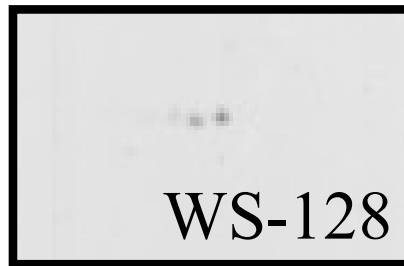


Abb. V-6: Ausschnitt WS-128, Spots bei etwa 45 kDa, pI 6

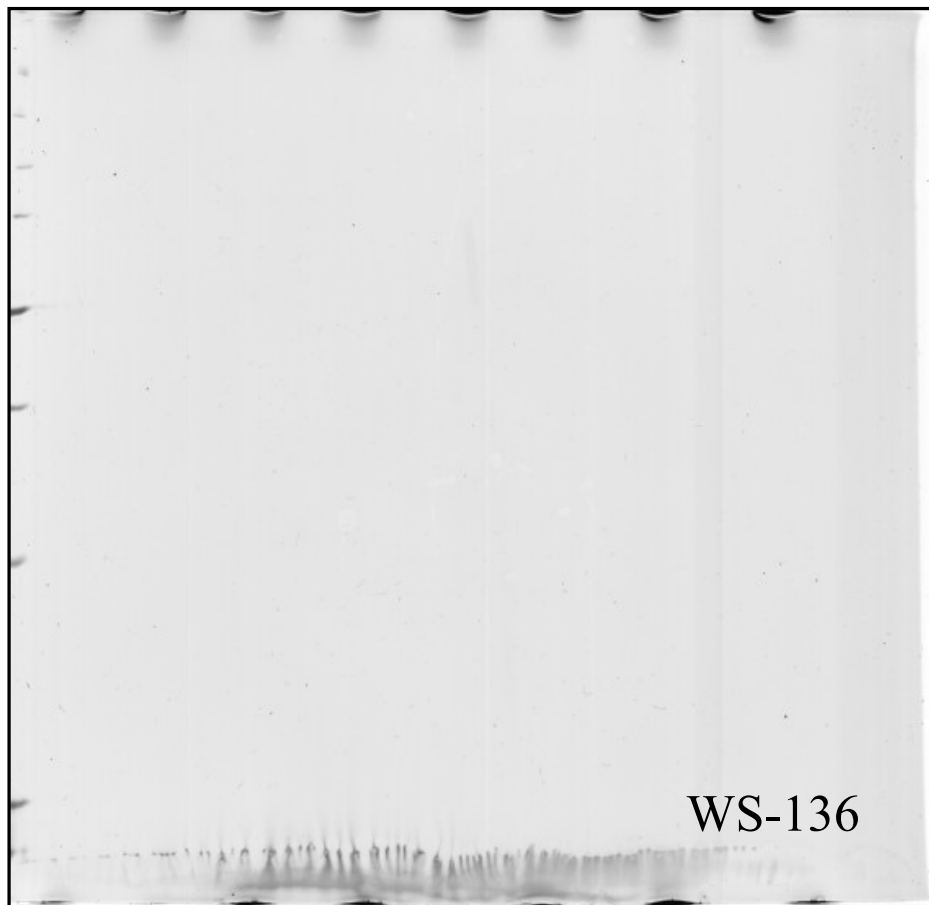


Abb. V-7: Gel WS-136, keine Spots zu sehen, Stripholder bei 250°C behandelt

Richtigkeit

Da es sich um sehr komplexe biologische Proben handelt, ist es nicht ohne weiteres möglich die Richtigkeit zu bestimmen. Es steht kein Referenzmaterial zur Verfügung und aufgrund der sehr unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine und der sehr unterschiedlichen Konzentrationen, in denen diese vorliegen, sind nicht alle Proteine der 2-DE zugänglich. Proteine unterhalb der Bestimmungsgrenze und die Proteine, deren Konzentration zu einer Sättigung der Spots führt, können nicht quantifiziert werden.

Als Alternative zum nicht verfügbaren Referenzmaterial bliebe noch die Möglichkeit, probenfremde Proteine als internen Standard einzusetzen. Dabei müßte sichergestellt werden, dass diese Standardproteine sich bei der 2-DE nicht mit denen der Probe überlappen. Desweiteren würde man eine zweite Methode zur Quantifizierung der Standardproteine benötigen, dies wäre beispielsweise mittels HPLC oder CE möglich, zusätzlich müßte man dann nachweisen, dass diese Quantifizierung mit der gewählten Färbemethode korreliert und der quantitative Wert nicht proteinspezifisch ist. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden *pI*-Marker-Proteine und Molekulargewichtsmarker getestet, dabei zeigte sich, dass die verwendeten *pI*-Marker-Proteine in der 2-DE nicht zu je einem definierten Spot führen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass man nicht ausschließen kann, dass es zu Überlappungen mit Proteinen der Probe kommt, sind derartige Marker-Proteine für eine absolute Quantifizierung als untauglich zu bewerten. Würde man versuchen den Molekulargewichtsmarker als externen Standard für eine Quantifizierung heranzuziehen, so hätte man zwar das Problem der Überlappung gelöst, würde aber dadurch, dass man mit einem externen Standard arbeitet, die erforderliche Genauigkeit einbüßen.

Einen validen Wert für die Menge eines Proteins auszuweisen ist unter den o. g. Voraussetzungen vorerst nicht möglich. Die Methode soll dazu dienen

dynamische Prozesse zu charakterisieren, und dabei sind in erster Linie die relativen Veränderungen von Interesse.

Neben der Möglichkeit einen Wert für die Optische Dichte eines Spots zu ermitteln, kann PD-Quest für Proteinspots eines Gels relative Werte angeben. PD-Quest bietet drei Möglichkeiten der Normalisierung:

- bezogen auf die Summe der OD des gesamten Gels.
- bezogen auf die Summe der OD aller Protein-Spots, die im quantifizierbaren Bereich liegen.
- bezogen auf die Summe der OD einer beliebige Anzahl an sog. „housekeeping“ Proteinen, die man zuvor zu einem Analysis-Set hinzufügen muss. Die gewählten „housekeeping“ Proteine sollten in allen Proben in gleicher Konzentration vorkommen und Linearität zeigen.

Es bleibt zu zeigen, wann eine relative Änderung mit statistischer Signifikanz tatsächlich eine relative Änderung ist und nicht von einer Schwankung der Meßwerte her rührt.

Um die Richtigkeit der Methode zu zeigen, bleibt lediglich die Möglichkeit eine Plausibilitätsbetrachtung¹¹⁶ anzustellen. Demnach ist ein Ergebnis wahrscheinlich richtig, wenn Selektivität und Linearität der Methode bewiesen wurde und demnach die Regressionsgerade durch den Ursprung verläuft.

Damit ist eine Pauschalbetrachtung der Richtigkeit der Methode nicht möglich, es muss im Einzelfall, sprich für einen Spot in einer bestimmten Probe geprüft werden, ob Selektivität und Linearität gegeben sind und man somit eine Aussage zur Richtigkeit der quantitativen Analysenergebnisse treffen kann.

Präzision

Diese Bestimmung zeigt inwieweit einzelne Werte aufgrund zufälliger Fehler um den Mittelwert streuen. Aus mehreren, unter gleichen Bedingungen erstellten Gelen, lassen sich mittels PD-Quest die dazu erforderlichen Daten gewinnen.

Untersucht wurde die Präzision hinsichtlich:

- Position der Spots, Bestimmung von Molekulargewicht und pI .
- Quantifizierung, differenziert nach Wiederhol-, Labor- und Vergleichspräzision.

Um die Präzision der Position auf dem Gel zu überprüfen, wurde in Richtung des pI (x-Achse) einem Spot am äußeren Rand des sauren Bereichs der Wert 0,01 zugeordnet und am äußeren Rand des basischen Bereichs der Wert 10. PD-Quest ordnet allen Spots, die zwischen diesen beiden liegen, in Abhängigkeit der Laufstrecke einen Wert zu. Ebenso wurde in Richtung des Molekulargewichts (y-Achse) verfahren. Abbildung V-8 zeigt das daraus resultierende Raster. Mit insgesamt 6 Gelen (jeweils mit 62,5 μg Gesamtprotein), die an zwei verschiedenen Tagen hergestellt wurden, wurde derart verfahren. Auf diesen Gelen wurden je 15 korrespondierende Spots gewählt. Die Spots dieses Analysis-Sets sind in Abbildung V-8 durch Pfeile gekennzeichnet. Die Werte für die Position der Spots in Richtung der Y-Achse, resp. des Molekulargewichts und die Werte in Richtung der x-Achse, resp. des pI 's, wurden in MS Excel[®] exportiert und ausgewertet (siehe hierzu Tabelle V-4). Eins der 6 ausgewerteten Gele weist eine leichte Torsion hinsichtlich des pI 's auf. Daher wurde die Standardabweichung in Tabelle V-5 und V-6 mit und ohne Berücksichtigung diese Gels berechnet.

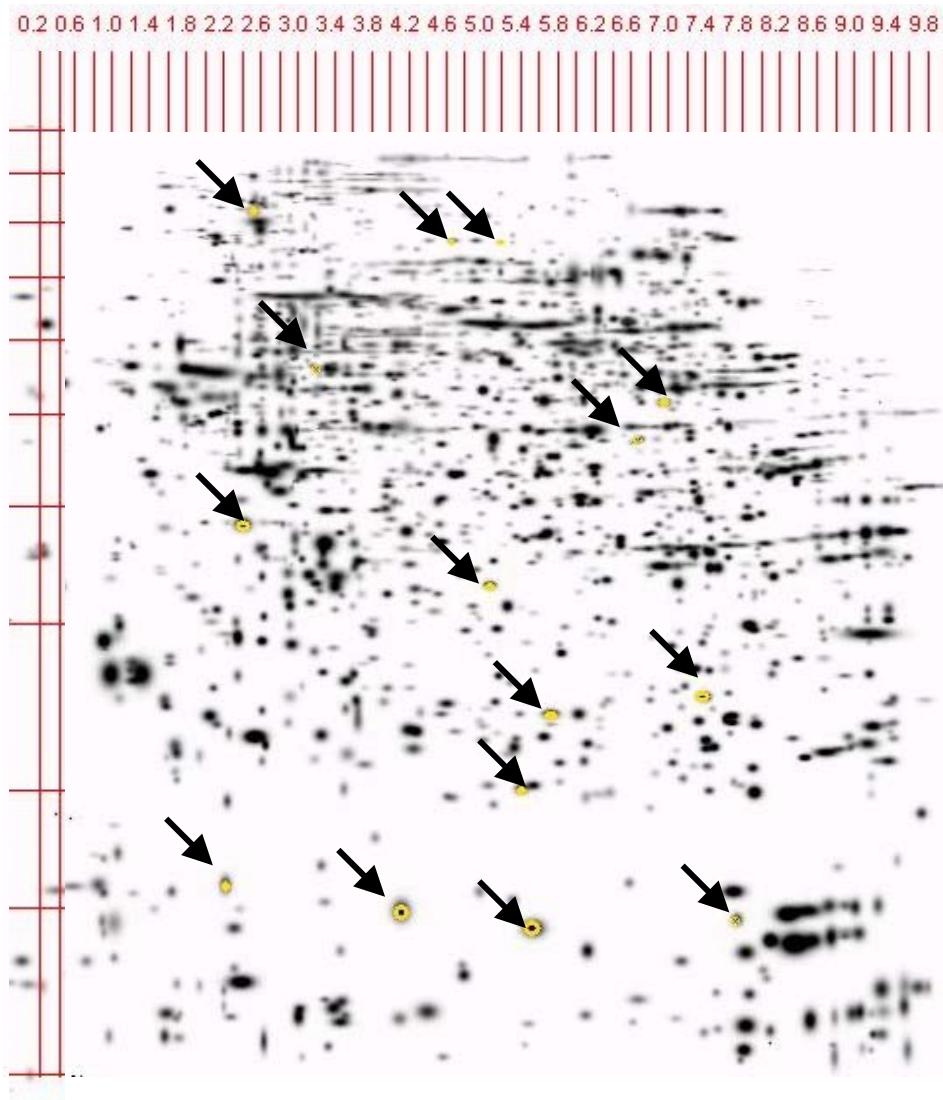


Abb. V-8: Die oben markierten Spots wurden hinsichtlich ihrer Position auf den 6 Gelen ausgewertet.

| Molekulargewicht | | | | | | | | |
|----------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|------------------|
| Gel | WS-57 | WS-58 | WS-59 | WS-60 | WS-67 | WS-68 | Stabw | Stabw ohne WS-68 |
| Spot1 | 99,97 | 100,41 | 99,72 | 101,12 | 99,87 | 101,63 | 0,77 | 0,57 |
| Spot2 | 91,89 | 91,69 | 91,06 | 95,45 | 93,41 | 91,77 | 1,62 | 1,76 |
| Spot3 | 91,74 | 91,62 | 91,02 | 95,46 | 93,63 | 93,00 | 1,64 | 1,83 |
| Spot4 | 64,60 | 65,34 | 65,33 | 66,15 | 64,95 | 67,46 | 1,03 | 0,58 |
| Spot5 | 59,07 | 58,55 | 59,22 | 60,78 | 59,73 | 56,48 | 1,44 | 0,84 |
| Spot6 | 53,34 | 53,47 | 53,51 | 55,05 | 54,49 | 51,72 | 1,14 | 0,76 |
| Spot7 | 42,15 | 42,53 | 42,55 | 40,77 | 41,41 | 44,04 | 1,12 | 0,77 |
| Spot8 | 35,73 | 36,67 | 35,69 | 36,69 | 36,90 | 36,29 | 0,52 | 0,58 |
| Spot9 | 26,38 | 26,47 | 26,39 | 26,13 | 26,42 | 25,41 | 0,41 | 0,13 |
| Spot10 | 25,06 | 26,61 | 25,26 | 26,03 | 26,28 | 25,31 | 0,63 | 0,67 |
| Spot11 | 20,41 | 21,21 | 20,40 | 20,78 | 21,07 | 20,20 | 0,41 | 0,37 |
| Spot12 | 15,70 | 15,86 | 15,55 | 14,85 | 15,51 | 16,34 | 0,49 | 0,39 |
| Spot13 | 14,64 | 15,25 | 14,55 | 14,86 | 15,25 | 15,46 | 0,37 | 0,33 |
| Spot14 | 14,29 | 14,03 | 14,22 | 13,95 | 14,39 | 14,02 | 0,17 | 0,18 |
| Spot15 | 13,99 | 14,59 | 14,25 | 14,33 | 14,66 | 14,50 | 0,25 | 0,27 |
| Mittelwert Stabw | | | | | | | 0,80 | 0,67 |
| Mittelwert Stabw [%] | | | | | | | 0,80 | 0,67 |

Tab. V-5: Daten zur Bestimmung der Stabw der ermittelten Molekulargewichte

| pI | | | | | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| Gel | WS-57 | WS-58 | WS-59 | WS-60 | WS-67 | WS-68 | Stabw | Stabw ohne WS-68 |
| Spot1 | 2,57 | 2,50 | 2,44 | 2,71 | 2,54 | 2,27 | 0,15 | 0,10 |
| Spot2 | 4,99 | 5,02 | 5,64 | 5,60 | 5,65 | 4,95 | 0,36 | 0,35 |
| Spot3 | 5,57 | 5,54 | 5,05 | 5,09 | 5,08 | 4,46 | 0,41 | 0,27 |
| Spot4 | 3,35 | 3,36 | 3,34 | 3,60 | 3,44 | 3,05 | 0,18 | 0,11 |
| Spot5 | 7,56 | 7,55 | 7,51 | 7,56 | 7,58 | 7,02 | 0,22 | 0,03 |
| Spot6 | 7,25 | 7,22 | 7,20 | 7,23 | 7,26 | 6,65 | 0,24 | 0,02 |
| Spot7 | 2,45 | 2,34 | 2,36 | 2,69 | 2,44 | 2,20 | 0,16 | 0,14 |
| Spot8 | 5,44 | 5,39 | 5,49 | 5,57 | 5,56 | 4,64 | 0,36 | 0,08 |
| Spot9 | 8,03 | 8,06 | 7,94 | 8,04 | 8,03 | 7,43 | 0,24 | 0,05 |
| Spot10 | 6,18 | 6,08 | 6,22 | 6,20 | 6,25 | 5,14 | 0,43 | 0,07 |
| Spot11 | 5,82 | 5,71 | 5,87 | 5,93 | 5,90 | 4,78 | 0,44 | 0,08 |
| Spot12 | 2,23 | 2,18 | 2,07 | 2,63 | 2,31 | 2,03 | 0,22 | 0,21 |
| Spot13 | 4,36 | 4,40 | 4,41 | 4,85 | 4,64 | 3,70 | 0,39 | 0,21 |
| Spot14 | 8,43 | 8,35 | 8,26 | 8,35 | 8,35 | 7,79 | 0,23 | 0,06 |
| Spot15 | 5,96 | 5,78 | 6,02 | 6,12 | 6,08 | 4,77 | 0,52 | 0,14 |
| Mittelwert Stabw | | | | | | | 0,30 | 0,13 |
| Mittelwert Stabw [%] | | | | | | | 3,02 | 1,27 |

Tab. V-6: Daten zur Bestimmung der Stabw der ermittelten pI-Werte

Validierung

Ermittlung des Konfidenzintervalls für *pI* und MW¹¹⁷

Als 95 %iges Konfidenzintervall (K 95) wird der Bereich um einen Mittelwert (*X*) aus (*n*) Proben bezeichnet, in dem mit 95 %iger Sicherheit der Wahre Mittelwert (μ) liegt. Voraussetzung ist, dass die Einzelwerte einer Normalverteilung folgen, sprich zufällige Streuung mit einer Standardabweichung (σ) um den wahren Mittelwert (μ). Ausreißer unter den Einzelwerten sollten eliminiert werden.

Formel zur Berechnung des (K 95):

$$(K95) = X \pm 1,960 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

So wäre beispielsweise für Spot 8 das Molekulargewicht $36,34 \text{ kDa} \pm 0,51$ und der *pI* $4,53 \pm 0,18$.

Es macht wenig Sinn derartige statistische Betrachtungen für jeden Spot anzustellen, es soll aber zeigen, wie die Präzision der mit 2-DE erzielten Molekulargewichts und *pI*-Daten einzuschätzen ist.

Bei den Molekulargewichten müsste noch berücksichtigt werden, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in Abhängigkeit des Molekulargewichtes einer logarithmischen Funktion folgt und zudem durch Verwendung nicht linearer Gradientengele dieser Zusammenhang mathematisch an Komplexität gewinnt. Gleiches gilt bei der Verwendung nicht linearer IPG-Strips.

Bei der Frage nach der Richtigkeit der mittels 2-DE ermittelten Molekulargewichte und *pI*-Werte muss berücksichtigt werden, dass posttranslationale Modifikationen zu deutlichen MW- und *pI*-Verschiebungen führen können, demnach darf man nicht nur die reine Aminosäuresequenz betrachten.

Wiederholpräzision

Hierzu wurden 4 Gele unter Verwendung derselben Probe mit je 62,5 µg Gesamtproteinkonzentration und unter denselben Bedingungen hergestellt. Alle 4 Gele wurden an einem Tag hergestellt, demnach waren sämtliche Lösungen und auch alle sonstigen Versuchsparameter identisch. Es wurde eine begrenzte Anzahl an Spots (29) für diese Auswertung herangezogen und zu einem Analysis-Set zusammengefaßt. Die Versuche zur System Suitability haben bereits gezeigt, dass nur gut aufgelöste und nicht überlappende Spots quantitativ auswertbar sind. Demnach wurde ein Bereich ausgewählt, in dem die meisten Spots diese Kriterien erfüllen. Abbildung V-9 zeigt den ausgewählten Bereich und die Spots des Analysis-Sets.

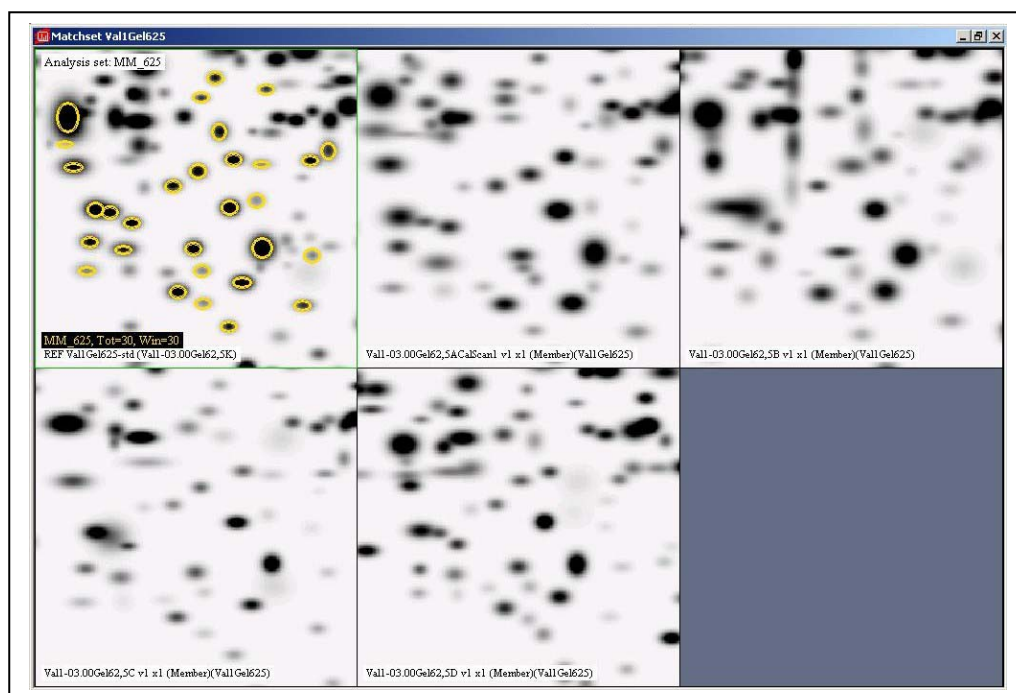


Abb. V-9: Spots des Analysis-Sets, Master-Gel und 4 Gele vom selben Tag.

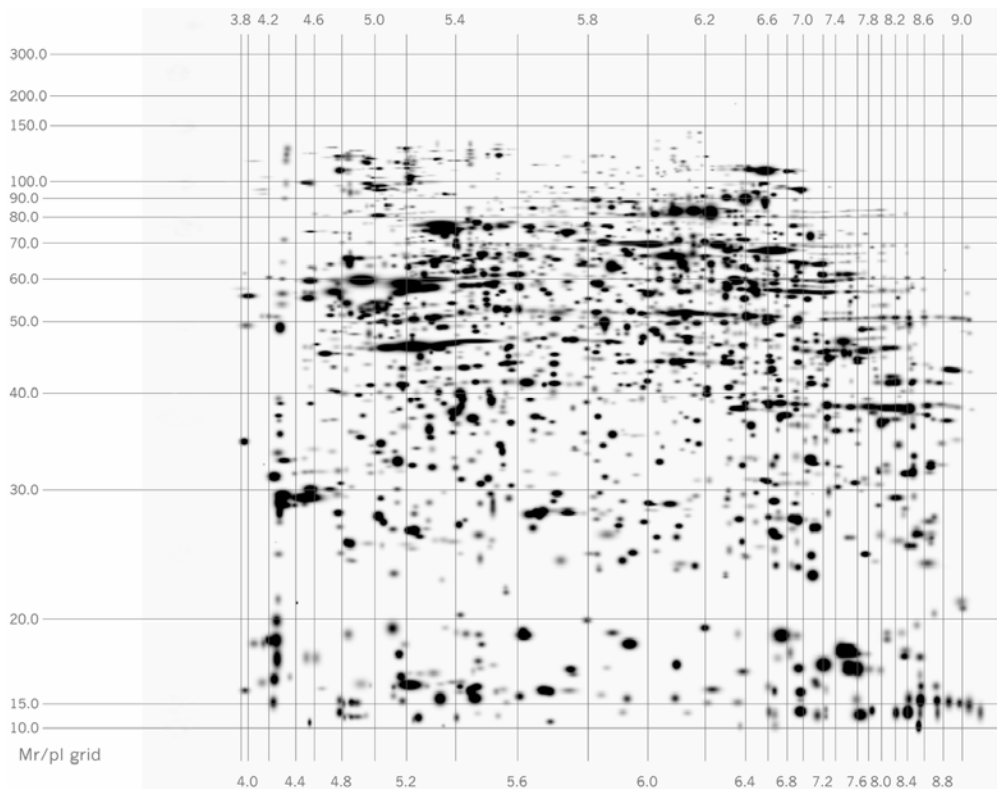


Abb. V-10: Ansicht der Spots eines 2-DE-Gels mit MW- und pI-Zuordnung, 50 µg Gesamtprotein, IPG-Strip 3-10 NL, 2.Dimension 10-15 % T, Silberfärbung.

Möglichkeiten OD-Daten zu normalisieren

Die Software bietet die Möglichkeit die OD-Werte der einzelnen Spots zu exportieren. Darüber hinaus werden 4 unterschiedliche Verfahren der Normalisierung angeboten, sprich die quantitativen Werte werden relativiert.

Dabei bezieht sich die Normalisierung auf:

- (a) die Summe der Gesamt-OD des Gels
- (b) die Summe der OD aller gültigen Spots
- (c) die Summe der OD aller Spots in einem Analysis-Set
- (d) einen vom Benutzer zu spezifizierenden Wert

| Gel-Code | Summe Gesamt OD des Gels | Summe OD aller gültigen Spots | Summe OD des Analysis-Sets |
|----------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| WS- 57 | 210178 | 112711 | 1586 |
| WS- 58 | 243323 | 135662 | 1718 |
| WS- 59 | 246959 | 152192 | 1017 |
| WS- 60 | 194533 | 114597 | 1044 |

Tab.V-7: OD-Werte der 4 Gele zur Wiederholpräzision

| Spot Nr. | WS-57 | WS-58 | WS-59 | WS-60 | Mittel- wert | Stabw | RSD [%] |
|------------|--------|--------|--------|--------|-----------------|-------|----------------|
| 3314 | 17,76 | 19,36 | 9,08 | 8,31 | 13,63 | 5,74 | 42,13 |
| 3315 | 46,69 | 50,38 | 23,69 | 20,73 | 35,37 | 15,32 | 43,31 |
| 3316 | 108,98 | 115,97 | 84,44 | 80,16 | 97,39 | 17,74 | 18,22 |
| 3317 | 26,49 | 137,18 | 88,38 | 20,87 | 68,23 | 55,21 | 80,92 |
| 3425 | 222,11 | 343,84 | 268,75 | 217,37 | 263,02 | 58,66 | 22,30 |
| 3426 | 99,15 | 101,04 | 57,72 | 51,79 | 77,43 | 26,30 | 33,97 |
| 4301 | 50,95 | 30,84 | 23,64 | 21,24 | 31,67 | 13,49 | 42,59 |
| 4304 | 47,08 | 34,02 | 18,00 | 26,04 | 31,29 | 12,40 | 39,62 |
| 4307 | 32,07 | 32,38 | 12,47 | 17,65 | 23,64 | 10,13 | 42,86 |
| 4308 | 78,13 | 65,92 | 28,01 | 40,10 | 53,04 | 23,02 | 43,40 |
| 4309 | 49,67 | 52,04 | 29,02 | 41,98 | 43,18 | 10,37 | 24,02 |
| 4310 | 17,18 | 14,91 | 3,92 | 7,88 | 10,97 | 6,15 | 56,02 |
| 4311 | 12,55 | 10,31 | 4,60 | 7,15 | 8,65 | 3,49 | 40,38 |
| 4312 | 25,35 | 12,87 | 10,40 | 14,39 | 15,75 | 6,61 | 41,94 |
| 4313 | 141,99 | 114,54 | 84,14 | 94,50 | 108,79 | 25,48 | 23,42 |
| 4314 | 109,91 | 101,52 | 48,45 | 55,26 | 78,79 | 31,41 | 39,86 |
| 4315 | 7,74 | 4,15 | 3,83 | 5,97 | 5,42 | 1,81 | 33,38 |
| 4317 | 201,37 | 180,17 | 98,20 | 138,46 | 154,55 | 45,76 | 29,61 |
| 4411 | 47,90 | 63,25 | 18,82 | 22,65 | 38,16 | 21,13 | 55,37 |
| 4412 | 9,93 | 39,48 | 13,55 | 22,78 | 21,44 | 13,19 | 61,54 |
| 4415 | 17,50 | 22,06 | 6,63 | 10,41 | 14,15 | 6,94 | 49,02 |
| 4417 | 9,42 | 34,68 | 5,40 | 15,78 | 16,32 | 12,96 | 79,44 |
| 4419 | 62,56 | 38,12 | 22,94 | 32,82 | 39,11 | 16,85 | 43,09 |
| 4423 | 11,42 | 2,03 | 5,40 | 11,18 | 7,51 | 4,59 | 61,16 |
| 4424 | 14,18 | 15,09 | 5,47 | 11,14 | 11,47 | 4,34 | 37,85 |
| 5302 | 23,72 | 18,05 | 9,79 | 3,30 | 13,72 | 9,00 | 65,59 |
| 5303 | 13,50 | 18,79 | 4,65 | 5,32 | 10,57 | 6,80 | 64,37 |
| 5403 | 37,08 | 20,86 | 11,16 | 14,56 | 20,92 | 11,50 | 54,99 |
| 5407 | 44,07 | 24,17 | 17,13 | 24,70 | 27,52 | 11,56 | 42,02 |
| Mittelwert | | | | | | | 45,25 |

Tab.V-8: OD-Werte zur Wiederholpräzision

Validierung

| Spot Nr. | OD | Normalisiert Gesamt OD des Gels | Normalisiert Summe OD aller gültigen Spots | Normalisiert Summe OD aller Spots im Analysis-Set |
|------------|---------|------------------------------------|--|---|
| | RSD [%] | RSD [%] | RSD [%] | RSD [%] |
| 3314 | 42,13 | 74,11 | 45,49 | 16,87 |
| 3315 | 43,31 | 56,30 | 46,77 | 18,54 |
| 3316 | 18,22 | 30,26 | 23,41 | 9,82 |
| 3317 | 80,92 | 42,25 | 76,17 | 74,08 |
| 3425 | 22,30 | 27,76 | 16,61 | 25,00 |
| 3426 | 33,97 | 44,99 | 38,67 | 9,55 |
| 4301 | 42,59 | 53,57 | 52,80 | 26,46 |
| 4304 | 39,62 | 47,43 | 48,81 | 23,35 |
| 4307 | 42,86 | 55,92 | 47,39 | 20,38 |
| 4308 | 43,40 | 50,84 | 50,31 | 23,11 |
| 4309 | 24,02 | 49,81 | 31,24 | 15,98 |
| 4310 | 56,02 | 58,98 | 60,96 | 37,81 |
| 4311 | 40,38 | 70,71 | 47,99 | 22,64 |
| 4312 | 41,94 | 45,11 | 53,29 | 31,68 |
| 4313 | 23,42 | 25,07 | 33,51 | 13,36 |
| 4314 | 39,86 | 41,60 | 45,94 | 16,27 |
| 4315 | 33,38 | 62,87 | 45,56 | 34,15 |
| 4317 | 29,61 | 38,71 | 37,80 | 15,00 |
| 4411 | 55,37 | 50,08 | 55,46 | 31,00 |
| 4412 | 61,54 | 48,15 | 58,66 | 48,74 |
| 4415 | 49,02 | 59,08 | 49,94 | 26,38 |
| 4417 | 79,44 | 77,49 | 73,96 | 62,33 |
| 4419 | 43,09 | 51,55 | 53,36 | 28,45 |
| 4423 | 61,16 | 107,70 | 70,12 | 65,10 |
| 4424 | 37,85 | 47,85 | 42,69 | 26,23 |
| 5302 | 65,59 | 81,24 | 73,45 | 50,84 |
| 5303 | 64,37 | 54,84 | 63,60 | 41,27 |
| 5403 | 54,99 | 68,57 | 64,78 | 37,37 |
| 5407 | 42,02 | 53,34 | 53,06 | 30,44 |
| Mittelwert | 45,25 | 54,35 | 50,41 | 30,42 |

Tab. V-9: Vergleich verschiedener Normalisierungsverfahren zur Quantifizierung, angegeben sind jeweils die relativen Standardabweichungen.

Betrachtet man die relativen Standardabweichungen der einzelnen Spots bei unterschiedlichen Normalisierungsverfahren, stellt man fest, dass mit der Normalisierung, bezogen auf die Gesamt-OD des Gels die schlechtesten Werte erhalten werden. Auch durch die Normalisierung, bezogen auf die Summe der OD aller gültigen Spots, lässt sich die Streuung nicht wesentlich verringern. Eine geringere Streuung erzielt man, indem man auf die Summe der OD des hier betrachteten Analysis-Sets normalisiert.

Da die Normalisierungsverfahren relativ abstrakt sind, hier ein erläuternder Vergleich: Das Normalisierungsverfahren, bezogen auf ein Analysis-Set, käme bei einer HPLC-Untersuchung folgender Vorgehensweise gleich. Aus einem HPLC-Lauf werden lediglich die Peaks mit einer Retentionszeit zwischen 3 und 6 Minuten betrachtet, die Gesamtpeakfläche wird mit 100 % gleichgesetzt und bei 4 Läufen in Folge werden die relativen Peakflächen verglichen und deren relative Standardabweichung wird ermittelt.

Schaut man sich nun die Spots im Einzelnen an, so stellt man fest, dass die Spots mit höheren relativen Standardabweichungen sich entweder teilweise mit anderen Spots überlappen oder aber geringe Intensität aufweisen. Als Maß für die Überlappung / Symmetrie der Spots kann die Spot-Qualität herangezogen werden. In Abbildung V-11 wurde die relative Standardabweichung nach Normalisierung, bezogen auf das Analysis-Set und der Mittelwert der Spot Quality, verglichen. Tabelle V-10 zeigt die zugehörigen Daten, in der letzten Spalte werden die Spots ausgewiesen, die sowohl eine Qualität > 60 als auch eine mittlere OD > 10 aufweisen.

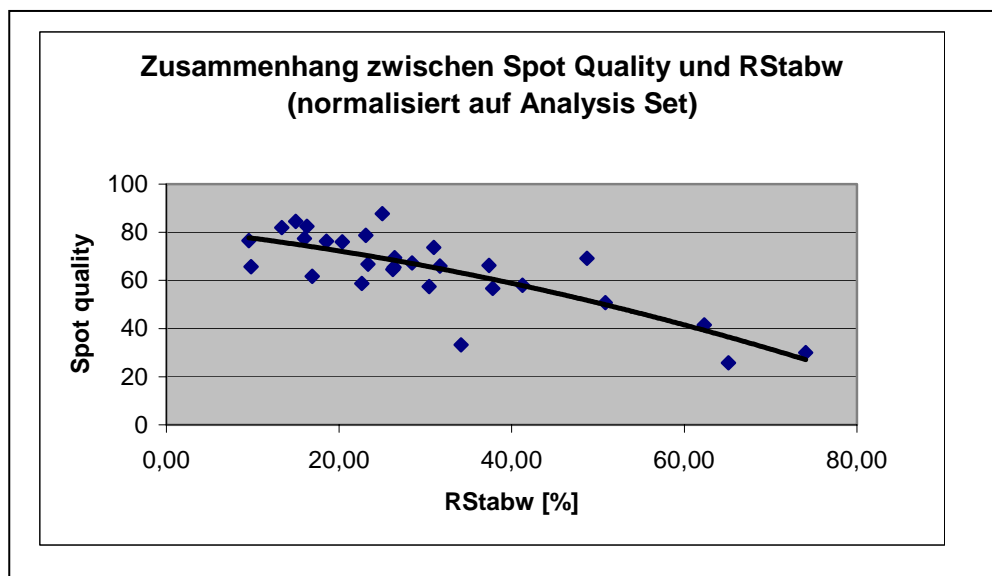


Abb. V-11: Spot Quality verglichen mit RStabw der Spot Quantity

Validierung

| Spot Nr. | RStabw [%] Norm Analysis | Mittelwert OD | Mittelwert Spot Quality | OD > 10 UND Spot Qual >60 |
|----------|-----------------------------|---------------|----------------------------|------------------------------|
| 3426 | 9,55 | 77,43 | 76,5 | ja |
| 3316 | 9,82 | 97,39 | 65,75 | ja |
| 4313 | 13,36 | 108,79 | 82 | ja |
| 4317 | 15,00 | 154,55 | 84,5 | ja |
| 4309 | 15,98 | 43,18 | 77,5 | ja |
| 4314 | 16,27 | 78,79 | 82,5 | ja |
| 3314 | 16,87 | 13,63 | 61,75 | ja |
| 3315 | 18,54 | 35,37 | 76,25 | ja |
| 4307 | 20,38 | 23,64 | 76 | ja |
| 4311 | 22,64 | 8,65 | 58,75 | nein |
| 4308 | 23,11 | 53,04 | 78,75 | ja |
| 4304 | 23,35 | 31,29 | 66,75 | ja |
| 3425 | 25,00 | 263,02 | 87,75 | ja |
| 4424 | 26,23 | 11,47 | 64,5 | ja |
| 4415 | 26,38 | 14,15 | 65,5 | ja |
| 4301 | 26,46 | 31,67 | 69,5 | ja |
| 4419 | 28,45 | 39,11 | 67,25 | ja |
| 5407 | 30,44 | 27,52 | 57,5 | nein |
| 4411 | 31,00 | 38,16 | 73,75 | ja |
| 4312 | 31,68 | 15,75 | 66 | ja |
| 4315 | 34,15 | 5,42 | 33,25 | nein |
| 5403 | 37,37 | 20,92 | 66,25 | ja |
| 4310 | 37,81 | 10,97 | 56,75 | nein |
| 5303 | 41,27 | 10,57 | 58 | nein |
| 4412 | 48,74 | 21,44 | 69,25 | ja |
| 5302 | 50,84 | 13,72 | 50,75 | nein |
| 4417 | 62,33 | 16,32 | 41,5 | nein |
| 4423 | 65,10 | 7,51 | 25,75 | nein |
| 3317 | 74,08 | 68,23 | 30 | nein |

Tab. V-10: RStabw Quantity, Mittelwert Spot OD, Mittelwert Spot Quality

Zusammenfassung der Ergebnisse zur Wiederholpräzision:

Es lassen sich qualitativ reproduzierbare Ergebnisse erzielen. Eine Quantifizierung kann nicht für Spots durchgeführt werden, die eine sehr niedrige Intensität zeigen, mit anderen Spots überlappen und / oder eine schlechte Spot-Qualität aufweisen. Nach Optimierung des Normalisierungsverfahrens und Einschränkung der auswertbaren Spots durch die o. g. Kriterien, lässt sich eine relative Standardabweichung in der Größenordnung von 25 % erzielen.

Laborpräzision

Hierunter versteht man die Präzision von Ergebnissen derselben Probe innerhalb eines Labors bei bewußter Änderung eines Parameters.

Es wurden 4 weitere Gele (in der Folge als Lauf 2 bezeichnet) aus derselben Probe, mit derselben Gesamtproteinmenge und unter denselben Bedingungen hergestellt, bezogen auf die Versuche zur Wiederholpräzision (Lauf 1) an einem anderen Tag und mit frischen Lösungen.

Es wurde das gleiche Analysis-Set wie bei der Wiederholpräzision gewählt, die Normalisierung erfolgte ebenfalls bezogen auf das Analysis-Set. Tabelle V-11 zeigt Mittelwerte der einzelnen Läufe sowie die relativen Standardabweichungen der Läufe. Darüber hinaus wurden die Mittelwerte über beide Läufe sowie die relative Standardabweichung aller Einzelwerte aus beiden Läufen und die relative Abweichung der Mittelwerte beider Läufe berechnet, ferner sind die Spots gekennzeichnet, die den unter Wiederholpräzision festgelegten Kriterien Quality >60 und OD >10 nicht entsprachen.

Validierung

| Spot Nr. | MW Lauf1 | MW Lauf2 | RSD Lauf1 | RSD Lauf2 | MW beide | RSD beide [%] | delta MW [%] | Lauf1 OD > 10 UND Quality > 60 | Lauf2 OD > 10 UND Quality > 60 |
|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|---------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 3314 | 9836 | 14402 | 16,87 | 25,31 | 12119 | 29,6 | 37,7 | ja | nein |
| 3315 | 25471 | 32099 | 18,54 | 9,88 | 28785 | 17,9 | 23,0 | ja | ja |
| 3316 | 73979 | 87055 | 9,82 | 29,75 | 80517 | 23,5 | 16,2 | ja | ja |
| 3317 | 50842 | 30473 | 74,08 | 21,49 | 40658 | 67,1 | 50,1 | nein | nein |
| 3425 | 203083 | 146632 | 25,00 | 29,10 | 174857 | 30,2 | 32,3 | ja | nein |
| 3426 | 56902 | 63626 | 9,55 | 11,89 | 60264 | 11,7 | 11,2 | ja | ja |
| 4301 | 23409 | 30319 | 26,46 | 15,67 | 26864 | 23,5 | 25,7 | ja | ja |
| 4304 | 23024 | 26618 | 23,35 | 9,63 | 24821 | 17,5 | 14,5 | ja | ja |
| 4307 | 17053 | 21480 | 20,38 | 15,23 | 19266 | 20,3 | 23,0 | ja | ja |
| 4308 | 38384 | 35398 | 23,11 | 18,02 | 36891 | 19,9 | 8,1 | ja | ja |
| 4309 | 32575 | 39160 | 15,98 | 7,91 | 35868 | 14,8 | 18,4 | ja | ja |
| 4310 | 7724 | 8839 | 37,81 | 15,72 | 8281 | 26,6 | 13,5 | nein | ja |
| 4311 | 6321 | 9802 | 22,64 | 29,04 | 8062 | 34,7 | 43,2 | nein | ja |
| 4312 | 11867 | 13084 | 31,68 | 10,17 | 12475 | 21,6 | 9,8 | ja | ja |
| 4313 | 82330 | 62860 | 13,36 | 2,12 | 72595 | 17,5 | 26,8 | ja | ja |
| 4314 | 57224 | 58751 | 16,27 | 14,35 | 57987 | 14,2 | 2,6 | ja | ja |
| 4315 | 4193 | 10413 | 34,15 | 34,99 | 7303 | 57,5 | 85,2 | nein | nein |
| 4317 | 115213 | 108371 | 15,00 | 8,70 | 111792 | 12,0 | 6,1 | ja | ja |
| 4411 | 26797 | 26877 | 31,00 | 10,03 | 26837 | 21,3 | 0,3 | ja | ja |
| 4412 | 16091 | 18894 | 48,74 | 17,76 | 17493 | 33,1 | 16,0 | ja | ja |
| 4415 | 10089 | 12289 | 26,38 | 8,79 | 11189 | 19,8 | 19,7 | ja | ja |
| 4417 | 11633 | 20953 | 62,33 | 42,54 | 16293 | 55,4 | 57,2 | nein | ja |
| 4419 | 28898 | 29750 | 28,45 | 17,19 | 29324 | 21,7 | 2,9 | ja | ja |
| 4423 | 6097 | 14687 | 65,10 | 76,86 | 10392 | 87,4 | 82,7 | nein | nein |
| 4424 | 8441 | 9493 | 26,23 | 15,92 | 8967 | 20,6 | 11,7 | ja | ja |
| 5302 | 9561 | 17223 | 50,84 | 8,41 | 13392 | 39,4 | 57,2 | nein | ja |
| 5303 | 7277 | 7296 | 41,27 | 24,36 | 7286 | 31,4 | 0,3 | nein | nein |
| 5403 | 15108 | 18835 | 37,37 | 24,62 | 16971 | 30,5 | 22,0 | ja | ja |
| 5407 | 20582 | 24320 | 30,44 | 33,90 | 22451 | 31,5 | 16,7 | nein | nein |

Tab. V-11: Quantitative Auswertung Vergleich Lauf 1 mit Lauf 2.

Test auf Normalverteilung nach David

Die Werte sind dann mit einem vorgegebenen Signifikanzniveau (meist $P = 99\%$) normalverteilt, wenn der Quotient aus Spannweite (maximaler Wert – minimaler Wert) und Standardabweichung sich innerhalb der von David vorgegebenen Grenzen befindet (bei $P = 99\%$ und Stichprobenanzahl = 8 ist die Untergrenze 2,35 und die Obergrenze 3,74).

| Spot Nr. | Min | Max | Spannweite | David Quotient |
|----------|--------|--------|------------|----------------|
| 3314 | 7954 | 18453 | 10499 | 2,93 |
| 3315 | 19850 | 35080 | 15230 | 2,96 |
| 3316 | 64585 | 118997 | 54412 | 2,87 |
| 3317 | 16695 | 86842 | 70147 | 2,57 |
| 3425 | 108592 | 264082 | 155491 | 2,94 |
| 3426 | 49580 | 71924 | 22344 | 3,16 |
| 4301 | 17951 | 33823 | 15872 | 2,52 |
| 4304 | 17686 | 29673 | 11987 | 2,76 |
| 4307 | 12256 | 23957 | 11701 | 2,99 |
| 4308 | 27524 | 49250 | 21726 | 2,96 |
| 4309 | 28516 | 43617 | 15101 | 2,85 |
| 4310 | 3851 | 10829 | 6978 | 3,17 |
| 4311 | 4523 | 12384 | 7861 | 2,81 |
| 4312 | 7491 | 15976 | 8485 | 3,15 |
| 4313 | 61464 | 90470 | 29006 | 2,29 |
| 4314 | 47611 | 69281 | 21670 | 2,62 |
| 4315 | 2414 | 15212 | 12798 | 3,05 |
| 4317 | 96492 | 132562 | 36070 | 2,69 |
| 4411 | 18491 | 36813 | 18322 | 3,20 |
| 4412 | 6257 | 22981 | 16724 | 2,89 |
| 4415 | 6516 | 13427 | 6910 | 3,12 |
| 4417 | 5307 | 26999 | 21692 | 2,40 |
| 4419 | 22188 | 39435 | 17247 | 2,71 |
| 4423 | 1180 | 25591 | 24412 | 2,69 |
| 4424 | 5375 | 11753 | 6378 | 3,46 |
| 5302 | 3163 | 18699 | 15536 | 2,95 |
| 5303 | 4566 | 10939 | 6373 | 2,79 |
| 5403 | 10968 | 25390 | 14421 | 2,78 |
| 5407 | 12910 | 32580 | 19670 | 2,78 |

Tab. V-12: Test auf Normalverteilung nach David. Es wurden die Daten der 8 Gele aus Lauf 1 und Lauf 2 verwendet.

Entsprechend der in Tabelle V-12 ausgewiesenen Daten sind alle hier betrachteten Einzelwerte normalverteilt.

Ermittlung von Ausreißern nach Grubbs

Hierzu wurde für alle 232 Einzelwerte der Grubbs Test¹¹⁶ durchgeführt. Dazu berechnet man die Prüfgröße Q . Ein Einzelwert ist dann als Ausreißer zu deklarieren, wenn der berechnete Wert größer ist als der in der entsprechenden Tabelle nach Grubbs¹¹⁶ aufgeführte Wert. In die Grubbs Tabelle gehen die Größe der Stichprobe und das gewählte Signifikanzniveau ein.

Validierung

Formel zur Berechnung von Q:

$$Q = \frac{|x_i - x|}{s}$$

x_i : Einzelwert

x : Mittelwert

s : Standardabweichung

Für ein Signifikanzniveau von 95 % und bei der gegebenen Stichprobengröße von acht, beträgt der tabellarische Wert nach Grubbs 2,032.

Lediglich einer der 232 Einzelwerte ergab einen höheren Wert und ist demnach als Ausreißer einzustufen. Der Grund für diese sehr geringe Anzahl an Ausreißern liegt in der hohen relativen Standardabweichung. Demnach können etwaige Ausreißer nur schwer ermittelt werden.

F-Test und T-Test¹¹⁸

Ziel dieser Auswertung soll sein herauszufinden, ob man mittels T-Test fälschlicherweise signifikante Unterschiede zwischen Lauf 1 und Lauf 2 findet. Voraussetzung für die Durchführung eines T-Tests ist die Varianzhomogenität. Da sowohl für Lauf 1 als auch für Lauf 2 dieselbe Probe verwendet wurde, sollten sich die Standardabweichungen und damit die Varianzen nur zufällig unterscheiden, es wurde trotzdem ein F-Test zur Prüfung auf Varianzhomogenität durchgeführt. Dazu wurde der F-Wert berechnet und mit dem kritischen Wert verglichen (bei je 3 Freiheitsgraden und einem $P = 95\%$, 9,28). Liegt der berechnete F-Wert oberhalb des kritischen Werts, ist keine Varianzhomogenität gegeben.

$$F - Wert = \frac{(s_1)^2}{(s_2)^2}$$

mit $s_1 > s_2$

Die Nullhypothese des T-Test lautet: Die beiden Stichproben (Lauf 1 und Lauf 2) unterscheiden sich nicht, die wahren Mittelwerte sind identisch.

Gegenhypothese: Die beiden Stichproben unterscheiden sich.

Die Nullhypothese wird dann zurückgewiesen, wenn der berechnete T-Wert nicht zwischen $+t^*$ und $-t^*$ liegt.

Formel zur Berechnung des T-Wertes:

$$T - Wert = \frac{x - y}{s_t} \sqrt{\frac{n_x \cdot n_y}{n_x + n_y}}$$

$$s_t = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x)^2 + \sum (y_i - y)^2}{n_x + n_y - 2}}$$

x: Mittelwert Lauf 1

y: Mittelwert Lauf 2

s_t: Standardabweichung zum T-Test

n_x Stichprobenumfang Lauf 1

n_y Stichprobenumfang Lauf 2

Berechnung der Freiheitsgrade:

$$v = n_x + n_y - 2$$

Validierung

Kritischer Wert für einen beidseitigen T-Test, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit für α von 0,05 und 6 Freiheitsgraden: $t^* = 2,447$

| Spot Nr. | F-Wert | F-Test | T-Wert | T-Test |
|----------|--------|--------|--------|----------|
| 3314 | 4,83 | OK | 2,28 | OK |
| 3315 | 2,22 | OK | 2,33 | OK |
| 3316 | 12,70 | failed | 0,97 | OK |
| 3317 | 33,07 | failed | -1,07 | OK |
| 3425 | 1,42 | OK | -1,70 | OK |
| 3426 | 1,94 | OK | 1,44 | OK |
| 4301 | 1,70 | OK | 1,77 | OK |
| 4304 | 4,40 | OK | 1,21 | OK |
| 4307 | 1,13 | OK | 1,86 | OK |
| 4308 | 1,93 | OK | -0,55 | OK |
| 4309 | 2,82 | OK | 2,17 | OK |
| 4310 | 4,42 | OK | 0,69 | OK |
| 4311 | 3,96 | OK | 2,18 | OK |
| 4312 | 7,98 | OK | 0,61 | OK |
| 4313 | 68,04 | failed | -3,51 | (failed) |
| 4314 | 1,22 | OK | 0,24 | OK |
| 4315 | 6,47 | OK | 3,18 | failed |
| 4317 | 3,36 | OK | -0,70 | OK |
| 4411 | 9,49 | failed | 0,02 | OK |
| 4412 | 5,46 | OK | 0,66 | OK |
| 4415 | 6,08 | OK | 1,53 | OK |
| 4417 | 1,51 | OK | 1,62 | OK |
| 4419 | 2,58 | OK | 0,18 | OK |
| 4423 | 8,09 | OK | 1,44 | OK |
| 4424 | 2,15 | OK | 0,79 | OK |
| 5302 | 11,25 | failed | 3,02 | (failed) |
| 5303 | 2,85 | OK | 0,01 | OK |
| 5403 | 1,48 | OK | 1,02 | OK |
| 5407 | 1,73 | OK | 0,72 | OK |

Tab. V-13: F-Test und T-Test Ergebnisse

Bei 5 der 29 ausgewerteten Spots war keine Varianzhomogenität gegeben. Bei 3 der Spots ergab der T-Test, dass sich die beiden Läufe, unter den gewählten Bedingungen fälschlicherweise signifikant voneinander unterscheiden, wobei 2 von 3 den F-Test nicht bestanden hatten. Quantitative, mittels 2-DE / Silberfärbung gewonnene Daten, müssen kritisch hinterfragt werden.

Vergleichspräzision

Unter Vergleichspräzision versteht man die Verwendung derselben Methode und derselben Probe, aber in einem anderen Labor und durch einen anderen Bearbeiter.

Da es am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt ein 2-DE Labor mit gleicher Geräteausstattung gibt, konnte in einem Ringversuch die Vergleichspräzision bestimmt werden. Dazu wurden mehrere Aliquots der in Wien verwendeten Probe nach Frankfurt transferiert und dort von 2 weiteren Bearbeitern (Dr. M. Walther und M. Masree) jeweils 4 Gele (Lauf 3 und Lauf 4) unter Verwendung des gleichen Protokolls und mit je 62,5 µg Protein hergestellt.

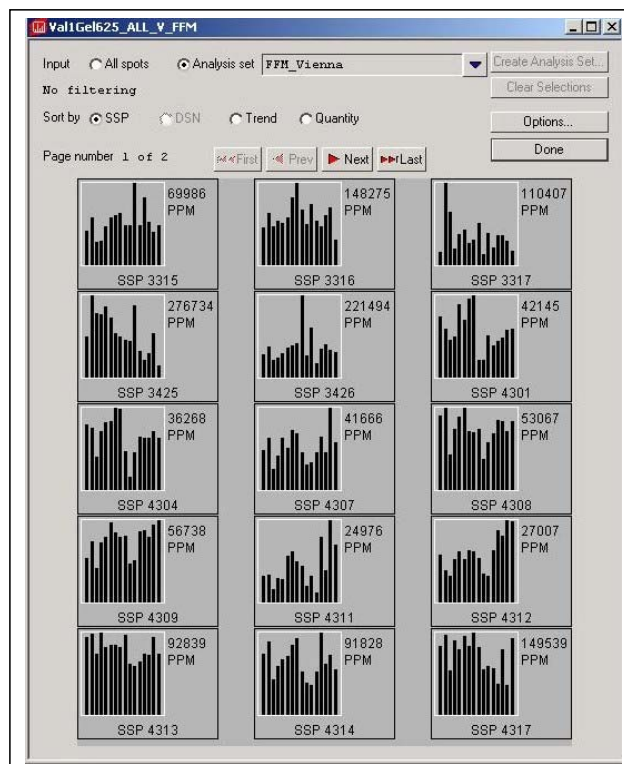


Abb. V-12: Ein Teil der Rohdaten des Analysis-Sets zur Laborpräzision, Vergleich Frankfurt / Wien

Validierung

Die Gele aus Lauf 1, 2, 3 und 4 wurden zu einem Matchset zusammengefügt, 24 der 29 Spots aus dem für die Vergleichs- und Wiederholpräzision verwendeten Analysis-Set konnten auf allen 16 Gelen „gematcht“ werden. Neben der Normalisierung, bezogen auf das Analysis-Set (24 Spots), wurde eine Normalisierung durchgeführt, bezogen auf ein weiteres Analysis-Set, welches aus 11 Spots besteht, die nicht zu den hier statistisch ausgewerteten Spots gehören, gut aufgelöst und über das ganze Gel verteilt sind. Tabelle V-14 gibt eine Übersicht über die erzielten Mittelwerte und relativen Standardabweichungen der einzelnen Läufe.

| Spot Nr. | Lauf 1 | | Lauf 2 | | Lauf 3 (M. Masree) | | Lauf 4 (Dr. Walther) | |
|----------|----------|---------|----------|---------|--------------------|---------|----------------------|---------|
| | MW | RSD [%] | MW | RSD [%] | MW | RSD [%] | MW | RSD [%] |
| 3315 | 27225,0 | 36,2 | 39778,9 | 12,4 | 42561,5 | 43,0 | 38754,5 | 32,7 |
| 3316 | 76924,0 | 15,7 | 107957,3 | 30,9 | 90497,2 | 19,1 | 77047,3 | 33,3 |
| 3317 | 54708,2 | 81,9 | 37643,3 | 21,3 | 33503,6 | 57,9 | 32452,3 | 31,1 |
| 3425 | 211236,9 | 27,1 | 180387,8 | 26,3 | 143819,1 | 46,6 | 80061,1 | 60,4 |
| 3426 | 60024,2 | 25,7 | 78851,4 | 14,1 | 112634,0 | 74,4 | 75589,1 | 12,8 |
| 4301 | 24065,3 | 22,6 | 37431,7 | 14,9 | 13739,4 | 46,1 | 21945,0 | 13,4 |
| 4304 | 24144,0 | 27,0 | 32929,0 | 10,6 | 15502,6 | 47,7 | 23599,5 | 6,5 |
| 4307 | 18318,4 | 36,0 | 26524,9 | 14,6 | 15889,4 | 20,2 | 27825,1 | 35,2 |
| 4308 | 40830,5 | 32,7 | 43729,2 | 17,7 | 31529,0 | 27,9 | 42937,0 | 7,6 |
| 4309 | 34314,7 | 25,8 | 48480,7 | 10,2 | 37349,1 | 31,1 | 51453,5 | 9,6 |
| 4311 | 6699,0 | 30,6 | 12207,5 | 31,3 | 6503,5 | 54,9 | 17987,2 | 35,6 |
| 4312 | 12138,0 | 27,4 | 16149,8 | 8,1 | 12252,6 | 32,4 | 24887,3 | 9,8 |
| 4313 | 85184,7 | 13,6 | 77711,3 | 2,2 | 65432,7 | 25,6 | 72987,3 | 13,0 |
| 4314 | 60757,4 | 29,9 | 72743,4 | 15,6 | 40757,8 | 19,2 | 66454,9 | 27,5 |
| 4317 | 121189,1 | 24,0 | 134170,9 | 10,7 | 94192,7 | 20,2 | 91537,7 | 47,4 |
| 4411 | 29485,4 | 52,3 | 33289,1 | 12,1 | 31812,7 | 35,0 | 47525,0 | 38,9 |
| 4412 | 17814,2 | 64,8 | 23449,9 | 20,3 | 24197,0 | 45,6 | 27846,6 | 37,1 |
| 4415 | 11036,5 | 46,2 | 15169,8 | 6,3 | 21321,6 | 36,2 | 35534,1 | 85,7 |
| 4419 | 30022,7 | 27,8 | 36733,5 | 16,3 | 45379,9 | 38,2 | 65259,2 | 9,2 |
| 4424 | 9066,2 | 37,5 | 11753,1 | 17,2 | 25246,0 | 58,5 | 20323,3 | 43,6 |
| 5302 | 10082,9 | 54,9 | 21336,1 | 11,0 | 7651,3 | 105,1 | 14539,9 | 45,7 |
| 5303 | 8110,0 | 62,3 | 9043,3 | 25,6 | 7834,4 | 71,2 | 17930,0 | 73,0 |
| 5403 | 15752,4 | 36,4 | 23334,6 | 26,3 | 34311,1 | 65,2 | 31169,2 | 38,0 |
| 5407 | 21192,8 | 27,5 | 29982,3 | 33,7 | 14453,7 | 37,2 | 48566,1 | 19,4 |

Tab. V-14: Vergleich Mittelwerte und RSD, Frankfurt / Wien.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der Tabelle V-14 etwas anschaulicher dargestellt. Der Mittelwert aus allen 4 Läufen wurde als tatsächlicher Mittelwert angenommen und jeweils die relative Abweichung der Mittelwerte aus einem Lauf berechnet.

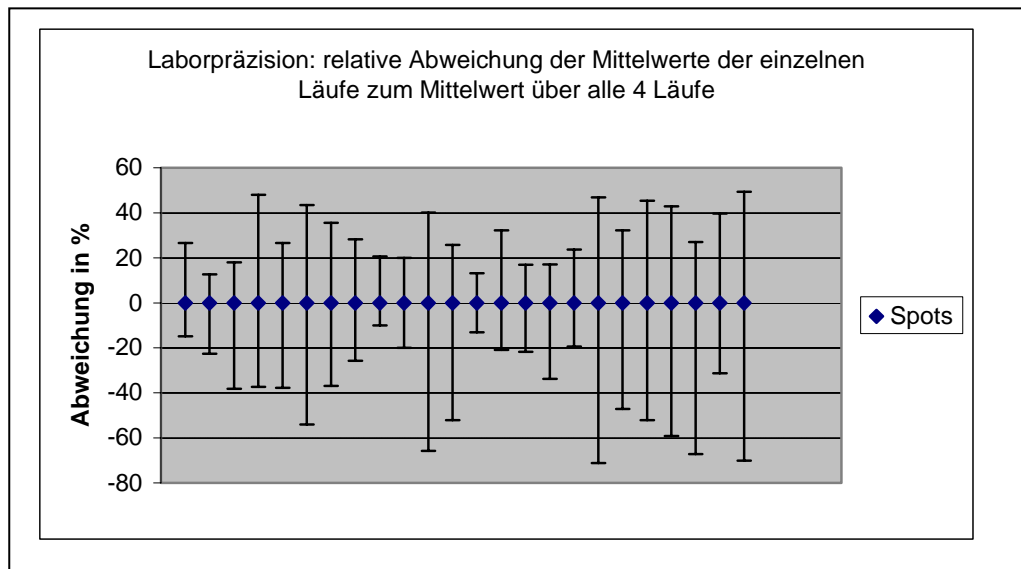


Abb. V-13: Der Mittelwert aus allen 4 Läufen wurde als wahrer Wert gesetzt (0), die Fehlerbalken zeigen die Abweichungen der Mittelwerte der einzelnen Läufe.

T-Test zur Laborpräzision

Mittels T-Test (Bedingungen siehe oben) wurden die in Wien und in Frankfurt hergestellten Gele auf signifikante Unterschiede hin verglichen. In Tabelle V-15 sind die berechneten T-Werte ausgewiesen, T-Werte, die außerhalb der Grenzen des kritischen Bereichs liegen, sind fettgedruckt. Bei 20 der 96 angestellten Vergleiche kam fälschlicherweise heraus, dass sich die quantitativen Ergebnisse signifikant unterscheiden. Die Fehlerrate ist somit $> 25\%$.

Validierung

| Spot Nr. | Lauf1 vs. Lauf3 | Lauf1 vs. Lauf4 | Lauf2 vs. Lauf3 | Lauf2 vs. Lauf4 |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 3315 | -1,48 | -1,44 | -0,29 | 0,15 |
| 3316 | -1,29 | -0,01 | 0,93 | 1,47 |
| 3317 | 0,87 | 0,97 | 0,39 | 0,81 |
| 3425 | 1,53 | 3,50 | 0,89 | 2,96 |
| 3426 | -1,23 | -1,71 | -0,80 | 0,44 |
| 4301 | 2,47 | 0,68 | 5,62 | 4,92 |
| 4304 | 1,75 | 0,16 | 4,26 | 4,90 |
| 4307 | 0,66 | -1,61 | 4,23 | -0,25 |
| 4308 | 1,16 | -0,31 | 2,08 | 0,19 |
| 4309 | -0,42 | -3,38 | 1,77 | -0,85 |
| 4311 | 0,09 | -3,36 | 2,18 | -1,55 |
| 4312 | -0,04 | -6,17 | 1,86 | -6,30 |
| 4313 | 1,94 | 1,63 | 1,46 | 0,98 |
| 4314 | 2,02 | -0,44 | 4,63 | 0,58 |
| 4317 | 1,56 | 1,14 | 3,36 | 1,87 |
| 4411 | -0,24 | -1,50 | 0,25 | -1,50 |
| 4412 | -0,80 | -1,30 | -0,12 | -0,77 |
| 4415 | -2,23 | -1,59 | -1,58 | -1,34 |
| 4419 | -1,60 | -6,85 | -0,94 | -6,72 |
| 4424 | -2,14 | -2,37 | -1,81 | -1,88 |
| 5302 | 0,50 | -1,03 | 3,27 | 1,93 |
| 5303 | 0,07 | -1,40 | 0,40 | -1,34 |
| 5403 | -1,61 | -2,34 | -0,95 | -1,18 |
| 5407 | 1,70 | -4,95 | 2,72 | -2,69 |

Tab. V-15 Berechnungen zum T-Test

Zusammenfassung und Bewertung zur Laborpräzision

Eine qualitative Reproduzierbarkeit zwischen unterschiedlichen Labors ist für gut aufgelöste Spots, die ein deutliches Signal ($OD > 10$) aufweisen, gegeben. Die in Frankfurt erzielten relativen Standardabweichungen liegen im Mittel mit etwa 35 % ähnlich wie die in Wien erzielten Werte. Der T-Test ergab fälschlicherweise bei über 25 % der angestellten Vergleiche einen signifikanten Unterschied. Demnach können quantitative Aussagen nur nach sorgfältiger Auswahl der Spots getroffen werden. Silbergefärbte 2-DE-Gele aus verschiedenen Labors können nicht ohne weiteres zusammengefasst werden.

Linearität

Ziel der Versuche zur Linearität ist es zu zeigen, ob 2-DE innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereiches Werte liefert, die der Menge des Analyten direkt proportional sind. Für gewöhnlich wird ein Meßwert über eine Kalibrierung (mittels Referenzsubstanz) in einen Analysenwert umgerechnet¹¹⁶. Hier greift erneut das Problem, dass eine solche Referenzsubstanz nicht zur Verfügung steht. In der 2-DE ist insbesondere die relative Veränderung von Interesse, nichtsdestotrotz muss überprüft werden, ob die relative Änderung Linearität zeigt, und ob Linearität eine proteinspezifische Eigenschaft ist oder für alle Proteine gleichermaßen gilt?

Beim Scannen der Gele wird ähnlich der UV-Spektrometrie die Intensität des durchtretenden Lichts bei bekannter Intensität des eingestrahnten Lichts gemessen.

Um Abschätzen zu können, ob die Kalibrierfunktion einer Geraden folgt, hier einige Details zur Ermittlung der OD. Bei der Spot Detektion werden die Spots einer Gaussverteilung angepasst. Der \log_{10} des Quotienten aus Intensität des eingestrahnten durch Intensität des durchgetretenen Lichtes wird für jedes Pixel eines Spots berechnet und zur Gesamt OD des Spots kumuliert. Damit auch Spots, die mit unterschiedlicher Auflösung eingescannt wurden, verglichen werden können, rechnet die Software mit der sog. image unit [IU] 1 IU = 100 micrometer.

Als Abschätzung, welche absolute Proteinmenge ein einzelner Spot repräsentiert, kann man den Quotient aus OD und der Gesamtintensität des Gels multipliziert mit der aufgetragenen Proteinmenge berechnen. Diese Betrachtung setzt jedoch Linearität aller Spots voraus, zudem einen konstanten Quotienten aus Meßwert und tatsächlicher Proteinmenge. Desweiteren führen sowohl überfärbte Spots als auch Spots unterhalb des Detektionslimits zu fehlerhaften Absolutwerten. Aussagen zur tatsächlichen Proteinmenge eines Spots können nur sehr eingeschränkt getroffen werden.

Validierung

In der Literatur werden für die Bestimmung der Linearität zwischen 3 und 10 Konzentrationsniveaus empfohlen, lt. ICH-Guideline werden fünf oder mehr, in DIN 38402 zehn Werte gefordert. Die in der Literatur empfohlene Anzahl der Messungen pro Konzentration variiert meist zwischen 2 und 6, selten werden 10 Bestimmungen gefordert.

Es können entweder jeweils Einzelwerte für eine Konzentration betrachtet werden oder aber die Mittelwerte.

Für die Untersuchungen zur Linearität wurden nur Gele herangezogen die von demselben Bearbeiter (alle aus Wien) stammen. Es wurden 7 verschiedene Gesamtproteinmengen zwischen 25 µg und 100 µg ausgewertet. Es wurden erneut die 29 Spots des bereits in den Auswertungen zur Wiederholpräzision verwendeten Analysis-Sets betrachtet.

| Gesamtproteinmenge [µg] | Anzahl Wiederholungen |
|----------------------------|--|
| 25 | 2 |
| 37,5 | 4 |
| 50 | 4 |
| 62,5 | 8 (aus den Versuchen zur Präzision) |
| 75 | 4 |
| 87,5 | 4 |
| 100 | 2 |

Tab. V-16: Übersicht der zur Linearität ausgewerteten Gele.

Zur Vorgehensweise

- I. Zuerst wurden die OD-Einzelwerte gegen die Proteinmenge aufgetragen und es wurde mittels MS Excel[®] eine Regressionsgerade berechnet, die nicht zwingend den Ursprung schneidet. Die Geradengleichung sowie der Korrelationskoeffizient wurden ermittelt.
- II. Es wurden die OD Mittelwerte gegen die Proteinmenge aufgetragen, Berechnung wie unter I.
- III. Dann wurden die auf das Analysis-Set normalisierten Einzelwerte ausgewertet. Durch die Normalisierung erhält man lediglich noch die relative Verteilung der Spots innerhalb des Analysis-Sets. Die normalisierten Werte wurden mit der aufgetragenen Proteinmenge multipliziert und gegen die Proteinmenge aufgetragen. Es wurden dieselben Kenngrößen wie oben ermittelt.
- IV. Als viertes wurden Mittelwerte der unter III berechneten normalisierten Einzelwerte gebildet und gegen die Proteinmenge aufgetragen.

Die beiden folgenden Tabellen V-17 und V-18 geben eine Übersicht.

Die Regressionsgerade folgt der Gleichung:

$$y = mx + c$$

m: Steigung

c: y-Achsenabschnitt

R²: Bestimmtheitsmaß

Der y-Achsenabschnitt weicht in vielen Fällen deutlich vom Ursprung ab, um diese Abweichung besser bewerten zu können, wurde eine relative Abweichung des y-Achsenabschnitts c_{rel} [%] berechnet.

$$c_{rel} = \frac{c}{100 \times m + c} \times 100$$

Validierung

| Lfd. Nr. | SSP | I. OD-Einzelwerte | | | | II. OD-Mittelwerte | | | |
|----------|------|-------------------|------|-------|----------------------|--------------------|------|-------|----------------------|
| | | R ² | m | c | c _{rel} [%] | R ² | m | c | c _{rel} [%] |
| MM01 | 3416 | 0,06336 | 1,52 | 179,7 | 54,1 | 0,13519 | 0,91 | 194,2 | 68,2 |
| MM03 | 3317 | 0,52045 | 2,25 | -20,0 | -9,8 | 0,92685 | 2,20 | -12,9 | -6,2 |
| MM04 | 3330 | 0,34179 | 3,06 | -14,9 | -5,1 | 0,78256 | 3,46 | -17,0 | -5,2 |
| MM05 | 3320 | 0,55941 | 1,39 | -23,7 | -20,5 | 0,84381 | 1,69 | -32,3 | -23,7 |
| MM06 | 3221 | 0,53277 | 0,66 | -12,7 | -24,0 | 0,87531 | 0,30 | 3,1 | 9,4 |
| MM07 | 3325 | 0,55458 | 1,56 | -34,1 | -28,0 | 0,90323 | 1,64 | -32,9 | -25,0 |
| MM08 | 3327 | 0,63026 | 1,06 | -11,6 | -12,3 | 0,90313 | 1,05 | -8,4 | -8,7 |
| MM09 | 4329 | 0,00026 | 0,05 | 78,2 | 94,4 | 0,08560 | 0,41 | 54,1 | 56,9 |
| MM10 | 4302 | 0,45764 | 1,00 | -16,8 | -20,3 | 0,82347 | 0,88 | -9,0 | -11,4 |
| MM11 | 4306 | 0,54390 | 0,88 | 0,6 | 0,7 | 0,92295 | 0,89 | 1,3 | 1,5 |
| MM12 | 4310 | 0,68826 | 1,45 | -29,5 | -25,5 | 0,93214 | 1,39 | -24,7 | -21,6 |
| MM13 | 4309 | 0,60366 | 1,54 | 34,9 | 18,5 | 0,90860 | 1,68 | 29,9 | 15,1 |
| MM14 | 4316 | 0,17667 | 1,11 | 130,6 | 54,0 | 0,54330 | 1,16 | 125,2 | 51,8 |
| MM15 | 4219 | 0,62173 | 1,88 | 0,2 | 0,1 | 0,90585 | 2,01 | -1,6 | -0,8 |
| MM16 | 4206 | 0,64077 | 1,75 | -30,6 | -21,3 | 0,95624 | 1,64 | -22,9 | -16,3 |
| MM17 | 4210 | 0,44205 | 0,39 | -4,0 | -11,3 | 0,82707 | 0,37 | -2,1 | -6,1 |
| MM19 | 4305 | 0,52780 | 1,57 | -18,4 | -13,3 | 0,91741 | 1,64 | -19,2 | -13,3 |
| MM20 | 4308 | 0,18452 | 0,44 | 17,5 | 28,4 | 0,61213 | 0,48 | 16,0 | 25,1 |
| MM21 | 4405 | 0,59897 | 1,00 | -22,4 | -28,9 | 0,85941 | 1,00 | -20,8 | -26,2 |
| MM22 | 4408 | 0,36591 | 0,39 | 0,8 | 1,9 | 0,70812 | 0,41 | 2,3 | 5,4 |
| MM23 | 4416 | 0,58139 | 0,64 | -13,1 | -25,4 | 0,84641 | 0,71 | -13,7 | -24,0 |
| MM24 | 4327 | 0,64192 | 2,37 | -68,9 | -41,1 | 0,83517 | 2,61 | -69,3 | -36,2 |
| MM25 | 4325 | 0,64249 | 0,94 | -24,6 | -35,3 | 0,98233 | 0,91 | -22,2 | -32,1 |
| MM26 | 4209 | 0,47752 | 0,47 | -8,0 | -20,3 | 0,82845 | 0,46 | -6,0 | -15,1 |
| MM27 | 4216 | 0,63638 | 0,73 | -13,9 | -23,8 | 0,88093 | 0,76 | -12,7 | -20,2 |
| MM28 | 4230 | 0,42290 | 0,68 | -9,3 | -15,7 | 0,74567 | 0,65 | -6,3 | -10,7 |
| MM29 | 4328 | 0,56279 | 0,43 | -8,4 | -23,9 | 0,81866 | 0,43 | -7,1 | -19,9 |
| MM30 | 4315 | 0,44485 | 0,60 | -18,0 | -42,7 | 0,76398 | 0,75 | -22,8 | -43,7 |
| MM31 | 4312 | 0,19755 | 0,44 | -7,5 | -20,7 | 0,68228 | 0,38 | -4,9 | -14,7 |
| | Min | 0,00026 | 0,05 | -68,9 | -42,7 | 0,08560 | 0,30 | -69,3 | -43,7 |
| | Max | 0,68826 | 3,06 | 179,7 | 94,4 | 0,98233 | 3,46 | 194,2 | 68,2 |

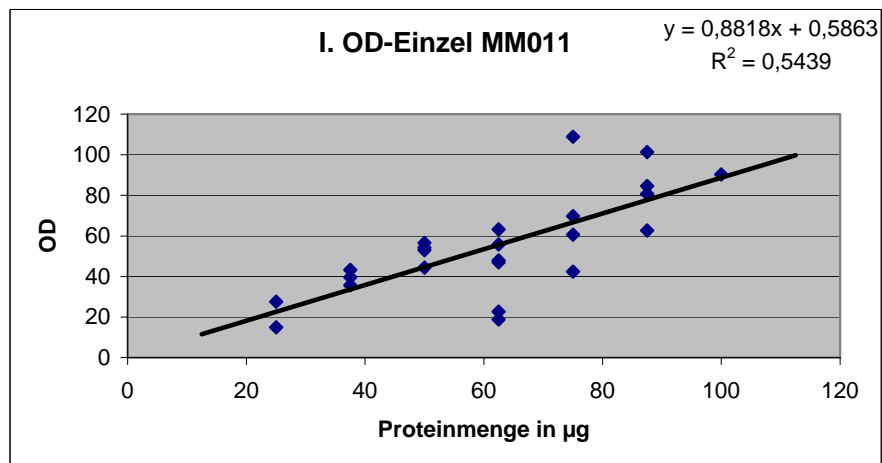
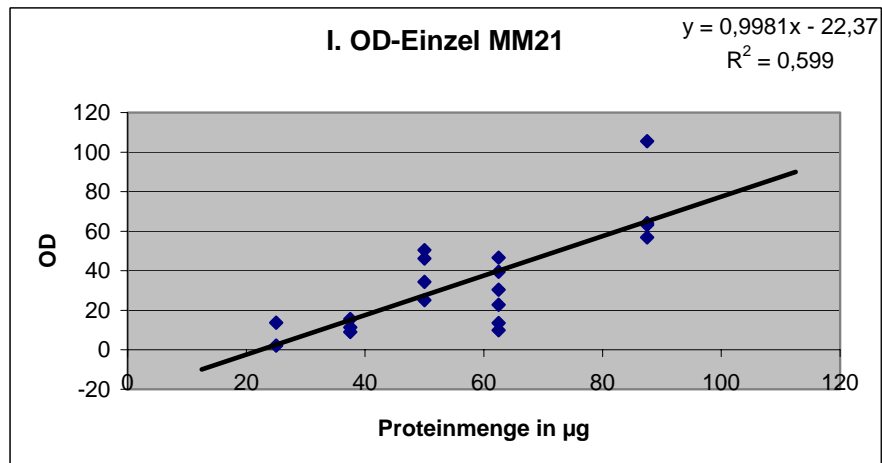
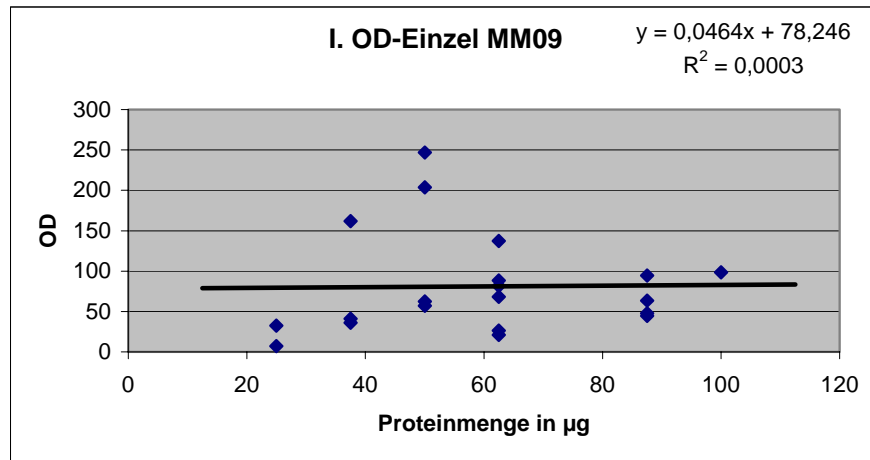
Tab. V-17: Auswertung zu den OD-Werten

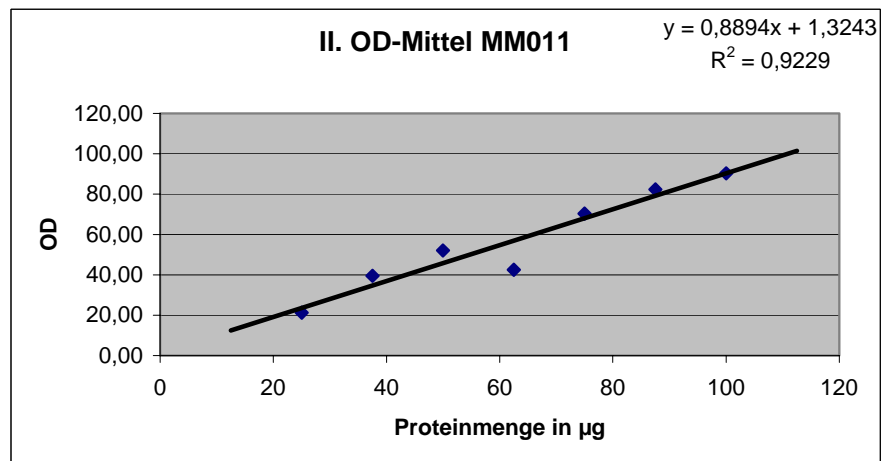
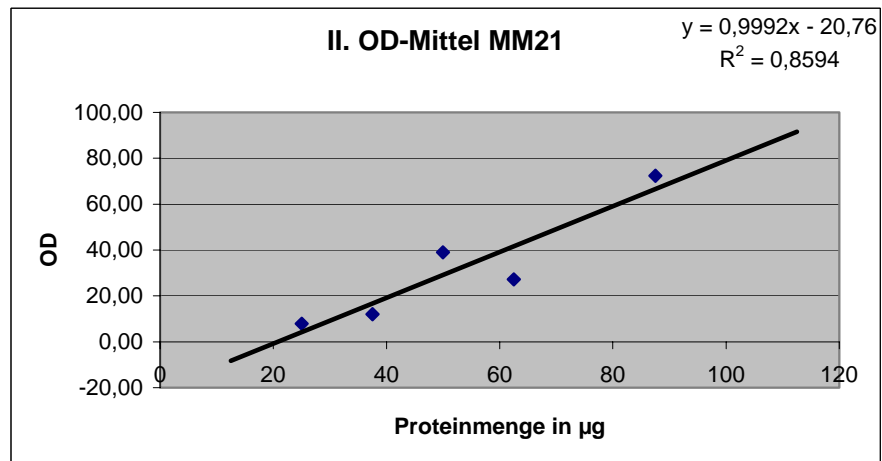
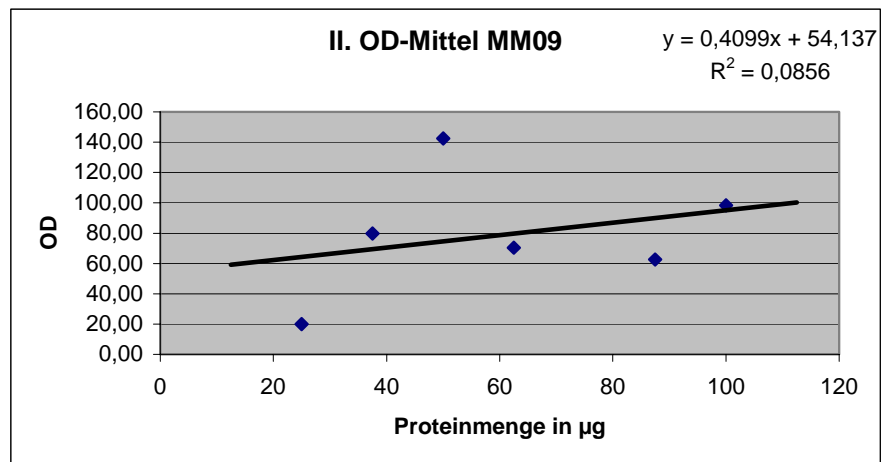
| Lfd Nr. | SSP | III. normalisierte Einzelwerte | | | | IV. normalisierte Mittelwerte | | | |
|---------|------|--------------------------------|------|---------|----------------------|-------------------------------|-------|---------|----------------------|
| | | R ² | m | c | c _{rel} [%] | R ² | m | c | c _{rel} [%] |
| MM01 | 3425 | 0,13754 | 68,9 | 4268,3 | 38,3 | 0,31993 | 46,4 | 4591,8 | 49,7 |
| MM03 | 3426 | 0,79226 | 74,8 | -886,1 | -13,4 | 0,98716 | 75,8 | -863,8 | -12,9 |
| MM04 | 3316 | 0,52038 | 96,0 | -604,7 | -6,7 | 0,81329 | 115,8 | -1082,0 | -10,3 |
| MM05 | 3315 | 0,71731 | 45,7 | -879,2 | -23,8 | 0,83324 | 57,0 | -1262,1 | -28,4 |
| MM06 | 3314 | 0,51902 | 15,5 | -172,4 | -12,5 | 0,98223 | 14,8 | -143,6 | -10,7 |
| MM07 | 4301 | 0,78185 | 48,1 | -1066,8 | -28,5 | 0,92202 | 53,9 | -1193,6 | -28,5 |
| MM08 | 4304 | 0,80647 | 34,9 | -460,2 | -15,2 | 0,97418 | 35,8 | -437,3 | -13,9 |
| MM09 | 3317 | 0,00913 | 8,2 | 1931,8 | 70,3 | 0,21250 | 19,3 | 1166,6 | 37,7 |
| MM10 | 4307 | 0,70701 | 26,4 | -371,1 | -16,4 | 0,98376 | 26,2 | -323,8 | -14,1 |
| MM11 | 4411 | 0,83688 | 29,3 | -113,7 | -4,0 | 0,99040 | 30,8 | -166,7 | -5,7 |
| MM12 | 4419 | 0,86356 | 48,9 | -1097,4 | -29,0 | 0,99065 | 47,6 | -985,3 | -26,1 |
| MM13 | 4313 | 0,78485 | 56,3 | 729,2 | 11,5 | 0,94307 | 61,6 | 473,2 | 7,1 |
| MM14 | 4317 | 0,33360 | 42,0 | 3598,3 | 46,1 | 0,81832 | 44,7 | 3197,1 | 41,7 |
| MM15 | 4314 | 0,85860 | 62,7 | -202,7 | -3,3 | 0,94198 | 69,8 | -433,7 | -6,6 |
| MM16 | 4308 | 0,90734 | 54,5 | -1022,5 | -23,1 | 0,98699 | 53,7 | -922,2 | -20,8 |
| MM17 | 4310 | 0,74206 | 11,7 | -137,2 | -13,3 | 0,97801 | 11,9 | -128,3 | -12,1 |
| MM19 | 4309 | 0,80256 | 50,5 | -692,4 | -15,9 | 0,96251 | 55,5 | -852,4 | -18,2 |
| MM20 | 4417 | 0,21197 | 16,8 | 245,8 | 12,8 | 0,80714 | 17,7 | 257,1 | 12,7 |
| MM21 | 4412 | 0,72682 | 31,3 | -714,9 | -29,7 | 0,94602 | 31,3 | -681,6 | -27,8 |
| MM22 | 4415 | 0,59114 | 13,7 | -76,4 | -5,9 | 0,81821 | 14,9 | -69,0 | -4,8 |
| MM23 | 4424 | 0,77246 | 20,7 | -483,7 | -30,5 | 0,89423 | 23,8 | -543,6 | -29,6 |
| MM24 | 5407 | 0,71987 | 76,8 | -2428,9 | -46,2 | 0,86770 | 88,2 | -2571,3 | -41,1 |
| MM25 | 5403 | 0,81672 | 28,6 | -740,4 | -34,9 | 0,98800 | 29,3 | -752,1 | -34,5 |
| MM26 | 4311 | 0,76492 | 13,3 | -226,8 | -20,5 | 0,93735 | 14,6 | -246,7 | -20,3 |
| MM27 | 4312 | 0,83693 | 23,2 | -494,2 | -27,0 | 0,91904 | 25,3 | -508,7 | -25,1 |
| MM28 | 5302 | 0,70320 | 23,1 | -378,7 | -19,7 | 0,94868 | 22,6 | -300,5 | -15,3 |
| MM29 | 5303 | 0,62031 | 12,9 | -219,5 | -20,5 | 0,90191 | 11,2 | -137,5 | -14,0 |
| MM30 | 4315 | 0,50706 | 20,2 | -615,4 | -43,8 | 0,80540 | 26,0 | -793,4 | -44,0 |
| MM31 | 4423 | 0,30272 | 10,7 | -134,7 | -14,4 | 0,95179 | 10,8 | -168,6 | -18,4 |
| | Min | 0,00913 | 8,2 | -2428,9 | -46,2 | 0,21250 | 10,8 | -2571,3 | -44,0 |
| | Max | 0,90734 | 96,0 | 4268,3 | 70,3 | 0,99065 | 115,8 | 4591,8 | 49,7 |

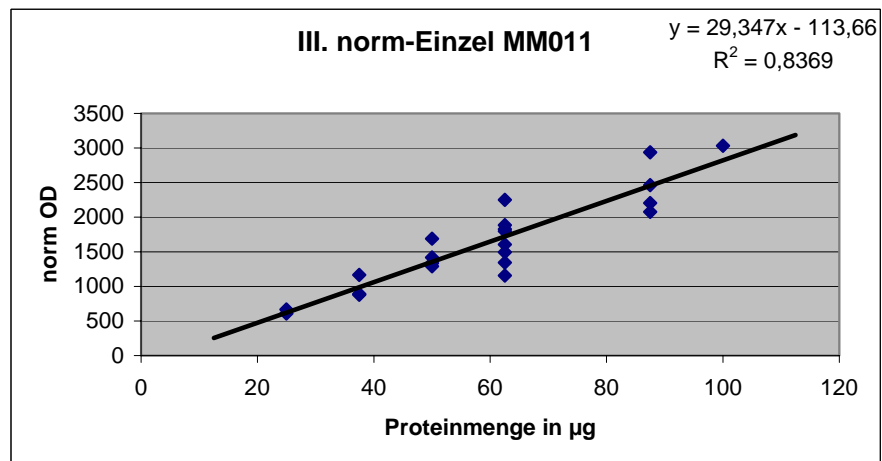
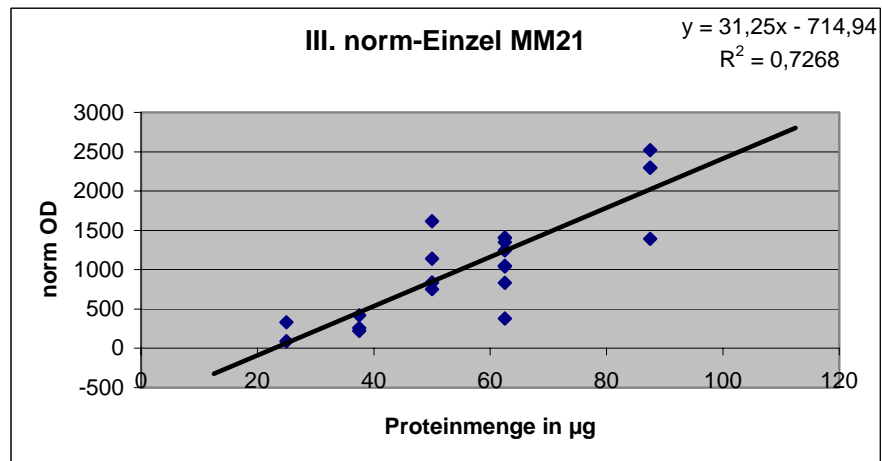
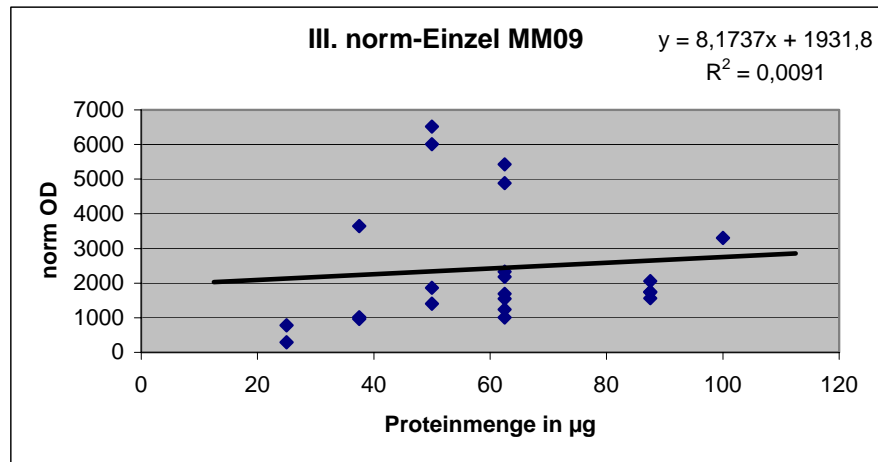
Tab. V-18: Auswertung zu den normalisierten Werten

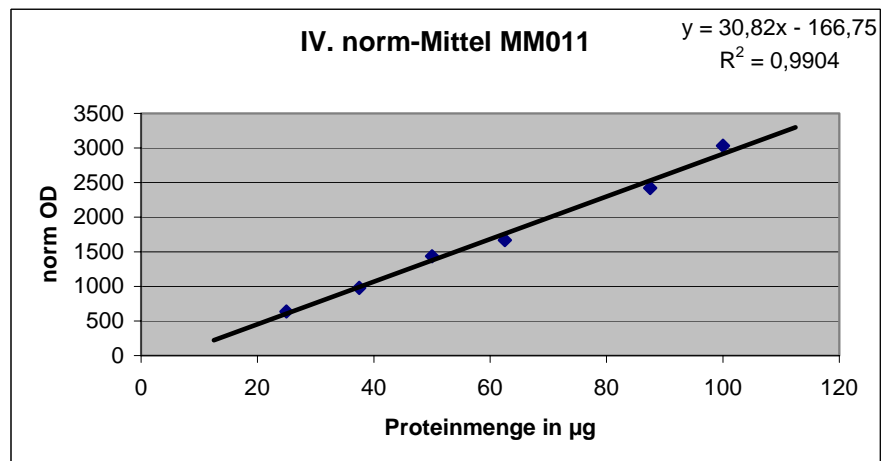
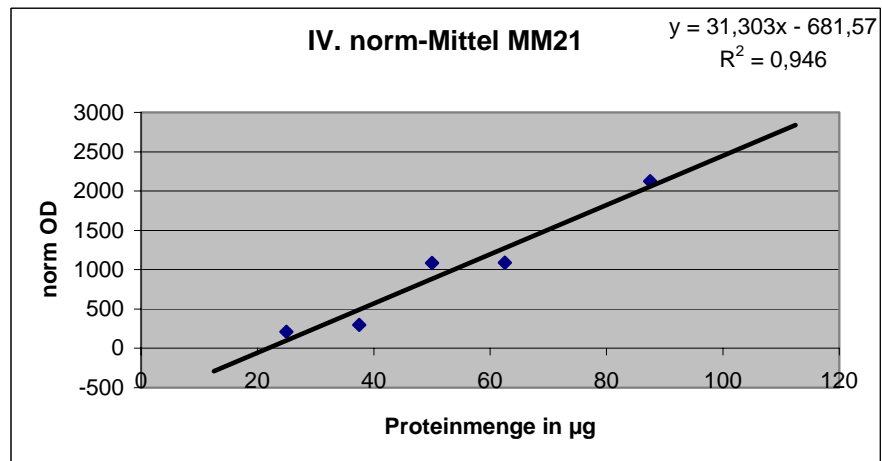
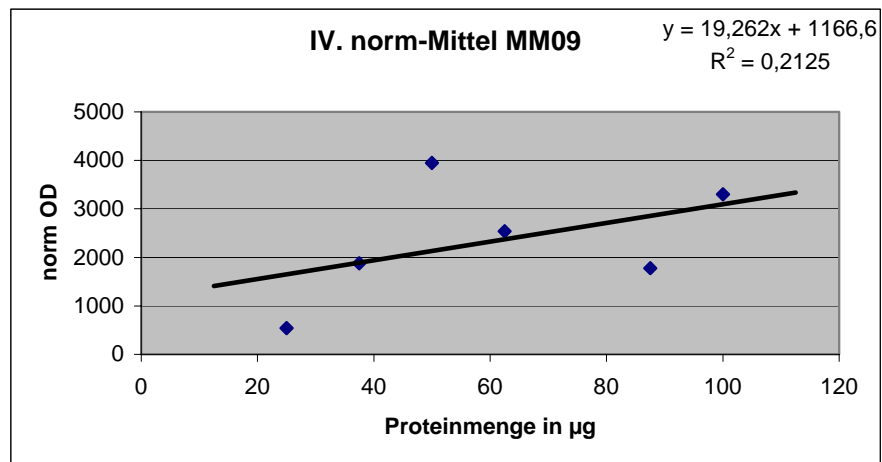
In den folgenden Diagrammen sind jeweils 3 Spots der unterschiedlichen Auswertungen I–IV abgebildet, wobei Spot MM09 keine Korrelation zwischen Proteinmenge und OD-Wert aufweist. MM21 steht für einen Spot der etwa dem Median der ausgewerteten Spots entspricht und Spot MM11 zeigt hinsichtlich Korrelation und relativer Abweichung des y-Achsenabschnitts für die Mittelwerte die beste Linearität.

Validierung









Bewertung der Versuche zur Linearität

Man kann die hier betrachteten Spots in drei Kategorien einteilen: Solche, die überhaupt keine Linearität zeigen, solche, die einen mehr oder weniger ausgeprägten Trend zeigen und solche, bei denen man von einem linearen Verhalten sprechen kann. Eine wesentliche Erkenntnis ist, dass Linearität proteinspezifisch ist, vergleiche hierzu auch¹¹¹. Daher sollte man, bevor man eine quantitative Aussage macht, prüfen, ob der Spot, resp. das Protein, sich tatsächlich linear verhält.

Wie bereits bei den Versuchen zur Präzision, hat sich auch hier gezeigt, dass man mit Einzelbestimmungen keine Aussage treffen kann. Nur wenn man mehrere Gele mittelt und nach Möglichkeit normalisiert, lassen sich innerhalb eines gewissen Vertrauensbereichs valide Aussagen treffen.

Die 2-DE in Kombination mit Silberfärbung ist keine wirklich quantitative Methode, selbst die Auswertung der normalisierten Mittelwerte ergibt für die meisten Spots unbefriedigende Korrelationskoeffizienten.

Es fällt auf, dass die Mehrzahl der Schnittpunkte mit der y-Achse im negativen Bereich liegen, dies gilt sowohl für die normalisierten, als auch für die OD-Werte. Ein negativer Blindwert ergibt zunächst keinen Sinn, möglich wäre, dass dieser Effekt auf die Hintergrundsubtraktion durch die Software zurückzuführen ist.

Üblicherweise gelten folgende Akzeptanzkriterien für eine lineare Kalibrierfunktion:

- Der Korrelationskoeffizient sollte $> 0,999$ sein und damit das Bestimmtheitsmaß $> 0,998$.
- Der y-Achsenabschnitt sollte um weniger als 5 % des Zielwertes vom Ursprung abweichen.

Diese Kriterien werden von keinem der oben aufgeführten Spots erfüllt.

Je höher der relative Anteil eines Spots an der Gesamtintensität des Gels oder des betrachteten Analysis-Sets, desto größer sollte die Steigung der

zugehörigen Regressionsgerade sein. Geht man davon aus, dass die Regressionsgerade eines Spots durch den Ursprung verläuft und Linearität gegeben ist, sollte sich bei einer Verdopplung der aufgetragenen Gesamtproteinmenge der OD-Wert ebenfalls verdoppeln. Damit kann man mit einem gegebenen Wertepaar (x/y), z.B. (50 µg/104,16 OD) den Sollwert der Steigung berechnen ($y/x=2,083$). Tabelle V-19 gibt an, inwieweit Soll- und Ist-Werte für die Steigung übereinstimmen. Als y-Werte wurden die Mittelwerte der OD für 62,5 µg Gesamtprotein ausgewählt.

| | OD-Mittelwert für 62,5 µg | m ist OD-MW | m Soll (y/x) |
|------|------------------------------|----------------|-----------------|
| MM01 | 277,06 | 0,91 | 4,43 |
| MM03 | 91,88 | 2,20 | 1,47 |
| MM04 | 110,73 | 3,46 | 1,77 |
| MM05 | 44,35 | 1,69 | 0,71 |
| MM06 | 19,27 | 0,30 | 0,31 |
| MM07 | 40,01 | 1,64 | 0,64 |
| MM08 | 37,79 | 1,05 | 0,60 |
| MM09 | 70,46 | 0,41 | 1,13 |
| MM10 | 29,15 | 0,88 | 0,47 |
| MM11 | 42,56 | 0,89 | 0,68 |
| MM12 | 49,74 | 1,39 | 0,80 |
| MM13 | 116,43 | 1,68 | 1,86 |
| MM14 | 177,09 | 1,16 | 2,83 |
| MM15 | 88,43 | 2,01 | 1,41 |
| MM16 | 63,73 | 1,64 | 1,02 |
| MM17 | 12,97 | 0,37 | 0,21 |
| MM19 | 57,20 | 1,64 | 0,92 |
| MM20 | 32,43 | 0,48 | 0,52 |
| MM21 | 27,15 | 1,00 | 0,43 |
| MM22 | 17,79 | 0,41 | 0,28 |
| MM23 | 13,77 | 0,71 | 0,22 |
| MM24 | 31,69 | 2,61 | 0,51 |
| MM25 | 29,34 | 0,91 | 0,47 |
| MM26 | 11,73 | 0,46 | 0,19 |
| MM27 | 19,25 | 0,76 | 0,31 |
| MM28 | 20,41 | 0,65 | 0,33 |
| MM29 | 11,56 | 0,43 | 0,18 |
| MM30 | 8,90 | 0,75 | 0,14 |
| MM31 | 16,31 | 0,38 | 0,26 |

Tab. V-19: Vergleich Soll- und Ist-Steigung der Regressionsgeraden

Bei den meisten Spots liegt die Ist-Steigung höher als der Berechnete Soll-Wert, dies paßt zu der bereits erwähnten Feststellung, dass die meisten Regressionsgeraden einen negativen Achsenabschnitt aufweisen.

Versuche zur Optimierung der Proteinbeladung

In Abbildung V-15 sind Gelausschnitte mit unterschiedlichen Proteinbeladungen gezeigt. Die beste Auflösung erzielt man für die hier verwendete Probe im Bereich von 50 – 75 µg. Bei weiterer Erhöhung der Proteinbeladung erhält man zwar mehr Spots, dafür nimmt die Überschneidung der Spots zu und die Qualität der Spots ab (siehe Abbildung V-14). Die Spots sind trotz des Gradienten-Gels (10-15 %) und nicht linearem IPG-Strip (3-10NL) nicht homogen über dem Gel verteilt. Es gibt die Möglichkeit mehrere Gele mit unterschiedlichen Proteinbeladungen zu einem virtuellen Gel, das in allen Bereichen gute Auflösung zeigt, zusammenzufügen. Es ist nicht empfehlenswert Bereiche mit überladenen und überlappenden Spots zu vergleichen.

Vergleich Anzahl Spots vs. Qualität der Spots

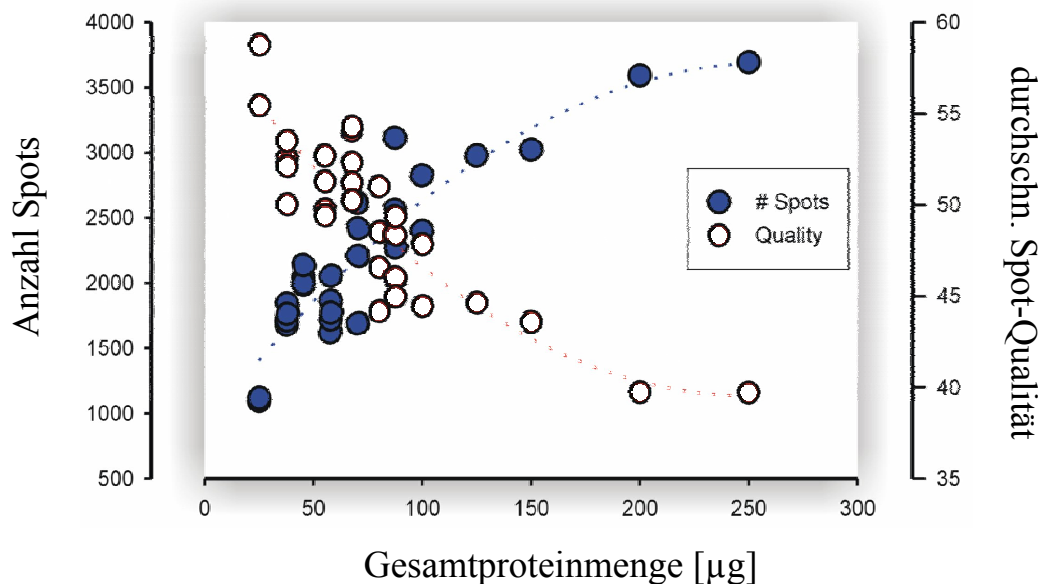


Abb. V-14: Anzahl Spots und Spot-Quality über der Gesamtproteinmenge.

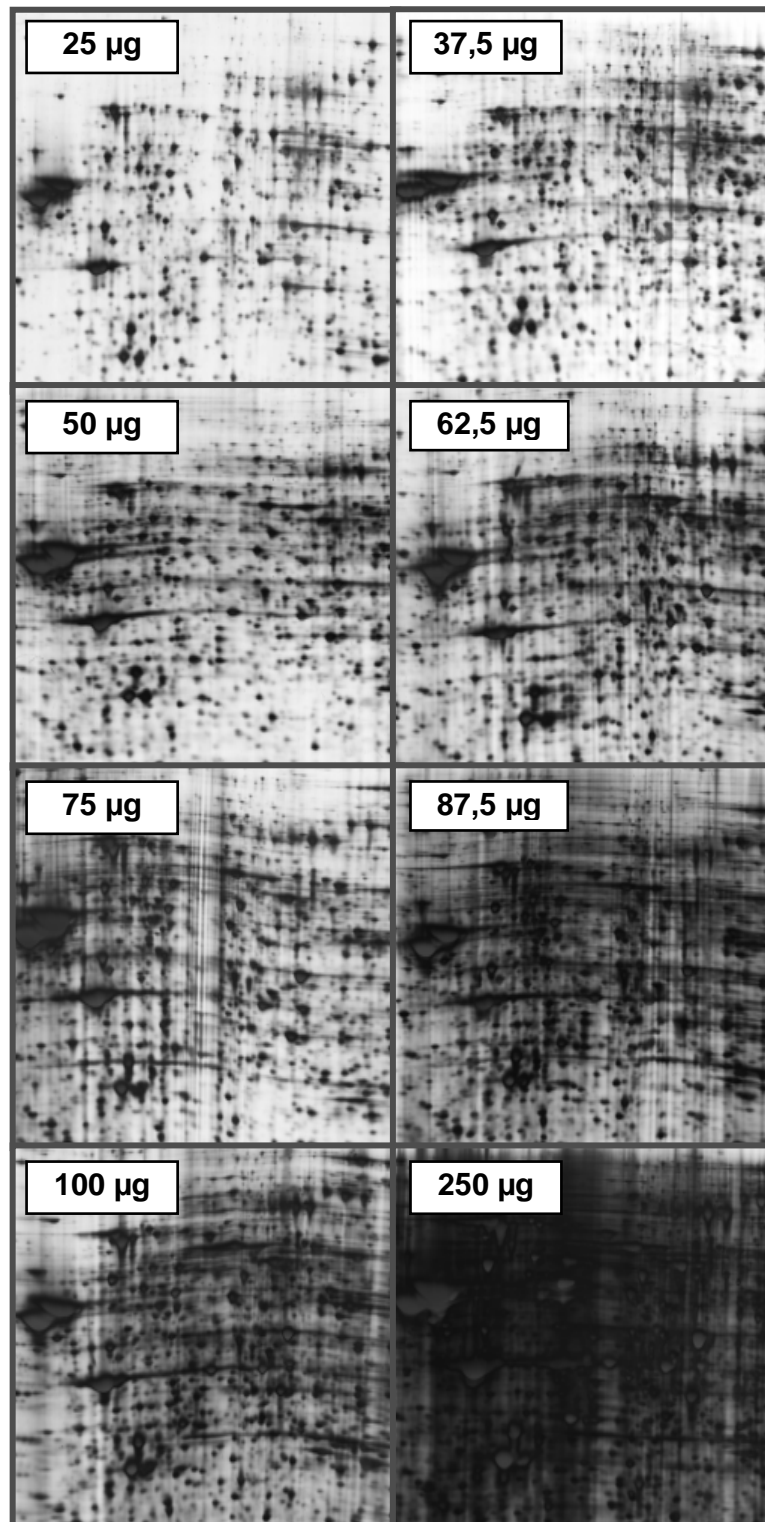


Abb.V-15: Gel-Ausschnitte mit unterschiedlichen Proteinbeladungen.

Selektivität und Spezifität

Prüfung auf Selektivität

Die Methode soll auf ihre Selektivität hin geprüft werden. Liefert die Methode für alle auf einem 2-DE-Gel visualisierten Proteine richtige Ergebnisse, so wäre sie selektiv. Kommt es zu Überlagerung von mehreren Spots, die von der Software als ein Spot erkannt werden, so ist die Methode nicht selektiv.

Trennt man komplexe Proteinmischungen mittels 2-DE, erkennt man rasch, dass die Methode nicht selektiv ist.

Eine nicht selektive Methode kann für einen Teil der Proteine, bei denen keine Überlagerung vorliegt, spezifisch sein. Mit „narrow“ und „ultra-narrow“ IPG-Strips konnte bereits gezeigt werden¹¹⁹, dass vermeintlich spezifisch aufgelöste Proteine in Wirklichkeit doch aus mehreren, sich überlagernden Proteinen bestehen.

Um die Spezifität einzelner Spots zu überprüfen wurde ein Gel mit einem sehr engen pI -Bereich (5,5-6,5) hergestellt und mit einem 3-10 NL Gel gleicher Proteinkonzentration (62,5 μ g) verglichen. Man erzielt dadurch im Bereich von pI 5,7 – 5,9 eine um den Faktor 2,5 – 3 erhöhte Auflösung. Die folgende Abbildung V-16 zeigt, dass hierdurch überlagernde Spots entzerrt werden können, dabei wurden keine darunter liegenden Spots detektiert. Abbildung V-17 zeigt einen größeren Ausschnitt im Bereich des für die Versuche zur Linearität verwendeten Analysis-Sets.

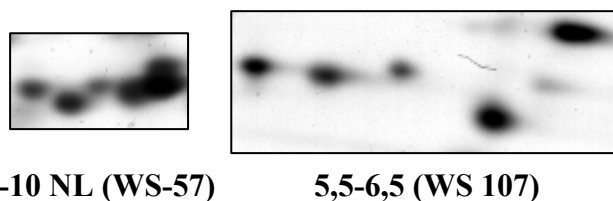


Abb. V-16: Vergleich 3-10NL mit einem "narrow gradient" 5,5-6,5

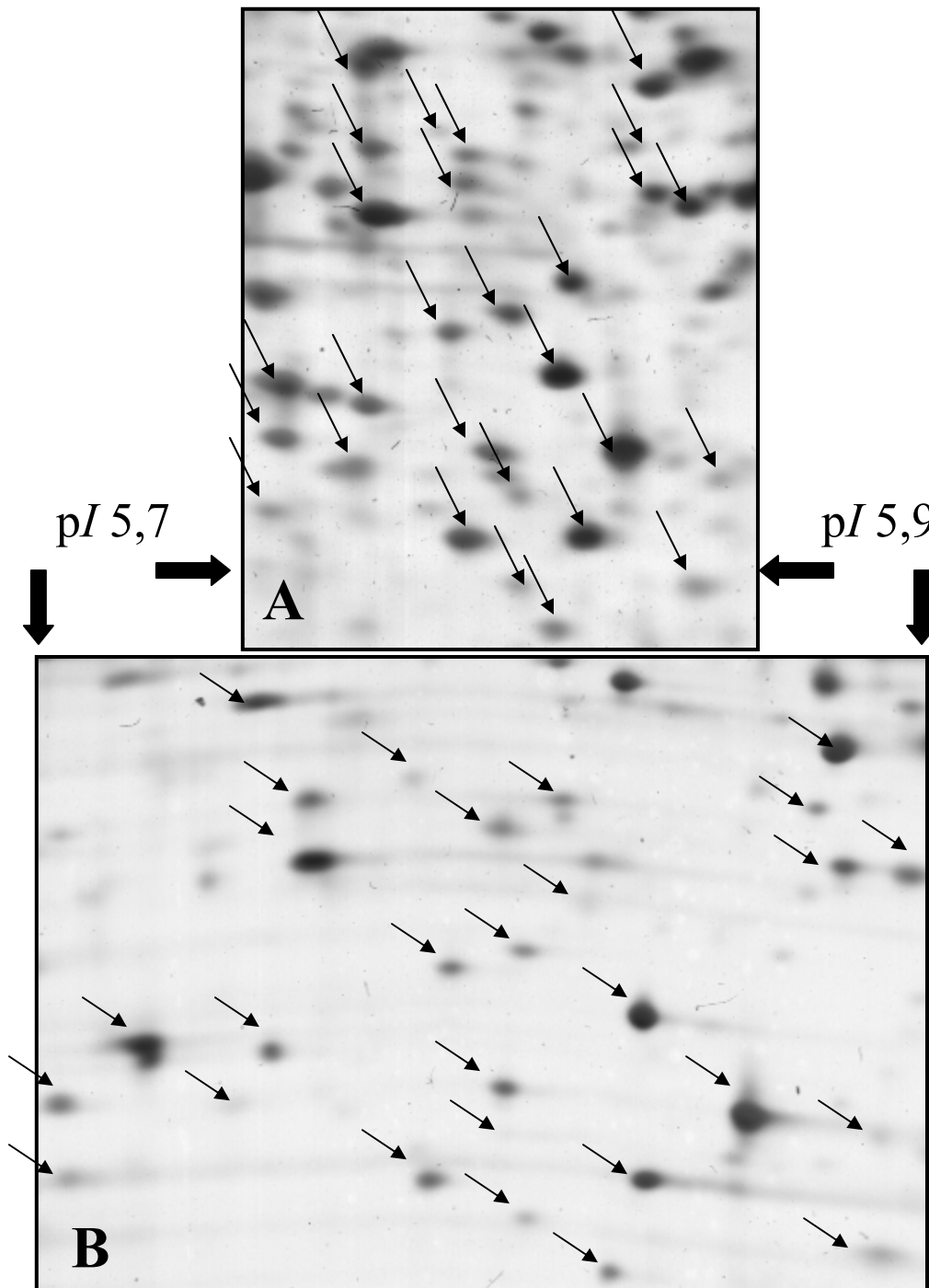


Abb. V-17: Vergleich von Ausschnitten 3-10 NL und 5,5-6,5

Wenn sich mehrere Spots überlagern, kann dies insbesondere bei der Aufklärung der Identität des / der Proteine mittels tryptischem Verdau / MS zu Problemen bei der Auswertung der Spektren führen. Außerdem können überlagernde Proteine, die auf dem Gel als ein Spot erscheinen und

unterschiedlich exprimiert und reguliert werden, zu Fehlinterpretationen bei einer Abschätzung der Spot-Quantität führen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Als Nachweisgrenze wird nach DIN 32645 die kleinste nachweisbare Menge eines Analyten bezeichnet. Im Bereich der Nachweisgrenze kann nur die Aussage getroffen werden ob ein Analyt vorhanden ist oder nicht und dies mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 50 %.

Die Bestimmungsgrenze beschreibt nach DIN 32645 die kleinste quantifizierbare Menge.

In der Chromatographie wird gewöhnlich zur Festlegung der Nachweisgrenze ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 herangezogen, für die Bestimmungsgrenze wird ein Signal/Rausch-Verhältnis von 9:1 empfohlen.

Zur Bestimmung des Rauschens wurden zwei Verfahren gewählt. Zum Einen bietet PD-Quest die Möglichkeit einen Density Plot zu erstellen. Die beiden Achsen wurden dabei so gewählt, dass auf keiner ein signifikantes Signal lag. Das so ermittelte durchschnittliche Rauschen liegt bei etwa 0,03 OD / Pixel. Als Zweites wurde ein kleiner aber deutlicher Spot vergrößert und der Mittelwert aus 3 x 3 Pixeln im Randbereich gebildet, Ergebnis etwa 0,02 OD. Dann wurden 6 kleine Spots vergrößert und die Pixel gezählt, der Mittelwert betrug 154 Pixel. Demnach liegt das Rauschen, bezogen auf einen kleinen Spot, bei 3 bis 4,5 OD und damit die Nachweisgrenze zwischen 9 und 13,5 OD. Demnach liegt die Bestimmungsgrenze bei 27 bis 40,5 OD.

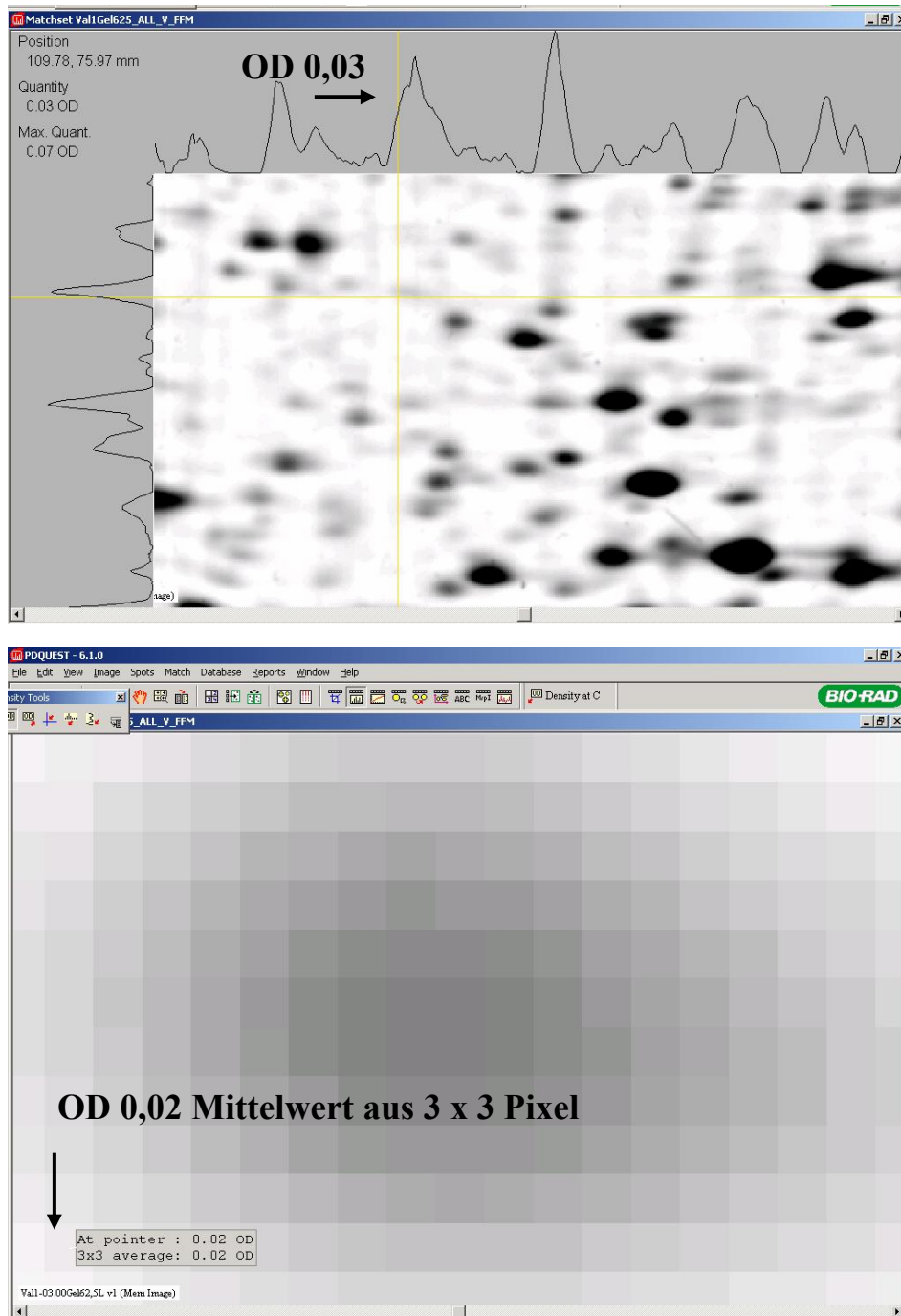


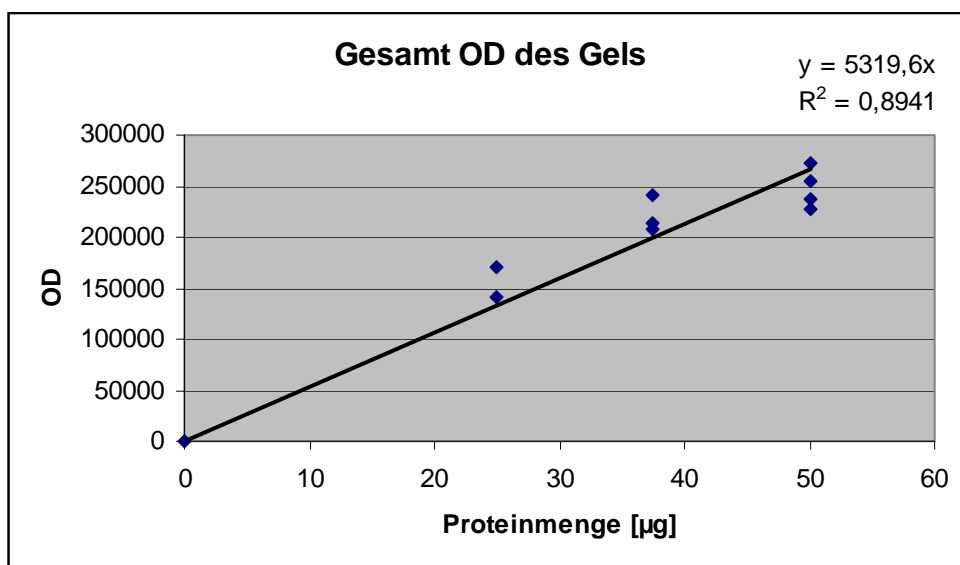
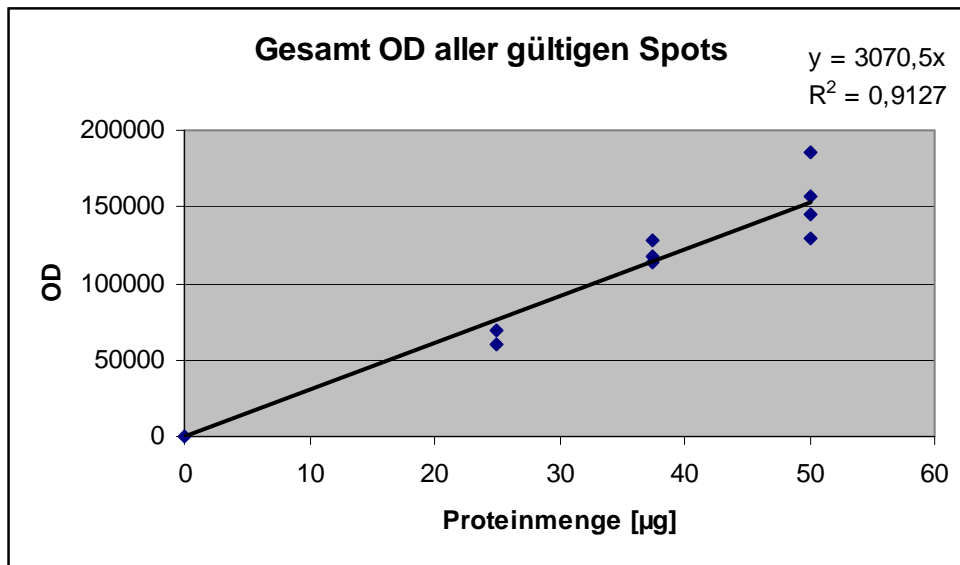
Abb.V-18: Zwei Verfahren zur Ermittlung des Grundrauschens.

Bei der automatischen Spot-Detektion gibt man im PD-Quest „Spot detection wizard“ den schwächsten noch zu detektierenden Spot vor, dieser sollte so

Validierung

gewählt werden, dass er oberhalb der Nachweisgrenze liegt. PD-Quest bietet weiter die Möglichkeit alle Spots unter einer bestimmten OD zu löschen, es ist sinnvoll von dieser Option Gebrauch zu machen und alle Spots mit einer OD kleiner als 10 zu entfernen. Gleiches gilt für Spots mit geringer Quality, alle Spots mit einer Quality kleiner als 60 sollten unmittelbar nach der Spot-Detektion gelöscht werden.

Nachdem ein Wert für die Nachweisgrenze ermittelt wurde, folgt jetzt noch eine Abschätzung mit welcher absoluten Proteinmenge die Nachweisgrenze zu korrelieren ist. Dazu wurde die Proteinbeladung für 25 µg (2 Gele), 37,5 µg (3 Gele) und 50 µg (4 Gele) gegen die Gesamt-OD aller gültigen Spots und gegen die Gesamt-OD des Gels (total density) aufgetragen. Da durch die Hintergrundsubtraktion bei der Spot-Detektion die unspezifische Färbung bereits eliminiert wird und auch die Färbung des Gels, die nicht einem konkreten Spot zugeordnet werden kann, mit dem Vorhandensein von Protein zu korrelieren ist, sollte der mit der Gesamt-OD der Gele berechnete Wert dem wahren Wert näher kommen. Es wurden nur Gele mit relativ niedriger Proteinbeladung (< 50 µg) berücksichtigt, da bei diesen der Anteil an gesättigten Spots noch nicht so hoch ist.



AbbildungV-19 Geradengleichungen zur Korrelation von Proteinmenge und OD

Ein Spot mit einer OD von 10 würde demnach etwa 1,9 ng Protein entsprechen, für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 50 kDa entspräche dies 38 fmol. Bezogen auf eine Gesamtproteinbeladung des Gels

mit 50 µg würde dieser Spot 38 ppm der Gesamtproteinmenge ausmachen. 2-DE kann demnach als Spurenanalytik bezeichnet werden.

Hierzu noch eine interessante Erhebung von Horwitz¹²⁰: Es wurden mehr als 3000 analytische Ringversuche über mehrere Jahre ausgewertet, daraus wurde eine empirische Formel abgeleitet, die beschreibt, welche Variationskoeffizienten für einen gegebenen Anteil eines Analyten an der Gesamtanalytenmenge noch akzeptabel sind.

| Anteil eines Analyten | Variationskoeff. unter Vergleichsbedingungen |
|-----------------------|--|
| 100 % | 2 |
| 50 % | 2,22 |
| 20 % | 2,55 |
| 10 % | 2,83 |
| 5 % | 3,14 |
| 2 % | 3,60 |
| 1 % | 4,00 |
| 0,5 % | 4,44 |
| 0,1 % | 5,66 |
| 100 ppm | 7,91 |
| 10 ppm | 10,9 |
| 1 ppm | 16,42 |

Tab. V-16: Analytanteil vs. akzeptable Variationskoeffizienten

Diese Tabelle relativiert die bei den Versuchen zur Präzision ermittelten hohen relativen Standardabweichungen.

Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich ist der Konzentrationsbereich des Analyten in der Probe, der mit einem akzeptablen Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität quantifizierbar ist.

Die Konzentrationen der einzelnen Proteine einer Probe sind, wie schon erwähnt, sehr unterschiedlich. Präzision, Richtigkeit und Linearität haben keine festen Werte, sondern unterscheiden sich von Protein zu Protein. Im Folgenden soll versucht werden Kriterien (K) zu finden, die dazu dienen abzuschätzen, ob ein Spot innerhalb des Arbeitsbereichs liegt.

Abbildung V-20 zeigt ein Fließschema, dass bei der Entscheidung, ob über einen Spot, resp. ein Protein, eine zuverlässige quantitative Aussage gemacht werden kann, behilflich sein soll.

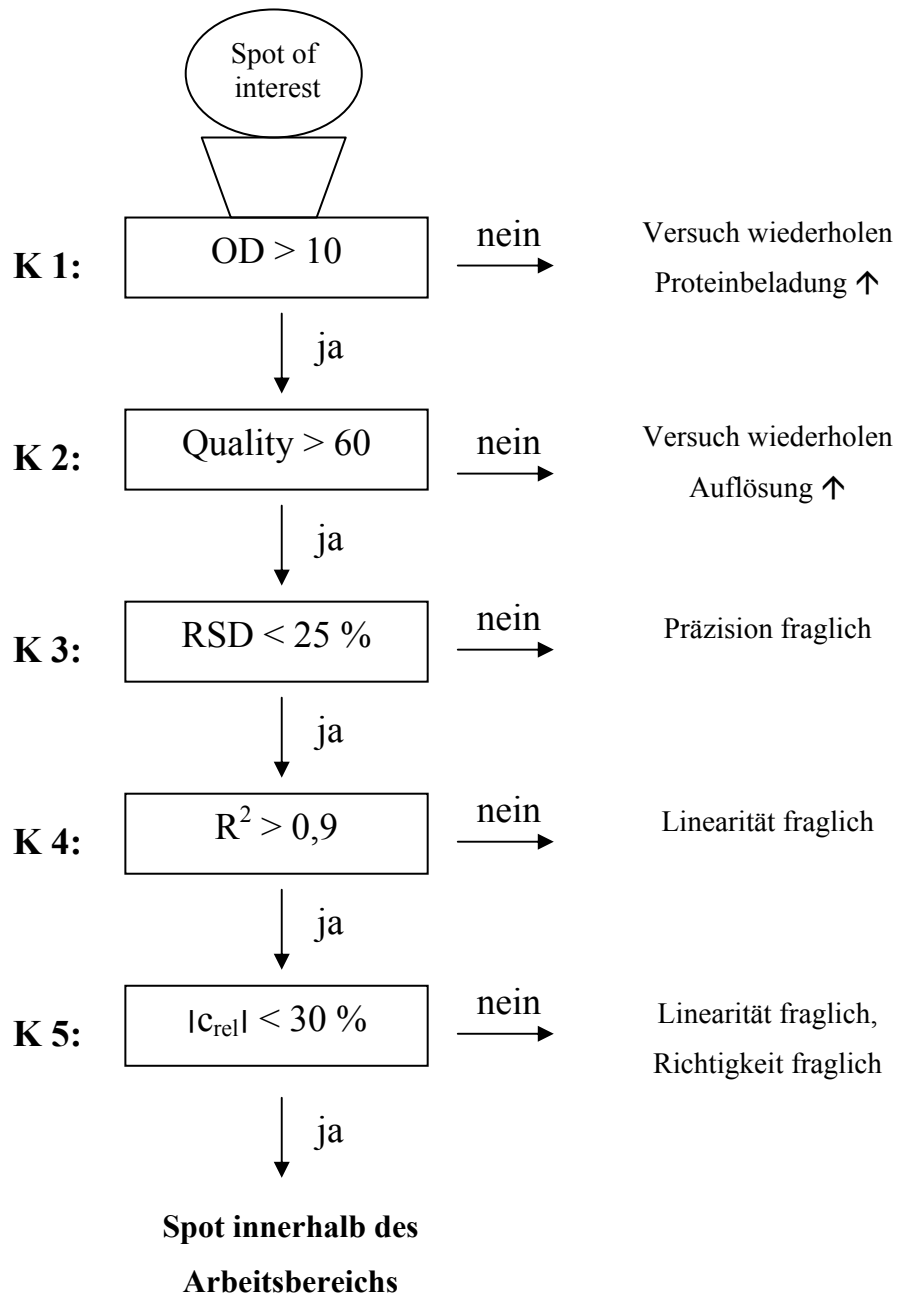


Abb.V-20: Fließschema mit Kriterien zur Überprüfung des Arbeitsbereichs

Datengrundlage der Tabelle V-17

K1: OD Mittelwerte aus Lauf 1

K2: Mittelwerte Quality aus Lauf 1

K3: Normalisiert auf Analysis-Set (29) Lauf 1

K4: K5 Auswertung zur Linearität normalisiert auf Analysis-Set (24)

| Nr. | SSP | K1 | | K2 | | K3 | | K4 | | K5 | | Σ n |
|------|------|--------|------|-----|------|------|------|------|------|-----|------|----------|
| MM01 | 3425 | 263,0 | ja | 88 | ja | 25,0 | nein | 0,32 | nein | 50 | nein | 3 |
| MM03 | 3426 | 77,4 | ja | 77 | ja | 9,6 | ja | 0,99 | ja | -13 | ja | 0 |
| MM04 | 3316 | 97,4 | ja | 66 | ja | 9,8 | ja | 0,81 | nein | -10 | ja | 1 |
| MM05 | 3315 | 35,4 | ja | 76 | ja | 18,5 | ja | 0,83 | nein | -28 | ja | 1 |
| MM06 | 3314 | 13,6 | ja | 62 | ja | 16,9 | ja | 0,98 | ja | -11 | ja | 0 |
| MM07 | 4301 | 31,7 | ja | 70 | ja | 26,5 | nein | 0,92 | ja | -29 | ja | 1 |
| MM08 | 4304 | 31,3 | ja | 67 | ja | 23,4 | ja | 0,97 | ja | -14 | ja | 0 |
| MM09 | 3317 | 68,2 | ja | 30 | nein | 74,1 | nein | 0,21 | nein | 38 | nein | 4 |
| MM10 | 4307 | 23,6 | ja | 76 | ja | 20,4 | ja | 0,98 | ja | -14 | ja | 0 |
| MM11 | 4411 | 38,2 | ja | 74 | ja | 31,0 | nein | 0,99 | ja | -6 | ja | 1 |
| MM12 | 4419 | 39,1 | ja | 67 | ja | 28,5 | nein | 0,99 | ja | -26 | ja | 1 |
| MM13 | 4313 | 108,8 | ja | 82 | ja | 13,4 | ja | 0,94 | ja | 7 | ja | 0 |
| MM14 | 4317 | 154,6 | ja | 85 | ja | 15,0 | ja | 0,82 | nein | 42 | nein | 2 |
| MM15 | 4314 | 78,8 | ja | 83 | ja | 16,3 | ja | 0,94 | ja | -7 | ja | 0 |
| MM16 | 4308 | 53,0 | ja | 79 | ja | 23,1 | ja | 0,99 | ja | -21 | ja | 0 |
| MM17 | 4310 | 11,0 | ja | 57 | nein | 37,8 | nein | 0,98 | ja | -12 | ja | 2 |
| MM19 | 4309 | 43,2 | ja | 78 | ja | 16,0 | ja | 0,96 | ja | -18 | ja | 0 |
| MM20 | 4417 | 16,3 | ja | 42 | nein | 62,3 | nein | 0,81 | nein | 13 | ja | 3 |
| MM21 | 4412 | 21,4 | ja | 69 | ja | 48,7 | nein | 0,95 | ja | -28 | ja | 1 |
| MM22 | 4415 | 14,2 | ja | 66 | ja | 26,4 | nein | 0,82 | nein | -5 | ja | 2 |
| MM23 | 4424 | 11,5 | ja | 65 | ja | 26,2 | nein | 0,89 | nein | -30 | ja | 2 |
| MM24 | 5407 | 27,5 | ja | 58 | nein | 30,4 | nein | 0,87 | nein | -41 | nein | 4 |
| MM25 | 5403 | 20,9 | ja | 66 | ja | 37,4 | nein | 0,99 | ja | -35 | nein | 2 |
| MM26 | 4311 | 8,7 | nein | 59 | nein | 22,6 | ja | 0,94 | ja | -20 | ja | 2 |
| MM27 | 4312 | 15,8 | ja | 66 | ja | 31,7 | nein | 0,92 | ja | -25 | ja | 1 |
| MM28 | 5302 | 13,7 | ja | 51 | nein | 50,8 | nein | 0,95 | ja | -15 | ja | 2 |
| MM29 | 5303 | 10,6 | ja | 58 | nein | 41,3 | nein | 0,90 | ja | -14 | ja | 2 |
| MM30 | 4315 | 5,4 | nein | 33 | nein | 34,1 | nein | 0,81 | nein | -44 | nein | 5 |
| MM31 | 4423 | 7,5 | nein | 26 | nein | 65,1 | nein | 0,95 | ja | -18 | ja | 3 |
| | | Σ nein | 3 | Σ n | 9 | Σ n | 17 | Σ n | 10 | Σ n | 6 | |

Tab. V-17: Kriterien zur Abschätzung, ob Spot im Arbeitsbereich liegt. Spots die alle Kriterien erfüllen, sind grau unterlegt.

Robustheit

Im Rahmen der Validierung wurden keine gesonderten Versuche zur Robustheit durchgeführt, vielmehr wurden alle Versuche strikt nach der zuvor erstellten SOP angefertigt.

Einige Anmerkungen zur Robustheit der Methode finden sich im Methodenentwicklungsteil dieser Arbeit sowie im Experimentellen Teil dieser

Validierung

Arbeit. Trotzdem gibt es einige Erkenntnisse, die im Laufe der Zeit gewonnen wurden und rückblickend der Validierung zuzuordnen sind.

Die Konzentration des IPG-Puffers in der Rehydrierlösung kann auf 1 % angehoben werden, ebenso kann die DTT-Konzentration auf 10 mg/ml verdoppelt werden.

Die Rehydrierung des IPG-Strips, sprich die Aufnahme der Rehydrierlösung inkl. Probe, kann mit oder ohne Spannung erfolgen, in der Literatur wird beschrieben, dass man mit Rehydrierung unter Spannung bessere Ergebnisse erzielt. Weder im Wiener noch im Frankfurter Labor konnte dies bestätigt werden.

Bei der Fokussierung kann man das Voltstundenintegral auf bis zu 100 kVhrs erhöhen, in keinem Fall kam es zu einer Überfokussierung²⁹. Die ideale kVhrs-Zahl hängt jedoch vom Ladungsträgergehalt der verwendeten Probe und dem pH-Bereich des IPG-Strips ab. Bei engeren pH-Bereichen sollte man die Spannung langsamer hochfahren. Die Gele zur Validierung wurden 62,5 kVhrs fokussiert, es empfiehlt sich die Methodenentwicklung mit 87,5 kVhrs zu beginnen und gegebenenfalls zu optimieren. Die IPG-Phor sollte auf Vhrs und nicht auf Zeit bezogen programmiert werden.

Trenngele müssen mindestens 3 Stunden polymerisieren, am besten gießt man die Trenngele am Nachmittag / Abend vor der geplanten Verwendung. Man kann die Trenngele mit Milli-Q Wasser überschichten, sollte dann aber nach etwa einer Stunde soviel 4-fach Trenngelpuffer zugeben, dass die Überschichtungslösung mit dem Trenngel isoton wird. Ohne diesen Schritt erhält man insbesondere für hochmolekulare Proteine mangelhafte Ergebnisse. Möchte man Trenngele über mehrere Tage lagern, sollte man sie mit Wasser-gesättigtem Butanol überschichten, mit Frischhaltefolie möglichst Luftdicht verpacken und in ein feuchtes Tuch eingeschlagen im Kühlschrank aufbewahren.

Im Laufe der Zeit hat sich gezeigt, dass es sowohl für den Arbeitsablauf als auch für die Ergebnisse vorteilhaft ist, die IPG-Strips nach der Fokussierung bei -80°C einzufrieren, der Zeitraum kann zwischen 10 min und mehreren Wochen variieren. Unbenutzte Strips sollten bei -20°C gelagert werden, nach der Fokussierung nicht bei -20°C lagern, sondern in flüssigem Stickstoff oder bei -80° aufbewahren, siehe hierzu auch ⁴².

Die Bedingungen der 2. Dimension wurden nicht verändert, eine Anmerkung hierzu: Man sollte mit dem Elektrophoresepuffer nicht zu sparsam sein. Die 2. Dimension funktioniert zwar auch, wenn die Unterseite des Gels gerade in den Anodenpuffer eintaucht, der Puffer hat aber auch eine wichtige Funktion bei der Wärmeableitung, daher sollte für 18 cm Gele etwa 3 l Anodenpuffer verwendet werden. Der Anodenpuffer kann ohne weiteres ohne Glycin hergestellt werden, dies ist der teuerste Bestandteil und bringt im Anodenpuffer keinerlei Vorteil.

Bei den Färbezeiten der Silberfärbung nach Blum¹²¹ sollte man sich an die Vorgaben des Protokolls halten, die Fixierzeit ist dort mit $> 1\text{h}$ angegeben. Die Fixierzeit kann ohne Qualitätseinbußen verlängert werden (über Nacht).

Fehlerabschätzung

Mögliche Fehler, wobei die relativen Fehler durch Normalisierung eliminiert werden:

- Pipettierfehler, bei ordentlich gewarteten Pipetten ± 2 % relativer Fehler.
- Mangelhafte Löslichkeit eines Proteins, absoluter Fehler schlecht quantifizierbar.
- Adsorptionseffekte von Proteinen, anhaften am Eppendorf Cap oder im Stripholder, da proteinspezifisch, ist dies ein absoluter Fehler.
- Unvollständige Aufnahme der Rehydrierlösung, relativer Fehler geschätzt bis etwa -10 %.
- Unvollständiger Transfer von der 1. auf die 2. Dimension, kann proteinspezifisch sein, dann ein absoluter Fehler.
- Nicht alle Proteine lassen sich gleich gut mit Silber anfärben, daher ist die Bestimmung der absoluten Proteinmenge in Relation zur gemessenen OD nur eingeschränkt möglich.
- Scanner / Software gibt für überlappende Spots einen absoluten Fehler von ca. 6 %.

Empfehlung für die Anzahl an Wiederholungen

Das Anfertigen von 2-DE-Gelen ist zeit- und kostenintensiv, daher sollte man nicht mehr Gele einer Probe anfertigen als unbedingt erforderlich.

Ist ein Gel offensichtlich Mißlungen, sprich verzogen, zeigt es starkes Streifen oder große Bereiche mit schlechter Auflösung, sollte man sich nicht die Mühe machen es trotzdem auszuwerten (schade um die Zeit) sondern den Versuch besser wiederholen.

Für eine Methodenentwicklung, bei der man lediglich die Aussage treffen möchte, ob die Änderung der Methode zu einem besseren oder schlechteren Ergebnis führt, reichen 2 Gele. Will man eine quantitative Aussage treffen,

sollte man mindestens 3 Gele anfertigen, normalisieren und die Mittelwerte bilden.

Bei einer angenommenen relativen Standardabweichung von 30 % erhält man in Abhängigkeit von der Größe der Stichprobe die folgenden Konfidenzintervalle:

| Stichprobenanzahl n | Konfidenzintervall 95 % bei 30 % RSD |
|---------------------|---|
| 1 | ±58,8 % |
| 2 | ±41,6 % |
| 3 | ±33,9 % |
| 4 | ±29,4 % |
| 5 | ±26,3 % |
| 6 | ±24,0 % |

Bei 3 Gelen liegt das Konfidenzintervall in der Nähe der relativen Standardabweichung. Grundsätzlich macht es wenig Sinn die Stichprobenzahl von vornherein zu erhöhen. Vergleicht man 2 Läufe aus je 3 Gelen, sollte man nur dann von einem tatsächlichen Unterschied sprechen, wenn der Unterschied der normalisierten Mittelwerte mindestens 50 % beträgt und zudem die unter Arbeitsbereich beschriebenen Kriterien für den betrachteten Spot erfüllt werden.

Fazit zur Validierung

Auch wenn viele der im Rahmen der Validierung angefallenen Ergebnissen, bedingt durch die großen Schwankungen und die zum Teil mäßige Reproduzierbarkeit, auf den ersten Blick unbefriedigend scheinen, hat die Validierung doch gezeigt, wie die mit 2-DE / Silberfärbung gewonnenen Daten zu bewerten sind.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die qualitative Reproduzierbarkeit hinsichtlich Molekulargewicht und *pI* gut ist, quantitative Aussagen sind nur eingeschränkt möglich, die Quantifizierbarkeit ist proteinspezifisch. Aufgrund der vielen Handarbeitsschritte ist die Abhängigkeit vom Hersteller der Gele nicht zu unterschätzen. Die Empfindlichkeit ist, mit einer Nachweisgrenze von etwa 2 ng beachtlich, ebenso die Vielzahl an Analyten, die parallel aufgelöst werden können.

Proteinanalytik gentechnisch modifizierter Organismen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten mit gentechnischen Methoden Einfluß auf die Proteinexpression zu nehmen. Durch Rekombination von Genen können Pro- und Eukaryotische Zellen derart modifiziert werden, dass sie ihrem eigentlichen Stoffwechsel fremde Proteine exprimieren. Die Expression von Proteinen kann durch den gezielten Einbau von Promotoren gesteigert werden. Es gibt aber auch die Möglichkeit die Expression einzelner Proteine gezielt zu unterdrücken. Nicht nur die Aminosäuresequenz ist für die Funktionalität eines Proteins verantwortlich, bei vielen eukaryotischen Proteinen sind posttranslationale Modifikationen essentiell. In den folgenden Abschnitten werden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur 2-DE und MALDI-MS Analytik von Proteinen aus gentechnisch modifizierten Organismen beschrieben.

Einleitung Transgenesis

Unter Transgenesis versteht man das Einbringen fremder genetischer Information in das Genom tierischer Keimbahnzellen. Die fremde DNA wird stabil in das Genom der Keimbahnzellen integriert und kann folglich auf die nächste Generation vererbt werden¹²².

Diese Methode wurde in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts etabliert, Palmiter et al.¹²³ berichteten 1982, dass transgene Mäuse, dank eines zusätzlichen Wachstumshormons, schneller wachsen und größer werden.

Die Produktion transgener Tiere funktioniert wie folgt:

Eizellen eines Spenderweibchens werden entnommen, durch Mikroinjektion von DNA, mittels retroviraler Vektoren oder durch Transfektion embryonaler Stammzellen wird die fremde DNA in die Eizellen eingebracht. Anschließend erfolgt die Implantation in ein pseudoschwangeres Empfängerweibchen. Die

Nachkommenschaft wird mittels PCR auf Vorhandensein der Fremd-DNA getestet. Durch Inzucht wird dann versucht eine neue genetische Linie zu etablieren¹²². Als weitere Möglichkeit können die transgenen Tiere geklont werden, wie beispielsweise das erste Klonschaf „Dolly“.

Mit dieser Technologie lässt sich die Auswirkung fremder genetischer Information auf einen Organismus überprüfen, ferner können gezielt „Knockouts“ erzeugt werden oder man kann auf diese Weise therapierrelevante Proteine herstellen. Die transgenen Tiere dienen dann als Bioreaktoren, eine derartige Arzneistoffproduktion wird als Gene Pharming bezeichnet. Bevorzugtes Organ zur Sezernierung der Proteine ist die Milchdrüse, auf diese Weise können die Proteine einfach gewonnen werden. Milch ist eine erneuerbare und relativ unkomplexe Körperflüssigkeit, wesentliche Bestandteile sind Casein und Lactalbumin. Ein weiterer Vorteil der Milch ist, dass die exprimierten Proteine keinen Effekt auf die normalen physiologischen Vorgänge des transgenen Tiers haben. Tabelle G-1 gibt eine Übersicht über veröffentlichte Erfolgsraten bei der Produktion transgener Tiere.

| Tier | Methode | Erfolgsrate |
|-------------|----------------|---------------|
| Kuh | Mikroinjektion | 0.06 % - 0.75 |
| Schaf | Mikroinjektion | 0.1 - 4.4 % |
| Schwein | Mikroinjektion | 0.3 - 4 % |
| Ziege | Mikroinjektion | 0.5 - 3 % |
| Ziege | Kerntransfer | 2.6 % |

Tab. G-1: Erfolgsraten bei der Produktion transgener Tiere¹²⁴

Die Erfolgsraten bei der Klonierung von Tieren liegen für Ziegen, Schafe und Rinder bei etwa 2 %, bezogen auf die Anzahl der rekonstruierten Embryonen. Zur Produktion des Schafs Dolly wurden insgesamt 277 Embryonen rekonstruiert.

Die Proteinmengen, die mittels transgener Tiere aus deren Milch gewonnen werden können, sind sehr unterschiedlich. Beispielsweise konnten im Schaf 25 ng/ml Faktor X hergestellt werden, der gleiche Organismus liefert bis zu 35 mg/ml α 1-Antitrypsin¹²². Einer nicht minder großen Schwankung unterliegen die Marktgröße und auch die Gramm-Preise für humane Proteine. Weltweit werden etwa 100 g Faktor VIII pro Jahr benötigt mit einem Marktwert von etwa 5.000.000 US\$ / g, demgegenüber steht ein Jahresbedarf an α 1-Antitrypsin von etwa 7.500 kg mit einem Marktwert von etwa 100 US\$ / g¹²⁴

Eine ganze Reihe transgen hergestellter Proteine wurden bzw. werden zur Zeit in klinischen Studien getestet (α 1-Antitrypsin, PPL Therapeutics, GB [www.ppl-therapeutics.com]; rhC1-Inhibitor, Pharming, NL, derzeit in klinischer Phase II; rh Lactoferrin, Pharming, NL, klinische Phase I abgeschlossen [www.pharming.com]). Die Zulassung eines transgen erzeugten Arzneistoffes war zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht erfolgt.

Versuche zur 2-DE Analytik von rekombinatem bovinen FSH α/β aus der Milch transgener Kaninchen

Bovines FSH ist ein heterodimeres Glykoprotein und zählt zu den Gonadotropinen. Bioaktives FSH besteht aus einer α und einer β Untereinheit, wobei die α -Untereinheit bei allen Gonadotropinen (LH, FSH, TSH, CG) identisch und die β -Untereinheit hormonspezifisch¹²⁵ ist. Beide Untereinheiten verfügen jeweils über eine intramolekulare Disulfidbrücke und tragen je zwei sialylierte N-Glycosidreste. Die posttranslationalen Modifikationen sind für eine ordnungsgemäße Faltung, die Ausbildung der Quartärstruktur sowie die Sekretion des Gonadotropins erforderlich^{126,127}.

Gonadotropine werden in der Reproduktionsmedizin eingesetzt, boFSH α/β wird zur Auslösung der Superovulation in der Rinderzucht verwendet¹²⁸. Die derzeit dominierende Quelle ist das aus bovinen Hypophysen aufgereinigte FSH. Hierbei ergeben sich einige Schwierigkeiten, das aufgereinigte FSH kann mit LH verunreinigt sein, LH antagonisiert die FSH Wirkung. Außerdem besteht die Gefahr der Kontamination mit infektiösem Material, insbesondere durch BSE hat diese Problematik an Bedeutung gewonnen. Rekombinant gewonnenes FSH stellt demnach eine attraktive und sichere Alternative dar.

Charakterisierung des Probenmaterials

Es wurden zwei Proben untersucht: Milch eines transgenen Kaninchen, die nachweislich bioaktives boFSH α/β in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ enthält (FSH-Milch) und Milch eines Kontrollkaninchens, die nachweislich kein boFSH α/β enthält (Kontroll-Milch). Die Milch-Proben stammen vom Institut für Biotechnologie und Tierzucht an der Veterinärmedizinischen Universität Wien (Prof. Müller). Die Vorgehensweise zur Produktion der transgenen Kaninchen sowie die analytische Charakterisierung des boFSH α/β

wurde 2002 von Coulibali, Müller et al. veröffentlicht¹²⁹. In dieser Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass die durch Co-Mikroinjektion von Genprodukten, bestehend aus der regulatorischen Sequenz für α 1-Casein und der jeweiligen Sequenz für boFSH α und boFSH β , erzeugten, doppelt transgenen Kaninchen, bioaktives boFSH α/β in die Milch sezernieren. Außer in den Milchdrüsen konnte in keinem anderen Gewebe mittels RT-PCR boFSH RNA nachgewiesen werden. Die Expression erfolgt demnach hochspezifisch in den Milchdrüsen. Der qualitative Nachweis des boFSH α/β erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western blot. Unter nicht reduzierenden Bedingungen findet man das heterodimere boFSH α/β bei etwa 38 kDa, unter reduzierenden Bedingungen findet man für die α -Untereinheit eine Bande bei 20 kDa und für die β -Untereinheit eine Bande im Bereich von 19-21,5 kDa. Als Referenzsubstanz wurde jeweils aus Hypophysen gewonnenes Material verwendet. Die Bioaktivität wurde über einen Luciferase Assay unter Verwendung einer FSH-sensiblen Reporter Zelllinie nachgewiesen. Durch einen WGA-Lektin-Assay konnten terminale Sialinsäuren nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde entfettete und ultrazentrifugierte Milch in einem ersten *in vivo* Test erfolgreich eingesetzt, die Milch stellt demnach auch direkt die Formulierung des rekombinanten Arzneistoffs.

Aufgabenstellung

Ziel der 2-DE Analytik war es, die Proteinexpressionsmuster der Milch des transgenen Kaninchens mit der des Kontroll-Kaninchens zu vergleichen, um herauszufinden, ob die gentechnische Manipulation die Expression der üblicherweise mit der Milch sezernierten Proteine beeinflusst. Hierbei sollte nach Möglichkeit über den differentiellen Ansatz das boFSH α/β nachgewiesen und eine Aussage zur Glycosylierung gemacht werden. Die boFSH α/β -Konzentration der Milch wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Müller bestimmt und beträgt ca. 100 $\mu\text{g/ml}$.

Aufarbeitung der Kaninchenmilchproben

Die Kaninchenmilch wird durch zehn minütige Zentrifugation bei 3.000 g und 10°C entfettet. Das sich abscheidende Fett wird vorsichtig entfernt und verworfen. Man erhält die entfettete Vollmilch [FSH-Voll, Kontroll-Voll]

Im Anschluss wird ein Teil Kaninchenmilch-Proteine durch Zentrifugation abgetrennt, 20 min bei 40.000 g, 10°C. Das entstehende Pellet wird verworfen und der Überstand in ein frisches Eppendorf Cap überführt. Man erhält jeweils den Überstand [FSH-ÜS, Kontroll-ÜS]. Die Parameter der Zentrifugationsschritte unterscheiden sich von denen bei Coulibaly et al.¹²⁹ beschriebenen (10 min, 3.000 g, 4°C und 20 min, 20.000 g, 4°C), die Ergebnisse können dennoch verglichen werden.

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt.

| | Proteinkonzentration [µg/µl] | Proteingehalt [%] |
|---------------|---------------------------------|----------------------|
| FSH-Voll | 110 | 11,0 |
| FSH-ÜS | 48 | 4,8 |
| Kontroll-Voll | 106 | 10,6 |
| Kontroll-ÜS | 48 | 4,8 |

Tab. G-2: Proteingehaltsbestimmung der Kaninchenmilch

Die Kaninchenmilch hat einen sehr hohen Proteingehalt, in der Literatur¹³⁰ wird ein Wert von 10 % angegeben.

Der boFSH α / β -Anteil in der entfetteten Vollmilch beträgt demnach etwa 0,1 %, bezogen auf die Gesamtproteinmenge und etwa 0,2 %, bezogen auf die Gesamtproteinmenge des Überstands. Geht man davon aus, dass man mittels 2-DE etwa 1500 bis 3000 Spots auflösen kann, so sollte zumindest nach Eingrenzung des *pI* und Molekulargewichtsbereichs ein Nachweis des

boFSH α/β möglich sein. Zum Zeitpunkt der ersten Versuche war noch nicht bekannt, wie heterogen posttranslationale Modifikationen sein können.

BoFSH α , Swiss Prot Eintrag P01217

Aminosäuresequenz:

MDYYRKYAAV ILAILSLFLQ ILHSFPDGEF TMQGCPECKL
KENKYFSKPD APIYQCMGCC FSRAYPTPAR SKKTMLVPKN
ITSEATCCVA KAFTKATVMG NRVVENHTEC HCSTCYHKS

Eigenschaften: 120 Aminosäuren, 1-24 Signalpeptid, N-Glycoside an Position 80 und 106, O-Glycosid an Position 67. Das Molekulargewicht ohne Glycoside und ohne Signalpeptid beträgt 10791,5 kDa, der zugehörige *pI* 8,7.

BoFSH β , Swiss Prot Eintrag P04837

Aminosäuresequenz:

MKSVQFCFLF CCWRAICCRS CELTNITITV EKEECGFCIS
INTTWCAGYC YTRDLVYRDP ARPNIQKTCT FKELVYETVK
VPGCAHHADS LYTPVATEC HSKCDS DST DCTVRGLGPS
YCSFREIKE

Eigenschaften: 129 Aminosäuren, 1-20 Signalpeptid, N-Glycoside an Position 25 und 42. Das Molekulargewicht ohne Glycoside und ohne Signalpeptid beträgt 12.298,9 kDa, der zugehörige *pI* 5,33.

Aus den o.g. physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine können unter reduzierenden Bedingungen im Bereich von 10-25 kDa und *pI* etwa 3-8,7 Spots des boFSH α/β auftreten. Die Glycosylierung führt durch terminale Sialinsäuren zu einer Verschiebung zu sauren *pI*-Werten.

Vergleich der entfetteten FSH-Vollmilch und des FSH-Überstandes

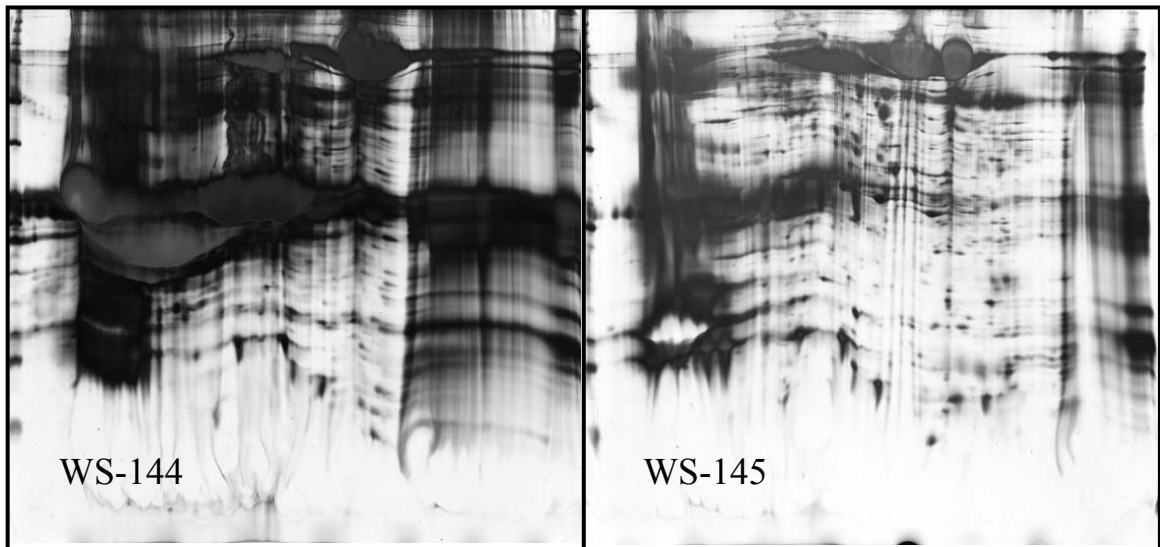


Abb. G-1: WS-144 FSH-Milch entfettet, 20 μ l, 2.200 μ g Protein. WS-145 FSH-Milch Überstand, 20 μ l, 980 μ g Protein. Jeweils 3-10 NL, 15 %T.

In einem ersten Versuch wurde ein Vergleich zwischen der entfetteten FSH-Vollmilch und dem FSH-Überstand nach 20 minütiger Zentrifugation angestellt. Es wurden jeweils 20 μ l aufgetragen. Durch den Zentrifugations-schritt werden einzelne Proteine bzw. Proteinfractionen quantitativ eliminiert. Da boFSH α/β im Überstand bleibt, wurde bei den folgenden Versuchen immer der Überstand verwendet. Analog zu WS-144 wurde auch ein 2-DE-Gel der Kontroll-Vollmilch hergestellt. Die aufgetragene Probenmenge sollte etwa 2 μ g boFSH α/β enthalten, da die 2-DE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wird, müssten die α - und β -Untereinheit getrennt voneinander vorliegen. Beim visuellen Vergleich von FSH und Kontroll-Milch im Molekulargewichtsbereich von 10-25 kDa konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Durch die sehr hohe Proteinbeladung sind weite Bereiche stark überladen.

Erhöhung der Auflösung

Neben der bereits durchgeführten Fraktionierung kann man durch Eingrenzen des *pI*-Bereichs und durch Variation der Acrylamidkonzentration der 2. Dimension die Auflösung verbessern. Außerdem wurde die aufgetragene Proteinmenge reduziert. Es wurden jeweils FSH- und Kontroll-Milchproben prozessiert.

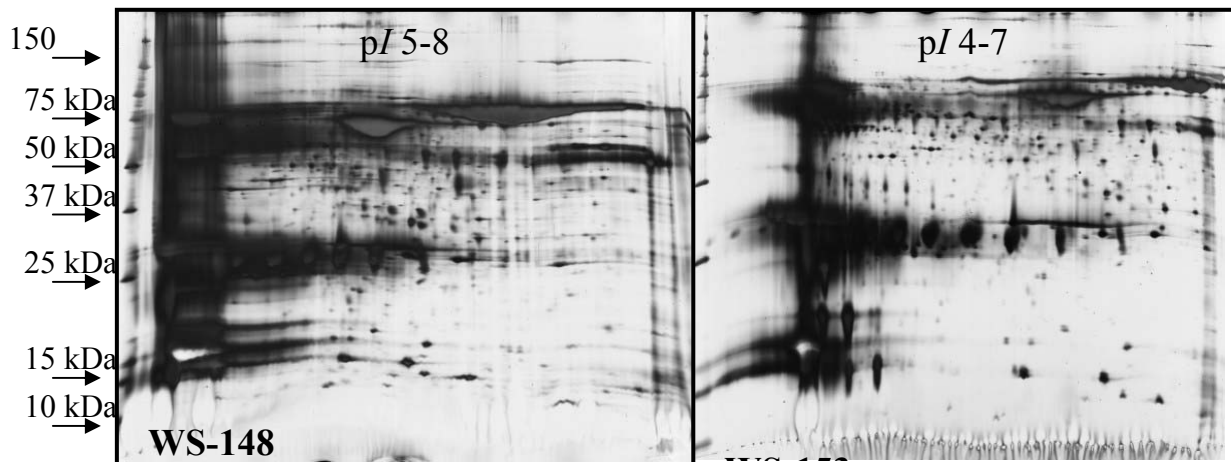


Abb. G-2: WS-148, FSH-Milch Überstand 10 μ l, 480 μ g Protein, 10-17,5 % T, WS-153, FSH-Milch Überstand, 5 μ l, 240 μ g, 10-17,5 % T.

Verwendung von Tricine-Gelen nach Schagger

Um die Auflösung in der 2. Dimension weiter zu verbessern wurden anstelle der Standard SDS-PAGE das Tricine-System nach Schagger¹³¹ verwendet. Hierdurch können insbesondere niedermolekulare Proteine besser aufgelöst werden, eine genaue Beschreibung zur Anfertigung der Tricine-Gele findet sich im Experimentellen Teil. Die folgende Abbildung G-3 zeigt, dass sich das System durchaus in Kombination mit IPG-Strips verwenden lässt. Es wurden je zwei Gele mit identischen Bedingungen hergestellt: WS-159 und WS-160 unter Verwendung des FSH-Milch Überstandes und WS-161 sowie WS-162 unter Verwendung des Kontroll-Milch Überstandes.

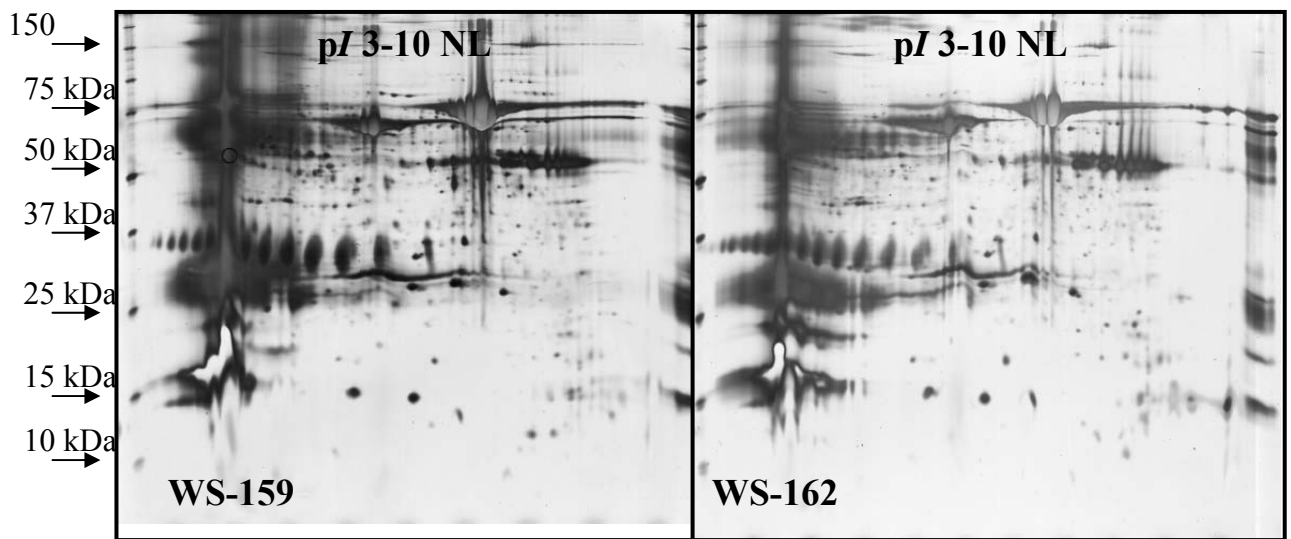


Abb. G-3 WS-159, FSH-Milch-Überstand 5 μ l, 240 μ g Protein, WS-162, Kontroll-Milch Überstand, 5 μ l, 240 μ g, beide 10 % T Tricine nach Schagger.

Auch bei genauem Vergleich des Bereiches zwischen 15 und 25 kDa der Gele WS-159, WS-160 mit WS-161, WS-162 konnten keine Unterschiede festgestellt werden, die boFSH α / β zugeordnet werden könnten. Ein vergrößerter Ausschnitt ist in Abbildung G-4 dargestellt. Entsprechend der angegebenen boFSH α / β Konzentration von 0.1 μ g / μ l sollten die Gele WS-159 und WS-160 jeweils 0,5 μ g boFSH α / β enthalten.



Abb. G-4: Ausschnitte aus WS-159 und WS-162

Fehlersuche

Es gibt verschiedene Erklärungen, warum sich das boFSH α/β nicht mittels 2-DE Silberfärbung nachweisen lässt:

- Die Proteine lassen sich nicht mittels Silberfärbung anfärben.
- Die boFSH α/β Proteinmenge liegt unterhalb der Nachweisgrenze, dies könnte durch große Heterogenität aufgrund posttranslationaler Modifikationen bedingt sein.
- Während der 2-DE-Probenprozessierung geht boFSH α/β durch Adsorptionseffekte oder mangelhafte Löslichkeit verloren.

FSH als Referenzsubstanz

Die Versuche einen boFSH β Standard mittels 2-DE zu trennen führten nicht zu einem verwertbaren Ergebnis. Dieser Standard war allerdings auch nicht für 2-DE sondern als Referenz für RIA-Tests gedacht. Der Standard war ein Lyophilisat aus 2,5 μg boFSH β und 1 ml einer 1 % BSA Lösung. Demnach war das Verhältnis von boFSH β zu BSA 1:4000 und damit ist dieser Standard nur für Methoden mit einer deutlich höheren Spezifität als 2-DE und Silberfärbung geeignet.

Da kein boviner Standard in der erforderlichen Qualität zur Verfügung stand, wurde für die folgenden Versuche rekombinantes humanes FSH (r-hFSH) verwendet. Von der Fa. Serono wurde ein Klinikmuster Gonal-F[®] 1200 IE zur Verfügung gestellt. Das darin verarbeitete r-hFSH wird in einer Ovarial-Zell-Linie des chinesischen Hamsters (CHO) produziert, besteht aus α - und β -Untereinheit des humanen FSH und stimmt in seiner Aminosäuresequenz mit dem humanen urinären FSH vollständig überein. Nicht identisch, aber dennoch sehr ähnlich, ist das Isoformenmuster der unterschiedlichen Glycosylierungsvarianten. 75 IE Gonal-F[®] entsprechen etwa 3,7 μg Protein.

| | Swiss Prot ID | Anzahl AS | Unterschiede in AS Sequenz | MW [D] | pI | Gravy |
|----------------------------------|------------------|--------------|-------------------------------|----------------|-------------|---------------|
| h-FSH α | P01215 | 92 | 27 | 10205,7 | 8,38 | -0,315 |
| b-FSH α | P01217 | 96 | | 10791,5 | 8,7 | -0,466 |
| h-FSH β | P01225 | 111 | 7 | 12485,1 | 5,91 | -0,342 |
| b-FSH β | P04837 | 109 | | 12298,9 | 5,33 | -0,311 |

Tab. G-3: Vergleich zwischen humanem und bovinem FSH

Auch wenn keine 100 %ige Übereinstimmung der Sequenzen zwischen humanem und bovinem FSH gegeben ist, sollte r-hFSH dafür geeignet sein nachzuweisen, ob es prinzipiell möglich ist, FSH mit 2-DE / Silberfärbung

nachzuweisen, und wenn ja, welche Mengen an Protein aufgetragen werden müssen.

Für die ersten 4 Gonal-F Gele wurden 0,3 µg, 0,4 µg, 0,6 µg und 1,2 µg aufgetragen, es wurden 3-10 NL IPG-Strips und das Tricine-System nach Schägger¹³¹ verwendet. Auf keinem der Gele konnten auf Anhieb Spots eindeutig dem r-hFSH zugeordnet werden. Die Zuordnung einzelner sehr schwacher Spots war erst im Nachhinein möglich. Abbildung G-5 zeigt eins der Gele aus diesem Lauf, man erkennt deutlich, dass Proteine der zuvor prozessierten Milchproben auf dem Gel zu sehen sind. Zum Zeitpunkt dieses Laufs existierte für die Stripholder noch keine Reinigungsvorschrift, die eine Cross-Kontamination wirklich ausschließen ließ.

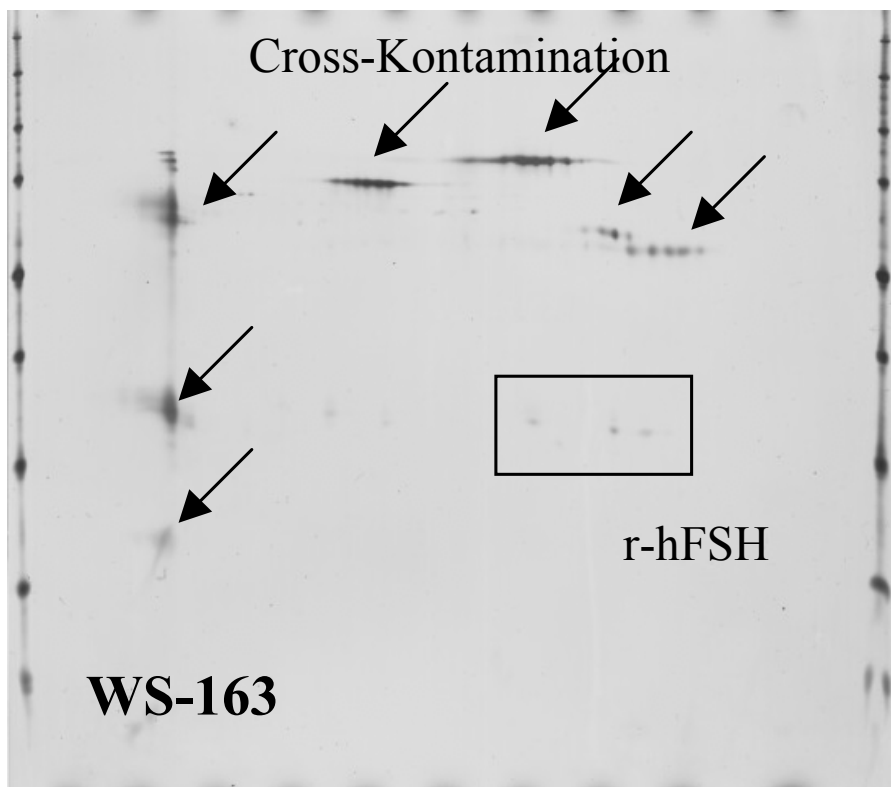


Abb. G-5: 0,3 µg r-hFSH (Gonal F), 10 % T Tricine, 3-10 NL

Für die folgenden Gele wurden die Striphholder nach der Reinigung mit Detergenz zusätzlich für >2 h bei 250°C behandelt (siehe Reinigungsvalidierung).

Nachweis von r-hFSH mittels 1-DE Silberfärbung

Da die Gele aus dem oben beschriebenen Lauf keine eindeutige Aussage zuließen, wurden 7 cm 1-DE Mini Gele 15 % T angefertigt. Ziel war es zu untersuchen, ob sich r-hFSH im 1-DE Gel mittels Silberfärbung nachweisen lässt.

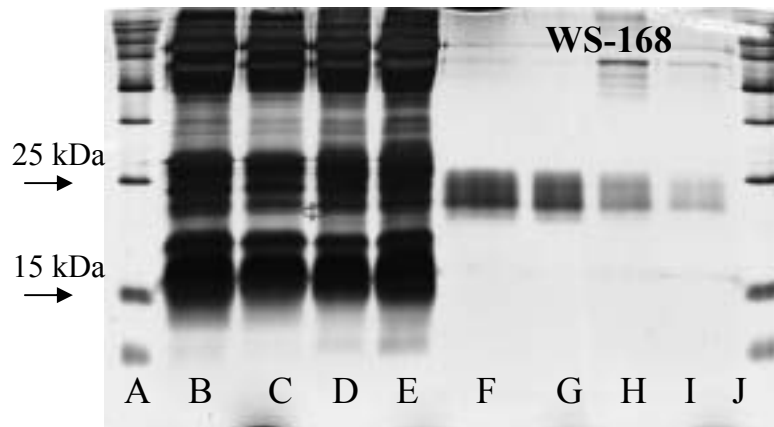


Abb. G-6: A und J MW-Standard, B 9,6 µg Kontroll-Milch ÜS, C 4,8 µg Kontroll-Milch ÜS, D 9,6 µg FSH-Milch ÜS, E 4,8 µg FSH-Milch ÜS, F 0,16 µg r-hFSH, G 0,08 µg r-hFSH, H 0,04 µg r-hFSH, I 0,02 µg r-hFSH

Auch geringe Mengen r-hFSH lassen sich im 1-DE Gel mittels Silberfärbung nachweisen, man sieht jedoch auch, dass man keine scharfe Bande für das r-hFSH erhält. Unterschiedliche Glycosylierungen führen zu unterschiedlichen Molekulargewichten der einzelnen Isoformen. Da die Isoformen sich auch hinsichtlich der *pI*-Werte unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass für den 2-DE Nachweis deutlich größere Mengen an Protein erforderlich sind.

Vergleich zwischen 1-DE und 2-DE getrenntem r-hFSH

Abbildung G-7 zeigt sehr deutlich, dass sich 2-DE dazu eignet unterschiedlich posttranslational modifizierte Proteine aufzutrennen und so die charakteristische Heterogenität abzubilden. Anstelle einer unscharfen Bande in der 1-DE erhält man in der 2-DE differenzierte Spots. Häufig ist die Glycosylierung wesentlich für die Wirksamkeit eines rekombinanten Arzneistoffs¹³². Die gelungene Auftrennung zeigt, dass r-hFSH im Laufe der 2-DE Probenprozessierung nicht durch Adsorptionseffekte oder mangelhafte Löslichkeit „verloren“ geht.

Was das Abschätzen der Nachweisgrenze angeht, so konnte gezeigt werden, dass man unter den in Abbildung G-7 gezeigten Bedingungen auch 1 µg r-hFSH nachweisen kann.

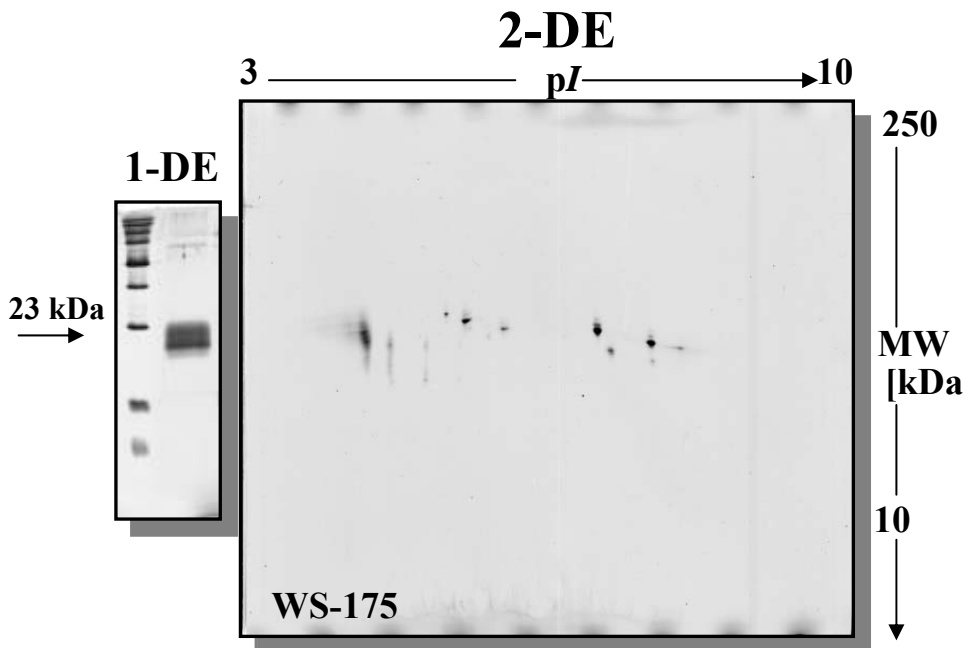


Abb. G-7: 1-DE Minigel, 0,1 µg r-hFSH, 15 % T. 2-DE, 2 µg r-hFSH, 18 cm 3-10 NL, 15 % T.

Zuordnung der α - und β -Untereinheit

Um eindeutig zuordnen zu können welche Spots der α - und welche der β -Untereinheit des r-hFSH zuzuordnen sind, wurde ein 2-DE-Gel von rekombinantem humanem Chorion Gonadotropin (hCG) hergestellt. Die α -Untereinheit des hCG und des FSH sind identisch, sie unterscheiden sich lediglich in ihrer β -Untereinheit. Beim hCG besteht die β -Untereinheit (Swiss Prot P01233) aus 145 Aminosäuren mit insgesamt 6 Disulfidbrücken und verfügt über 2 N-Glykoside (AS 13 und AS 20) sowie 4 mögliche O-Glycoside (AS 121, 127,132, 138). Das Molekulargewicht der unmodifizierten Aminosäuresequenz beträgt 15.532 Da, der zugehörige pI 8,65.

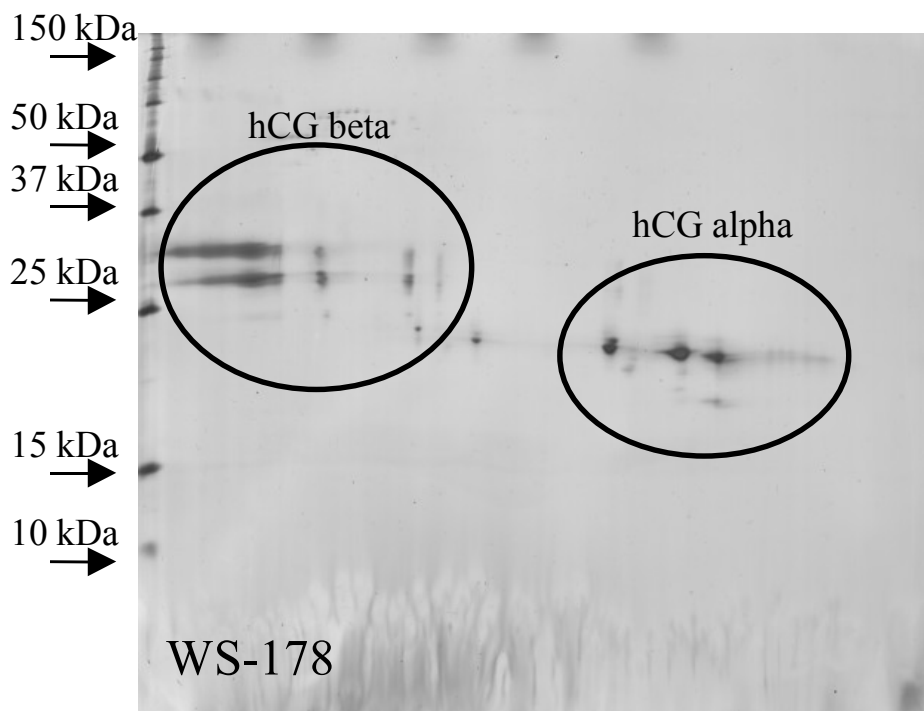


Abb. G-8: 5 μ g r-hhCG (Ovitrelle[®]) 18 cm, 3-10 NL, 15 % T

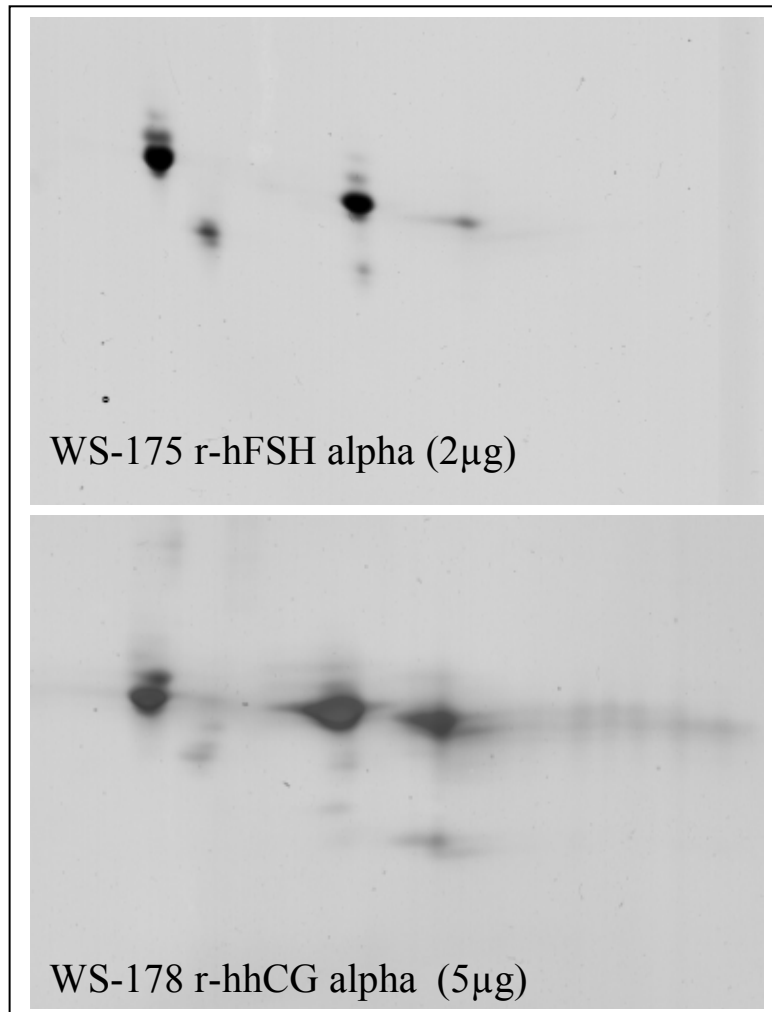


Abb. G-9: Vergleich der 2-DE getrennten alpha Untereinheiten von r-hFSH und r-hhCG

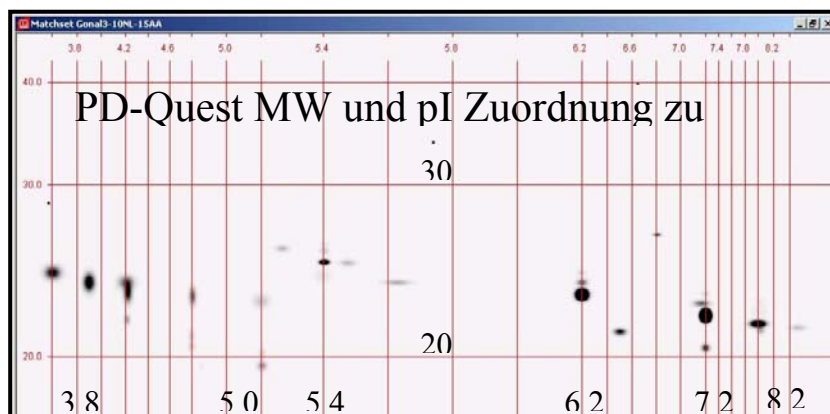


Abb. G-10: r-hFSH Molekulargewichte und pI-Werte

Gezielte Suche nach r-boFSH Spots

In der Veröffentlichung von Coulibali et al.¹²⁹ wurde der Milchüberstand des transgenen Kaninchens mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung getrennt. Es konnte nur in Fraktionen mit einem *pI* zwischen 4,65 und 6,28 boFSH nachgewiesen werden, mit einem Hauptpeak zwischen *pI* 5,7 und 6,05. Der *pI*-Bereich entspricht dem für boFSH aus transgener Mausmilch (4,2-6,1) und aus CHO-Zellen (4,0-5,2)¹³³. Demnach scheinen die posttranslationalen Modifikationen des boFSH sich vom hFSH zu unterscheiden.

Im Bereich kleiner *pI* 5,5 würden etwaige boFSH-Spots durch andere Kaninchenmilch Proteine überlagert, es bleibt also der Bereich zwischen *pI* 5,5 und 6,5. In der unten gezeigten Abbildung sind jeweils Ausschnitte der FSH-Milch und der Kontrollmilch gegenübergestellt, es wurden die Bereiche, in denen mit r-boFSH Spots zu rechnen ist, eingerahmt. Bei WS-153 und WS-151 wurden 18 cm 4-7 IPG-Strips verwendet, es wurden 240 µg Gesamtprotein aufgetragen. WS-153 sollte 0,5 µg r-boFSH enthalten. Die Gele WS-147 – WS-150 wurden mit 18 cm 5-8 IPG-Strips angefertigt, bei WS-148 und WS-150 wurden 480 µg Gesamtprotein aufgetragen, bei WS-147 und WS 150 960 µg Gesamtprotein. Daraus ergeben sich für die FSH-Milch Proben 1 µg bzw. 2 µg r-boFSH.

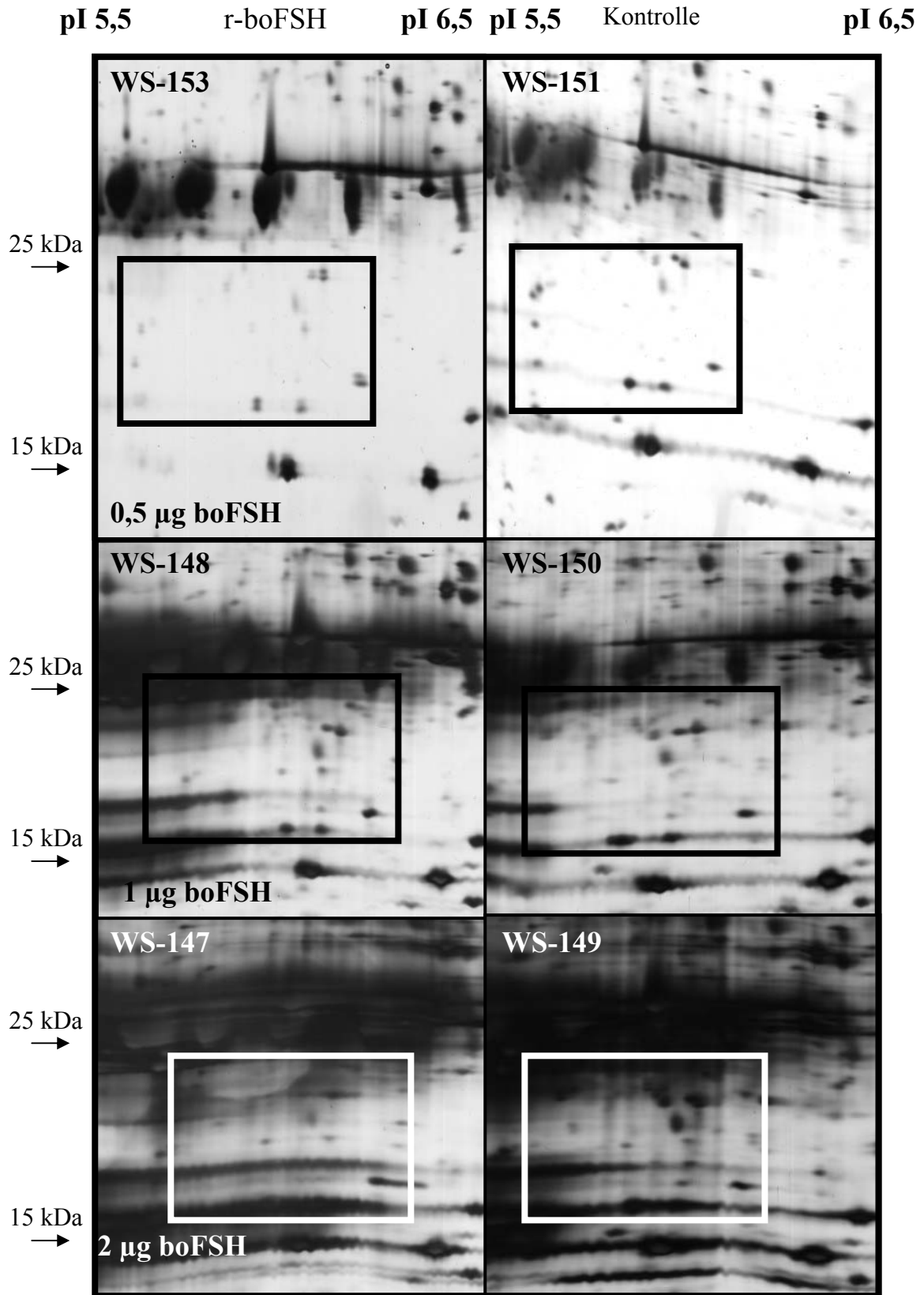


Abb. G-10: Ausschnitte FSH-Milch ÜS vs. Kontroll Milch ÜS.

In den in Abbildung G-10 aufgezeigten Ausschnitten lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den FSH und den Kontrollproben feststellen. Die Gele WS-147 und WS-149 sind bereits deutlich überladen.

Unter den gegebenen Bedingungen lässt sich das r-boFSH nicht mittels 2-DE Silberfärbung nachweisen. Die Spezifität der Silberfärbung ist unter den gegebenen Bedingungen nicht ausreichend, ein entsprechender Antikörper für einen 2-DE Western blot stand leider nicht zur Verfügung.

Beim Vergleich der Proteinmuster der transgenen Milch mit der Kontrollmilch konnten über den gesamten Bereich kaum Unterschiede festgestellt werden. Lediglich bei der Intensität einzelner Spots zeigten sich Differenzen. Die Manipulation scheint demnach keinen Einfluß auf die mit 2-DE abbildbaren Proteine zu haben.

2-DE Analytik von Bcl-xL

Funktion von Bcl-xL - Strategien der Tumorthherapie

Bcl-xL gehört zur Familie der Bcl-2 Proteine und hat eine anti-apoptotische Wirkung. Die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus um gezielt fehlerhafte oder geschädigte Zellen zu eliminieren. Die Bcl-2 Proteine übernehmen als Gegenspieler des apoptotischen Geschehens eine wichtige Funktion bei der Feinsteuerung. Bcl-xL interagiert mit verschiedenen an der Apoptose beteiligten Proteinen, so wurde beispielsweise ein Bcl-xL-BAK Proteinkomplex gefunden und charakterisiert¹³⁴. Bcl-xL hemmt die Aktivierung von Caspasen¹³⁵, Bcl-xL bildet auch mit BAX und Bcl-2 Heterodimere [swissprot entry Q07817], Siva-1 bindet an Bcl-xL und inhibiert dessen anti-apoptotische Wirkung¹³⁶. Die Regulation der Apoptose ist äußerst komplex, Caspasen werden durch enzymatische Spaltung aktiviert, die aktivierten Caspasen wiederum schneiden Proteine und lösen dadurch den Zelltod aus, ohne das umgebende Gewebe zu beschädigen. Bcl-xL verfügt über eine Caspase Schnittstelle, Clem et al. zeigten¹³⁵, dass die Caspase-1 und Caspase-3 an diese Schnittstelle bindet. Man geht davon aus, dass die Caspasen durch diese Bindung an Bcl-xL ihre eigentliche Funktion im apoptotischen geschehen nicht wahrnehmen können. Überwiegt die Aktivität der Caspasen wird das Bcl-xL geschnitten, das daraus resultierende 16 kDa Fragment hat pro-apoptotische Eigenschaften. Bcl-xL hat demnach die Aufgabe die Apoptose in Schach zu halten, gewinnen apoptotische Vorgänge die Überhand, fördern die entstehenden Bcl-xL Fragmente einen raschen Ablauf der Apoptose. Neben dem Bcl-xL-Gen gibt es eine weitere Splicevariante das Bcl-xS. Dies codiert für ein deutlich kürzeres Protein, daher s für small, es fehlen die Aminosäuren 126-188, im Gegensatz zum Bcl-xL hat es pro-apoptotische Wirkung.

Die Proteine der Bcl-2 Familie stellen interessante Targets für die Entwicklung von Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung gegenüber einer herkömmlichen Chemotherapie resistenter Tumore dar. Eine ganze Reihe Chemotherapeutika, wie beispielsweise Cisplatin oder Etoposid, zielen darauf ab die Tumorzellen in die Apoptose zu zwingen.

Cisplatin wird zur Behandlung maligner Melanome eingesetzt, diese zeigen jedoch häufig Resistenz gegenüber der Chemotherapie. Das anti-apoptotische Bcl-xL ist eine mögliche Ursache für derartige Resistenzen. In der Arbeitsgruppe um Prof. Pehamberger (AKH) Wien konnte gezeigt werden, dass Mel Juso Zellen, die zuvor durch stabile Transfektion dazu gebracht wurden Bcl-xL in erhöhtem Maß zu exprimieren, eine signifikant geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Apoptose auslösenden Agens Cisplatin aufweisen¹³⁷. Weiter konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Antisense Oligonucleotiden (ISIS 16009), die die Expression des Bcl-xL inhibieren, die Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin gesteigert werden konnte. Bei Antisense Oligonucleotiden handelt es sich um einzelsträngige Oligonucleotide, die durch Komplexierung der komplementären mRNA die Translation und damit die Proteinexpression hemmen.

Ziel des Ansatzes ist es chemotherapieresistente maligne Melanome und auch andere Tumoren, wie beispielsweise Colon Carzinome¹³⁸, durch Inhibition von anti-apoptotischen Faktoren mittels Oligonucleotiden einer Chemo- oder Strahlentherapie zugänglich zu machen.

Erste vielversprechende klinische Untersuchungen zum Einsatz eines Oligonucleotids (Augmerosen), das gegen Bcl-2 gerichtet ist und in Kombination mit Dacarbazin bei malignen Melanomen zum Einsatz kommt, wurden bereits veröffentlicht¹³⁹. Auch im Bereich der Oligonucleotidsynthese werden neue Konzepte entwickelt¹⁴⁰, um Oligonucleotide gezielt in die Zelle zu bringen und dort eine möglichst hohe Affinität zur Ziel-RNA zu erreichen.

Physikalisch chemische Eigenschaften des Bcl-xL

Bcl-xL besteht aus 233 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 26 kDa und einen *pI* von 4,86. Als posttranslationale Modifikation wird lediglich der Schnitt durch Caspasen nach AS61 beschrieben. Das apparente Molekulargewicht in der SDS-PAGE beträgt etwa 32-33 kDa¹³⁵.

Aminosäuresequenz siehe unter Swissprot Q07817.

Ziel der 2-DE Analytik

Für die bereits oben erwähnten genetisch modifizierten Juso Zellen (Juso_Bcl-xL), bei denen durch stabile Transfektion eines pSFFVneo-Bcl-xL Plasmids die Expression des Bcl-xL etwa um Faktor 8 gegenüber der Kontrollzelle (Juso_neo) gesteigert wurde¹³⁷, sollen mittels 2-DE die Proteinexpressionsmuster verglichen werden. Ein Ziel war herauszufinden, ob es durch die genetische Modifikation zu sichtbaren Veränderungen der Proteinexpression kommt. Von den physikalisch chemischen Eigenschaften liegt Bcl-xL in einem Bereich, der durch 2-DE abgebildet werden kann. Aussagen zur Konzentration an Bcl-xL konnten der Literatur nicht entnommen werden. Demnach konnte zu Beginn der Versuche nicht abgeschätzt werden ob Bcl-xL oberhalb der Nachweisgrenze liegt. Weiteres Ziel der Versuche war das Bcl-xL und etwaige Modifikationen durch 2-D Elektrophorese darzustellen und die unterschiedlich starke Expression der Juso_Bcl-xL im Vergleich zu den Juso_neo Zellen zu zeigen. Die zu erarbeitende 2-DE Methode, sollte ferner Anwendung in der Dissertation von Johannes Winkler⁹⁶ finden, als Testsystem für die *in vitro* Untersuchung der von ihm synthetisierten 2'-aminomodifizierten Antisense Oligonucleotide. Zum Einen, um zu untersuchen, ob es durch die Gabe der Oligonucleotide zu einer Änderung des Proteinexpressionsmusters kommt, hierdurch könnten gegebenenfalls Rückschlüsse auf unerwünschte Wirkung der Antisense Oligonucleotide gezogen werden und zum Anderen um direkt den Einfluß des Antisensemoleküls auf das Zielprotein zu zeigen.

Probenaufarbeitung und 2-DE Vergleich von Juso_Bcl-xL mit Juso_neo

Die beiden Juso Zellproben wurden als gefrorenes Pellets (-80°C) von der Abteilung für Dermatologie des Allgemeinen Krankenhauses an unser Institut überführt. Die Pellets wurden mit je 500 µl Lysispuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 20 nM PMSF) in einem Glasmörser unter ständiger Kühlung aufgeschlossen (ca. 2 min), anschließend in ein Eppendorf cap überführt, durch Zentrifugation wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt, der Überstand wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford.

Zum Vergleich der Proteinexpressionsmuster wurden 2-DE-Gele mit jeweils 75 µg Gesamtprotein unter Verwendung von 18 cm 3-10 NL IPG-Strips, eines 10-15 % T Gradienten Gels für die 2. Dimension und anschließender Silberfärbung nach Blum¹²¹ angefertigt (sonstige Parameter siehe Experimenteller Teil). Abbildung B-1 zeigt ein 2-DE-Gel der Juso_neo Zellen.

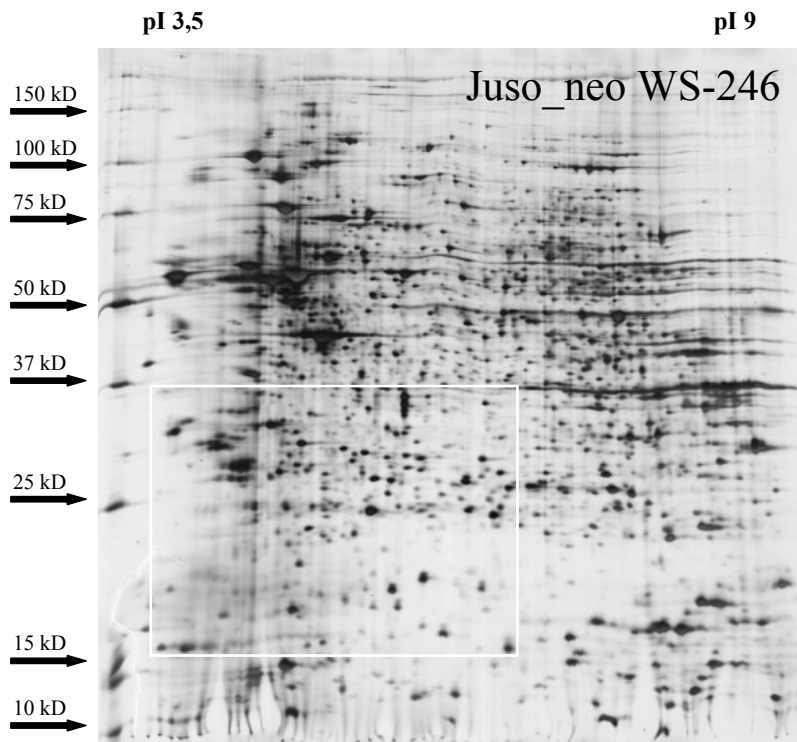


Abb. B-1: pI 3 -10 NL, 18 cm, 10-15 % T, Juso_neo 75 µg Gesamtprotein

In Abbildung B-2 ist ein 2-DE-Gel der stabil transfizierten Juso_Bcl-xL Zellen abgebildet. Das Bcl-xL sollte in dem weiß markierten Bereich zu finden sein. In der darauffolgenden Abbildung (B-3) wurden die weißen Bereiche der Bcl-xL und der Neo 2-DE-Gele vergrößert. Auch bei sorgfältiger Durchsicht konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, die potentiell auf eine erhöhte Expression des Bcl-xL schließen lassen würden. Unter Berücksichtigung der im Validierungsteil dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse, sollte es zwar möglich sein ein um den Faktor 8 stärker exprimiertes Protein auffindig zu machen, es ist aber davon auszugehen, dass Bcl-xL unter den oben gewählten Versuchsbedingungen unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Hier zeigt sich eins der wesentlichen Probleme der 2-DE: Interessante Proteine, die regulatorische Funktionen innerhalb der Zelle übernehmen, werden häufig in

Bcl-xL

geringen Mengen exprimiert und durch die Vielzahl an Strukturproteinen und Enzymen, die in hohen Konzentrationen vorliegen, überlagert.

Eine Aussage, die Aufgrund des Vergleiches der 2-DE-Gele der Juso_Neo mit der Juso_Bcl-xL Probe getroffen werden kann, ist, dass es durch die genetische Modifikation der Zellen nicht zu einer signifikanten Änderung der abbildbaren Proteinexpression kommt. Eine wirklich globale Aussage ist nicht möglich, da man sich auf das beschränken muss, was sichtbar wird. Auch wenn es eine eingeschränkte Aussage ist, so ist dies doch vielmehr, als man noch vor 30 Jahren über die Proteinexpression von Zellsystemen aussagen konnte.

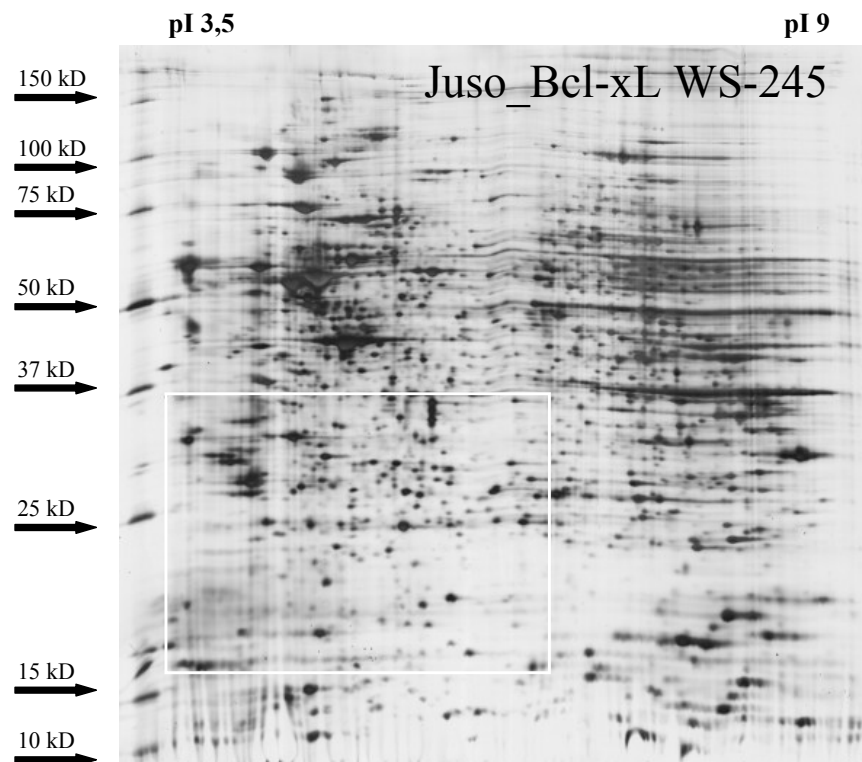


Abb. B-2: Juso_Bcl_xL 75 µg Gesamtprotein 18 cm 3 -10 NL, 10-15 % T

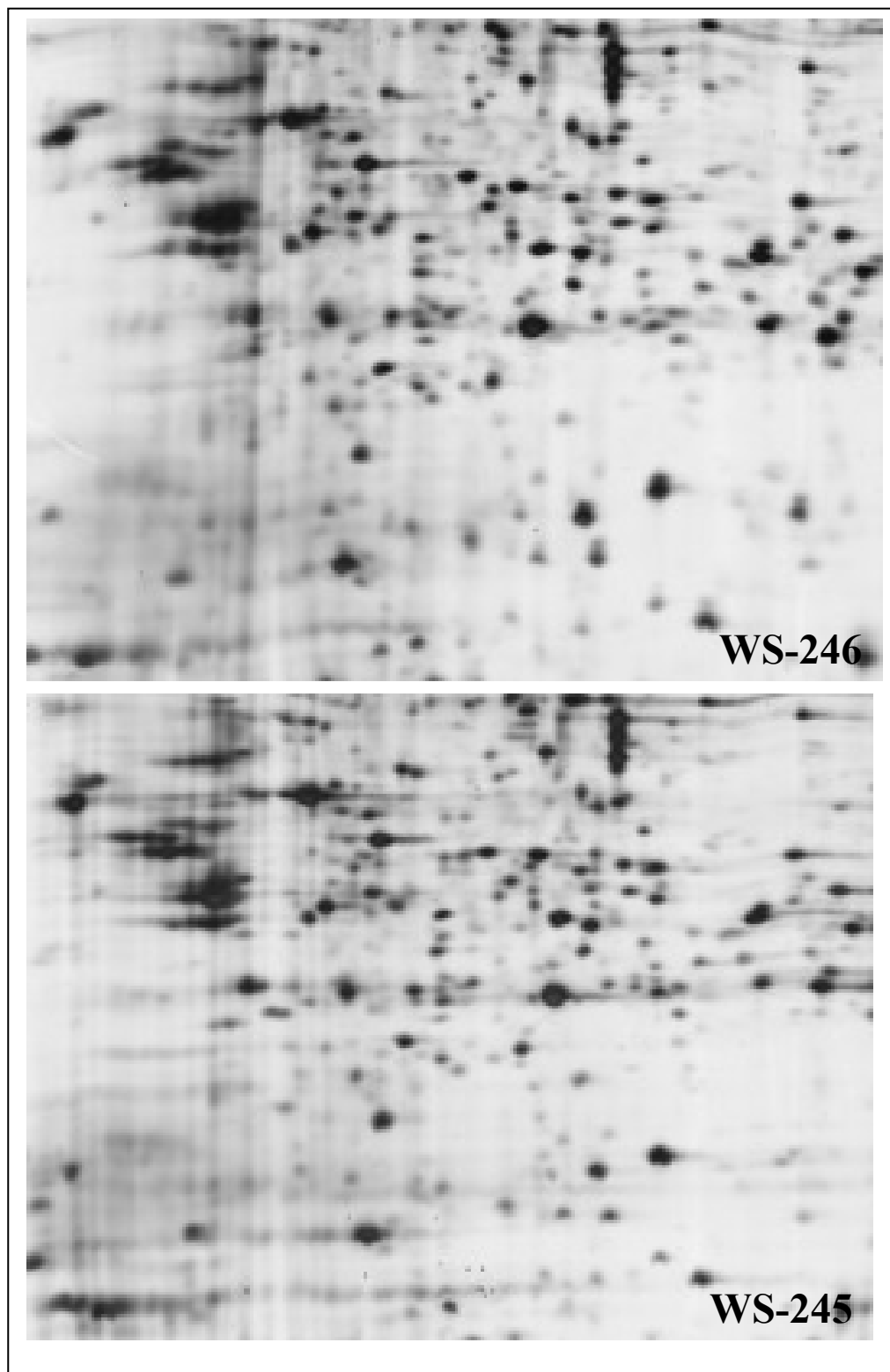


Abb. B-3: relevante Ausschnitte der vorhergehenden Abbildungen, vergrößert

Erhöhung der Spezifität - 2-DE Western blot

Wie oben gezeigt, konnte Bcl-xL mittels 2-DE Silberfärbung nicht nachgewiesen werden. Daher wurde versucht das Bcl-xL auf 2-DE Minigelen mittels Western blot nachzuweisen. Es wurde ein Bcl-x Antikörper der Firma Transduction verwendet, eine detaillierte Beschreibung der Versuchsbedingungen findet sich im Experimentellen Teil dieser Arbeit. Es wurden je 2 Gele der Juso-neo und der Juso_Bcl-xL Proben mit 20 µg und 80 µg Gesamtprotein angefertigt. Abbildung B-4 zeigt einen Vergleich der Western blots bei einer 5 minütigen Belichtung. Man erkennt deutlich, dass die Juso_Bcl-xL Zellen mehr Zielprotein exprimieren, von dem Versuch einer exakten Quantifizierung wurde abgesehen, die Literaturangabe Faktor 8 erscheint realistisch¹³⁷. Im 1-DE Western blot sieht man lediglich 2 Banden, wobei die obere relativ unscharf ist¹³⁸. Eine derartige Unschärfe scheint auf den ersten Blick häufig auf eine Unzulänglichkeit der Methode zurückzuführen zu sein, dies ist jedoch in vielen Fällen eine Täuschung. Überlagerung von verschiedenen Proteinen oder posttranslationale Modifikationen, die beachtliche Heterogenität aufweisen können, sind meist die Ursache. Der 2-DE Western blot zeigt das die unscharfe 1-DE Bande mit höherem Molekulargewicht sich zu 3 Spots auflöst. Da der Antikörper gegen Bcl-x gerichtet ist, dürfte er auch das kleinere Bcl-xS (Mw 18,9 kDa, pI 5,0) erkennen, die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei dem Spot mit niedrigem Molekulargewicht um Bcl-xS handelt. Ein weiteres in der Literatur beschriebenes Fragment ist der durch Caspasen geschnittene Abschnitt AS62-233 (Mw 19,2, pI 5,4). Die Spots auf den Western blots (Abbildung B-4) wurden durchnummeriert, Spot 1, 2 und 4 liegen im Bereich von pI 5, Spot 3 bei etwa pI 6,5. Entweder handelt es sich um ein posttranslational modifiziertes Bcl-xL oder um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit einem Protein.

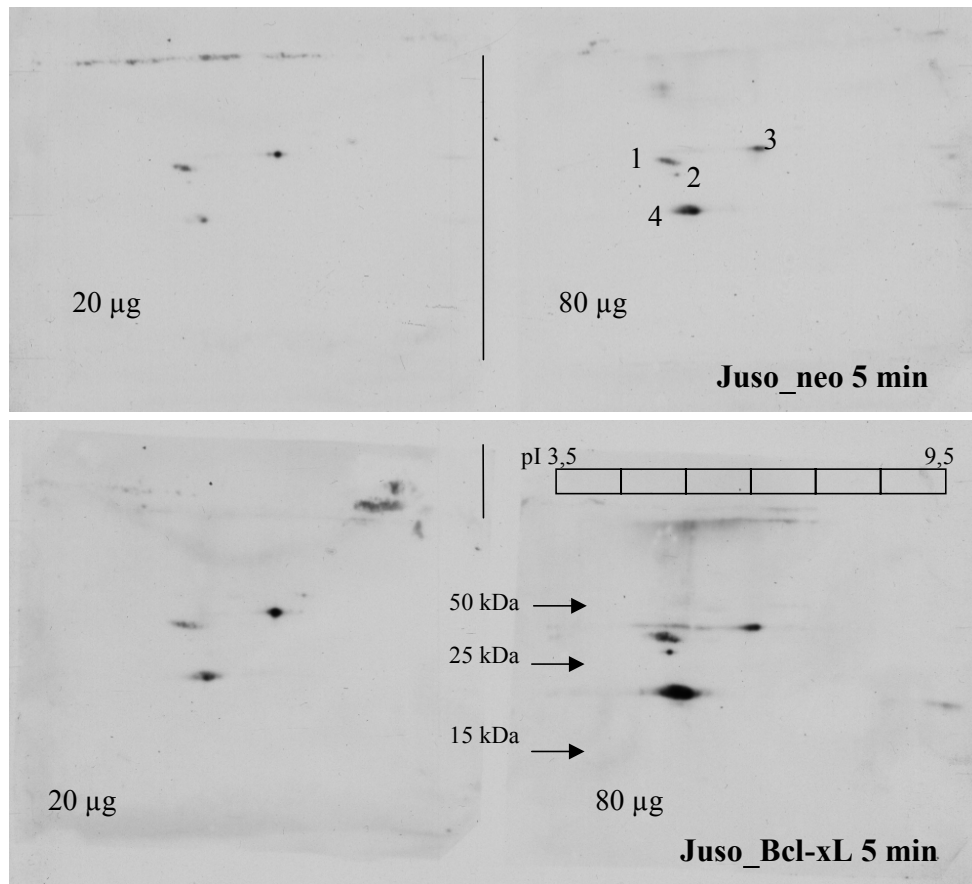


Abb. B-4: Western blots der Juso_neo und der modifizierten Juso_Bcl-xL Zellen

Schaut man sich Spot 1 etwas genauer an, so ist es durchaus möglich, dass sich darunter unterschiedliche posttranslationale Modifikationen des gleichen Proteins verbergen. Zu Bcl-xL sind bisher, mit Ausnahme der Spaltung durch Caspasen, keine posttranslationalen Modifikationen bekannt.

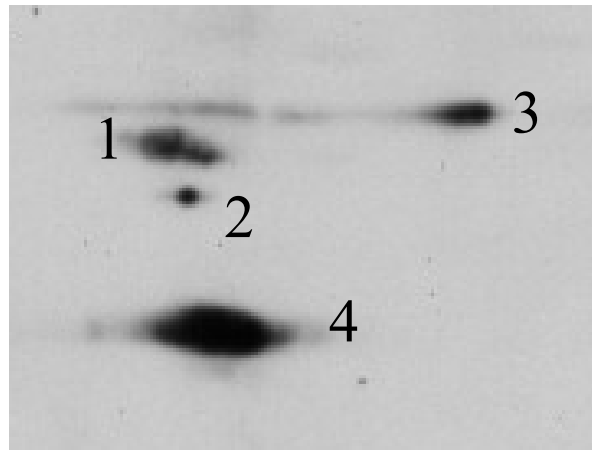


Abb. B-5: Ausschnitt des 80 µg Juso_Bcl-xL Blots, 5 min belichtet

Fazit zur 2-DE Analytik von Bcl-xL

Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass die gentechnische Manipulation der Juso Zellen nicht zu einer, auf einem silbergefärbten 18 cm 3-10 NL, 10-15 %T 2-DE-Gel, sichtbaren Veränderung der Proteinexpression führt. Bcl-xL lässt sich nicht mittels Silberfärbung nachweisen, durch 2-DE Western blot können jedoch unterschiedliche Bcl-x Isoformen nachgewiesen werden. Zudem zeigen die Western blots, dass das Ziel der genetischen Manipulation, nämlich eine Überexpression des Bcl-xL's, erreicht wurde. Insbesondere zur Überprüfung der Effektivität einer Antisenseblockade kann durch 2-DE Western blots zusätzliche Information gewonnen werden. Gesetzt den Fall, dass Spot 3 kein Bcl-xL wäre, so würde man diesen im 1-DE Western blot auch nach Blockade durch ein Oligonucleotid detektieren und dem Bcl-xL zuordnen. In diesem Fall wäre die Antisense Hemmung des Bcl-xL in Wirklichkeit besser als das Versuchsergebnis vermuten ließe.

Analytik rekombinanter Arzneistoffe mittels 2-DE

Definition rekombinante Arzneistoffe

Als rekombinante Wirkstoffe werden solche Arzneistoffe bezeichnet, die von speziell zu diesem Zweck gentechnisch modifizierten Organismen produziert werden. Diese Definition, die auch Eingang ins Europäische Arzneibuch gefunden hat¹⁴¹, differenziert zwischen den rekombinanten Produkten und solchen, die durch biotechnologische Verfahren hergestellt wurden. Beispiele für rein biotechnologische Verfahren sind z. B. die Fermentation von Penicillinen oder die biotechnologische Modifikation von Schweineinsulin zu dem entsprechenden Humanprodukt.

Einleitung

Die im Laufe der Arbeit gewonnenen Erfahrungen haben dazu geführt, einen Schwerpunkt auf die Analytik rekombinanter Arzneistoffe mittels 2-DE und Massenspektrometrie zu setzen. Die Untersuchungen zur 2-DE von rekombinantem FSH haben gezeigt, dass diese Methode sehr gut geeignet ist posttranslational modifizierte Proteine zu trennen. Seit rh-Insulin 1982 durch die US-amerikanische Behörde als erstes rekombinantes Arzneistoff zugelassen wurde, hat diese Arzneistoffklasse zunehmend an Bedeutung gewonnen. Da alle rekombinanten Arzneistoffe komplexe Makromoleküle oder, wenn posttranslationale Modifikationen vorliegen, heterogene Mischungen von Makromolekülen darstellen, sind auch die Anforderungen an die Analytik dieser Arzneistoffe entsprechend komplex und nicht mit den üblicherweise im Rahmen der Arzneistoffanalytik angewandten Methoden vergleichbar. Es besteht für rekombinante Arzneistoffe durchaus Bedarf an Methoden zu

entwickeln, mittels derer Identität, Reinheit und Gehalt nachgewiesen werden können.

Weiterhin ausschlaggebend für die Wahl dieses Schwerpunktes waren die Monographien des EuAB, hier werden sowohl IEF als auch SDS-PAGE für die Proteinanalytik verwendet. 2-DE hat als Methode noch keinen Eingang ins Arzneibuch gefunden. Da die Kombination aus IEF und SDS-PAGE, resp. 2-DE, hinsichtlich der Auflösung deutliche Synergieeffekte bringt, war es nahe-liegend diese Methode zu evaluieren. Im allgemeinen Teil dieser Arbeit wurde die Frage der Komplexität des Proteoms bereits ausgiebig diskutiert, untersucht man rekombinante Arzneistoffe, so wird die Komplexität der Probe auf ein Minimum heruntergebrochen. Nichtsdestotrotz bieten die mit 2-DE rekombinanter Proteine erzielten Ergebnisse Grundlage zur Optimierung eines Proteomics Ansatzes komplexer Proben.

Gewinnung rekombinanter Arzneistoffe

Geschichtliche Meilensteine, die Rekombinationstechniken erst ermöglichten, waren die Entdeckung des Aufbaus und der Struktur der DNA durch Watson und Crick 1953¹⁴², die Entschlüsselung des Genetischen Codes in den 60er Jahren, die Entdeckung von Plasmiden, Restriktionsendonucleasen und der reversen Transkriptase, die Methoden zur Sequenzierung von Genen durch Sanger sowie die Entwicklung der PCR (polymerase chain reaktion) als DNA/RNA Amplifikationstechnik. Die erste Rekombination von Genen gelang Cohen und Boyer 1973, als erster rekombinanter Arzneistoff wurde 1982 das von Eli Lilly produzierte rh-Insulin in den USA zugelassen¹⁴³, 1985 folgte Somatotropin (Genentech), ebenfalls in den USA^{122,143,144}.

Die gängigsten Expressionssysteme für rekombinante Arzneistoffe sind: E. coli, ein prokaryotischer Organismus, der nicht in der Lage ist Proteine posttranslational zu modifizieren, CHO-Zellen (chinese hamster ovarian) und

BHK-Zellen (baby hamster kidney) als eukaryontische Expressionssysteme, die demnach Proteine auch posttranslational modifizieren können. Ferner werden Hefezellen für die Arzneistoffproduktion eingesetzt (Insulin Novo Nordisk). Es gibt weitere Systeme zur Expression rekombinanter Proteine, allerdings gibt es derzeit noch keine zugelassenen Arzneimittel, deren Wirkstoff auf diese Weise produziert wird. Hierzu zählen transgene Tiere, Insektenzellen und Pflanzenzellen. Eine umfassende Übersicht zu rekombinanten Arzneistoffen, welche Techniken bei der Rekombination von Genen angewendet werden, wie diese funktionieren sowie eine Beschreibung der unterschiedlichen Expressionssysteme, Vorgehensweise bei der Fermentation und Aufreinigung der Proteine, findet man in dem Buch Gentechnik, Biotechnik von Prof. Dingermann¹²². Hier werden auch derzeit am Markt befindlichen Arzneimitteln diskutiert.

Vorteile rekombinanter Arzneistoffe

Bei den aus tierischen oder humanen Geweben gewonnenen Proteinarzneistoffen stellt die Verfügbarkeit ein Problem dar, so benötigt man für die Versorgung eines Diabetikers mit porcinem Insulin etwa 50 Bauchspeicheldrüsen. Bei einer Diabetes melitus Inzidenz von etwa 1 zu 200 ergäbe sich allein für Deutschland ein Jahresbedarf von 20 Mio. Bauchspeicheldrüsen.

Rekombinante Arzneistoffe sind ihrer Aminosäuresequenz nach mit dem humanen Protein identisch, hierdurch werden allergische Reaktionen, wie sie zum Teil bei tierischen Proteinen auftreten, vermieden. Auch hinsichtlich der Aufreinigung und den Möglichkeiten zur Standardisierung der Arzneistoffe bieten die rekombinanten Verfahren deutliche Vorteile.

Bei der Verwendung von Organextrakten, insbesondere solchen humanen Ursprungs, kam es häufiger zur Übertragung von Pathogenen. Aus diesem

Grund wurden beispielsweise Extrakte aus Leichenhypophysen vom Markt genommen und mittlerweile durch rekombinante Produkte ersetzt.

Viele Proteine, die im Organismus in äußerst geringen Mengen vorkommen, wurden durch rekombinante Verfahren erst zugänglich.

Gentechnische Methoden wurden in den letzten Jahrzehnten immer wieder kontrovers in der Öffentlichkeit diskutiert, die Anwendung der „roten Biotechnologie“ zur Gewinnung rekombinanter Arzneistoffe hat mittlerweile breite Zustimmung gefunden. Die oben angeführten Vorteile hinsichtlich Verfügbarkeit, Sicherheit und Wirksamkeit sowie die strikten Anforderungen an Forschungs- und Produktionsstätten konnten auch hartnäckige Bedenkensträger überzeugen.

Übersicht der rekombinanten Arzneistoffe

Im Jahr 2000 lag der Gesamtumsatz, der mit rekombinanten Arznei- und Impfstoffen erzielt wurde, weltweit bei etwa 25 Mrd. US \$, dies entspricht etwa 17,5 % des gesamten Weltpharmamarktes. Zum Vergleich, im Jahr 1995 lag der Anteil bei 5 % (lt. Verband forschender Arzneimittelhersteller, Bonn). Der Anteil der rekombinanten Substanzen an Neuzulassungen lag bei etwa 12,5 %. Die Entwicklungszeiten für rekombinante Arzneistoffe sind kürzer als die synthetisch gewonnener Arzneistoffe und die Ausfallraten geringer. Diese Zahlen belegen, dass rekombinante Arzneistoffe einen signifikanten Anteil des Weltmarktes einnehmen.

Rekombinante Arzneistoffe können in folgende Klassen unterteilt werden:

- Insuline
- Zytokine
- Antianämika
- Hypophysenhormone
- Blutgerinnungsfaktoren
- Fibrinolytika und Antikoagulantien
- Monoklonale Antikörper
- sonstige

Es gibt einige rekombinante Arzneistoffe, die bei sehr seltenen Krankheiten, wie beispielsweise Morbus Gaucher, eingesetzt werden. Diese sind unter der Rubrik „sonstige“ zusammengefasst. In den folgenden Tabellen ist der Handelsname, die Bezeichnung des Wirkstoffs, die Indikation (kurz gefasst), das Expressionssystem sowie der Hersteller aufgeführt. Diese Übersichtstabellen zeigen die zum Zeitpunkt der Zusammenstellung in der EU zugelassenen rekombinanten Arzneimittel.

Es bleibt noch ein interessanter Aspekt anzufügen: Rekombinante Arzneistoffe sind nicht immer exakte Kopien der natürlich vorkommenden Proteine. Bei einigen rekombinanten Proteinen, den sogenannten Muteinen, wurden durch gezielte Modifikation der Aminosäuresequenz, die Eigenschaften der Proteine verbessert. Meist zielt die Optimierung auf eine Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften ab. Ein Beispiel ist Humalog[®], hierbei handelt es sich um ein besonders schnell wirksames Insulinderivat. Dies wurde erreicht, indem die Reihenfolge der Aminosäuren an Position 28 und 29 in der B-Kette vertauscht werden. Anstelle Prolin–Lysin wurde die Abfolge in Lysin–Prolin abgeändert, daher auch die Bezeichnung Lispro. Diese Modifikation

verringert die Bildung von Insulin-Hexameren und führt dadurch zu einer wesentlich schnelleren Insulinwirkung.

Eine ähnliche Modifikation führte zu dem Mutein von Novo Nordisk (Insulin Aspartat). Hier wurde das für die Hexamerbildung wesentliche Prolin (B28) gegen Asparaginsäure ausgetauscht. Durch diesen Austausch entsteht so ebenfalls ein schnell freisetzendes Insulin.

Von der Firma Aventis wurde der genau gegensätzliche Effekt erzielt, bei Lantus[®]/Insuman[®] handelt es sich um ein dreifach modifiziertes, langsam freisetzendes Insulin.

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die derzeit am Markt verfügbaren rekombinanten Arzneistoffe, Handelsnamen, ihre Indikation, die Expressionssysteme mit denen sie gewonnen werden und die Hersteller.

| | Handels- name | Rekomb. Wirkstoff | Indikation | Expressions system | Hersteller |
|-----------------|---|------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| INSULINE | Berlinsulin [®] | Humaninsulin | Diabetes | E. coli | Berlin Chemie |
| | Huminsulin [®] | Humaninsulin | Diabetes | E. coli | Lilly |
| | Insulin Actrapid [®] | Humaninsulin | Diabetes | S. cerivisiae | Novo Nordisk |
| | Humalog [®] | Insulin lispro | Diabetes | E. coli | Lilly |
| | Lantus [®] , Insuman [®] | Insulin glargine | Diabetes | E. coli | Aventis |
| | NovoRapid [®] | Insulin aspartat | Diabetes | S. cerivisiae | Novo Nordisk |
| ZYTOKINE | Roferon [®] | Interferon -alfa- 2a | Hepatitis, div. Krebserkrankungen | E. coli | Roche |
| | Pegasys [®] | Peginterferon alfa-2a | Hepatitis, div. Krebserkrankungen | E. coli | Roche |
| | Intron A [®] | Interferon -alfa- 2b | Hepatitis, div. Krebserkrankungen | E. coli | Essex |
| | Peg-Intron [®] | Peginterferon alfa-2b | Hepatitis, div. Krebserkrankungen | E. coli | Essex |
| | Avonex [®] Rebif [®] | Interferon beta- 1a | schubhafte MS | CHO | Biogen |
| | Betaferon [®] | Interferon beta- 1b | sek. progrediente MS | E. coli | Schering |
| | Imukin [®] | Interferon gamma 1-b | chron. Granulomatose | E. coli | Boehringer Ingelheim |

| | Handelsname | Rekomb. Wirkstoff | Indikation | Expressions-system | Hersteller |
|--------------------|--|--------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| ZYTOKINE | Inferagen [®] | Interferon alfacon-1 | chron. Hepatitis C | E. coli | Amgen/ Yamanou. |
| | Proleukin [®] | Aldesleukin, IL2 | Metastas. Nierenzellkarzinom | E. coli | Chiron |
| | Leucoma [®] | Molgramostim | Stimmul. von Granul., Makroph. | E. coli | Novartis / Essex |
| | Neupogen [®] | Filgrastim | Stimulation von Granulocyten | E. coli | Amgen / Roche |
| | Granocyte [®] | Lenograstim | Stimulation von Granulocyten | CHO | Rhône-Poulenc |
| ANTI-ANÄMIKA | Erypo [®] | Epoetin alfa | Anämie | CHO | Janssen |
| | Neorecormon [®] | Epoetin beta | Anämie | CHO | Roche |
| | Aranesp [®] Ne spo [®] | Darbepoetin alfa | Anämie | CHO | Amgen/D. Biotec |
| HYPOPHYSEN-HORMONE | Gonal-F [®] | rh-FSH (alfa) | Vorbereitung einer ass. Konzeption | CHO | Serono |
| | Puregon [®] | rh-FSH (beta) | Vorbereitung einer ass. Konzeption | CHO-K1 | Organon |
| | Ovitrelle [®] | r-HCG | Induktion des Eisprungs | CHO | Serono |
| | Luveris [®] | r-hLH | Infert., Anwend. Komb. mit rh-FSH | S. cervisiae | Serono |
| | Genotropin [®] | Somatropin | Minderwuchs | E. coli | Pharmacia |

| | Handels- name | Rekomb. Wirkstoff | Indikation | Expressions system | Hersteller |
|-------------------------------|--------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| HYPO-PHYSEN HORMONE | Humatrope® | Somatropin | Minderwuchs | E. coli | Lilly |
| | Saizen® | Somatropin | Minderwuchs | Mäuse- zelllinie | Serono |
| | Norditropin® | Somatropin | Minderwuchs | E. coli | Novo Nordisk |
| | Zomacton® | Somatropin | Minderwuchs | E. coli | Ferring |
| BLUTGERINNUNGSFAKTOREN | Kogenate® | Faktor VIII | Faktor VIII Mangel, Hämophilie A | BHK | Bayer |
| | NexGen® | Faktor VIII | Faktor VIII Mangel, Hämophilie A | BHK | Bayer |
| | Rekombinante® | Faktor VIII | Faktor VIII Mangel, Hämophilie A | CHO | Baxter |
| | ReFacto® | mod. Faktor VIII (Morocto- cog alfa) | Faktor VIII Mangel, Hämophilie A | CHO | Genet. Instit. of Europe |
| | Bioclata® | Faktor VIII | Faktor VIII Mangel, Hämophilie A | CHO | Centeon |
| | BeneFIX® | Faktor IX (nonacog alfa) | Faktor IX-Mangel, Hämophilie B | CHO | Genet. Instit. of Europe |
| | Novoseven® | Faktor VII | Hämophilie A oder B | BHK | Novo Nordisk |

2-DE und MALDI-MS rekombinanter Arzneistoffe

| | Handels- name | Rekomb. Wirkstoff | Indikation | Expressions -system | Hersteller |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|---|--------------------------------|----------------------|
| FIBRINOLYTIKA ANTIKOAGULANTIEN | Actilyse® | Alteplase, tPA | akuter Herzinfarkt | CHO | Boehringer Ingel. |
| | Rapilysin® | Reteplase | akuter Herzinfarkt | E. coli | Boehringer Mannh. |
| | Metalyse® | Tenecte- plase | akuter Herzinfarkt | CHO | Genentech / Roche |
| | Refludan® | Lepirudin | Thrombose- prophylaxe | S. cerivisiae | Aventis |
| MONOKLONALE ANTIKÖRPER | Mabthera® | Rituximab | Follikuläres Lymphom | CHO | Roche / Genentech |
| | Mab- Campath® | Alemtuzum ab | Chron. lymph. Leukämie | CHO | ILEX Pharmaceu. |
| | Herceptin® | Trastu- zumab | Brustkrebs | CHO | Genentech / Roche |
| | ReoPro® | Abciximab | Thromboseproph. bei Angina pect. | Hybridomzel len | Centocor Europe |
| | Simulect® | Basilix- imab | Zur Immunsupp. nach Nierentranspl. | Myelomzelle n | Novartis |
| | Zenapax® | Dacli- zumab | Zur Immunsupp. nach Nierentranspl. | Maus- Myelom | Roche |
| | Orthoclone® | Muron- omab CD3 | Immunsupp. Herz-, Nieren- und Lebertranspl. | Hybridomzel len | Ortho Biotech |

| | Handelsname | Rekomb. Wirkstoff | Indikation | Expressions-system | Hersteller |
|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Monoklonale Antik. | Remicade® | Infliximab | Morbus Crohn | Maus-Myelom | Centocor |
| | Synagis® | Palivizumab | Respiratorisches Syncytialvirus | Mauszelllinie | Abbott |
| SONSTIGE | Pulmocyme® | Dornase alfa, DNase | Cystische Fibrose | CHO | Roche |
| | Cerezyme® | Imiglucerase | Morbus Gaucher | CHO | Genezyme |
| | Fabrazyme® | Galactosidase | Fabry disease | CHO | Genezyme |
| | Forcaltonin® | Calcitonin (salmon) | Osteopor., Morb. Paget, Hyper-calc. | E. coli + Enzym | Unigene |
| | GlucaGen® | Glucagon | Hypoglycämie | E. coli | Novo Nordisk |
| | Beromun® | TNF alpha-1a | nicht resezierbare Weichteilsarkome | E. coli | Boehringer Ingelh. |
| | Enbrel® | TNFreceptor2-IgG1 | rheumatoide Arthritis | CHO | Immunex |

Qualitätssicherung und Analytik rekombinanter Arzneistoffe

1-DE und 2-DE Analytik von Interferon

Interferon alfa 2a (Roferon®)

Substanzcharakteristika:

Das natürliche Interferon alpha-2a besteht aus 165 Aminosäuren. Der theoretische *pI* liegt bei 5,99, das Molekulargewicht des Proteins ohne posttranslationale Modifikationen beträgt 19.241,11 Da. Die Interferone alpha-2a, -2b und -2c unterscheiden sich in maximal 2 Aminosäuren (Position 23 und 34) und haben jeweils ein O-Glycosid an Position 106. Es gibt je 2 Disulfidbrücken. Das rekombinante Interferon alfa-2a verfügt aus klonierungstechnischen Gründen über ein zusätzliches N-terminales Methionin, es wird in *E. coli* exprimiert und ist demnach nicht glycosyliert.

Aminosäuresequenz:

```
M  CDLPQTHSLG  SRRTLMLLAQ  MRKISLFSLC  KDRHDFGFPQ
EEFGNQFQKA   ETIPVLHEMI   QQIFNLFSTK   DSSAAWDETL
LDKFYTELYQ   QLNDLEACVI   QGVGVTETPL   MKEDSILAVR
KYFQRITLYL  KEKKYSPCAW  EVVRAEIMRS  FSLSTNLQES  LRSKE
(Swissprot. Nr. P01563, MW 19372,3 Da, pI 5,97)
```

Physiologische Wirkung:

Alpha-Interferone interferieren mit der Virusreplikation und versetzen Zellen in einen „antiviralen Zustand“. Dieser Effekt weist eine hohe Spezies-Spezifität auf, sprich humane Alpha-Interferone zeigen in anderen Organismen nur geringe Wirkung. Zusätzlich haben Alpha-Interferone eine immunstimulierende Wirkung.

Indikation als Arzneistoff:

Behandlung chronischer Hepatitiden (Hepatitis B und Hepatitis C)

Behandlung des Kaposi-Sarkoms bei AIDS Patienten

Behandlung von Haarzelleukämie

Behandlung von Philadelphia Chromosom positiver chronisch myeloischer Leukämie

Behandlung des cutanen T-Zell-Lymphoms

Behandlung eines fortgeschrittenen Non-Hodgkin-Lymphoms

Kommentar:

Die Glycosylierung ist für die *in vivo* Aktivität des Proteins nicht erforderlich, daher ist es möglich Interferon alfa-2a in einem prokaryontischen Expressionssystem (E.Coli) herzustellen^{122,143}.

Interferon alpha 2b (Intron A[®])

Substanzcharakteristika:

Interferon alpha-2b unterscheidet sich vom Interferon alpha-2a lediglich durch den Austausch von Lysin an Position 23 gegen Arginin. Diese Stelle im Protein ist nicht an der Rezeptorbindung beteiligt, so dass ein Aminosäureaustausch toleriert wird. Das rekombinante Interferon alfa-2b verfügt ebenfalls über ein zusätzliches N-terminales Methionin. Es wird in *E. coli* exprimiert und ist demnach nicht glycosyliert.

Aminosäuresequenz:

```
M  CDLPQTHSLG  SRRTLMLLAQ  MRRISLFSCL  KDRHDFGFPQ
EEFGNQFQKA   ETIPVLHEMI   QQIFNLFSTK   DSSAAWDETL
LDKFYTELYQ   QLNDLEACVI   QGVGVTETPL   MKEDSILAVR
KYFQRITLYL  KEKKYSPCAW  EVVRAEIMRS  FSLSTNLQES  LRSKE
```

(Swissprot Nr. P01563, MW 19400,32 Da, pI 5,97)

Physiologische Wirkung:

Die physiologische Wirkung ist ähnlich der des Interferon alpha-2a (s.o.).

Indikation:

Behandlung chronischer Hepatitis B

Zur kurzfristigen Behandlung chronischer Hepatitis C

Behandlung des Kaposi-Sarkoms bei AIDS Patienten

Behandlung von Haarzelleukämie

Zur remissionserhaltenden Therapie spezieller Non-Hodgkin-Lymphome

Kommentar:

Sowohl für Interferon alfa-2b als auch für alfa-2a gibt es pegylierte Derivate. Ein 12 kDa Polyethylenglycol wird über die freie epsilon-Aminogruppe eines Lysins kovalent an das Interferon geknüpft. Dies bewirkt zum Einen eine

verlängerte Halbwertszeit und verringert zum Anderen die Immunogenität des Interferons. Die biologische Aktivität bleibt weitestgehend unverändert.

Intron[®] unterscheidet sich in der Formulierung des Arzneistoffs von Roferon[®]. Roferon[®] liegt als Lösung vor, Intron[®] als Trockensubstanz, die mit Humanalbumin stabilisiert wird^{122,143}.

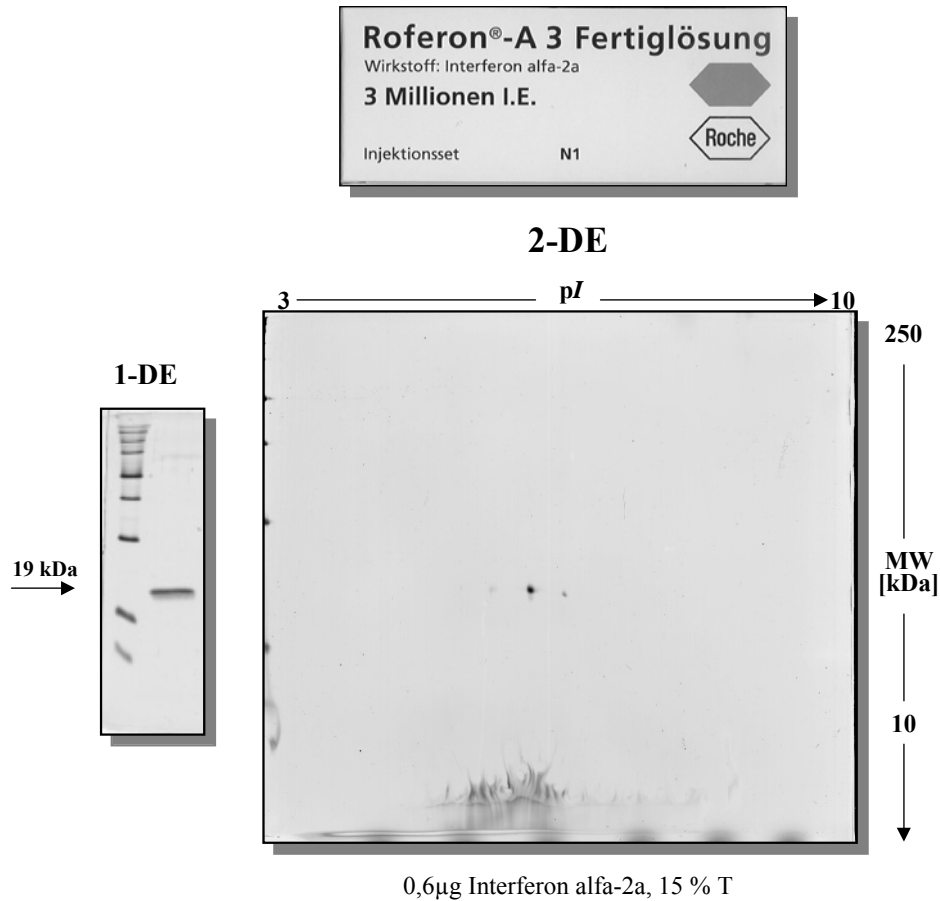


Abb. R-1: Ausschnitt aus 1-DE Minigel WS-180 und Gel WS-183

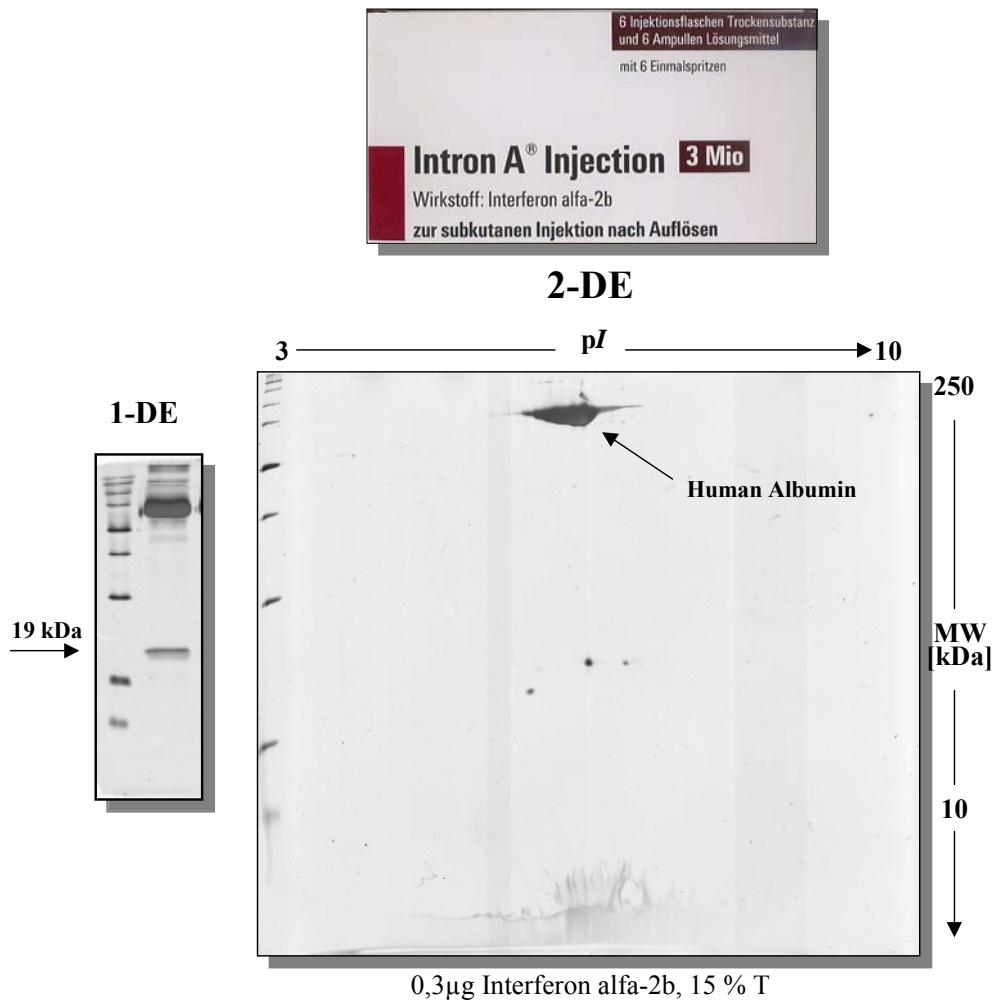


Abb. R-2: Ausschnitt aus 1-DE Minigel WS-180, Gel WS-182

Sowohl beim Roferon als auch beim Intron sieht man auf den 1-DE Gelausschnitten eine scharfe Bande und etwas darunter einen schwachen Schatten. Abbildung R-2 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt eines 1-DE Gels. Der Vergleich von Roferon (R) und Intron (I) zeigt, dass der Schatten beim Intron etwas stärker ausgeprägt ist.

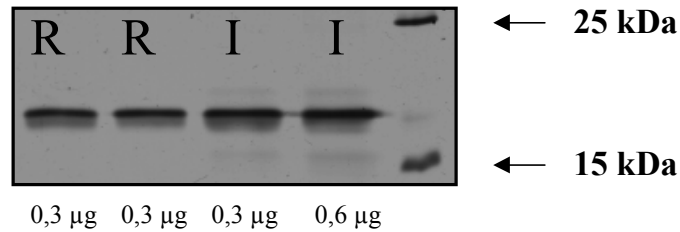


Abb. R-3: Ausschnitt eines 1-DE Minigels (15 % T, Silberfärbung nach Blum¹²¹)

Aufgrund der Abwesenheit posttranslationaler Modifikationen erwartet man sowohl beim Intron als auch beim Roferon Arzneimittel, welche lediglich ein definiertes Protein enthalten. Dass dem nicht so ist, belegt die 1996 erschienene Veröffentlichung von Bausch et al.¹⁴⁵, darin wird die Isolierung und Charakterisierung einer Monomethioninsulfoxid Variante des Interferon alfa-2b beschrieben. Auch wenn es hierdurch zu einer leichten Konformationsänderung einer ursprünglich alphahelikalen Struktur hin zu einer Faltblattstruktur kommt, wird die biologische Aktivität nicht weiter beeinflusst. Auf der 2002 in Berlin abgehaltenen EUFEPS Tagung (Optimising Biotech Medicines: Rational Development of Therapeutic Proteins) wurde die Thematik der Nebenkomponenten rekombinanter Arzneistoffe am Beispiel des Interferon alfa-2b von James Bausch diskutiert. Mittlerweile sind weitere Nebenkomponenten bekannt, beispielsweise Deamidierungsprodukte. Der Vortrag behandelte die Frage: Wie man in Zukunft die Bioäquivalenz rekombinanter Generika zeigen kann? Trotz der Verfügbarkeit analytischer Verfahren wie NMR, MS, CD-Spektroskopie kann man nicht mit letzter Konsequenz sagen, ob ein Makromolekül, wie beispielsweise generisches Interferon alfa-2b, bis zur tertiär Struktur mit dem Original Interferon alfa 2b ident ist. Tenor des Vortrags war, und dies deckt sich mit der derzeitigen Meinung der Zulassungsbehörden, dass man für die Zulassung von Biogenerika vollständige klinische Studien benötigt.

Was in der 1-DE als Schatten angedeutet wird und in der 2-DE jeweils mindestens 3 Spots ergibt, ist demnach nicht auf eine Unzulänglichkeit der Methode zurückzuführen, vielmehr werden hier neben dem Interferon alfa 2, Nebenkomponenten aufgetrennt.

Der strukturelle Unterschied zwischen Interferon alfa 2a und -2b ist marginal, die isoelektrischen Punkte sind identisch und das Molekulargewicht differiert um lediglich 28,02 Da. Molekulargewichtsunterschiede dieser Größenordnung lassen sich mittels standard SDS-PAGE nicht voneinander trennen. Abbildung R-4 zeigt den Ausschnitt eines 2-DE-Gels, auf dem eine Mischung aus 0,6 µg Interferon alfa 2a und 0,6 µg Interferon alfa 2b getrennt wurden. Vergleicht man das Spotmuster mit den oben gezeigten 2-DE-Gelen, auf denen jeweils nur ein Arzneistoff getrennt wurde, erkennt man, dass die auf der Abbildung R-4 mit 1 und 2 gekennzeichneten Spots aus der Überlagerung von INF alfa 2a und INF alfa 2b resultieren, Spot 3 ist nur INF alfa 2a und Spot 4 nur INF alfa 2b zuzuordnen.

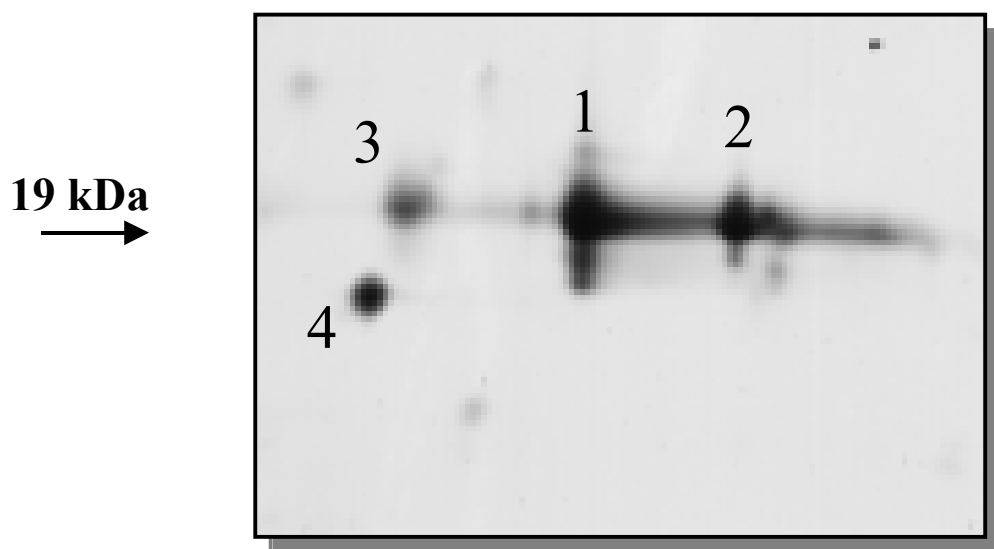


Abb. R-4: Ausschnitt eines 2-DE-Gels (WS-186), Mischprobe INF alfa 2a und -2b

Tryptischer Verdau und MALDI-MS von Interferon alfa 2

Der Spot 1 (Abb. R-4) des silbergefärbten 2-DE-Gels WS-186 wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Trypsin (P00760) verdaut. Die Peptidfragmente wurden mit einem Kratos Kompaq seg TOF-MS vermessen. Als Matrix wurde α -cyano Zimtsäure verwendet. 100 Einzelschüsse wurden aufsummiert, die Laserenergie betrug 90, die Beschleunigungsspannung 20 kV und die Messung erfolgte im Reflectron Modus. Das Gerät war zuvor mit einer Mischung aus Bradykinin, Angiotensin und Insulin B kalibriert worden.

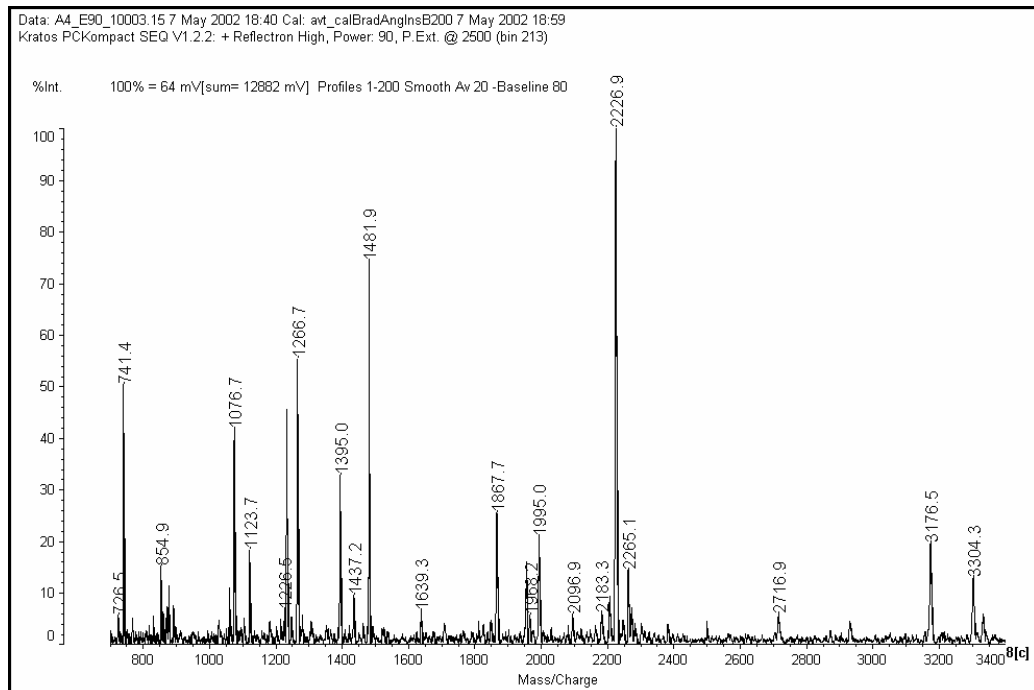


Abb. R-5 : MALDI-MS eines tryptischen Verdau von Interferon alfa 2

Um die so erhaltenen Peptidmassen vergleichen zu können wurden mittels des Peptid Mass Tools (www.expasy.ch) die möglichen Fragmente von Interferon alfa 2a und 2b berechnet. Es wurden nur Peptidfragmente mit einer Masse > 500 Da berücksichtigt, die Anzahl der ausgelassenen Schnittstellen (MC = miss cleavages) wurde auf 2 begrenzt. Die aufgrund der Probenaufarbeitung zu

erwartenden carbamidomethyl Derivatisierung der Cysteine (Cys_CAM) wurde berücksichtigt. Desweiteren wurde auch die Möglichkeit einer Oxidation von Methioninen berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte unter der Annahme, dass die Peptide als einfach protonierte Kationen $[M+H]^+$ vorliegen mit den aus der Isotopenverteilung ableitbaren mittleren Molekülmassen.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der Ergebnisse wieder. Neben den gemessenen Massen sind die berechnete Masse, der Abschnitt der Aminosäuresequenz, die Anzahl der ausgelassenen Schnittstellen (MC) sowie etwaige Modifikationen der Peptide wiedergegeben.

| Masse | Masse berechnet | Sequenz | MC | Modifikationen |
|--------|-----------------|-------------------|----|----------------|
| 3332,8 | 3331,78 | 136-163 | 2 | Cys_CAM 139 |
| 3304,3 | 3304,80 | 85-113 | 0 | - |
| 3176,5 | 3176,53 | 25-50 | 2 | Cys_CAM 30 |
| 2716,9 | 2717,26 | 1-23 | 2 | Cys_CAM 2 |
| 2226,9 | 2227,36 | 33-50 | 1 | - |
| 1995,0 | 1996,35 | 135-150 | 2 | Cys_CAM 139 |
| 1956,0 | 1956,08 | 35-50 | 0 | - |
| 1867,7 | 1868,18 | 136-150 | 1 | Cys_CAM |
| 1481,9 | 1482,63 | 151-163 | 0 | - |
| 1395,0 | 1395,66 | 24-34 INF alfa 2b | 2 | Cys_CAM 30 |
| 1395,0 | 1395,62 | 135-145 | 1 | Cys_CAM 139 |
| 1266,7 | 1267,44 | 136-145 | 0 | Cys_CAM 139 |
| 1232,9 | 1233,58 | 14-23 | 1 | - |
| 1123,7 | 1124,39 | 24-32 INF alfa 2b | 1 | Cys_CAM 30 |
| 1076,7 | 1077,39 | 15-23 | 0 | - |
| 741,4 | 741,86 | 122-126 | 1 | - |

Tab. R-1: Gefundene Massen und die korrespondierenden Fragmente eines theoretischen Verdaus.

Es wurden nur Massen berücksichtigt, die sich signifikant vom Grundrauschen abheben (Signal zu Rausch Verhältnis > 3). Die erzielte Sequenzabdeckung (Sequence coverage) beträgt 68 %. Die folgenden Sequenzabschnitte konnten durch Zuordnung der Massen nicht identifiziert werden: 51-84, 114-121, 127-134, 164-166. Eine Differenzierung zwischen 2a und 2b Fragmenten ist nur dann möglich, wenn mindestens eine MC vorliegt. Da sich 2a und 2b im Austausch von Lysin gegen Arginin unterscheiden und die davorliegende Aminosäure Arginin ist, wird beim vollständigen Verdau die AS 24 in jedem Fall herausgeschnitten.

Rekombinantes humanes Follikel-stimulierendes Hormon (rh-FSH Gonal F[®])

Substanzcharakteristika:

FSH ist ein Heterodimer, bestehend aus einer alpha und einer beta Unter-einheit. Die beiden Ketten sind nicht kovalent miteinander verknüpft.

Die FSH alpha-Kette besteht aus 92 Aminosäuren, der theoretische pI liegt bei 8.38, das Molekulargewicht des Proteins ohne posttranslationale Modifikationen beträgt 10.205,74 Da. Das fertig prozessierte Protein enthält drei Kohlenhydratseitenketten, davon ein O-Glycosid an Position 39 und zwei N-Glycoside an den Positionen 52 und 78. Das Protein weist 5 Disulfidbrücken auf.

Aminosäuresequenz:

APDVQDCPEC TLQENPFFSQ PGAPILQCMG CCFSRAYPTP
LRSKKTMLVQ KNVTSESTCCV AKSYNRVTVM GGFKVENHTA
CHCSTCYH KS (P01215)

Die FSH beta-Kette besteht aus 111 Aminosäuren, der theoretische pI liegt bei 5.91, das Molekulargewicht des Proteins ohne posttranslationale Modifik-

ationen beträgt 12485,18 Da. Es enthält zwei N-Glycoside an den Positionen 7 und 24. Das Protein weist 6 Disulfidbrücken auf.

Aminosäuresequenz:

NSCELTNITI AIEKEECRFC ISINTTWCAG YCYTRDLVYK
DPAKPKIQKT CTFKELVYET VRVPGCAHHA DSLYTYPVAT
QCHCGKCDS DSTDCTVRGLG PSYCSFGEMK E (P01225)

Physiologische Wirkung:

FSH wird von den endokrinen Zellen des Hypophysen-Vorderlappens gebildet und ins Blut sezerniert. Bei der Frau stimuliert FSH die Follikelreifung und die Oestrogen-Biosynthese. Beim Mann wird die Spermatogenese angeregt.

Indikation:

Rekombinantes FSH wird in der Reproduktionsmedizin verwendet:

- zur kontrollierten ovariellen Überstimulation bei hypo- oder normogonadotropischer Infertilität
- zur Induktion multipler Follikel für die künstliche Befruchtung
- bei Anovulation
- zur Spermienbildung bei Männern mit zentralem Hypogonadismus

Kommentar:

Die alpha-Kette des FSH ist auch Bestandteil anderer Sexual-Hormone (LH, hCG), die beta-Kette ist jedoch spezifisch für FSH. Die Kohlenhydratseitenketten sind für die Wirksamkeit des Proteins essentiell, daher wird rh-FSH in CHO-Zellen exprimiert. Es gibt zwei Produzenten für rekombinantes FSH (Serono (Gonal F[®], Follitropin alfa) und Organon (Puregon[®], Follitropin beta))^{122,143}.

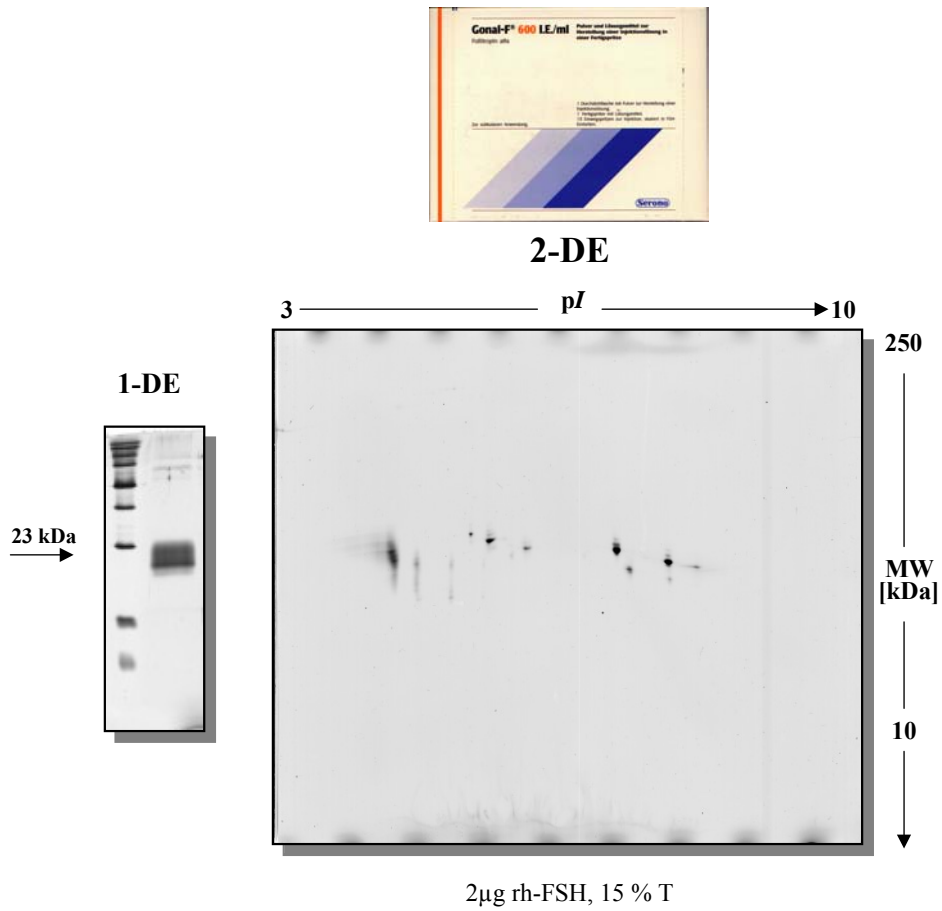


Abb. R-5: Vergleich der 1-DE und 2-DE Auftrennung von rh-FSH (Gonal F[®])

Verglichen mit den Interferonen zeigt sich beim rekombinanten FSH ein deutlich komplexeres 2-DE Image. Die im 1-DE sehr unscharfe Bande kann in der 2-DE Auftrennung weitestgehend aufgelöst werden. Ein guter Beleg für die Möglichkeit mittels 2-DE komplexe Proteinmuster aufzulösen.

Erythropoietin

Substanzcharakteristika:

Humanes Erythropoietin (rh-EPO, Swissprot P01588) besteht aus 166 Aminosäuren, der theoretische pI liegt bei 8.75, das Molekulargewicht des Proteins ohne posttranslationale Modifikationen beträgt 18.396,14 Da. Es gibt vier Kohlenhydratseitenketten, davon ein O-Glycosid an Position 126 und drei N-Glycoside an den Positionen 24, 38 und 83. Das Protein weist 2 Disulfidbrücken auf (29-33 und 7-161).

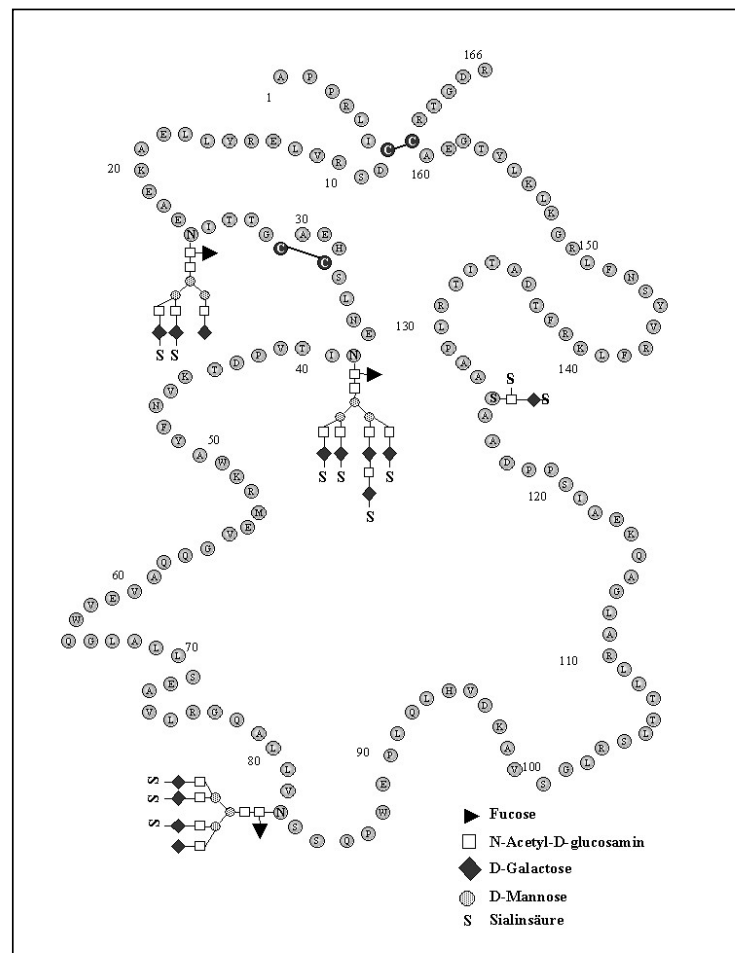


Abb. R-6: Schematische Darstellung von rh-EPO

Physiologische Wirkung:

Erythropoietin wird hauptsächlich in der Niere gebildet und stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Erythrozyten aus erythroiden Vorläuferzellen¹³². Hierdurch werden die aufgrund von Alterungsprozessen absterbenden roten Blutkörperchen kontinuierlich ersetzt. Wesentliche Indikationen sind schwere Formen der Anämie, wie sie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (insbesondere Dialysepatienten) und bedingt durch Chemotherapie bei Krebspatienten vorkommt.

Die Glycosylierung des EPO's ist essentiell für die *in vivo* Aktivität des Proteins. Insbesondere die terminalen Sialinsäuren, welche für die Acidität des Glycoproteins verantwortlich sind, haben sich als wesentlich erwiesen. Spaltet man die Sialinsäuren mittels Neuraminidase ab, so wird das Asialo-Erythropoietin *in vivo* sehr rasch hepatisch eliminiert¹³². Daher muss rh-EPO in einem System exprimiert werden, das in der Lage ist posttranslationale Modifikationen einzufügen. Neben dem von Roche produzierten Neorecormon[®] gibt es eine Reihe weiterer rh-EPO Zubereitungen (Epogen[®], Epogin[®], Epomax[®], Eprex[®], Procrit[®]). Im Allgemeinen werden CHO-Zellen als Expressionssystem verwendet¹⁴⁶.

Die Struktur der Zuckerketten ist nicht einheitlich und führt zur charakteristischen Mikroheterogenität des Erythropoietins, das in Abbildung R-6 schematisch gezeigte Erythropoietin stellt nur eine mögliche Variante der Glycosylierung dar. Die Zuckerketten des rekombinant gewonnenen Proteins stimmen weitestgehend mit denen des nativen rh-EPO's überein¹⁴⁷. Ein nicht unbeträchtlicher Anteil der rh-EPO Weltjahresproduktion wird mißbräuchlich zu Doping-Zwecken verwendet¹⁴⁸. Lassne et al. konnten mittels IEF in den Urinproben zweier Tour de France Teilnehmer von 1998 für rh-EPO typische Banden nachweisen¹⁴⁹.

Die Firma Amgen hat im Juni 2001 die Zulassung für ein modifiziertes rekombinantes Erythropoietin mit einer veränderten Aminosäuresequenz und

einem zusätzlichen N-Glycosid erhalten (Aranesp[®]), durch diese zusätzliche Glycosylierung verlängert sich die Halbwertszeit.

Analytik von Erythropoietin

In der Monographie des Europäischen Arzneibuchs¹⁵⁰ mit dem Titel „konzentrierte Erythropoietin-Lösung“ werden zur Prüfung auf Identität, Reinheit und Wirksamkeit / Gehalt die folgenden Methoden angewendet:

Identität:

Die Bestimmung der Wirksamkeit dient gleichzeitig als Prüfung auf Identität.

Mittels Kapillarelektrophorese (nach Ph. Eur. 2.2.47) wird die zu untersuchende Probe mit einem Erythropoietin BRS (biological reference standard) verglichen. Mit dieser Methode lassen sich bis zu acht verschiedenen Isoformen des Erythropoietins differenzieren. Die Isoformen treten in unterschiedlicher relativer Häufigkeit auf, für Prozentgehalte gelten die folgenden Grenzwerte: Isoform_1 0-15 %, Isoform_2 0-15 %, Isoform_3 5-20 %, Isoform_4 10-35 %, Isoform_5 15-40 %, Isoform_6 10-35 %, Isoform_7 0-20 %, Isoform_8 0-15 %.

Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblotting:

Die SDS-PAGE (nach Ph. Eur 2.2.31) wird mit 12 %T Gelen von 16 cm Seitenlänge und 0,75 mm Dicke durchgeführt, wiederum unter Verwendung eines Erythropoietin BRS sowie geeigneter Molekulargewichtstandards. Die Anfärbung des SDS-Gels erfolgt mittels Coomassie. Als Ergebnis erhält man eine einzelne diffuse Bande, die in Bezug auf Lage und Intensität der Referenzbande entspricht.

Für den Western blot können monoklonale oder polyklonale Antikörper verwendet werden, die Detektion kann radioaktiv oder durch eine enzymatische Reaktion erfolgen. Das Elektropherogramm der Untersuchungslösung soll, ebenso wie das der Referenzprobe, eine einzelne, breite Bande zeigen.

Peptidmustercharakterisierung:

Untersuchungs- und Referenzlösung werden mittels Trypsin hydrolysiert. Die so erhaltenen Peptidfragmente werden mit Hilfe der Flüssigchromatographie (Ph. Eur. 2.2.29) getrennt und verglichen. Die Detektion erfolgt spektralphotometrisch bei 214 nm.

N-terminale Sequenzanalyse:

Der Edman-Abbau wird unter Verwendung eines Gerätes zur automatischen Festphasen-Sequenzierung durchgeführt, dabei werden die ersten 15 Aminosäuren des Erythropoietins bestimmt.

Reinheit

Die Proteinkonzentration wird spektralphotometrisch nach Ph. Eur. 2.5.33, Methode I bestimmt. Als Ergebnis werden 80-120 % der angegebenen Konzentration akzeptiert.

Die Prüfung auf Dimere und verwandte Substanzen mit größerer relativer Molekülmasse erfolgt durch Größenausschlußchromatographie nach Ph. Eur. 2.2.30. In der Untersuchungslösung dürfen höchstens 2 % der Peakfläche mit einer Molekülmasse größer der des Erythropoietin-Peaks vorliegen.

Der Sialinsäuregehalt der Untersuchungslösung wird bestimmt. Hierbei müssen mindestens 10 Mol Sialinsäure pro Mol Erythropoietin vorliegen. Als Referenz dient eine *N*-Acetylneuraminsäurelösung.

Prüfung auf Bakterien-Endotoxine nach Ph. Eur. 2.6.14: Weniger als 20 I.E. / 100.000 I.E. Erythropoietin.

Gehalt / Wirksamkeit

Die Bestimmung der Wirksamkeit erfolgt im Tierversuch (A oder B). Die Angabe der Wirksamkeit erfolgt unter Bezugnahme auf den Erythropoietin BRS in Internationalen Einheiten (I.E.).

- In polyzythämischen Mäusen

Die Polyzythämie wird durch Haltung der Mäuse in einer Umgebung mit reduziertem atmosphärischem Druck induziert. Es wird die Fähigkeit der Untersuchungslösung zur Stimulation des Einbaus von radioaktivem $^{59}\text{Fe}(\text{III})$ im Vergleich zu einem Erythropoietin BRS bestimmt.

- In normozythämischen Mäusen

Hierbei wird die Fähigkeit der Untersuchungslösung zur Stimulation der Retikulozytenproduktion bestimmt, wiederum im Vergleich zu einem Erythropoietin BRS.

Die Erythropoietin Monographie wurde mit dem Nachtrag 1999 ins Europäische Arzneibuch aufgenommen und bis zum Erscheinen der 4. Auflage 2002 unverändert beibehalten. Die Kapillarelektrophorese als Identitätsprüfung (s.o.) wurde erst mit der 4. Auflage eingeführt und ersetzt die in der ursprünglichen Fassung beschriebene isoelektrische Fokussierung.

Im Europäischen Arzneibuch steht, dass mit Zustimmung der zuständigen Behörde alternative Analysenmethoden zu Kontrollzwecken eingesetzt werden können, wenn diese sicherstellen, dass eindeutig entschieden werden kann, ob die Substanz den Anforderungen des Arzneibuchs entsprechen würde, wenn die offiziellen Methoden angewendet würden (Ph. Eur. 4. Ausgabe, Grundwerk S.3).

Ausgangspunkt für eine detaillierte Auseinandersetzung mit der Analytik des Erythropoietins mittels 2-DE war die ursprüngliche Monographie des Europäischen Arzneibuchs (Nachtrag 1999), in der SDS-PAGE und IEF zur Identitätsbestimmung des Erythropoietins beschrieben wird. Die Kombination von IEF und SDS-PAGE bringt hinsichtlich der Auflösung eine deutliche Synergie. Die aus den unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen des Erythropoietins resultierende Mikroheterogenität lässt sich analytisch nur schwer abbilden. Es war zu klären, ob sich 2-DE eignet diese komplexe Mikroheterogenität abzubilden und somit eine alternative Methode zu den in der Arzneibuch Monographie beschriebenen Methoden darstellt. Darüber

hinaus sollte mittels tryptischem Verdau und MALDI-MS strukturelle Information zum Erythropoietin gewonnen werden. Die MALDI-MS Daten können für einen Identitätsnachweis herangezogen werden als alternative Methode zum im EuAB beschriebenen Immunoblotting, der HPLC Analyse nach tryptischem Verdau und der Edmansequenzierung.

Die ersten Versuche zur 2-DE von Erythropoietin

Die Erythropoietin-Plasmaspiegel liegen beim Gesunden etwa bei 0,01-0,03 I.E./ml¹⁴³. Demnach beträgt die Gesamtmenge an Erythropoietin bei einem Körpergewicht von 75 kg etwa 30-100 I.E. (Blutvolumen = 1/12 des Körpergewichts, davon etwa 55 % Plasma)¹⁵¹.

Das für die 2-DE Analytik verwendete Neorecormon[®] enthält 10.000 I.E. / 600µl, dies entspricht 17 I.E. Erythropoietin / µl. In der Fachinformation der Fa. Roche zu Neorecormon[®] wird eine Proteinmasse von 83 µg / 10.000 I.E. angegeben.

Bei den ersten 2-DE Versuchen mit Neorecormon[®] wurden 34 I.E und 170 I.E. Erythropoietin auf je einem 18 cm 3-10NL IPG-Strip aufgetragen, fokussiert und nach der 2. Dimension (10-15 % T) wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Obwohl die aufgetragene Menge an Erythropoietin im Bereich der insgesamt im menschlichen Körper vorkommenden Menge liegt, waren auf keinem der Gele Proteine sichtbar. Es gibt verschiedene Erklärungen dafür, mitunter lassen sich Proteine nur schlecht mittels Silber anfärben, sie könnten während der 2-DE Prozessierung an Oberflächen adsorbieren oder unter den gewählten Bedingungen präzipitieren. Die aufgetragene Menge könnte zu gering sein, insbesondere da nicht bekannt ist, wie heterogen die Mischung aufgrund der posttranslationalen Modifikationen wirklich ist. Bei den ersten Versuchen wurde das Neorecormon[®] ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt, Hilfsstoffe der Zubereitung könnten ebenfalls die 2-DE stören.

Um zu ermitteln welche Mengen erforderlich sind damit rh-EPO mittels Silberfärbung nachgewiesen werden kann, wurde eine Verdünnungsreihe

hergestellt. Auf dem 1-DE Minigel WS-197, 15 % T, SDS-PAGE nach Lämmli¹⁵², Silberfärbung nach Blum¹²¹, wurden 2 x 8,5 I.E., 2 x 17 I.E., 2 x 34 I.E. und 2 x 70 I.E. aufgetragen. Das Gel ist in Abbildung R-7 abgebildet, bei Auftragemengen ab 17 I.E erkennt man eine deutliche Bande bei 37 kDa (Molekulargewichtstandard Biorad Precision).

Für die folgenden 2-DE Experimente wurde Neorecormon[®] mittels des Pierce Slide-A-Lyzer[®] Systems dialysiert, um eventuell störende Hilfsstoffe abzutrennen und die aufgetragene Menge wurde auf 850 I.E (50µl) erhöht (Gel WS-203). Abbildung R-7 zeigt einen Vergleich zwischen 1-DE und 2-DE von rh-EPO.

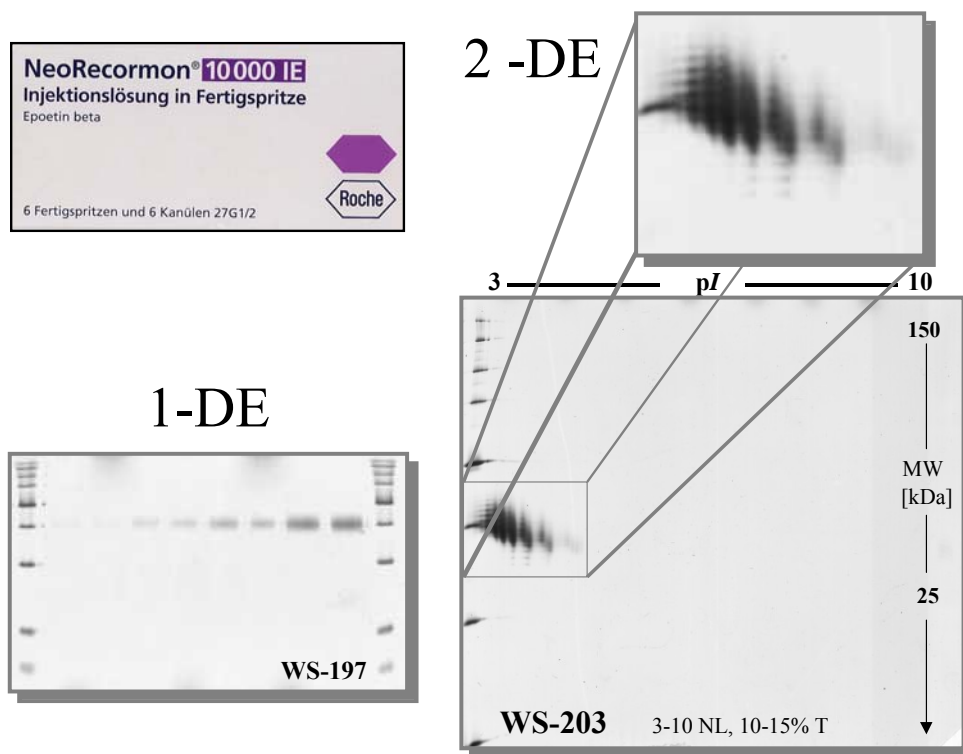


Abb. R-7: Vergleich 1-DE / 2-DE von rh-EPO

Auf dem 1-DE Gel erkennt man unscharf erscheinende Banden. Der Vergleich mit dem 2-DE-Gel zeigt deutlich, dass sich diese Unschärfe auflösen lässt. Im

2-DE-Gel erhält man im Bereich von pI 3,5-4,5 mehrere Spot-Reihen (etwa 8), die apparenten Molekulargewichte liegen zwischen 32 und 45 kDa, insgesamt können mehr als 40 Spots zugeordnet werden.

Die Glycosylierungen des rh-EPO's führen demnach zu einer signifikanten Verschiebung von Molekulargewicht und pI , die Verschiebung in den sehr sauren pI -Bereich resultieren aus den terminalen Sialinsäuren. Der durchschnittliche Sialinsäuregehalt des Neorecormons[®] liegt bei 13 mol Sialinsäure / mol rh-EPO¹⁵³. Die N-Glycoside sind Mischungen aus bi-, tri- und tetra-antennenen Zuckerketten mit unterschiedlicher Anzahl an N-acetyllactosaminyl-Wiederholungen¹³². Die in der 2-DE abbildbare Mikroheterogenität ist demnach sehr wahrscheinlich als Kombination aus unterschiedlichen pI -Werten aufgrund der variablen Anzahl an Sialinsäuren und durch die unterschiedlichen Molekulargewichte der Zuckerketten erklärbar. Der sichtbare Trend, dass die Molekulargewichte zu saureren pI -Werten hin zunehmen, spricht ebenfalls dafür.

Optimierungsversuche

Die in der folgenden Abbildung gezeigten Gelausschnitte zeigen exemplarisch die Bemühungen die 2-DE Auftrennung von rh-EPO zu optimieren. Dazu wurden unterschiedliche IPG-Strips 3-10 linear im Gegensatz zu den oben verwendeten nicht linearen Streifen verwendet, es wurden auch Versuche mit pI 4-7 IPG-Strips gemacht. Zudem wurde die Acrylamidkonzentration in der 2. Dimension variiert und ebenso die aufgetragene Menge an rh-EPO. Keine der Modifikationen führte zu einer signifikanten Verbesserung im Vergleich zu dem oben gezeigten und mit den Standardparametern angefertigte 2-DE-Gel.

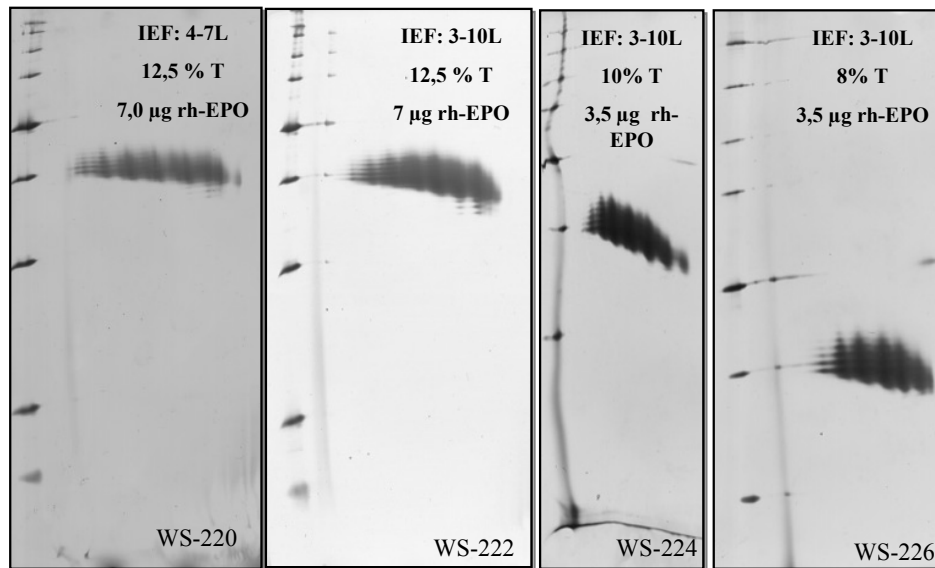


Abb. R-8: Methodenentwicklung, Optimierung der Acrylamidkonzentration.

Deglycosylierung von rh-EPO

Durch gezielte Deglycosylierung des rh-EPO's sollte die Auswirkung der posttranslationalen Modifikationen auf die Mikroheterogenität und das Verhalten der Proteinmischung im 2-DE-Gel untersucht werden. Durch enzymatische Umsetzung lassen sich Sialinsäuren, N- und O-Glycoside gezielt abspalten. In Abbildung R-9 sind die verwendeten Enzyme sowie die Organismen, aus denen diese gewonnen werden, beschrieben, die Versuchsbedingungen zum enzymatischen Abbau der Zucker finden sich im Experimentellen Teil dieser Arbeit.

Rh-EPO wurde mit unterschiedlichen Kombinationen dieser Enzyme behandelt, im Anschluß daran wurden jeweils 2-DE-Gele der deglycosylierten Proben angefertigt.

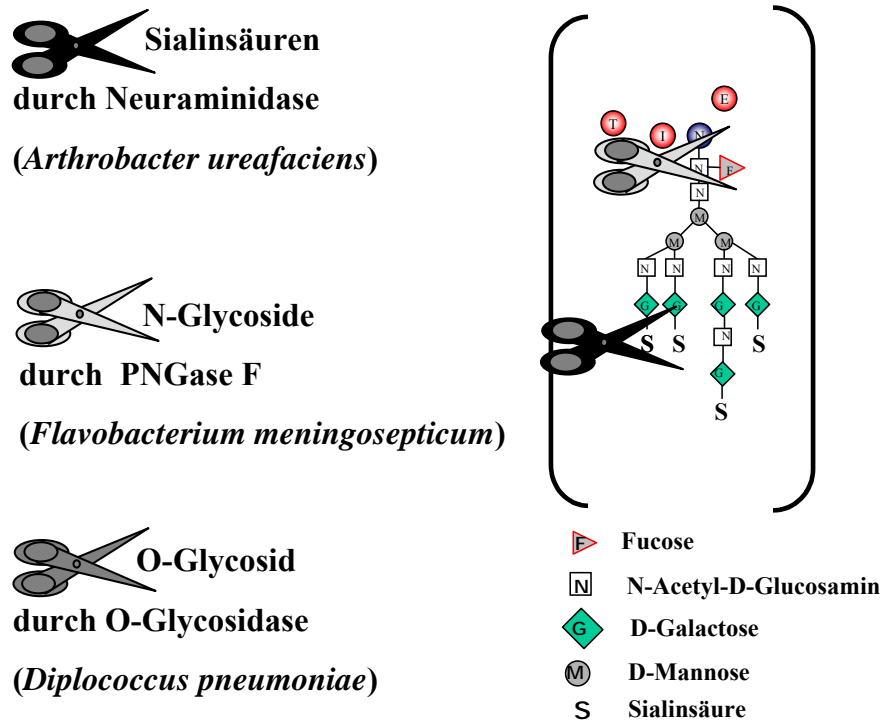


Abb. R-9: Enzyme zum gezielten Abbau von Glycosiden

Die Ergebnisse der Deglycosylierungsversuche werden in der folgenden Abbildung (R-10) gezeigt. Gel A (WS-203) zeigt nochmals das unbehandelte EPO zum Vergleich, auf Gel B (WS-204) wurde 850 I.E. asialo rh-EPO, auf Gel C (WS-210) 850 I.E. asialo und O-deglycosyliertes rh-EPO, auf Gel D (WS-211) 850 I.E. N-deglycosyliertes rh-EPO, auf Gel E (WS-214) 210 I.E. asialo und N-deglycosyliertes rh-EPO und auf Gel F (WS-215) 110 I.E. komplett deglycosyliertes rh-EPO aufgetragen.

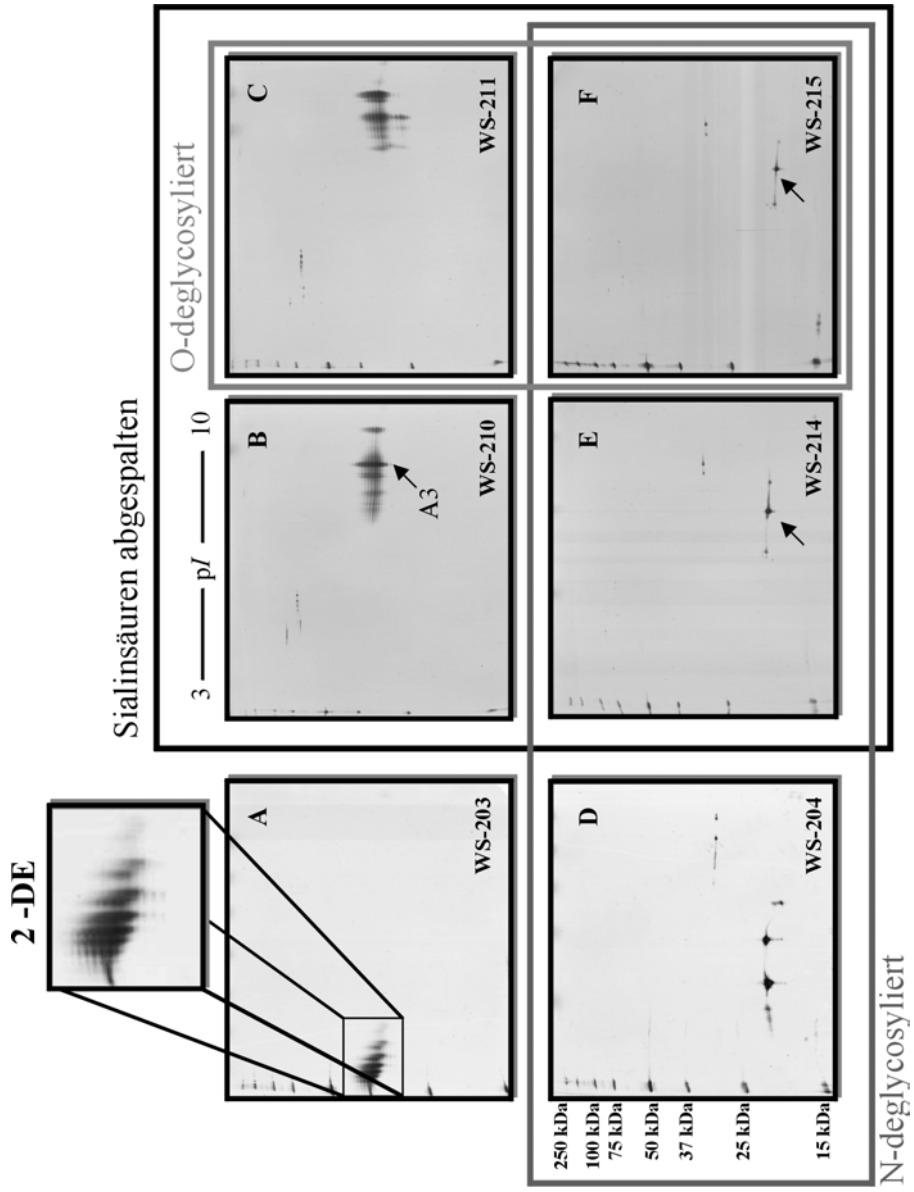


Abb. R-10: Ergebnisse der Versuche zur gezielten Deglycosylierung von rh-EPO

Bewertung der rh-EPO Deglycosylierungsversuche

Man sieht deutlich, dass es durch Abspalten der terminalen Sialinsäuren zu einer *pI* Verschiebung in den Bereich *pI* 6,6-8,6 kommt. Spaltet man die N-Glycoside ab, erhält man 4 deutliche und einige kleinere Spots, deren Molekulargewicht bei etwa 19 kDa \pm 1 kDa liegt und damit in der Nähe des unmodifizierten EPO's. Eine Kombination aus Abspaltung der N-Glycoside und der Sialinsäuren führt in die Nähe der aufgrund der Aminosäuresequenz zu erwartenden Position des EPO's. Die Abspaltung des O-Glycosides hat keinen großen Einfluß auf Position des Spots auf dem 2-DE-Gel, was auch nicht weiter verwundert, da an dieser Stelle nur eine kleine Zuckereinheit anknüpft.

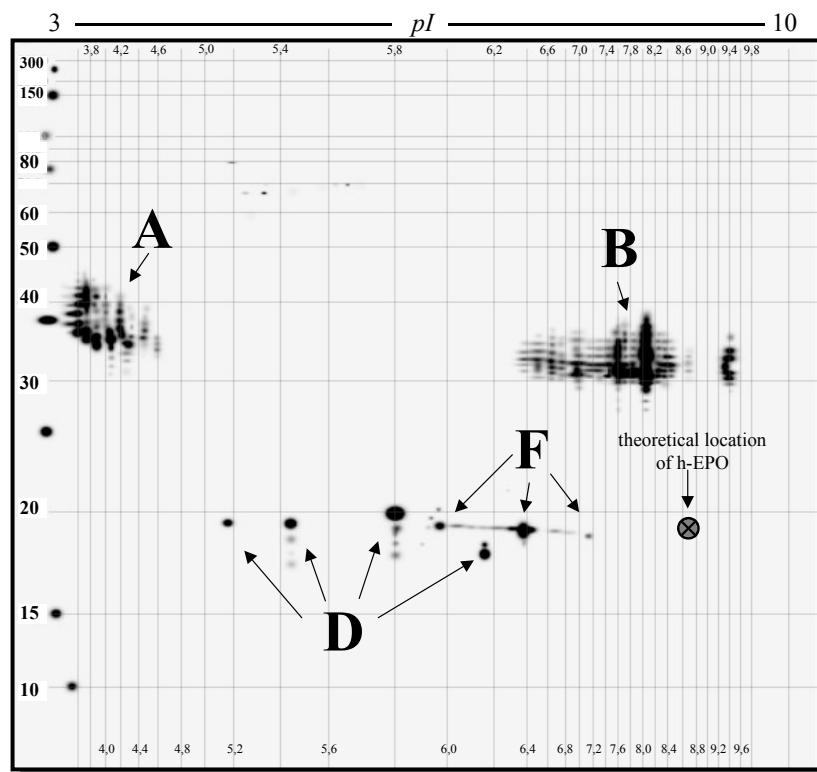


Abb. R-11: Mastergel des Matchsets der Gele zur rh-EPO Deglycosylierung, die Daten sind als Spots dargestellt und wurden mit PD-Quest erzeugt.

Die Ergebnisse der Deglycosylierungsversuche belegen, dass die Sialinsäuren für die Verschiebung und Heterogenität in Richtung des pI 's verantwortlich sind und die N-Glycoside sich maßgeblich auf variierende Molekulargewichte auswirken.

Es konnte gezeigt werden, dass 2-DE geeignet ist die Mikroheterogenität des rh-EPO's abzubilden. Die Kombination von IEF und SDS-PAGE, resp. 2-DE bringt als Synergie-Effekt eine deutlich bessere Auflösung. Durch gezielte Deglycosylierung lässt sich darüber hinaus wertvolle Information zur Glycosylierung des rh-EPO's gewinnen. Rh-Epo ist keineswegs ein einheitlicher Stoff, sondern vielmehr eine komplexe, makromolekulare Mischung. Die Zulassungsbehörde, in diesem Fall die EMEA, stellt hohe Ansprüche an die Qualität rekombinanter Arzneistoffe. Im Gegensatz zu den synthetisch hergestellten Arzneistoffen, bei denen analytische Verfahren zu Identität (z.B. NMR) und Reinheit (Impurity profiling meist mit HPLC) zu aussagekräftigen Ergebnissen führen, sind Protein-Arzneistoffe analytisch schwerer zu greifen. Die Zulassung ist daher viel stärker an einen standardisierten Prozeß und die zugehörigen klinischen Studien gebunden. Demnach werden Änderungen des Prozesses häufig erst nach erneuten klinischen Studien genehmigt.

2-DE ist durchaus geeignet qualitative strukturelle Information zu rh-EPO zu liefern und ist damit eine denkbare alternative zu den im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Identitätsprüfungen. Zudem könnten etwaige Verunreinigungen sichtbar werden, die im EuAB beschriebenen Reinheitsprüfungen könnten hierdurch sinnvoll ergänzt werden.

Auch für die 2-DE komplexer Proteinmischungen lassen sich aus diesem Beispiel einige Rückschlüsse ziehen. Es ist beachtlich, wie weit ein posttranslational modifiziertes Protein von seinem aufgrund der Aminosäuresequenz berechneten pI und MW abweichen kann und wie heterogen die posttranslationalen Modifikationen sein können. Dies führt nicht

zuletzt dazu, dass man sehr hohe Proteinmengen benötigt, um rh-EPO mittels Silberfärbung nachweisen zu können. Darüber hinaus ist das glycosylierte EPO schlecht durch Silber anfärbbar. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt gewöhnlich im Bereich von etwa 2 ng, hier waren µg-Mengen erforderlich, bevor Spots sichtbar wurden. Würde man sich zum Ziel setzen EPO im Blut mittels 2-DE nachzuweisen, so wäre dies ohne vorherige Aufreinigung und Anreicherung sicherlich zum Scheitern verurteilt. EPO wäre sicherlich eins der interessanten Proteine, das man nicht finden würde.

Auch was Streifen und Mehrfachspots auf 2-DE-Gelen angeht, so ist es häufig die Heterogenität posttranslational modifizierter Proteine und nicht die Unzulänglichkeit der Methode, die zu diesen Effekten führt.

MALDI-MS von rh-EPO

Ziel der MALDI-MS Analytik von rh-EPO war Information zur Aminosäuresequenz des Proteins zu erhalten. MALDI-MS nach tryptischem Verdau wäre eine alternative Methode zur im europäischen Arzneibuch beschriebenen HPLC Analytik nach tryptischem Verdau und zur Edman Sequenzierung.

Eine detaillierte Beschreibung des Protokolls zum tryptische Verdau findet sich im Experimentellen Teil dieser Arbeit. Die Silbergefärbten Proteine wurden entfärbt⁴⁸, das verwendete Protokoll basiert auf einer Veröffentlichung von Shevchenko et al.⁴⁶. Nachdem Verdau wurde das resultierende Pellet in etwa 2 µl 0,1 % TFA aufgenommen. Die MALDI-Probenvorbereitung erfolgte nach dem Sandwichverfahren. Das Target mit 1 µl Matrixlösung (gesättigte α-cyano Zimtsäure in 0,1 % TFA) benetzen, Lösung wieder entfernen, 0,5 µl Probe auf das Target geben und unmittelbar 0,8 µl Matrix zugeben, trocken fönen. Nach dem gleichen Verfahren wird auch die Kalibriermischung (Angiotensin / Bradykinin / Insulin B) auf den gleichen Probenträger aufgetragen. Vor der Messung wird das Gerät kalibriert.

Die in der folgenden Abbildung gezeigten Ausschnitte aus MALDI-MS Spektren zeigen die Versuche glycosyliertes rh-EPO tryptisch zu verdauen. In den Spektren I und III wurde je eine Spotreihe (mit gleichem pI aber unterschiedlichen Molekulargewichten) tryptisch verdaut, Spektrum II zeigt den tryptischen Verdau einer Spotreihe eines asialo rh-EPO's, die Spots sind auf Gel WS-212 in Abbildung R-12 durch einen Pfeil markiert.

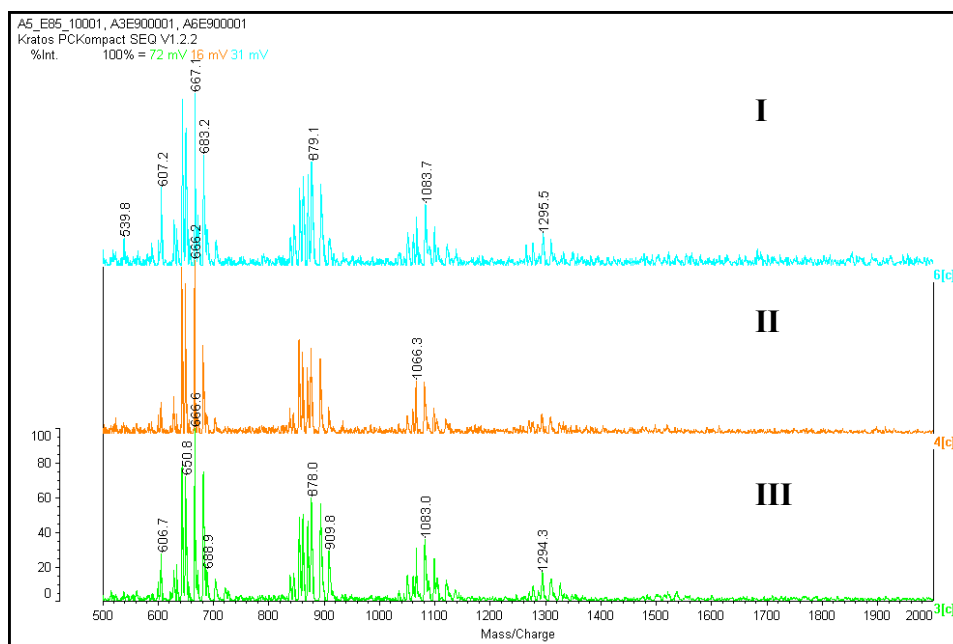


Abb. R-12: MALDI-MS Spektren tryptisch verdauter Proben von rh-EPO (I und III) und asialo rh-EPO (II).

Man erhält auf den 3 oben gezeigten Spektren Peakabfolgen, die eine gewisse Symmetrie aufweisen. Es kommt regelmäßig vor, dass Peaks einen Abstand von 16 Da aufweisen. Dies entspricht dem Massenunterschied zwischen einer Hexose und einer Desoxyhexose, wie beispielsweise Fucose. Den Peaks konnten jedoch keine EPO-Peptidfragmente zugeordnet werden. Ein tryptischer Verdau von glycosyliertem rh-EPO zur Identitätsbestimmung des Proteins ist demnach nicht möglich. Da keine Peptide, auch nicht solche, die

keine Glycosylierungsstelle haben, gefunden wurden, scheint die Glycosylierung den tryptischen Verdau zu verhindern. Rh-EPO verfügt über einen in Summe sehr voluminösen Zuckeranteil, es ist demnach denkbar, dass hierdurch die Aminosäurekette vom Trypsin abgeschirmt wird.

MALDI-MS nach tryptischem Verdau von deglycosyliertem rh-EPO

Für den folgenden tryptischen Verdau (mit TRY1_BOVIN P007600) wurde deglycosyliertes rh-EPO verwendet (siehe mit Pfeil gekennzeichneten Spot, Abbildung R-13 WS-215). In dem folgenden Spektrum sind die dem Erythropoietin zuzuordnenden Peptidmassen mit Pfeilen gekennzeichnet, bei den mit (*) gekennzeichneten Peaks handelt es sich um Autodigestfragmente des Trypsins. Die theoretischen Massen wurden mittels der Swissprot Datenbank (www.expasy.ch) ermittelt.

Die der Messung zugrunde gelegten Parameter waren: Maximal 2 misscleavages, Carbamidomethyl-Cysteine (Cys_CAM) und Acrylamid-Adukte (Cys_PAM) wurden berücksichtigt, ebenso Methioninsulfoxide (MSO). Es wurden nur Peptidfragmente mit einer Masse größer als 500 Da ausgewertet, die Peptidmassen wurden als Durchschnittswerte der Aminosäuren und als einfach protonierte $[M-H]^+$ berechnet. Es wurden nur Peaks berücksichtigt, die sich signifikant vom Grundrauschen abheben (Signal zu Rausch Verhältnis > 3). Massengenauigkeit ± 1 Da.

Die Auswertung des Spektrums ergab eine Sequenzabdeckung von 75 %, insgesamt konnten 13 Peptidfragmente zugeordnet werden.

2-DE und MALDI-MS rekombinanter Arzneistoffe

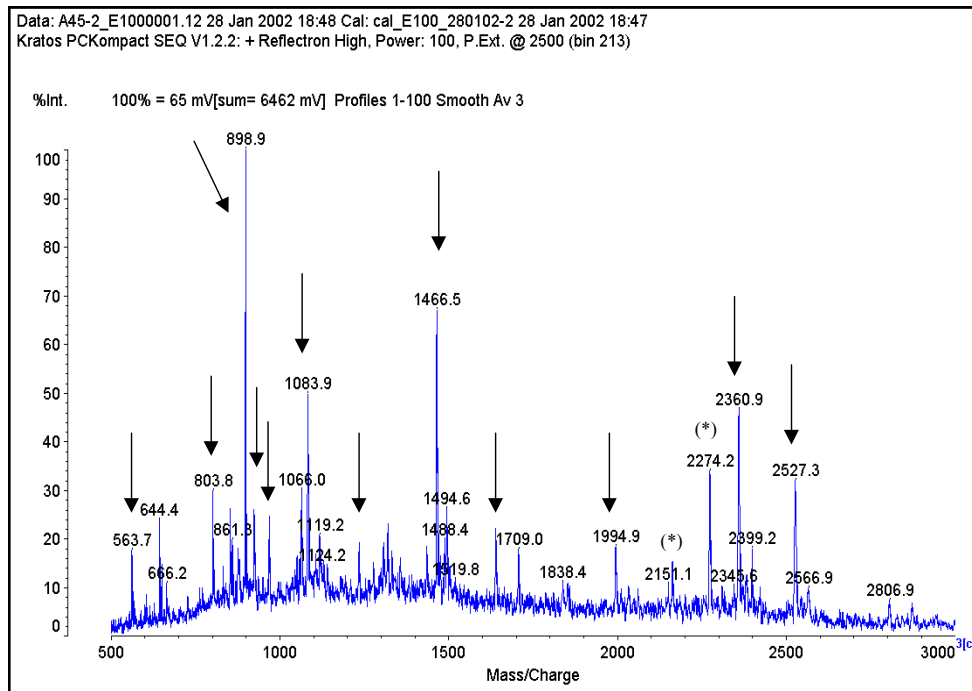


Abb. R-13: MALDI-MS trypt. Verdau von deglycosyliertem rh-EPO (WS-212)

1 APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITGCA EHCSLNENIT
VPDTKVNIFYA **51** WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL
LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS **101** GLRSLTLLR ALRAQKEAIS
PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR **151** GKLKLYTGEA
CRTGDR

Die fettgedruckten Abschnitte der obigen Sequenz korrelieren mit den Peptidfragmenten des Massenspektrums.

| Masse [Da] | Masse berechnet [Da] | Sequenz | MC | Modifikationen |
|------------|----------------------|---------|----|----------------|
| 2527,3 | 2527,94 | 54-76 | 0 | - |
| 2360,9 | 2360,67 | 77-97 | 0 | - |
| 1994,9 | 1993,37 | 5-20 | 2 | Cys-PAM 7 |
| 1640,2 | 1640,85 | 153-166 | 2 | Cys-CAM 161 |
| 1466,5 | 1466,63 | 117-131 | 0 | - |
| 1235,3 | 1234,48 | 11-20 | 1 | - |
| 1083,9 | 1084,26 | 46-53 | 1 | - |
| 1083,9 | 1084,26 | 144-152 | 1 | - |
| 924,9 | 925,03 | 132-139 | 0 | - |
| 970,1 | 970,09 | 155-162 | 0 | Cys_CAM 161 |
| 898,9 | 899,04 | 144-150 | 0 | - |
| 803,8 | 803,97 | 104-110 | 0 | - |
| 563,7 | 563,72 | 140-143 | 0 | - |

Tab. R2: Ergebnisse MALDI-MS nach tryptischem Verdau, deglycosyliertes rh-EPO.

Tryptischer Verdau von rh-EPO mittels Lys-C

Ziel des folgenden Experiments war es die Sequenzabdeckung zu erhöhen. Neben Trypsin gibt es eine ganze Reihe weiterer Enzyme, die man für einen gezielten Verdau nutzen kann. Trypsin schneidet nach den Aminosäuren Lysin und Arginin, Lys-C schneidet nur nach Lysin. Durch Einsatz von Lys-C entstehen andere Peptidfragmente. Ziel war hierdurch Fragmente zu finden, die durch den tryptischen Verdau nicht abgedeckt wurden. Für den Lys-C-Verdau wurde ein silbergefärbter Spot des Gels WS-214, siehe Pfeil auf Abbildung R-14, verwendet. Bei diesem Protein wurde das O-Glycosid nicht

abgespalten, der betreffende Sequenzbereich war jedoch schon durch den tryptischen Verdau abgedeckt.

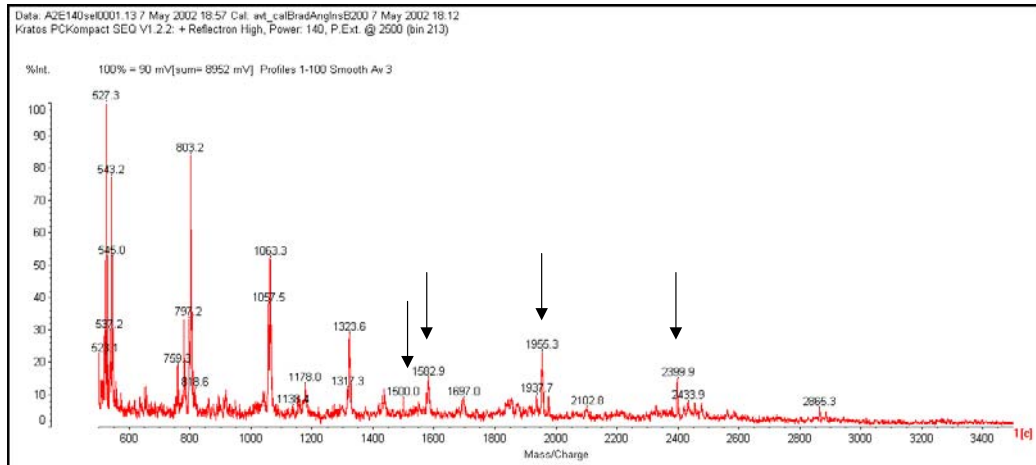


Abb. R-14: MALDI-MS Lys-C Verdau von rh-EPO (WS-212)

1 **APRLICDSR VLERYLLEAK** EAENITTGCA EHCSLNENIT
 VPDTKVNFYA 51 WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL
 LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS 101 **GLRSLTLLR ALRAQKEAIS**
 PPDAASAAPL RTITADTFRK **LFRVYSNFLR** 151 **GKLKLYTGEA**
CRTGDR

| Masse [Da] | Masse berechnet [Da] | Sequenz | MC | Modifikationen |
|------------|----------------------|---------|----|----------------|
| 2399,9 | 2400,84 | 1-20 | 0 | Cys_CAM |
| 1955,3 | 1956,34 | 98-116 | 0 | - |
| 1583,0 | 1583,80 | 153-166 | 1 | - |
| 1499,9 | 1500,78 | 141-152 | 0 | - |

Tab. R-3: tryptischer Verdau von rh-EPO mit Lys-C, MALDI-MS Ergebnisse

Durch den Lys-C Verdau konnten weitere 16 Aminosäuren identifiziert werden, darunter auch die ersten 4 Aminosäuren APPR. Die Sequenz-abdeckung nach Trypsin-Verdau + Lys-C Verdau beträgt 85 %. Als einziges

Peptid, das nicht eindeutig zugeordnet werden konnte bleibt der Abschnitt AS21-45. Als Cys_CAM hat dieses Fragment ein Molekulargewicht von 2805,02 Da, auf dem Spektrum des tryptischen Verdaus gibt es einen Peak bei 2806,9, dieser erfüllt jedoch nicht die Massen-Toleranz von ± 1 Da. Würde man diesen als Cys-CAM Fragment 21-45 werten, so wäre eine Sequenzabdeckung von 100 % erreicht.

Die MALDI-MS Versuche haben gezeigt, dass man nur mit dem deglycosylierten rh-EPO auswertbare Ergebnisse erhält. Es lässt sich eine gute bis sehr gute Sequenzabdeckung erreichen, die Aussagekraft dieser Ergebnisse ist ohne weiteres mit denen einer HPLC nach tryptischem Verdau bzw. einer Edman-Sequenzierung zu vergleichen. Die Strategie ein zweites Enzym zur Steigerung der Sequenzabdeckung zu wählen, hat sich ebenfalls als erfolgreich herausgestellt. Die Methode stellt demnach eine sinnvolle Alternative zu den im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Methoden dar.

Für die Bearbeitung komplexer Proteinmischungen mittels 2-DE MALDI-MS kann aus den hier gezeigten Ergebnissen der Rückschluß gezogen werden, dass Glycosylierungen dazu führen können, dass zum Einen Proteine durch die glycosylierungsbedingte Heterogenität unter der Nachweisgrenze liegen und zum Anderen eine Identifizierung mittels MALDI-MS verhindern werden kann. Als Konsequenz daraus sollte man zur Identifizierung mittels MALDI-MS eukaryotische Proben vor der 2-DE deglycosylieren, dies führt zu einer Dekomplexierung der Probe, was sicherlich wünschenswert ist. Ein Vergleich mit einer unbehandelten Probe kann Aufschluß darüber geben welche Proteine durch die Deglycosylierung modifiziert wurden.

CAF-MALDI

CAF steht für chemically assisted fragmentation, weiterführende Information zu dieser Technik findet sich bei Keough et al.¹⁵⁴. Dass man mittels MALDI-MS Peptide sequenzieren kann wurde bereits im allgemeinen Teil ausgeführt. Hierbei macht man sich den sog. „post source decay“ zunutze. Beim CAF-MALDI wird durch N-terminale Sulfonierung die Effizienz der Fragmentierung deutlich gesteigert, zu dem entstehen ausschließlich b- und y-Ionen. Nur das y-Ion behält eine positive Ladung und kann somit im Reflectron Modus detektiert werden (siehe Abbildung R-16), dies vereinfacht die Interpretation der Spektren. Abbildung R-15 zeigt die Umsetzung eines Peptids mit dem Sulfonierungsreagenz, durch die Derivatisierung wird das Molekulargewicht des Peptids um 136 Da erhöht.

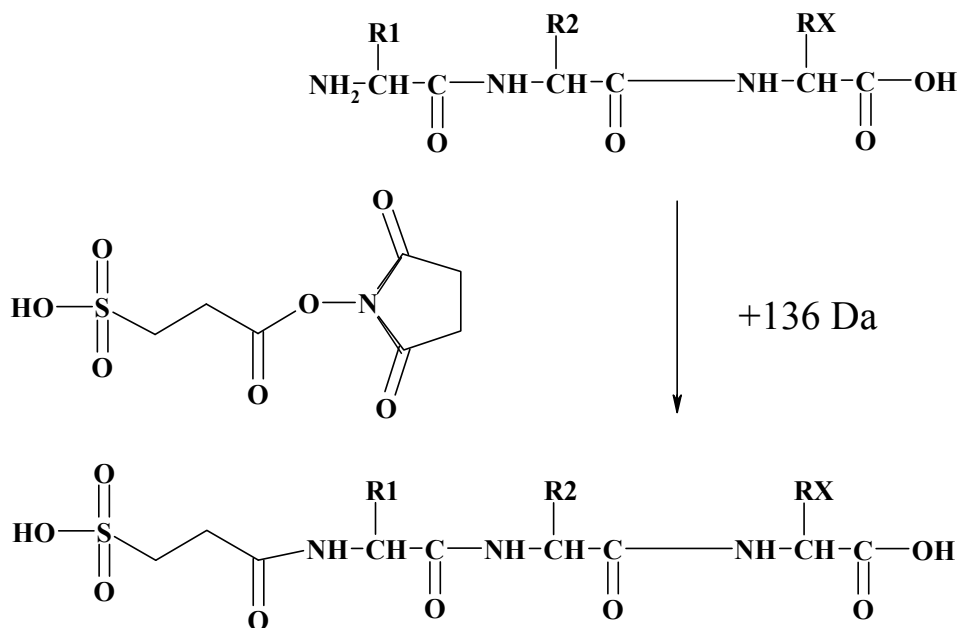


Abb. R-15: CAF-Derivatisierung

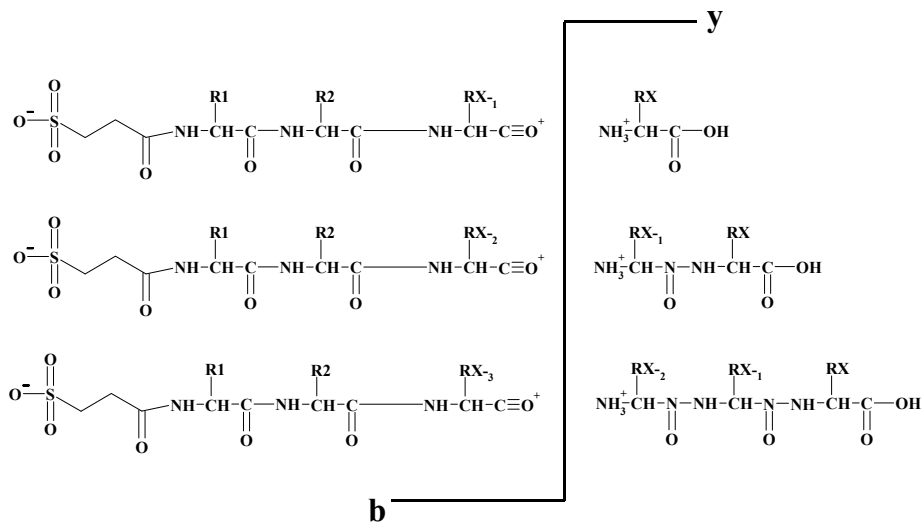


Abb. R-16.: CAF-Fragmentierung

Anwendung CAF-MALDI

Die notwendigen Reagenzien können bei der Fa. Amersham als Ettan CAF-MALDI Sequencing Kit (Katalog Nr. 17-6002-97) bezogen werden. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in der Amersham Anleitung zum Kit (71-5024-09) sowie im experimentellen Teil dieser Arbeit.

Mögliche Anwendungen des CAF-MALDI sind:

- Ansequenzierung einzelner Peptidfragmente eines tryptischen Verdau, um bei geringer Sequenzabdeckung die Identität eines Proteins zu bestätigen.
- Als Alternative zur Edman-Sequenzierung, wie sie teilweise in Arzneibuchmonographien zur Analytik rekombinanter Arzneistoffe gefordert wird.
- Peptid-Sequenzierung zur Aufklärung von Mutationen.

CAF-MALDI zur Sequenzierung von ChANX V

Das verwendete Chicken Annexin V wurde von der november AG, Erlangen, Deutschland zur Verfügung gestellt. Es wird rekombinant in *E. coli* hergestellt. In ersten präklinischen und klinischen Tests konnte bereits die Wirksamkeit von ChANX V als Tumorthapeutikum gezeigt werden. Den Krebspatienten wird Tumorgewebe entnommen, dieses wird bestrahlt und mit ChANX V versetzt, die Applikation des so gewonnenen Therapeutikums erfolgt subcutan. Hierdurch soll eine tumorspezifische Immunantwort erzeugt werden, die den Tumor gezielt eliminiert.

Das Gel WS-236 zeigt ein silbergefärbtes 2-DE-Gel eines hochaufgereinigten chicken Annexin V, das Protein (Swissprot 17153) besteht aus 321 Aminosäuren, hat einen theoretischen *pI* von 5,6 und ein Molekulargewicht von 36.198 Da. Mittels tryptischem Verdau und MALDI-MS konnte eine Sequenzabdeckung > 72 % erzielt werden. Im Folgenden ist die Aminosäuresequenz aufgeführt, die fettgedruckten Abschnitte entsprechen den zugeordneten Peptiden des MALDI-MS Spektrums.

**1 MAKYTRGTVT AFSPFDARAD AEALRKAMKG MGTDEETILK
ILTSRNNAQR 51 QEIASAFKTL FGRDLVDDLK SELTGKFETL
MVSLMRPARI FDAHALKHAI 101 KGAGTNEKVL TEILASRTPA
EVQNIKQVYM QEYEANLEDK ITGETSGHFQ 151 RLLVVLLQAN
RDPDGRVDEA LVEKDAQVLF RAGELKWGTD EETFITILGT 201
RSVSHLRRVF DKYMTISGFQ IEETIDRETS GDLEKLLLAV
VKCIRSVPAY 251 FAETLYYSMK GAGTDDDTLI RVMVSRSEID
LLDIRHEFRK NFAKSLYQMI 301 QKDTSGDYRK ALLLLCGGDD E**

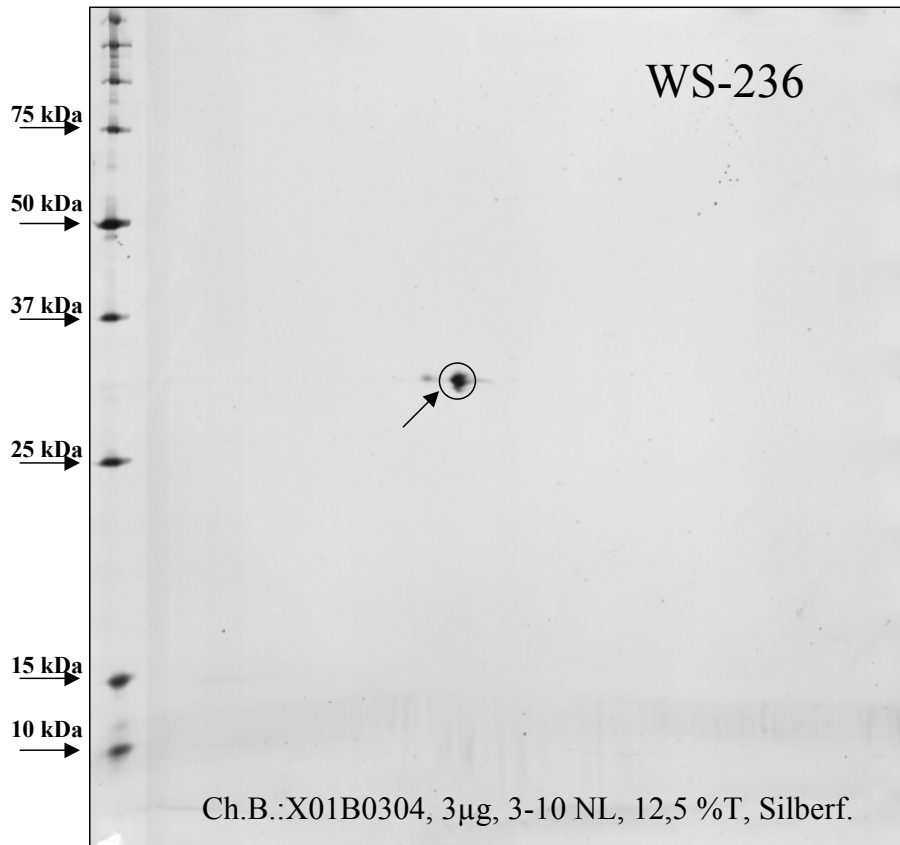


Abb. R-17: Gel WS-236; Aufgereinigtes chicken Annexin V

2-DE und MALDI-MS nach tryptischem Verdau lassen bereits zuverlässige Rückschlüsse auf die Identität und Reinheit des ChANX V zu. Mit der CAF-Derivatisierung und Ansequenzierung eines Peptids sollte in der Strukturbestimmung noch ein Schritt weitergegangen werden. In Abbildung R-18 sind der tryptische Verdau des ChANX V mit und ohne CAF-Derivatisierung gegenübergestellt. Man erkennt deutlich, dass das Peptid mit 1269,4 Da zu dem um 136 Da schwereren Sulfo-Peptid umgesetzt wurde.

2-DE und MALDI-MS rekombinanter Arzneistoffe

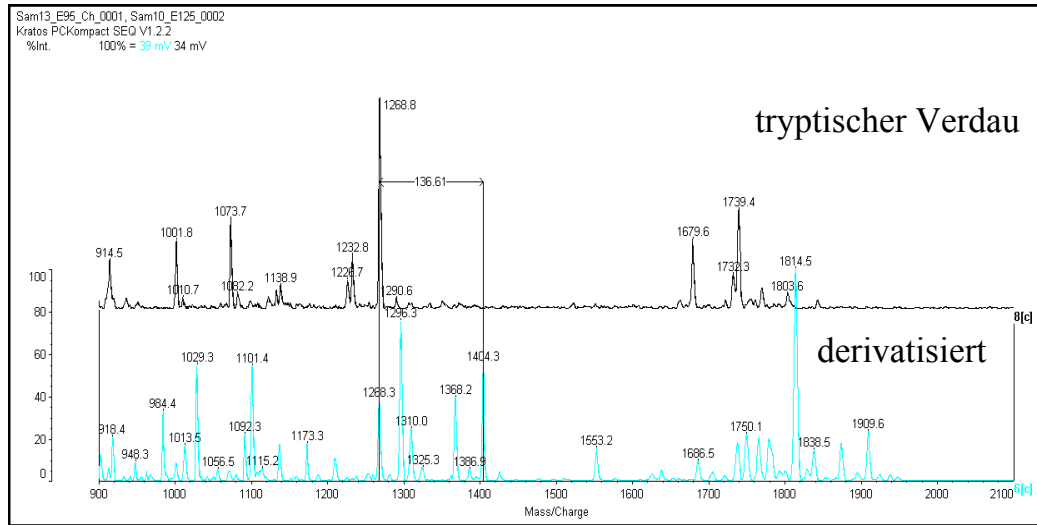


Abb. R-18: MALDI-MS Spektrum eines tryptischen Verdau von ChANX V, im unteren Spektrum wurde der tryptische Verdau mittels CAF derivatisiert.

Über das „Ion gate“ des MALDI-TOF Gerätes wurde dieses Sulfo-Peptid (1404,4 Da) selektiert, durch eine Erhöhung der Laserenergie kann es fragmentiert werden. Das folgende Spektrum zeigt die resultierenden Fragmente. Mittels CAF-MALDI lassen sich 7 der 12 Aminosäuren dieses Peptids eindeutig identifizieren.

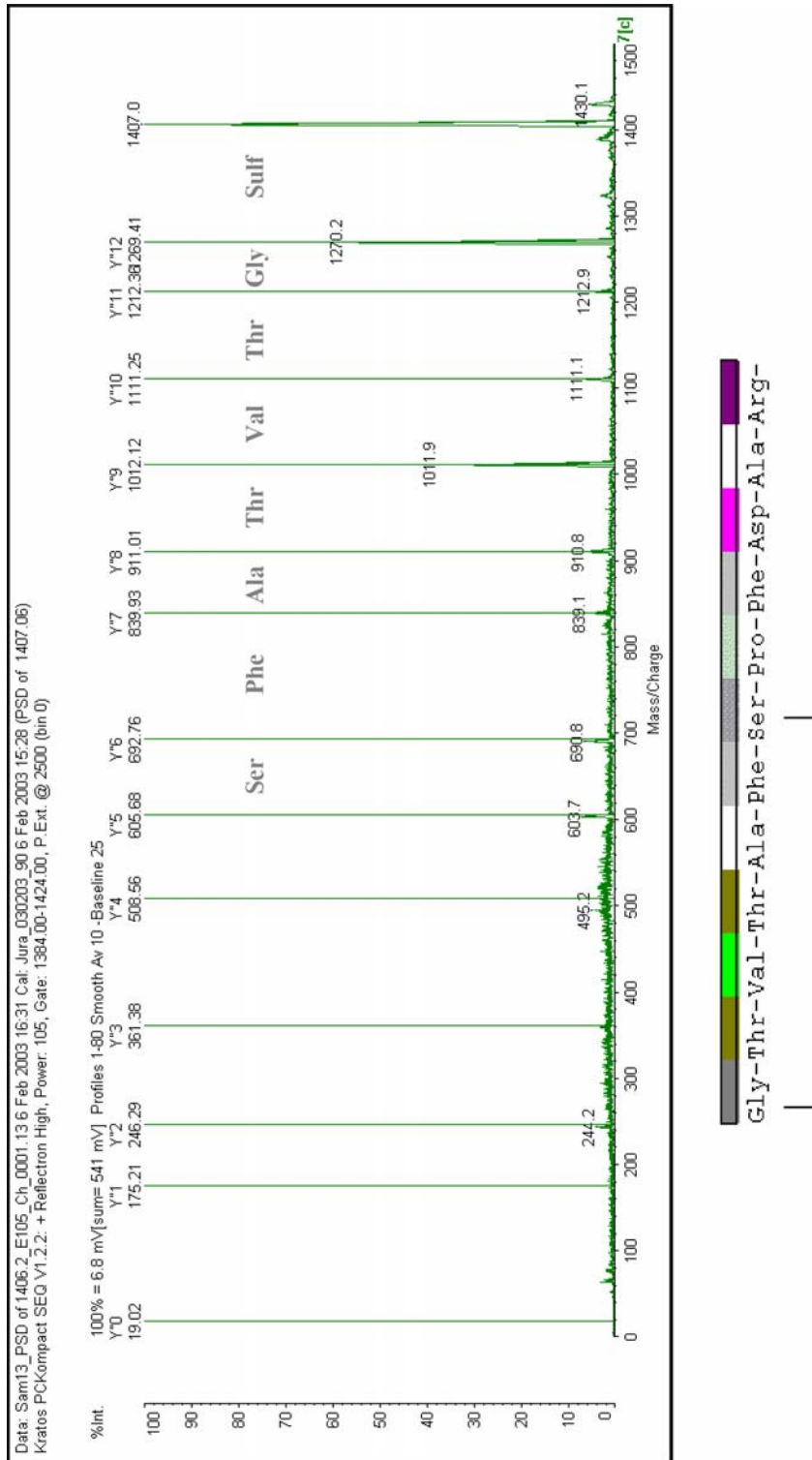


Abb. R19: Ergebnis der CAF-MALDI Sequenzierung des 1269,4 kDa Peptids von ChANX V

Immunglobuline

Immunglobuline werden ausschließlich von B-Zellen synthetisiert, sie stellen die humorale Immunantwort dar und eliminieren für den Organismus schädliche Viren und Bakterien. Bei Säugetieren unterscheidet man fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen (IgG, IgA, IgD, IgM, IgE), hinzukommen eine Vielzahl an Unterklassen. Immunglobuline weisen eine enorme Diversität auf, selbst ohne Stimulation durch Antigene kann der menschlichen Organismus 10^{12} unterschiedliche Antikörper exprimieren¹⁶³. Immunglobuline stellen mit etwa 20 % der Plasmaproteine einen hohen Anteil der im Blut zirkulierenden Proteine, Abbildung R-20 zeigt den schematischen Aufbau eines Antikörpers.

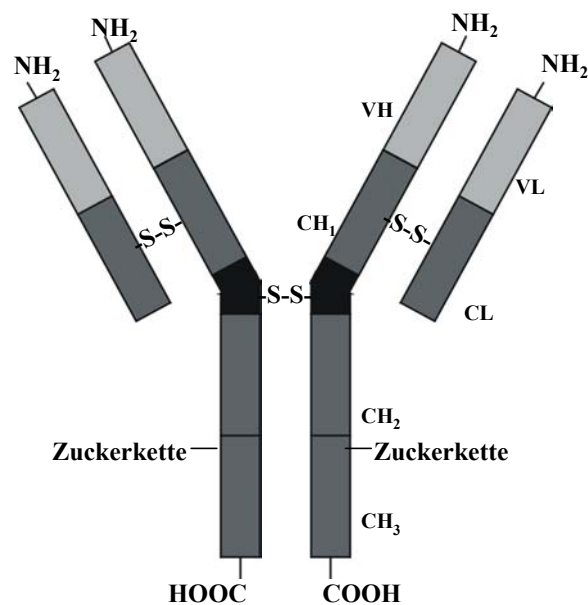


Abb. R-20: Schematischer Aufbau eines Antikörpers¹⁵¹

Immunglobuline sind Glycoproteine und zeichnen sich durch symmetrischen Aufbau aus, sie bestehen aus 2 schweren (ca. 440 Aminosäuren) und 2 leichten Ketten (ca. 220 AS), diese sind kovalent über Disulfidbrücken verknüpft. Die Antigenbindungsstellen befinden sich im Bereich der variablen N-Termini. Die schweren Ketten aller Immunglobuline sind zu dreiviertel konserviert und weisen dementsprechend eine relativ konstante Aminosäureabfolge auf, bei den leichten Ketten macht die variable Region 50 % aus. Das Molekulargewicht der schweren Ketten liegt je nach Klasse zwischen 50 und 61 kDa, das der leichten Ketten bei etwa 22 kDa. Bei den leichten Ketten unterscheidet man κ - und λ -Ketten, diese kommen in allen Immunglobulinklassen vor.

2-DE von Immunglobulinen

Den physiko-chemischen Eigenschaften der Immunglobuline nach ist es möglich diese mit 2-DE zu analysieren. Da die 2-DE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wird, werden die Immunglobuline in leichte und schwere Ketten gespalten.

Es gibt mittlerweile eine ganze Reihe an Arzneimitteln, die Immunglobuline enthalten.

- Aus humanem Blut gewonnene Immunglobuline, die bei Immundefekten Anwendung finden.
- Antisera
- Monoklonale Antikörper, viele davon sind rekombinant gewonnene, chimäre Antikörper

Venimmun[®]

Dieses Arzneimittel wird aus humanen Plasmaspenden gewonnen, durch Fraktionierung und Aufreinigung des Plasmas wird eine Mischung aus

IgG (80 %), IgA (12 %) und IgM (8 %) erhalten. Es wird bei angeborenem oder erworbenem Antikörpermangel angewendet, die Applikation erfolgt intravenös¹⁵⁵.

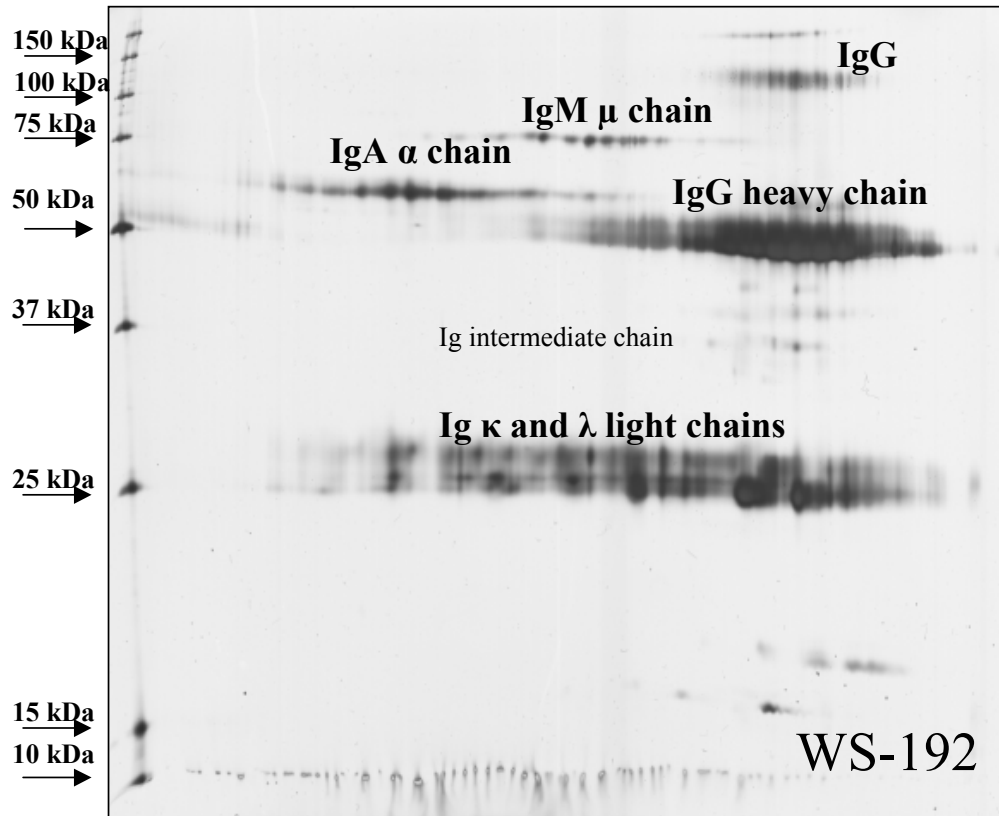


Abb. R-21: Gel WS-192 pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 25 µg IgG, IgM, IgA (Venimmun®, Silberfärbung)

Mittels 2-DE lassen sich die unterschiedlichen Immunglobulinklassen auftrennen, zudem wird die enorme Diversität dieser Glycoproteine sichtbar. Die Intensität der einzelnen Fraktionen spiegelt die vom Hersteller angegebenen Mengenverhältnisse wieder. Die Zuordnung der unterschiedlichen Immunglobuline erfolgte im Abgleich mit dem humanen Plasma-Referenzgel, welches auf der Swissprot Homepage bereitgestellt wird.

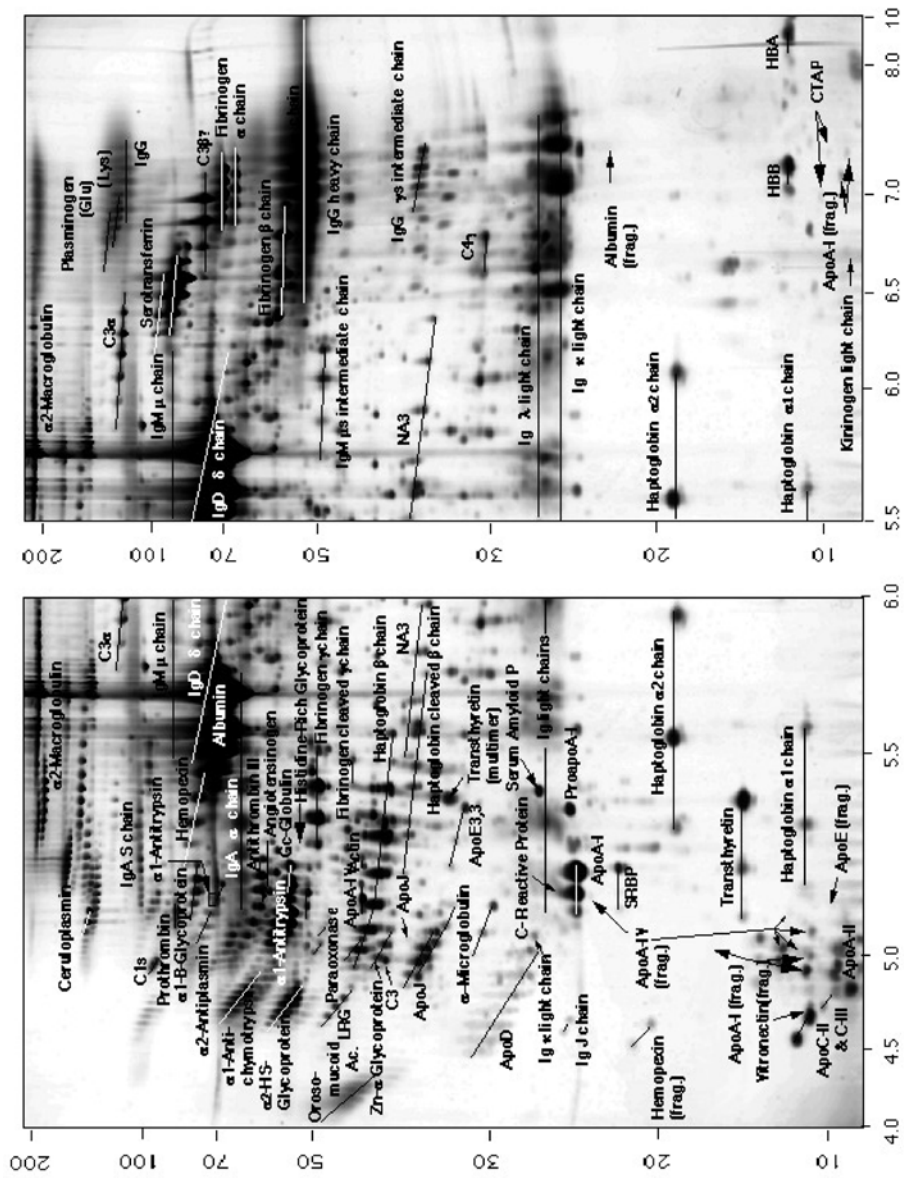


Abb. R-22: Plasma-Referenzgel (www.expasy.ch)

Mabthera®

Bei Mabthera® (INN Rituximab) handelt es sich um einen in CHO-Zellen hergestellten rekombinanten Antikörper, wobei die konstanten Regionen der leichten und schweren Ketten humanen Ursprungs sind (IgG1), die variablen Regionen stammen von der Maus.

Rituximab bindet an das transmembranäre Antigen CD20, welches auf prä-B- und reifen B-Lymphozyten exprimiert wird. CD20 wird auf > 95 % aller Non-Hodgkin-Lymphome des B-Zell-Typs exprimiert. Es findet sich sowohl auf gesunden als auch auf malignen B-Zellen, nicht jedoch auf hämatopoetischen Stammzellen, frühen Vorläuferzellen der B-Zellen, Plasmazellen oder anderem Gewebe. Die Bindung von Rituximab an CD20 induziert die Lyse der B-Zelle. (Quelle Abda Datenbank, Stand 06.2004). Beim folikulären Non-Hodgkin-Lymphom werden Dosen von 375 mg / m² gegeben, einmal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen.

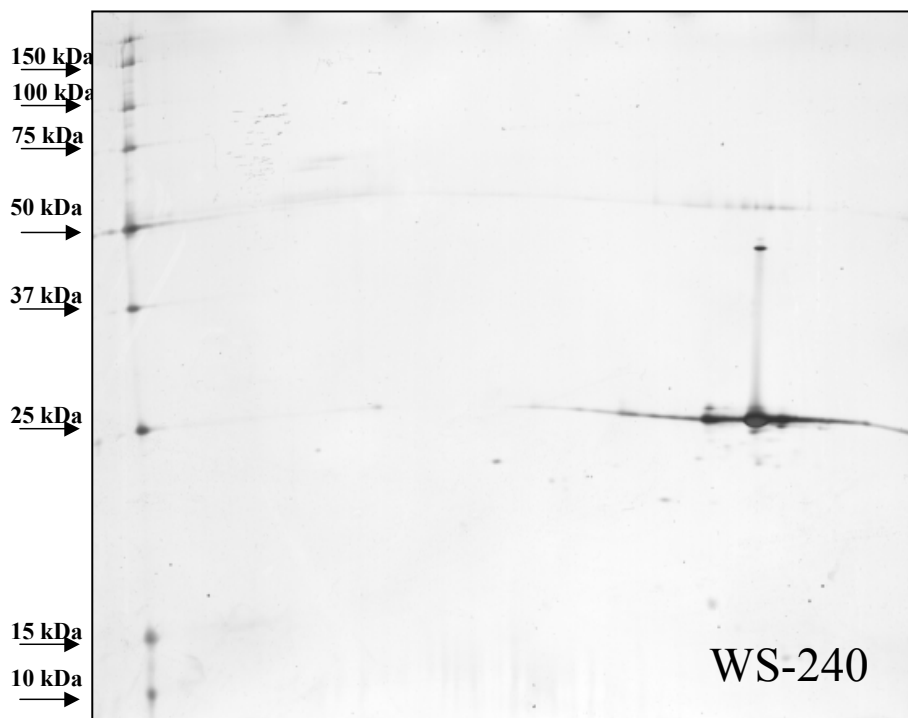


Abb. R-23: Gel WS-240, pI 3-10NL, 18 cm, 12,5 % T, 5µg Rituximab

Im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie, die alle schnell proliferierenden Zelltypen angreift, bieten die monoklonalen Antikörper einen gezielten Ansatz mit entsprechend guten Ansprechraten und geringeren Nebenwirkungen.

Vergleicht man das 2-DE-Gel WS-240 mit WS-192 und dem Plasma-Referenzgel, erkennt man, dass es sich bei Rituximab um einen Antikörper vom IgG-Typ handelt. Aufgrund der Monoklonalität ist die Diversität deutlich eingeschränkt. Da es sich um ein glycosyliertes Protein handelt, liegt trotzdem eine gewisse Heterogenität vor.

Herceptin® (INN Trastuzumab)

Ein weiterer rekombinanter Antikörper, der mittels 2-DE getrennt wurde, ist das Trastuzumab. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörper vom IgG1-kappa Typ, der in CHO-Zellen produziert wird. Der Aufbau des Antikörpers ist ähnlich wie beim Rituximab, die konstanten Regionen sind humanen Ursprungs, die funktionellen, antigen-bindenden Domänen stammen von der Maus (4D5). Trastuzumab richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER2). Bei 20-30 % aller primären Mammakarzinome wird HER2 überexprimiert, was zu einer erhöhten Zellteilungsrate führt. Die Bindung von Trastuzumab und HER2 blockiert diesen Rezeptor und bietet somit eine Möglichkeit für eine gezielte Tumor Therapie.

Patientinnen, bei denen eine HER2-Überexpression nachgewiesen wurde (die extrazelluläre Domäne des HER2 lässt sich im Serum nachweisen), werden initial mit 4 mg / kg Trastuzumab behandelt, im Anschluß daran werden wöchentlich 2 mg / kg gegeben.

Das Gel WS-238 zeigt die 2-DE / Silberfärbung von 5 μg Trastuzumab, ähnlich wie beim Rituximab erkennt man auch hier, dass es sich um einen monoklonalen, glycosylierten Antikörper vom IgG-Typ handelt.

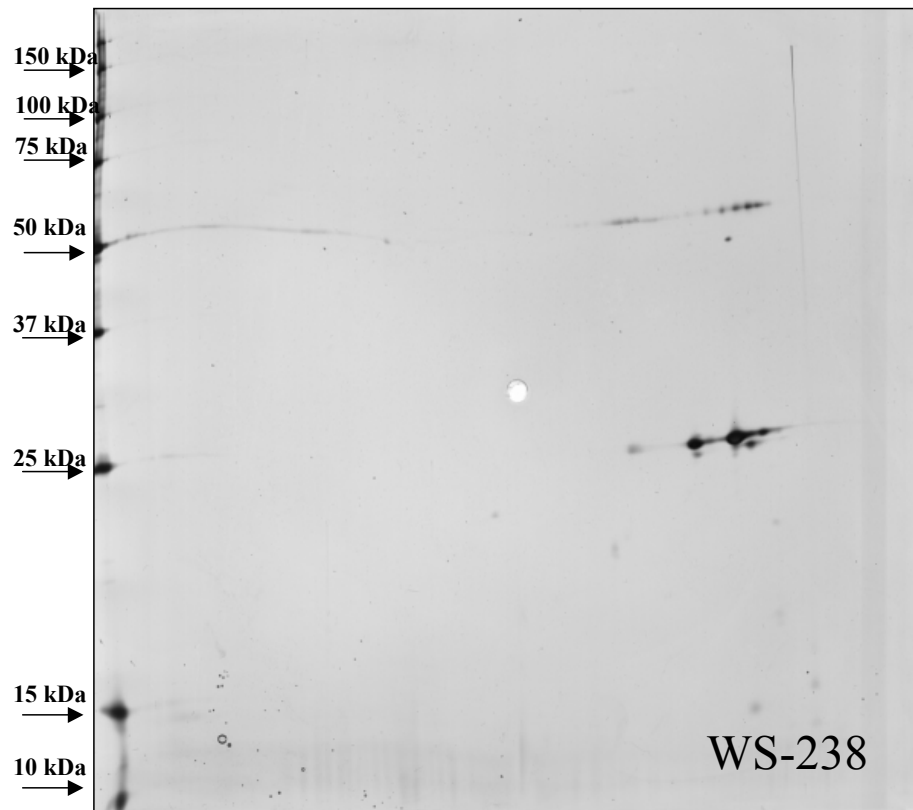


Abb. R-24: Gel WS-238 pI 3-10NL, 18 cm, 12,5 % T, 5 μg Trastuzumab

Bewertung und Ausblick zu 2-DE-MS rekombinanter Arzneistoffe

Mit den hier gezeigten Beispielen zur Analytik rekombinanter Arzneistoffe mittels 2-DE und MALDI-TOF-MS konnte belegt werden, dass sich diese Techniken durchaus für die Analytik rekombinanter Arzneistoffe eignen. Es lassen sich Aussagen hinsichtlich Identität und Reinheit der rekombinanten Arzneistoffe treffen, zudem kann die, insbesondere bei posttranslational modifizierten Proteinen auftretende, Mikroheterogenität abgebildet werden.

Ein Beleg für die Schwierigkeit der Charakterisierung von Proteinarzneistoffen und damit auch für den Bedarf weiterer Analysenverfahren ist, dass die Zulassung dieser Wirkstoffe sehr stark auf den Produktionsprozeß bezogen wird. Bei synthetisch gewonnenen Arzneistoffen kann bei Abänderung des Produktionsprozesses in der Regel durch eine entsprechende Analytik die Gleichwertigkeit des Produktes nachgewiesen werden. Bei Protein-Arzneistoffen ist dies kaum möglich, daher wird von den Behörden meist eine erneute klinische Prüfung des mit dem abgeänderten Produktionsprozeß gewonnenen rekombinanten Arzneistoffes gefordert¹⁴³.

Rekombinante Wirkstoffe als Generika

Da in den nächsten Jahren die Patente für die ersten rekombinanten Arzneistoffe auslaufen werden, befinden sich zur Zeit eine Reihe rekombinanter Generika in der Entwicklung. Die strukturelle Übereinstimmung mit den Originator-Produkten zu zeigen ist nicht ohne weiteres möglich. Gerade bei Arzneistoffen, die in sehr niedrigen Konzentrationen verabreicht werden, ist es äußerst schwierig, die Bioverfügbarkeit zu bestimmen. Bei Substanzen, die, wie beispielsweise Interferone, endogen im menschlichen Körper zu finden sind, kommt erschwerend hinzu, dass eine Differenzierung zwischen dem endogenen Protein und dem von außen zugeführten Arzneistoff vorgenommen werden muss. Auch bei den rekombinanten Generika werden

klinische Studien zum Nachweis von Wirksamkeit und Unbedenklichkeit unabdingbar sein.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass viele rekombinante Arzneistoffe wesentlich zum Fortschritt der Pharmakotherapie beigetragen haben. Manche Proteinwirkstoffe sind durch diese Herstellungsmethode überhaupt erst zugänglich geworden, andere stehen heute in großen Mengen und deutlich verbesserter Qualität zur Verfügung. Betrachtet man die Entwicklungskandidaten im Bereich der rekombinanten Arzneistoffe, so lassen diese für die Zukunft auf weitere wichtige Arzneistoffe hoffen.

Klinische Proteomics

Ein weiterer Bereich, der auch von pharmazeutischem Interesse ist, sind klinische Anwendungen der 2-DE. Eine umfassende Übersicht der klinischen Anwendungen und der bereits untersuchten Gewebe gibt Young et al.⁹. Ein wesentliches Ziel klinischer Proteomics ist es, Krankheiten aufgrund einer spezifischen Proteinexpression zu diagnostizieren und nach Möglichkeit deren Progredienz anhand von Markerproteinen zu verfolgen, auch die pharmazeutische Industrie sucht gezielt nach Markerproteinen¹⁵⁶. Da die 2-DE für den routinemäßigen Einsatz in der Klinik zu teuer und von der Handhabung zu aufwendig ist, zielen viele der klinischen Projekte darauf ab, die Markerproteine mittels 2-DE zu identifizieren und ihre Korrelation mit dem Krankheitsgeschehen zu validieren, um dann in der Folge eine einfacher zu handhabende und kostengünstigere Methode - wie beispielsweise einen ELISA - zu entwickeln. Eine pathologische Veränderung auf Proteinebene zu charakterisieren, bietet zudem die Chance, ein Target für eine rationelle Arzneistoffentwicklung zu finden. In der Regel findet eine Gegenüberstellung von krankem und gesundem Gewebe statt, über diesen differentiellen Ansatz lassen sich die krankheitsrelevanten Proteine ermitteln.

Durch die Kooperation mit Frau Dr. Messinger vom Nordwestkrankenhaus in Frankfurt bestand die Möglichkeit Serum-, Urin- und Cerebrospinal Fluid-Proben von Patienten mit monoklonaler Gammopathie mittels 2-DE zu untersuchen. Bei diesem Krankheitsbild kommt es zu einer Überexpression funktionsloser Immunglobuline. Hinsichtlich der physikalisch chemischen Eigenschaften der bei diesem Krankheitsbild zu analysierenden Proteinen gibt es weitestgehende Übereinstimmung mit den im Kapitel rekombinante Arzneistoffe untersuchten Immunglobulinen. Hierdurch war bereits zu Beginn der 2-DE-Analytik gesichert, dass diese Proteine mittels 2-DE-Silberfärbung abgebildet werden können. Im Folgenden ein kurzer Überblick zum

pathologischen Hintergrund der Gammopathien und insbesondere zu den Bence Jones Proteinen.

Bence Jones Proteine

Die Bezeichnung Bence Jones Proteine geht zurück auf den englischen Arzt Henry Bence Jones (London 1813-1873)¹⁵¹. Bence Jones Proteine zählen zu den Paraproteinen, diese sind dem Aufbau nach Immunglobuline oder Fragmente von Immunglobulinen, jedoch ohne die Funktion eines Antikörpers zu haben. Der Aufbau der Immunglobuline, bestehend aus schweren und leichten Ketten, wurde bereits bei den rekombinanten monoklonalen Antikörpern beschrieben.

Paraproteine werden von sog. Plasmozytomen (syn. Multiples Myelom, Kahler Krankheit) gebildet, dabei handelt es sich um entartete monoklonale, lymphoide Zellen. Die Erkrankung zählt zu den monoklonalen Gammopathien¹⁵⁷.

Als Bence Jones Proteine werden die leichten Ketten der Paraproteine bezeichnet. Bei etwa 60-70 % aller Plasmozytome lassen sich Bence Jones Proteine im Urin nachweisen. Aufgrund des relativ geringen Molekulargewichts der leichten Ketten (etwa 22 kDa) und der aus der unkontrollierten Expression resultierenden hohen Plasmaspiegel, kommt es zu einer renalen Eliminierung von Bence Jones Proteinen (Bence Jones Proteinurie). Eine besondere Form des Plasmozytoms stellt das relativ seltenen Bence Jones Plasmozytom (3,5 – 6 % aller Plasmozytome) dar, dieses Plasmozytom exprimiert ausschließlich leichte Ketten.

Maligne Formen der monoklonalen Gammopathie weisen mit einer Krankheitsdauer zwischen wenigen Monaten und 15 Jahren, bei einer mittleren Überlebenszeit zwischen 48 und 58 Monaten, eine ungünstige Prognose auf.

Die Behandlung erfolgt symptomatisch und zielt darauf ab, die Plasmazellmasse zu reduzieren. Neben Chemo-, Strahlen- und Steroidtherapie

werden auch Zytokine angewendet. Komplikationen, die sich im Verlauf der Erkrankung ergeben, sind eine progrediente Niereninsuffizienz aufgrund präzipitierender Bence Jones Proteine, ein sekundäres Antikörpermangelsyndrom, Hypercalzämie und mitunter eine Hyperviskosität des Blutes¹⁵⁷.

Analytik von Gammopathien

Serum-Proben können mittels Kapillarelektrophorese analysiert werden. Diese Methode wird auch im Nordwestkrankenhaus (Frankfurt) angewendet. Aus dem Elektropherogramm kann die Gesamtproteinmenge [g/dl] sowie die relative Verteilung der einzelnen Fraktionen abgelesen werden. Gewöhnlich erhält man 5 Fraktionen (Albumin, Alpha1-, Alpha2-, Beta- und Gamma-Fraktion). Liegt eine monoklonale Gammopathie vor, so findet man einen signifikanten Peak im Bereich der Beta- oder Gamma-Fraktion, bei polyklonalen Gammopathien stellt man eine relativ vergrößerte AUC in einem dieser Bereiche fest, jedoch ohne das einen sauber getrennter Peak herausragt. Die Normbereiche können der folgenden Tabelle entnommen werden.

| | relativer Anteil | absolute Proteinkonz. |
|-----------------------------|------------------|-----------------------|
| TP (Gesamtprotein) | | 66-83 g/l |
| ALBUMIN | 54,7-68,7 % | 37,5-50,1 g/l |
| ALPHA1 | 3,7-7,8 % | 2,6-5,8 g/l |
| ALPHA2 | 5,2-10,7 % | 3,6-8,4 g/l |
| BETA | 8,5-13,7 % | 6-9,9 g/l |
| GAMMA | 10,7-19,2 % | 7,2-14,6 g/l |
| ALBUMIN / GLOBULIN QUOTIENT | | 2,2-1,2 |

Tab. K-1: Normbereiche [Quelle Nordwestkrankenhaus FFM]

2-DE von Bence Jones Proteinen

Weitere gängige Methoden zur Analytik der Serum- und Urinproteine sind Trägerelektrophorese auf Papier oder Celluloseacetat. Eine genauere Diagnostik, insbesondere die der Immunglobuline, kann durch eine Immunelektrophorese bzw. durch die mittlerweile häufiger angewandte Immundefixation erzielt werden. Quantitativ lassen sich einzelne Immunglobuline durch Zusatz der entsprechenden Antikörper und anschließender Messung der aus der Antigen-Antikörperreaktion resultierenden Trübung bestimmen. Eine detaillierte Übersicht zu den elektrophoretischen Methoden, die bei der Bestimmung der Bence Jones Proteinurie angewendet werden, findet man bei Marshall und Williams¹⁵⁸. In diesem Review werden neben den bereits erwähnten Methoden auch SDS-PAGE mit unterschiedlichen Färbetechniken sowie IEF und 2-DE beschrieben.

2-DE von Gammopathien

Ziel der 2-DE Untersuchungen war es herauszufinden, inwiefern die 2-DE Ergebnisse mit den klinischen Befunden korrelieren und ob man mittels 2-DE zusätzliche krankheitsrelevante Information erhält.

Die 2-DE ist, aufgrund der vielen Handarbeitsschritte und da sie relative kostenintensiv ist, keine Technik, die man ohne weiteres in einem klinischen Labor etablieren kann. Die Methode könnte jedoch in unklaren Fällen dazu dienen die Krankheit bzw. deren Verlauf exakter zu charakterisieren.

| Patient | Probe | Diagnose |
|--------------------|-------|---|
| GoMa | Serum | Normalbefund |
| LiGe | Serum | monoklonale Gammopathie IgA Typ Lambda |
| MüTh | Serum | monoklonale Gammopathie IgA Typ Kappa |
| PIAl | Serum | monoklonale Gammopathie IgG Typ Lambda |
| ArHe | Serum | monoklonale Gammopathie IgG Typ Kappa |
| NiMi | Serum | monoklonale Gammopathie IgG Typ Kappa |
| PfHa | Serum | monoklonale Gammopathie IgM Typ Lambda |
| LiGe | Urin | kein Hinweis auf Bence-Jones-Proteinurie |
| WeKl | Urin | Bence-Jones-Proteinurie Typ Kappa, Überlaufproteinurie, Nierenschädigung |
| MaHe (05.2001) | Urin | Bence-Jones-Proteinurie Typ Kappa |
| NiKa | Urin | kein Hinweis auf Bence-Jones-Proteinurie |
| MaHe2 (09.2001) | Urin | kein Hinweis auf Bence-Jones-Proteinurie |
| LeIm | Urin | kein Hinweis auf Bence-Jones-Proteinurie |
| StHe | Urin | kein Hinweis auf Bence-Jones-Proteinurie |

Tab. K-2: Die obige Tabelle gibt eine Übersicht der mittels 2-DE untersuchten Proben, die ausgewiesenen Befunde beruhen auf den Laboruntersuchungen, die am Frankfurter Nordwestkrankenhaus durchgeführt wurden.

Probenvorbereitung

Sämtliche Proben wurden bei -20°C gelagert, nach dem Auftauen mittels eines Vortexers durchmischt und ohne weitere Probenaufarbeitung in die Rehydrierlösung überführt. Alle Proben wurden auf 18 cm 3-10NL IPG-Strips getrennt, für die 2. Dimension wurden 10-15 % T-Gradientengele oder 12,5 % T-Gele verwendet. Die Silberfärbung erfolgte nach Blum¹²¹. Von den

2-DE von Bence Jones Proteinen

Serumproben wurde zwischen 1 und 4 μl aufgetragen, die applizierten Volumina der Urinproben wurden entsprechend der Creatininwerte auf ein Äquivalent, welches 30 μl der Urinprobe LiGe entspricht, berechnet. Die Anwendung der im Methodenteil dieser Arbeit beschriebenen Standardprotokolle führte zu hochaufgelösten 2-DE-Gelen.

Bei den Urinproben zeigte sich, dass die Salzkonzentrationen doch erheblich schwanken, dies führte dazu, dass bei der IEF die Maximalspannung teilweise nicht erreicht wurde. Durch Versuche zur Leitfähigkeit der unterschiedlichen Urinproben konnten eine Schwankungsbreite (max/min) von etwa vier ermittelt werden, es wurde der Quotient aus Leitfähigkeit/Clearance ermittelt. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wäre es empfehlenswert eine Dialyse der Urinproben vorzuschalten, z. B. unter Verwendung des im Methodenteil beschriebenen Mikrodialysators. Arbeiten zur Entwicklung einer hochauflösenden 2-DE von Urinproben finden sich bei Pieper et al.¹⁵⁹.

Vergleich CE mit 2-DE

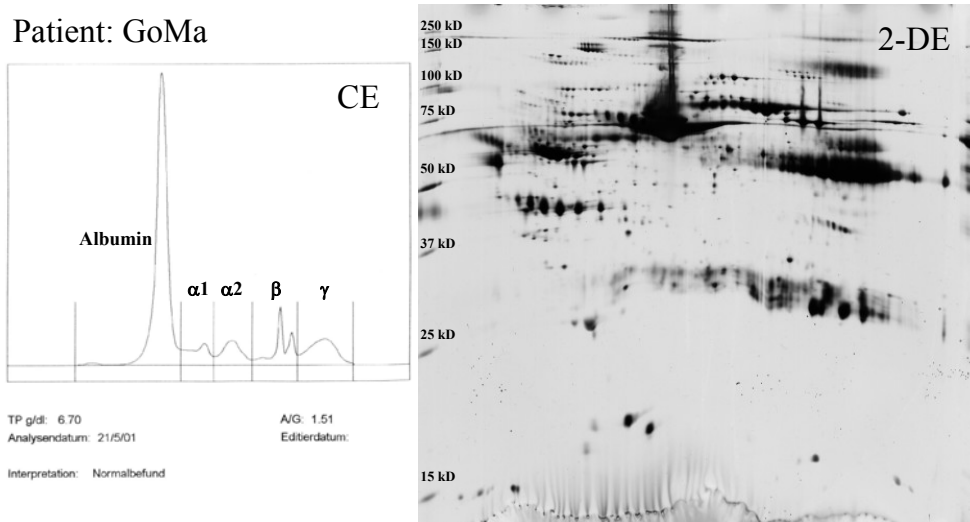


Abb. K-1: CE und 2-DE eines Patienten ohne Befund, Gel WS-251, pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 2 μl Serum

Das 2-DE-Gel der Probe GoMA wird in der Folge verwendet um Spots aufzuzeigen, die deutlich überexprimiert sind. Im Vergleich „gesund“ gegen „krank“ wird es jeweils als Referenzgel „gesund“ eingesetzt. Die Immunglobuline stellen einen beträchtlichen Anteil aller auf einem 2-DE-Gel aus einer Serum Probe abgebildeten Proteine dar. Um die Zuordnung der Spots zu den einzelnen Immunglobulinen zu verdeutlichen, wird in der folgenden Abbildung nochmals das Gel WS-192 gezeigt. Auf diesem Gel wurden 25 µg Gesamtprotein des Arzneimittels Venimmun® aufgetragen, bei diesem Präparat handelt es sich um aufgereinigte Immunglobuline (IgG 80 %, IgA 12 %, IgM 8 %). Nähere Informationen zu Immunglobulin-Arzneimitteln finden sich im Kapitel „Rekombinante Arzneistoffe“ dieser Arbeit.

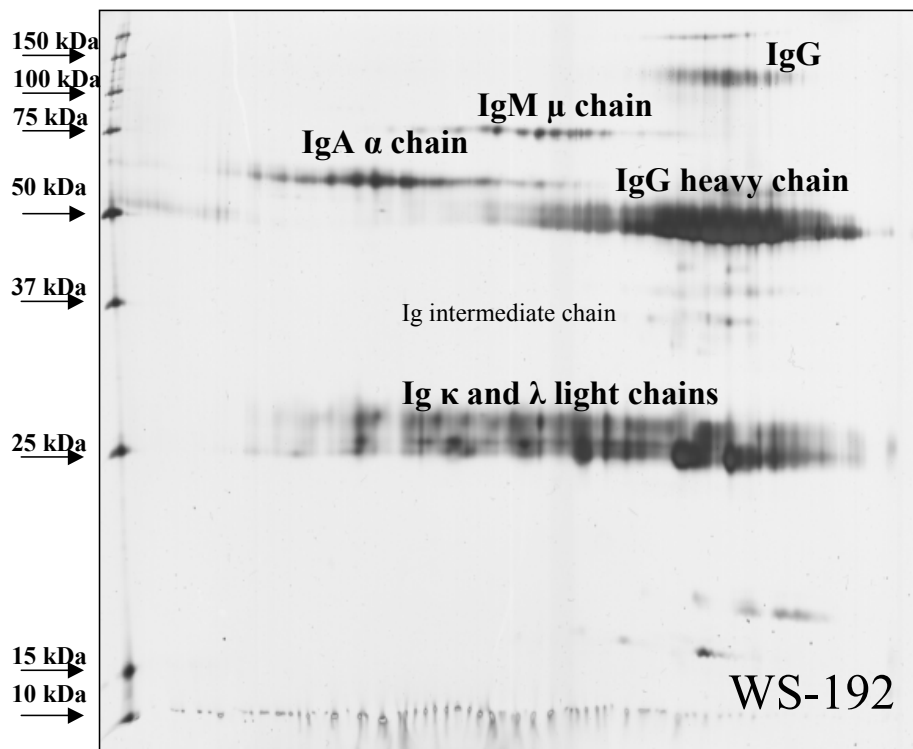
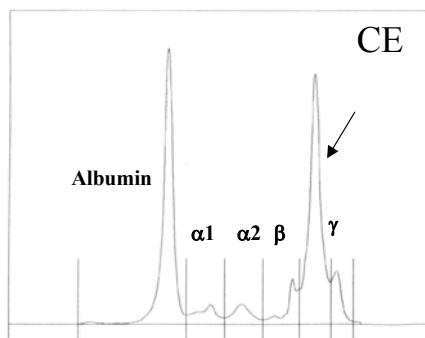


Abb. K-2: Gel WS-192, pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 25µg Venimmun®

Vergleiche CE mit 2-DE von Patienten mit Gammopathie

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch einige Gegenüberstellungen der CE-Messungen von Serumproben, die am Frankfurter Nordwestkrankenhaus durchgeführt wurden, nebst dem dort erhobenen Befund sowie den in Wien angefertigten 2-DE-Gelen.

Patient: MüTh



TP g/dl: 9.20 ++
Analysendatum: 21/5/01 Edierdatum: 21/5/01
Interpretation: Bekannte monoklonale Gammopathie IgA Typ Kappa.
M.-Gradient von 3.57 g/dl.

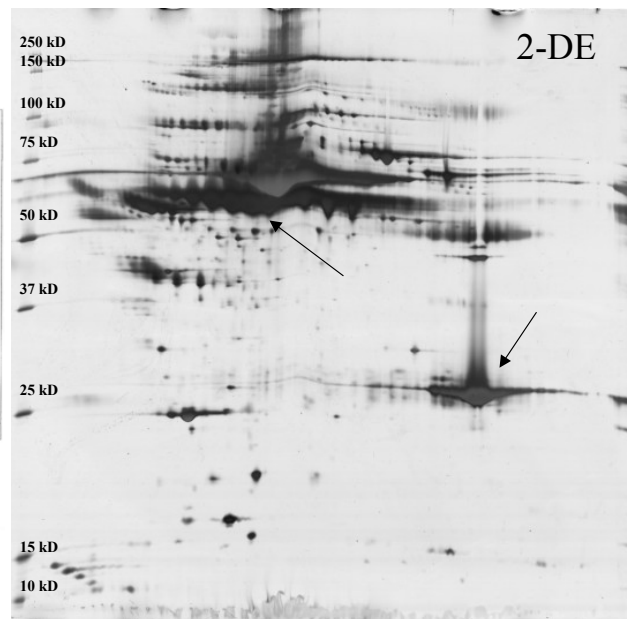


Abb. K-3: WS-253 MüTh, pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 2 μ l Serum

Man erkennt sowohl auf dem Elektropherogramm als auch auf dem zugehörigen 2-DE-Gel eine deutliche Überexpression einzelner Immunglobuline, diese sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das 2-DE-Gel deckt sich mit dem Befund einer monoklonalen Gammopathie Typ Kappa, zudem erkennt man ein sekundäres Antikörpermangelsyndrom, die im basischen zwischen 50 und 75 kDa auffindbaren IgG-Ketten sind nur schwach exprimiert.

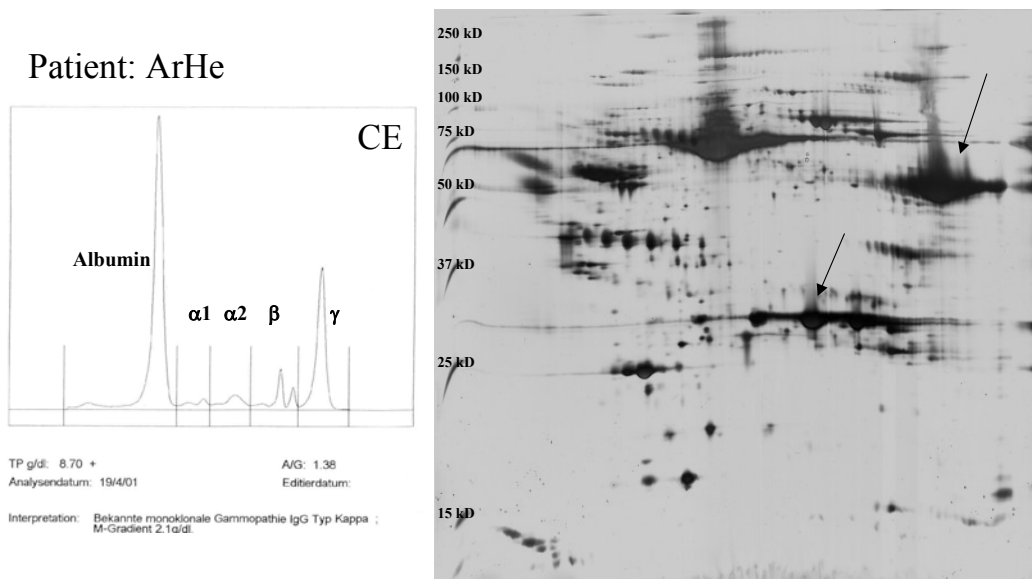


Abb. K-4: Gel WS-257 ArHe, pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 2 μ l Serum

Auch hier erkennt man sowohl auf dem Elektropherogramm als auch auf dem 2-DE-Gel eine signifikante Erhöhung der Gamma-Fraktion, respektive der Leichtketten vom Typ Kappa. Der Vergleich mit dem 2-DE-Gel von MüTh zeigt, dass im Fall ArHe andere Immunglobulinketten deutlich überexprimiert werden (siehe hierzu die mit Pfeilen markierten Spots auf dem Gel WS-257).

Bei der Gegenüberstellung der beiden Methoden erkennt man, dass mittels 2-DE aufgrund der 2 Dimensionen eine höhere Auflösung erzielt werden kann und damit mehr Information zur Verfügung steht (pI, MW, Intensität). Die CE ist sicherlich hinsichtlich der Präzision bei der Quantifizierung überlegen, dafür ist aber die Auflösung limitiert. Die Tatsache, dass sich einzelne Proteine überlagern, kommt demnach bei der CE stärker zum Tragen als bei der 2-DE. Da die Überexpression einzelner Proteine zu einem sekundären Antikörpermangelsyndrom führen kann, ist es durchaus denkbar, dass wenn sich eine derartige Kompensation in derselben CE-Fraktion abspielt, eine maligne Entartung unentdeckt bleibt.

2-DE von Bence Jones Proteinen

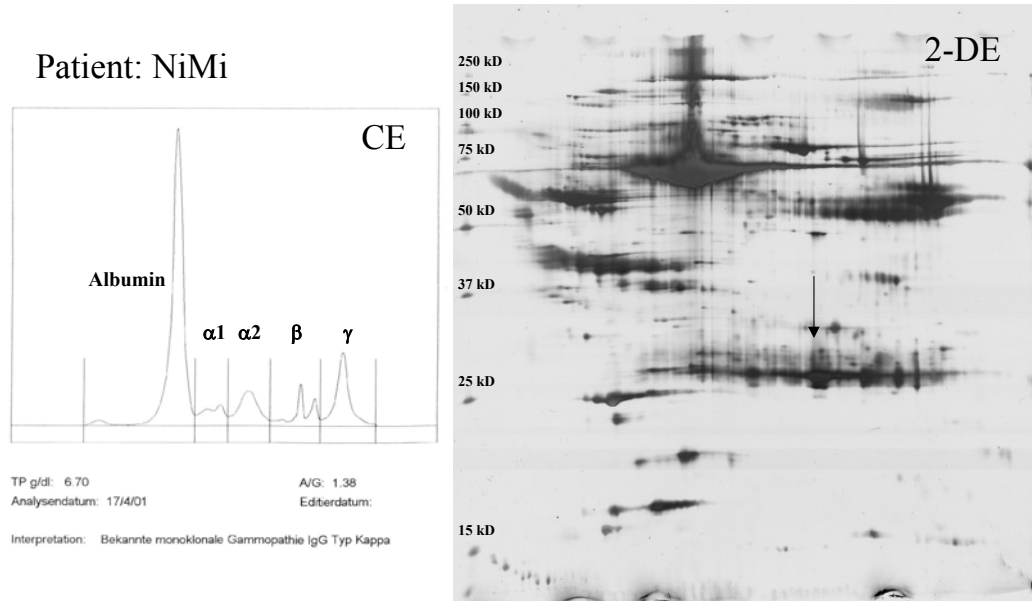


Abb. K-5: Gel WS-259 NiMi, pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T 2 μ l Serum

Im Fall des Patienten NiMi ist die Überexpression weniger stark ausgeprägt als bei ArHe oder MüTh, man erkennt jedoch, dass in der Gamma-Fraktion einzelne Immunglobuline überexprimiert werden.

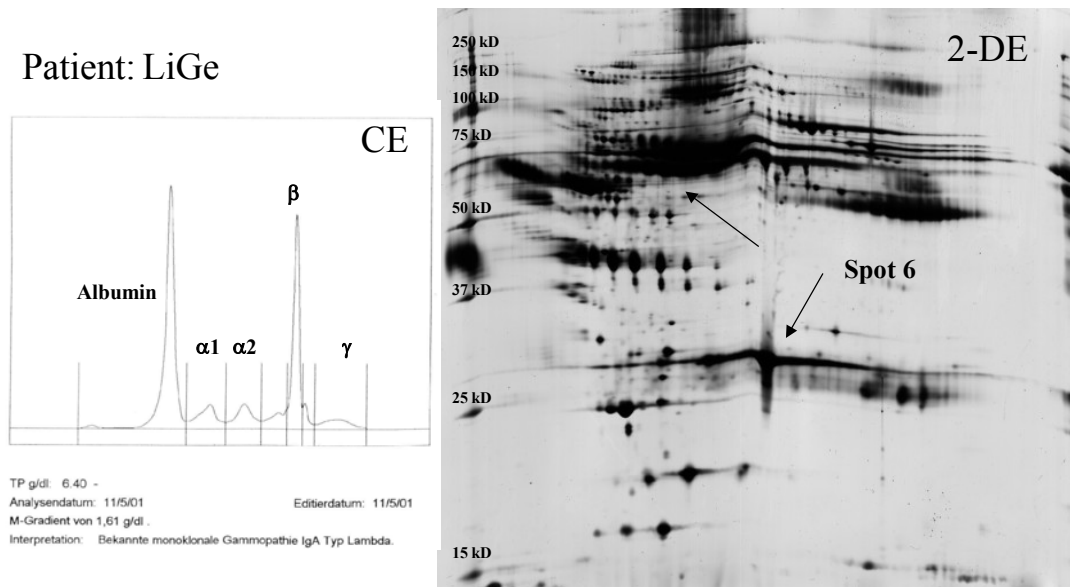


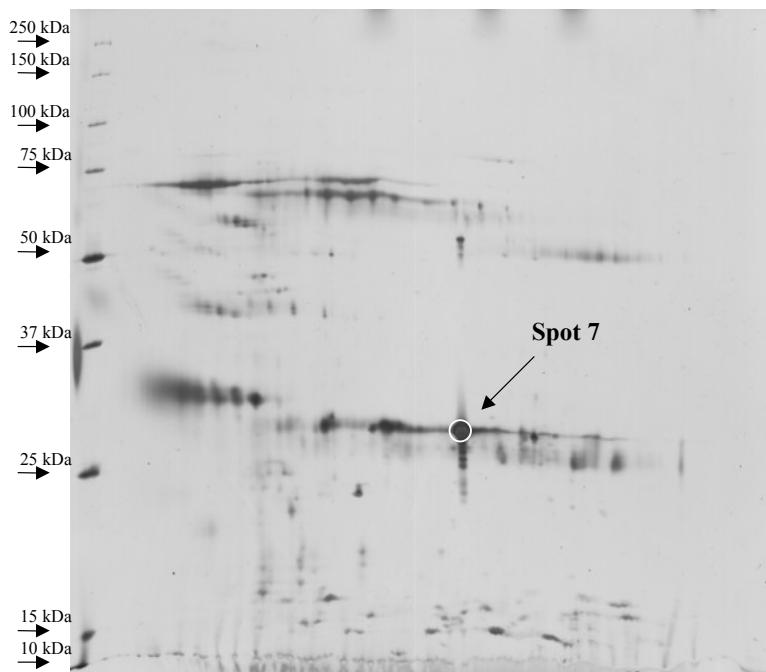
Abb. K-6: Gel WS-260 LiGe, pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 2 μ l Serum

Als abschließendes Beispiel der CE / 2-DE-Gegenüberstellung von Serum Proben wird ein Fall dargestellt, bei dem es in der Beta-Fraktion zu einer signifikanten Überexprimierung kommt. Die Diagnose des Nordwestkrankenhauses lautet monoklonale Gammopathie IgA Typ lambda. Man sieht auf dem 2-DE-Gel sehr deutlich ein überexprimiertes Protein im Bereich 28-30 kDa, $pI \sim 7$.

Es wurde nur eine Auswahl der erstellten 2-DE-Gele gezeigt, auch bei den anderen in der Tabelle (K-2) aufgeführten Proben deckt sich der CE-Befund mit den Ergebnissen der 2-DE. Wie bereits erwähnt, bringt die 2-DE gegenüber der CE aufgrund der besseren Auflösung mehr Information.

Untersuchung von Urinproben mittels 2-DE auf Gammopathien

Eine der untersuchten Urinproben stammt vom Patienten LiGe, in dieser Urinprobe konnten vom Nordwestkrankenhaus **keine** Immunglobuline nachgewiesen werden.



2-DE von Bence Jones Proteinen

Abb. K-7: Gel WS-271 LiGe, *pI* 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 30 µl Urin

Das oben gezeigte 2-DE-Gel (WS-271) zeigt sehr deutlich, dass man das in der Serumprobe mittels 2-DE als überexprimiert gefundene Protein auch in der Urinprobe nachweisen kann.

Um sicherzustellen, dass die auf den Gelen der Serum- und der Urin-Probe von LiGe markierten Proteine (MW 28-30 kDa, *pI* 7) identisch sind, wurden beide Spots ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI-MS analysiert (zur praktischen Durchführung des tryptischen Verdau und der MALDI Messung siehe Experimenteller Teil).

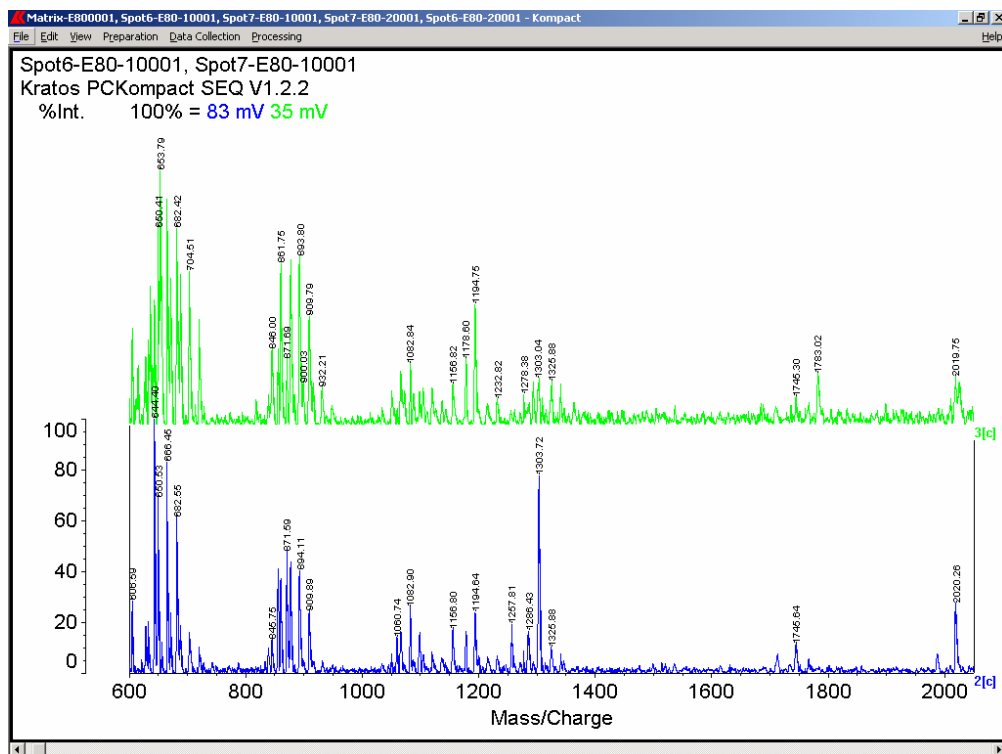


Abb. K-8: Ausschnitt der MALDI-MS Spektren des überexprimierten Proteins LiGe, Spot 6 entspricht der Serum Probe, Spot 7 der Urinprobe.

Die weitgehende Übereinstimmung der Peptide zeigt, dass der Spot der Urinprobe LiGe mit dem der Serum Probe identisch ist.

Versuche zur Strukturaufklärung mittels MALDI-MS

Der Versuch über eine Datenbanksuche (www.expasy.ch und www.matrixscience.com) die beim tryptischen Verdau des Spots 6 der Probe LiGe erhaltenen Peptide einem oder mehreren Proteinen zuzuordnen war nicht erfolgreich. Bei genauerer Betrachtung verwundert dies auch nicht weiter, da die Immunglobuline aus variablen und konstanten Bereichen aufgebaut sind. So wird man voraussichtlich nur die konstanten Regionen finden. Darüber hinaus gibt es zwei Probleme: Die konstanten Bereiche der leichten Ketten stellen nur einen Teil des gesamten Proteins dar und haben demnach ein niedriges Molekulargewicht, ein Großteil der mittels MALDI-MS gemessenen Peptide gehört jedoch zu anderen Proteinabschnitten. Dies ist die Begründung dafür, dass die üblicherweise angewandte Strategie der Proteinidentifizierung nicht erfolgreich war.

Es musste also eine Vorauswahl an Proteinen getroffen werden, mit denen die entsprechenden Massen aus dem MALDI-Versuch vergleichen kann. Hierzu wurden aus der Swissprot Datenbank alle unter dem Suchkriterium „immunoglobulin AND human“ gefundenen Proteine einem theoretischen tryptischen Verdau unterzogen (Trypsin, $[M+H]^+$, maximal 1 MC (miss-cleavage), möglicherweise Acrylamidaddukte, möglicherweise Methionin oxidiert, möglicherweise Cysteine carboxymethyliert, Massen average).

Die Massen des tryptischen Verdaus des Spots 6 wurden nun mit denen der Immunglobulin Peptide aus den theoretischen Verdauen verglichen. Die beste Übereinstimmung wurde für das Protein LAC_HUMAN (Swissprot P01842) erhalten, diese wird in der Swissprot-datenbank als „Ig lambda chain C regions“ bezeichnet. Die Struktur wurde bereits Ende der 60er Jahre aufgeklärt¹⁶⁰, der Titel der Veröffentlichung lautet: „Immunoglobulin lambda-chains. The complete amino acid sequence of a Bence Jones Protein.“. In der folgenden Abbildung ist nochmals das MALDI-MS Spektrum gezeigt. Die

Übereinstimmenden Peptide wurden gekennzeichnet, die Sequenzabdeckung beträgt 72 %.

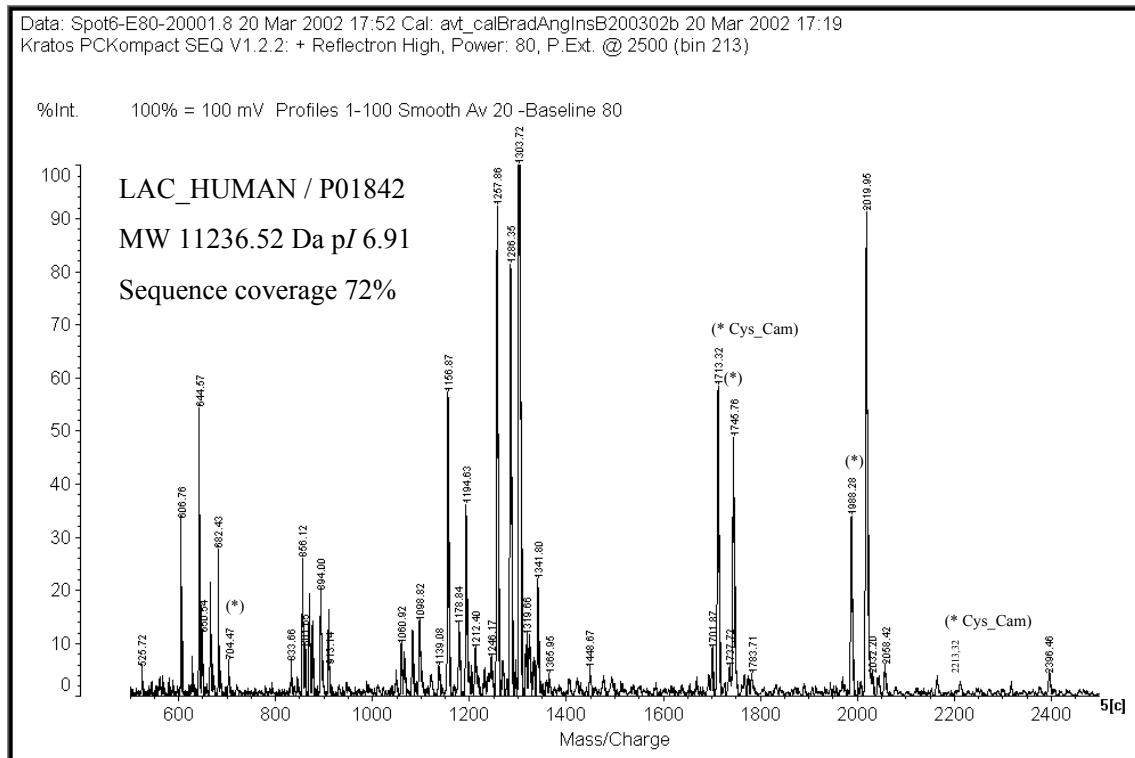


Abb. K-9: Ausschnitt des MALDI-MS Spektrums des Spots 6 [LiGe] Proteine, die LAC_HUMAN zugeordnet werden konnten, sind mit (*) gekennzeichnet.

LAC_HUMAN

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA
WKADSSPVKA GVETTTPSKQ SNNKYAASSY **LSLTPEQWKS**
HRSYSCQVTH EGSTVEKTVA PTECS

Die Abschnitte der Aminosäuresequenz, die mittels MALDI-MS identifiziert wurden, sind fettgedruckt dargestellt.

Es wurden weitere Urinproben, die ohne Befund von Bence Jones Proteinen vom Nordwestkrankenhaus zur Verfügung gestellt wurden, mittels 2-DE untersucht.

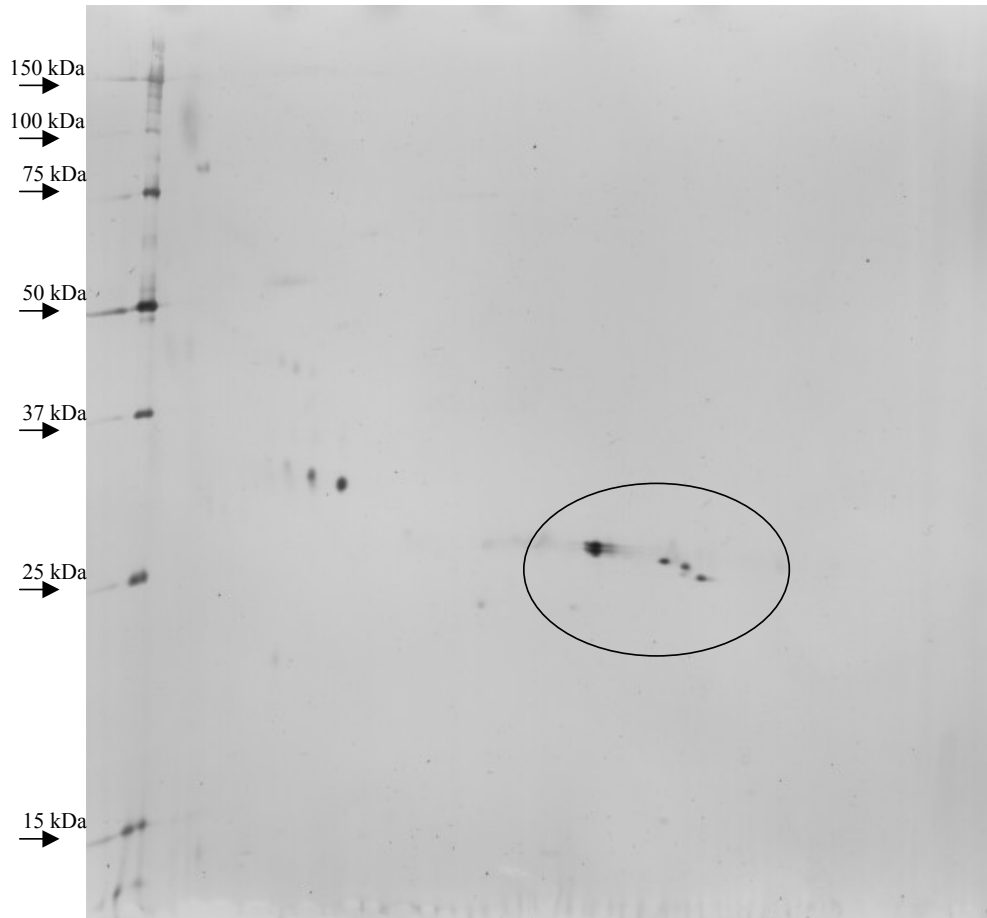


Abb. K-10: WS-280 MaHe2, pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 17,46 µl Urin

Die Proteine im umrahmten Bereich liegen dort, wo man die Leichtketten der Immunglobuline erwartet, demnach handelt es sich im vorliegenden Fall (MeHa2) mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Bence Jones Proteinurie.

Eine zu einem früheren Zeitpunkt genommene Urinprobe des Patienten MeHa, wurde vom Nordwestkrankenhaus als Bence Jones positiv identifiziert, dieser Befund deckt sich mit dem 2-DE Ergebnis (Abbildung nicht gezeigt).

2-DE von Bence Jones Proteinen

In einem weiteren Fall (NiKa), bei dem ebenfalls im Urin durch das Labor des Nordwestkrankenhauses keine Bence Jones Proteine nachgewiesen werden konnten, der aber einen Bence Jones Protein positiven Vorbefund hatte, ließen sich mittels 2-DE Immunglobulin Leichtketten nachweisen. Gleiches gilt für die Urinprobe von StHe, wobei nur wenige sehr schwache Spots im Bereich der Leichtketten sichtbar wurden (Abbildung nicht gezeigt). Im Fall des Patienten LeIm konnten auch mit 2-DE keinerlei Proteine im Urin nachgewiesen werden, was den Befund des Nordwestkrankenhauses bestätigt. Die folgende Abbildung zeigt ein 2-DE-Gel eines Patienten mit einer massiven Proteinurie. Die Diagnose des Nordwestkrankenhauses lautet: Bence Jones Proteinurie Typ Kappa, Überlaufproteinurie und glomeruläre Nierenschädigung. Dies deckt sich mit dem 2-DE Befund.

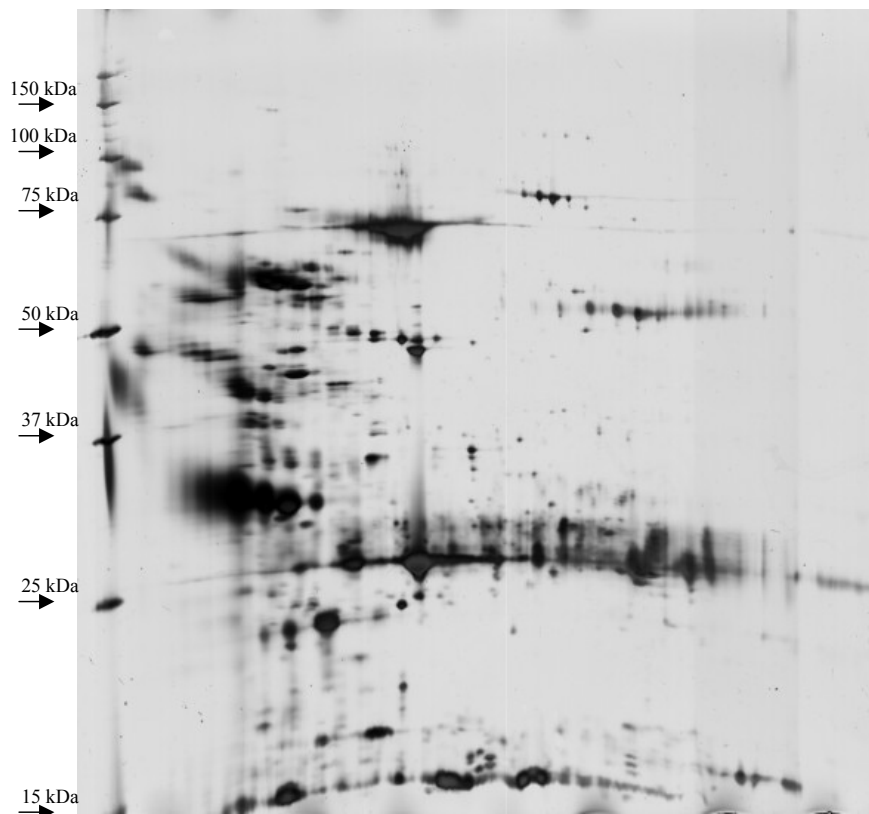


Abb K-11: WS-275 WeK1, pI 3-10 NL, 18 cm, 10-15 % T, 23,17 µl Urin

Die Vielzahl der auf dem Gel WS-275 sichtbaren Spots zeigt eine massive Proteinurie. Im Bereich 26-30 kDa finden sich die Ig-Leichtketten, bei etwa 55 kDa und pI 7,5-8 die IgG schweren Ketten (vergleiche hierzu auch Gel WS-192, Venimmun).

Fazit zur 2-DE von Bence Jones Proteinen

Immunglobuline lassen sich gut mittels 2-DE abbilden. Da sie einen signifikanten Anteil an der Gesamtproteinmenge stellen, ist eine Aufkonzentrierung vor der Analyse nicht erforderlich. Eine Probenaufarbeitung der Serumproben ist nicht erforderlich, man kann also unmittelbar mit der IEF beginnen, dies ist auch für die Reproduzierbarkeit vorteilhaft, da jede Manipulation der Probe, wie beispielsweise Fällung, zum Verlust von Proteinen führen kann. Auch wenn bei den hier gezeigten Urinproben keine Dialyse der Proben vorgenommen wurde, sollte dieser Schritt zur Entsalzung vorgeschaltet werden.

Hinsichtlich der Auflösung ist die 2-DE der CE überlegen. In einigen Fällen konnten die am Nordwestkrankenhaus als Bence Jones negativ getesteten Urinproben doch mittels 2-DE als Bence Jones positiv identifiziert werden. Nachteile der 2-DE sind: Die Methode ist zeitaufwendig, schlecht automatisierbar und kostenintensiv. Im Gegensatz dazu ist die CE sehr gut automatisiert und führt rasch zu einem Ergebnis. Wie bereits eingangs erwähnt, kann die 2-DE als zusätzliche Methode in kritischen oder unklaren Fällen wertvolle Information liefern.

Automation - Proteomat

Das Färben der Gele und hier insbesondere die Verwendung der Silberfärbung, ist zeitaufwendig und von der Tätigkeit her wenig anspruchsvoll. Für die im Rahmen dieser Arbeit am häufigsten angewendete Färbung, Silberfärbung nach Blum¹²¹, benötigt man etwa 3 Stunden. Dabei kann man, außer beim ersten Färbeschritt, der einstündigen Fixierung, kaum eine sinnvolle Nebenbeschäftigung durchführen. Es ist durchaus möglich an einem Tag zwei Ansätze durchzuführen (2. Dimension + Färbung), hierfür müssen bei guter Vorbereitung etwa 12 Stunden veranschlagt werden. Stünde ein Färbeautomat zur Verfügung, würde sich diese Zeit um 3 Stunden auf etwa 9 Stunden verkürzen. Die Überlegung, die Färbung zu automatisieren, beinhaltet demnach nicht nur, sich einer wenig beliebten Tätigkeit zu entledigen, sondern auch den Probendurchsatz bei angemessenen Arbeitszeiten zu steigern.

Die Fa. Amersham Biosciences bietet einen Färbeautomaten an, dieser verfügt jedoch über lediglich eine Färbeschale, was die Anzahl der Gele begrenzt, außerdem ist das Gerät für einen Universitätsbetrieb relativ teuer.

Ziel der Automation war einen flexiblen, modularen Färbeautomaten zu entwickeln und zu bauen, der über einen PC angesteuert werden kann. Die Flexibilität bezieht sich darauf, dass unterschiedliche Stückzahlen an Gelen gleichzeitig gefärbt werden können und das man unterschiedliche Färbeprotokolle verwenden kann.

Die Planung erfolgte gemeinsam mit Prof. Kratzel. Die technische Ausgestaltung sowie die Programmierung der Steuersoftware wurden von Prof. Dr. Kratzel durchgeführt.

Proteomat

Die Färbelösungen können in einen der insgesamt 6 Kanister (K1-K6) gefüllt werden. Jeder dieser Kanister ist mit einem steuerbaren Magnetventil versehen und kann vom PC aus über die Steuereinheit geöffnet und wieder geschlossen werden. Die Dosierung der Lösungsvolumina erfolgt über das Zeitintervall, es besteht die Möglichkeit unterschiedliche Viskositäten und gegebenenfalls unterschiedliche Füllhöhen der Kanister bei der Wahl der Zeitintervalle zu berücksichtigen. Aus den Kanistern gelangt die Lösung in ein Speichergefäß (S), von hier werden die Färbeschalen (S1-S3) mittels der zugehörigen Pumpen (P1-P3) befüllt. Das deionisierte Wasser, welches zum Waschen verwendet wird, gelangt direkt aus der Leitung in das Speichergefäß und wird von hier auf die Schalen verteilt. Bei den nur kurzen Waschschrritten besteht die Möglichkeit deionisiertes Wasser zu- und gleichzeitig abzupumpen.

Während der ersten Testläufe zeigte sich, dass es beim Kontakt der Silberlösung mit den Messingventilen aufgrund des positiveren Normalpotentials der Silberionen zur Reduktion von $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ kommt. Die Silberlösung wurde in der Folge mittels einer weiteren Pumpe aus einem Glasgefäß in das Speichergefäß gepumpt. Die Schalen werden auf einem herkömmlichen Schüttler hin und her bewegt, um einen gleichmäßigen Kontakt der Lösung mit den Gelen in der Färbeschale zu gewährleisten. Das Abpumpen der Lösungen aus den Schalen und die Überführung der Lösungen in das Abfallgefäß erfolgt ebenfalls durch Pumpen (P4-P6). Es besteht die Möglichkeit eine Differenzierung der Abfälle vorzunehmen, so sollte beispielsweise bei der Silberfärbung, die Silberlösung getrennt von den restlichen Abfällen entsorgt werden.

Die nachfolgende Skizze (Abb. P-1) zeigt den schematischen Aufbau der Anlage, Abbildung P-2 zeigt ein Foto des im Labor installierten Prototypen des Färbeautomats.

Proteomat

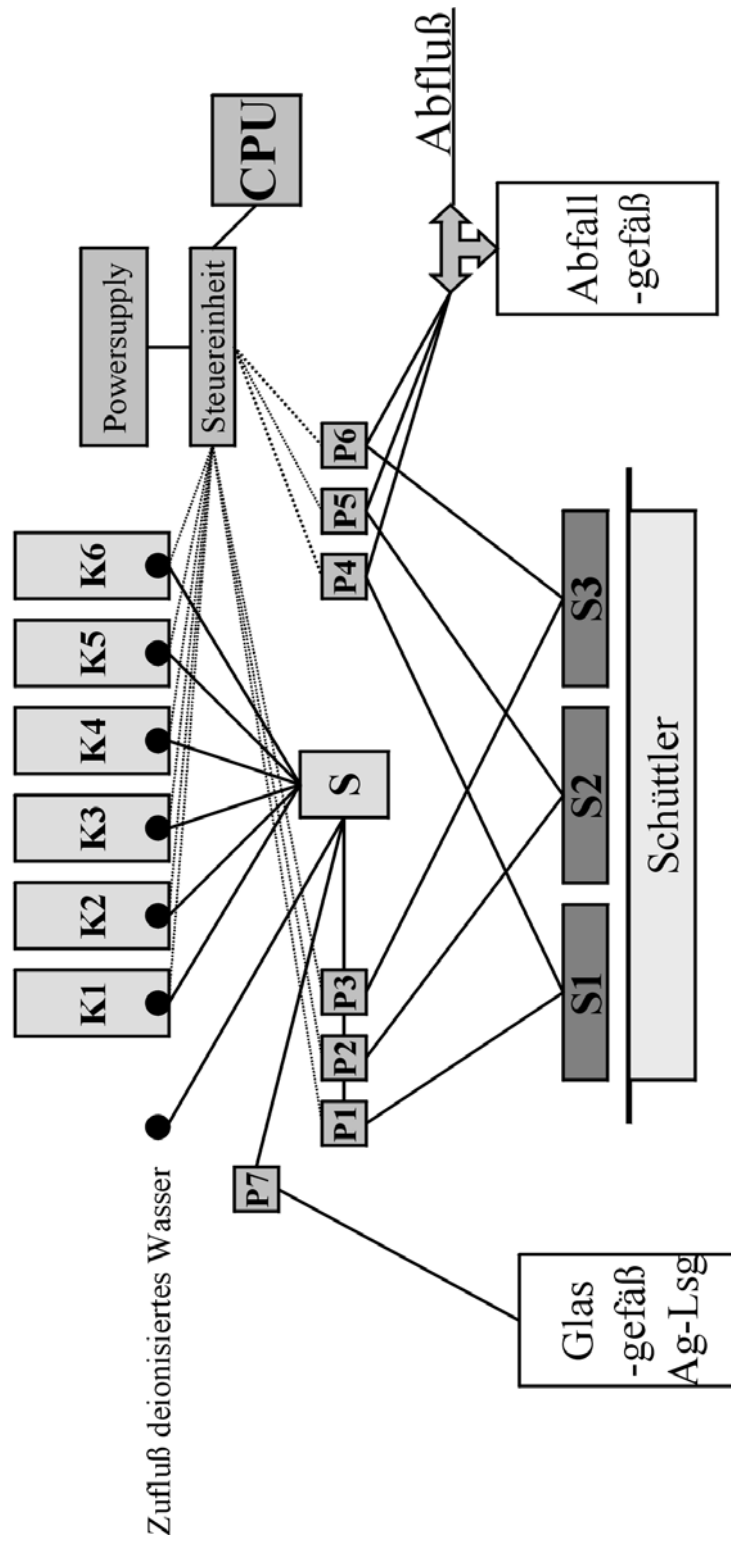


Abb. P-1: Schematischer Aufbau des Proteomaten mit 3 Färbeschalen.

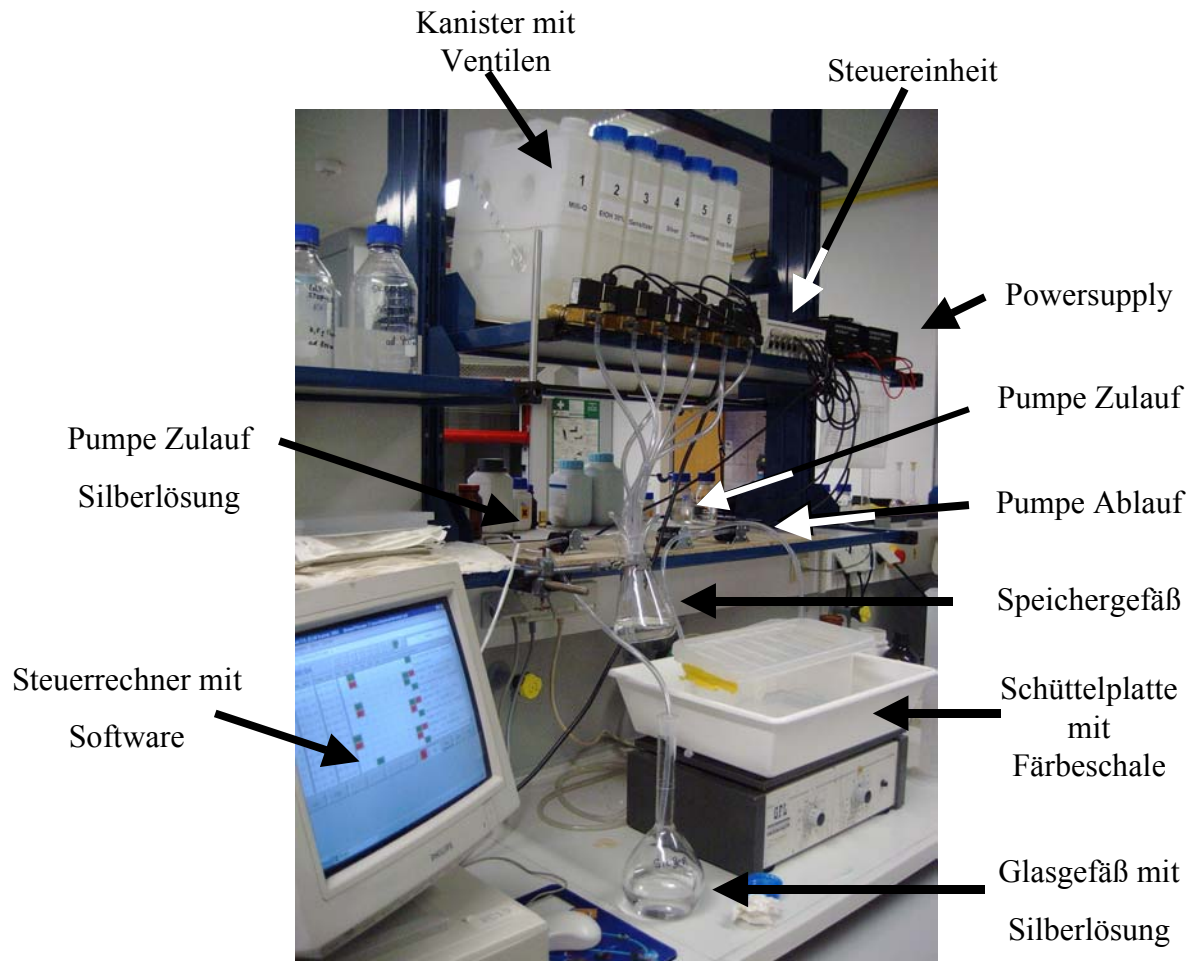


Abb. P-2: Prototyp des Proteomat

Handgefärbtes Gel vs. Proteomat gefärbtes Gel

Die nachfolgenden Gelausschnitte (Abb. P-3) zeigen einen Vergleich zwischen der konventionellen Silberfärbung von Hand (A) und der Verwendung des Färbeautomaten (B). Gel B wurde ohne manuelle Intervention gefärbt. Da es sich um einen Testlauf des Proteomaten handelt wurden 1-DE Minigele verwendet, bei der Probe handelt es sich Molekulargewichtsstandard.

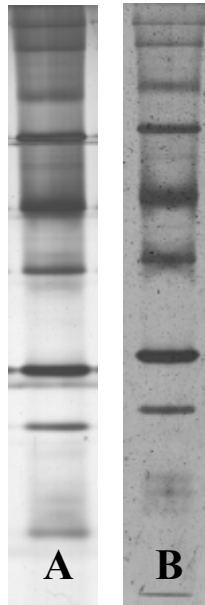


Abb. P-3 Gelausschnitte: Gel A wurde von Hand gefärbt, Gel B mit dem Proteomat

Steuersoftware zum Proteomat

Die von Prof. Kratzel erstellte Steuersoftware basiert auf einer Borland Datenbank, die Ansteuerung der Elektrischen Bauteile des Proteomaten erfolgt über Active X Steuerelemente.

Der Proteomat wurde erst gegen Ende dieser Arbeit fertiggestellt und konnte somit nicht mehr zur routinemäßigen Färbung von 2-DE-Gelen genutzt werden. Die Testläufe haben die Funktionalität des Systems gezeigt.

Experimenteller Teil

Verwendete Chemikalien

Aceton, puriss, p.a. (Fluka, Buchs, Schweiz)

Acetonitril, "Baker HPLC analyzed" (J.T. Baker B.V., Deventer, Holland);

Acrylamid 2X, research grade (SERVA Electroph. GmbH, Heidelberg, D)

Agarose SERVA high EEO, research grade (SERVA, Heidelberg, D)

Albumin, Bovine; for SDS Gel Electrophoresis (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

Ammoniumhydrogencarbonat, purum p.a. (Fluka, Buchs, Schweiz).

Ammoniumpersulfat, analytical grade (SERVA, Heidelberg, D)

Angiotensin II, Mass Spec Standard (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

Bradykinin, Fragment 1-7, Mass Spec Stand. (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

Bromphenolblau. Na-Salz, research grade (SERVA, Heidelberg, D)

n-Butanol, zur Synthese (Merck, Darmstadt, D)

Calciumchlorid-dihydrat, puriss p.a. (Fluka, Buchs, Schweiz).

CHAPS, research grade (SERVA, Heidelberg, D)

Coomassie Brilliant Blue G 250, pure (SERVA, Heidelberg, D)

α -Cyano-4-hydroxymizsäure wasserfrei, (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

Demineralisiertes Wasser

Dimethylsulfoxid, puriss. (Fluka, Buchs, Schweiz)

Dithiothreitol, research grade (SERVA, Heidelberg, D)

DryStrip Cover Fluid (Pharmacia Biotech AB, Upsala, Schweden)

EDTA-dinatrium, analytical grade (SERVA, Heidelberg, D)

Essigsäure conc., chem. rein 99.0-100.5 % (Gatt-Koller)

Ethanol 96 % vergällt mit Toluol.

Formaldehyd-Lösung 36.5 %, puriss. p.a. (Fluka, Buchs, Schweiz)

Glycerin, plant (SERVA, Heidelberg, D)

Glycin, analytical grade (SERVA, Heidelberg, D)

Harnstoff, analytical grade (SERVA, Heidelberg, D)

Experimenteller Teil

Insulin, Oxidized B Chain, Mass Spec Std (Sigma-Aldrich GmbH, Steinh., D)

Iodacetamid, research grade (SERVA, Heidelberg, D)

4-Iodphenol, 99 % (Acros organics, New Jersey, USA)

IPG buffer, pH 3-10 NL (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, SE)

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat, pro analysi (Merck)

Kaliumhexacyanoferrat (Neuber GmbH, Wien, Österreich).

Magnesiumchlorid-hexahydrat, purum p.a. (Fluka, Buchs, Schweiz)

Methanol, zur Analyse (Müller-Scherr)

Milli-Q Wasser, Resistiv. 18.2 MΩ·cm bei 25° C (Millipore, Bedford, USA).

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, res. grade (SERVA, Heidelberg, D)

N,N'-Methylenbisacrylamid 2X, research grade (SERVA, Heidelberg, D)

Natriumcarbonat wasserfrei, zur Analyse (Riedel-de Haën)

Natriumchlorid, (GATT-KOLLER GmbH & Co. Absam, Österreich)

Natriumdodecylsulfat, for biochemical application (SERVA, Heidelberg, D)

Natriumhydrogenphosphat, 99 % (Sigma Aldrich)

Natriumthiosulfat wasserfrei, purum p.a., (Fluka, Buchs, Schweiz)

Phosphorsäure 85 %, "Baker analyzed" (J.T. Baker B.V., Deventer, Holland)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

Prec. protein Standard, Unstained, Broad Range (Bio-Rad Lab., Inc. USA)

Salzsäure, p.a. (Donauchem Handelsges.mbH, Wien, Österreich)).

Silbernitrat, "Baker analyzed" reagent (J.T. Baker B.V., Deventer, Holland)

Thioharnstoff, puriss. p.a. (Fluka, Buchs, Schweiz)

Trichloressigsäure, for protein sequence analysis (Fluka, buchs, Schweiz).

Tris(hydroxymethyl)aminomethan, research grade (SERVA, Heidelberg, D)

Triton X-100 (SERVA, Heidelberg, D)

Trypsin, Sequencing grade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D).

Wasserstoffperoxid

Enzyme zur Deglykosylierung

Verwendete Geräte

PROTEAN[®] II xi Multi-Gel Casting Chamber

Bio-Rad; Katalog Nummer 165-2025

Komponenten: Giesskammer, Lange und kurze Glasplatten, Spacer, Alignment card;

Gel size: 20 x 20 cm

GRADIENT MAKER SG 500 (500 ml)

Amersham Pharmacia Biotech; Catalog Number 11238-2/28/89

IPGPhor[™] Isoelectric Focusing System

Amersham Pharmacia Biotech; Catalog Number 80-6415-35

PROTEAN[®] II xi Cell

Bio-Rad

Komponenten: Untere Puffer-Kammer, Deckel mit Elektroden, Cooling core, Gießstand mit Alignment slot, Sandwich Klemmen, Alignment card.

MultiTemp III

Amersham Pharmacia Biotech; Catalog Number 18-1106-33

PowerPac 1000 (Power supply)

Bio-Rad; Catalog Number 165-5055

Mini-PROTEAN[®] 3 Cell

Bio-Rad; Catalog Number 165-3301

Compounds:

Experimenteller Teil

Hofer® SE 1200 Easy Breeze™

Amersham Pharmacia Biotech; Catalog Number 80-6290-71

Kratos Kompact SEQ

MALDI-TOF-MS

Ultraschallsonotrode

Bandelin, Deutschland

Speedvac

Milli-Q UF Plus und Milli-RO 5 Plus

Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

Röntgenfilme

Verwendete Software

PDQuest 6.2.1

BioRad

Kompact MALDI Software Version 1.2.2

Kratos

Probenaufschluß und Proteinsolubilisierung

Sowohl die Aufschlußmethode als auch die Zusammensetzung des Lysispuffers richten sich nach Art und verfügbarer Menge der Probe.

Das Verhältnis Probe zu Lysispuffer sollte so gewählt werden, dass die resultierende Proteinkonzentration etwa 10 µg/µl beträgt.

Lysispuffer enthalten in der Regel Detergentien, Harnstoff und/oder Thioharnstoff als Chaotrop sowie Proteaseinhibitoren. Direkt vor der Verwendung kann Dithiothreitol zur Reduktion von Disulfidbrücken zugesetzt werden.

Folgende Aufschlußmethoden wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Ultraschallsonotrode:

3 x 2-5 sec bei mittlere bis niedriger Energie (20 %) in einem Eppendorf Cap beschallen, dabei die Mischung aus Probe und Lysispuffer in einem Eisbad kühlen. Zwischen den einzelnen Beschallungen warten bis sich der Schaum abgesetzt hat. Diese Methode eignet sich insbesondere für kleine Volumina (100-500 µl), gröbere Gewebestücke müssen zuvor zerkleinert werden. Sehr gut geeignet für Zellen und weiche Gewebestücke.

Ultraturrax:

3 x 10-20 sec unter Kühlung die Probe im Lysispuffer zerkleinern. Diese Methode eignet sich auch für gröbere Gewebestücke. Mit dem am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien verfügbaren Ultraturrax lassen sich nur größere Volumina bearbeiten (>2 ml).

Zermahlen der Probe mittels eine Glas-Plümpers

„Freeze-thaw“

3 Zyklen aus kurzem Einfrieren der Mischung aus Probe und Lysispuffer in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen. Diese Methode ist

Experimenteller Teil

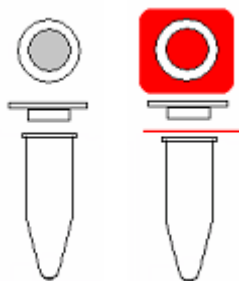
ebenfalls für kleine Volumina geeignet. Außerdem lassen sich auf diese Weise Zellen in einem hypotonen Puffer aufschließen ohne die Zellkompartimente zu zerstören. Durch Zentrifugation können dann die einzelnen Zellkompartimente getrennt werden.

Unabhängig von der gewählten Aufschlußmethode sollte im Anschluß eine Zentrifugation durchgeführt werden (10 min bei 20.000 g), dies dient dazu nicht solubilisierte Zell- bzw. Gewebebestandteile abzutrennen. Der resultierende Überstand wird in ein neues Eppendorf Cap überführt und das Pellet verworfen.

Lagerung und Handhabung der Proben

Proben sollten nach Möglichkeit frisch aufgearbeitet werden. Lange Standzeiten sind zu vermeiden. Um Proteinabbau zu verhindern, müssen die Proben ununterbrochen gekühlt werden. Nach der Aufarbeitung können Proben in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagert werden. Um häufiges auftauen und wieder Einfrieren der Proben zu vermeiden sollten die Proben entsprechend der Versuchsplanung aliquotiert werden.

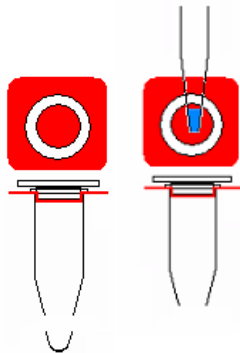
Microdialyse



Schritt 1 und 2

Eine Möglichkeit Proben zu entsalzen ist die Dialyse. Da häufig nur sehr geringe Probenvolumina zur Verfügung stehen wurde ein Verfahren zur Microdialyse entwickelt. Mit dieser Methode wurden Probenvolumina von 10 bis 100 μl dialysiert.

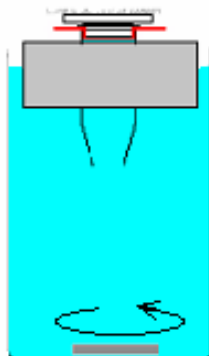
Man benötigt lediglich eine Dialysemembran (Cut off 3,5 kD) sowie einige Eppendorf Caps.



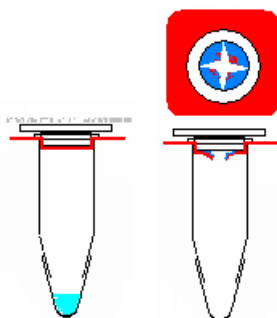
Schritt 3 und 4



Schritt 5



Schritt 6



Schritt 7 und 8

Im ersten Schritt wird der Deckel eines Eppendorf Caps vom Rumpf getrennt und ausgehöhlt. Als zweiter Schritt wird die Dialysemembran kurz in Wasser getaucht und zwischen Deckel und Rumpf des Eppendorf Caps gelegt, der Deckel wird nun auf den Rumpf gedrückt. Um sicherzustellen, dass die Membran dicht abschließt und nicht beschädigt wurde, sollte man 200 μ l Milli-Q Wasser auf die Membran geben und 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren, dabei muss der Boden des Eppendorf Caps trocken bleiben.

Im dritten Schritt wird der Boden des Eppendorf Caps mit einer Rasierklinge abgetrennt. Als nächstes kann die zu dialysierende Probe auf die Membran aufgebracht werden. Als fünfter Schritt wird der Deckel mit Parafilm verschlossen, Parafilm darf nicht mit der Probe in Kontakt kommen. Dann wird der Rumpf des Eppendorf Caps vollständig mit Milli-Q Wasser gefüllt, es ist darauf zu achten, dass die Dialysemembran direkten Kontakt mit dem Milli-Q Wasser hat. Der fertige Microdialysator wird nun in eine Styroporhalterung eingebracht und über Nacht in einem 400 ml Becherglas dialysiert. Das Becherglas wird in einer mit Eiswasser gefüllten Styroporbox platziert und mit einem Magnetrührer durchmischt. Für Schritt 7 und 8 benötigt man zwei Böden von Eppendorf Caps, nach Beendigung der Dialyse wird das Milli-Q Wasser aus dem Rumpf des Eppendorf Caps entfernt und einer der Böden



Schritt 9

aufgesetzt. Anschließend wird 3 min bei 500 rpm zentrifugiert dadurch wird das restliche noch anhaftenden Milli-Q Wasser entfernt. Der mit Wasser gefüllte Boden wird gegen einen frischen ausgetauscht. Zur dialysierten Probe gibt man 60 μ l Rehydrierlösung, diese Mischung wird nun Mehrfach mit der Pipette aspiriert, um an der Membran anhaftende Proteine in Lösung zu bringen, dann wird die Membran mit einer Nadel kreuzförmig zertrennt. In einem letzten Zentrifugationsschritt (3 min bei 10.000 g) wird die Mischung aus Probe und Rehydrierlösung in den abnehmbaren Boden des Eppendorf Caps überführt.

Proteinbestimmung nach Bradford¹⁶¹

Mittels des Bradford Assays wird die Proteinkonzentration im Vergleich zu einer Rinderserumalbumin (BSA) Lösung bekannter Konzentration bestimmt. Die Messung erfolgt spektralphotometrisch bei 595nm.

Den Coomassie Farbstoff in Ethanol lösen, etwas Wasser zu geben, langsam mit der Orthophosphorsäure vermischen und mit Milli-Q Wasser ad 250 ml auffüllen. Das fertige Bradford Reagenz kühl lagern, mindestens 2 Monate haltbar.

Herstellung des BSA Standards

Es ist empfehlenswert eine 0,5 % BSA Lösung in Milli-Q Wasser herzustellen, diese zu aliquotieren und bei -20°C zu lagern. Direkt vor der Durchführung des Bradford Assays wird eines der Aliquots aufgetaut und 1:10 mit dem gleichen Puffer, der auch zum Lösen der Probe verwendet wurde, verdünnt.

Verwendetes Pipettierschema und Auswertung:

Zu 1,000 ml Bradford Reagenz wird ein Aliquot der Probe bzw. des 0,05 %igen BSA Standards gegeben. Diese Mischung wird mit Milli-Q Wasser ad 1,100 ml aufgefüllt. Es bildet sich ein blauer Protein – Farbstoff Komplex, die Auswertung der spektralphotometrischen Messung kann mit MS Excel[®] durchgeführt werden. Bei der Auswertung nur Extinktionswerte < 1,0 berücksichtigen.

| | | Volumen Bradford RG | Volumen BSA 0,05 % | Masse BSA | Volumen Milli Q | Volumen Probe | Absorption bei 595nm | Proteinkonzentration |
|----------|----------------|------------------------|-----------------------|------------|-----------------|---------------|-------------------------|----------------------|
| Lfd. Nr. | Sample Code | [μ l] | [μ l] | [μ g] | [μ l] | [μ l] | [] | [μ g/ μ l] |
| 1 | Standard-0-A | 1000 | 0 | 0 | 100 | | | |
| 2 | Standard-0-B | 1000 | 0 | 0 | 100 | | | |
| 3 | Standard-2,5-A | 1000 | 5 | 2,5 | 95 | | | |
| 4 | Standard-2,5-B | 1000 | 5 | 2,5 | 95 | | | |
| 5 | Standard-5-A | 1000 | 10 | 5 | 90 | | | |
| 6 | Standard-5-B | 1000 | 10 | 5 | 90 | | | |
| 7 | Standard-10-A | 1000 | 20 | 10 | 80 | | | |
| 8 | Standard-10-B | 1000 | 20 | 10 | 80 | | | |
| 9 | P1-1-A | 1000 | 0 | | 99 | 1 | | |
| 10 | P1-1-B | 1000 | 0 | | 99 | 1 | | |
| 11 | P1-1-C | 1000 | 0 | | 99 | 1 | | |
| 12 | P1-2-A | 1000 | 0 | | 98 | 2 | | |
| 13 | P1-2-B | 1000 | 0 | | 98 | 2 | | |
| 14 | P1-2-C | 1000 | 0 | | 98 | 2 | | |
| 15 | P1-5-A | 1000 | 0 | | 95 | 3 | | |
| 16 | P1-5-B | 1000 | 0 | | 95 | 3 | | |
| 17 | P1-5-C | 1000 | 0 | | 95 | 3 | | |
| 18 | Standard-10-C | 1000 | 20 | | 80 | | | |
| 19 | Standard-5-C | 1000 | 10 | | 90 | | | |
| 20 | Standard-2,5-C | 1000 | 5 | | 95 | | | |
| 21 | Standard-0-C | 1000 | 0 | | 100 | | | |

Tab. E1: Bradford-Pipettierschema

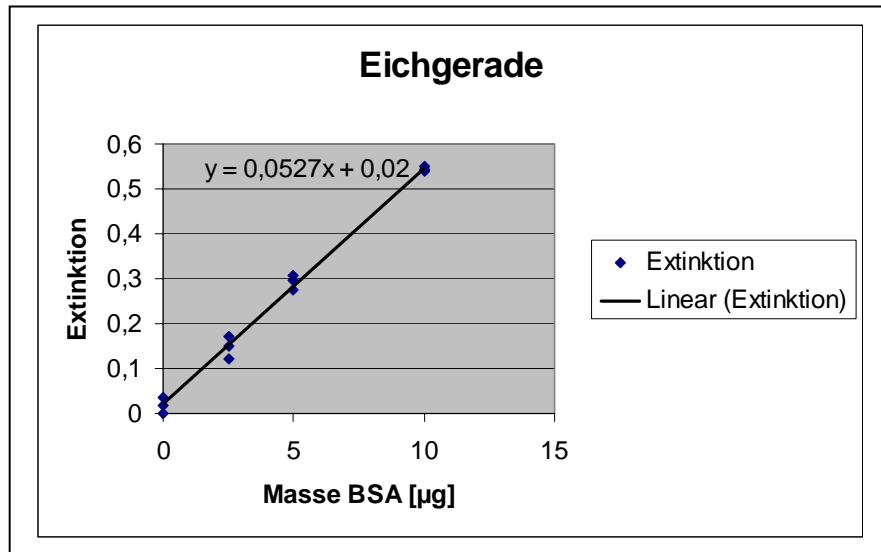


Abb. E-1: Eichgerade (mit Beispielwerten)

Hinweise zur Durchführung:

Sorgfältig pipettieren und die Pipetten regelmäßig auf Richtigkeit und Genauigkeit überprüfen (Abweichungen +/- 2 % sind tolerierbar).

Probe + Bradford Reagenz + Milli-Q Wasser gut durchmischen und zügig vermessen. Der Protein Farbstoffkomplex ist nur für eine gewisse Zeit stabil (siehe Abbildung und Abbildung, relative Abweichung nach 10 min -2 %, nach 20 min -4 % und nach 30 min -6 %) lange und unregelmäßige Standzeiten vermeiden.

Detergentien können je nach Konzentration den Bradford-Assay stören.

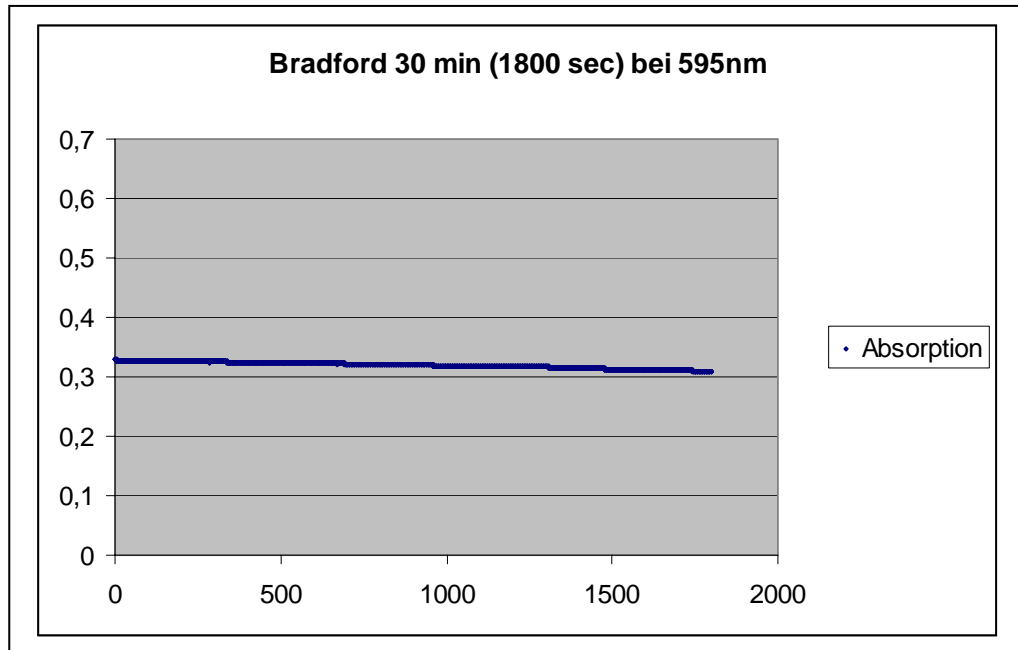


Abb. E-2: Bestimmung der Stabilität des Protein-Farbstoffkomplexes

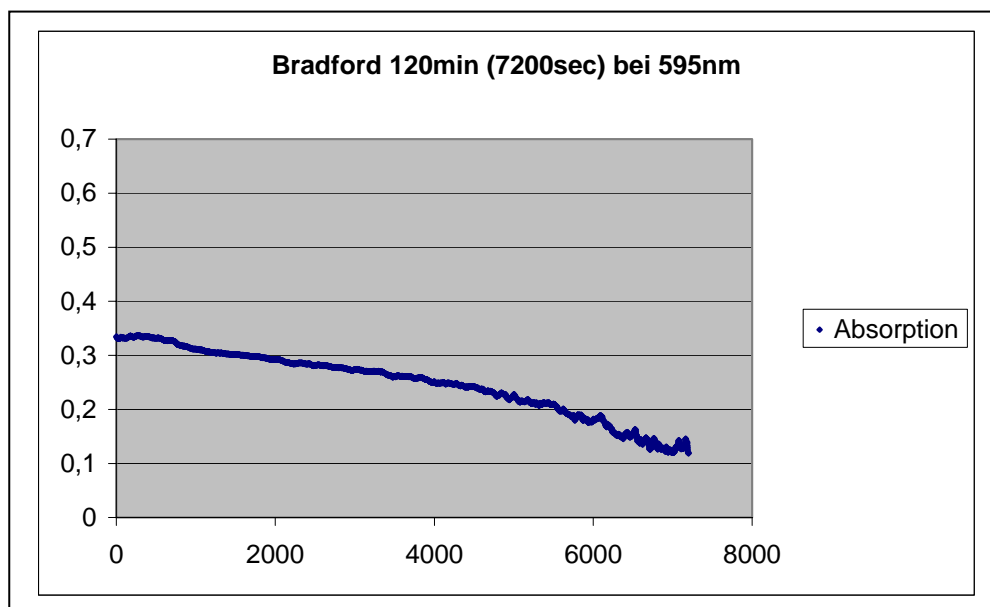


Abb. E-3: Bestimmung der Stabilität des Protein-Farbstoffkomplexes 120 min

TCA-Aceton-Fällung

Die bereits lysierte und homogenisierte Probe 5 min bei 1000 g zentrifugieren, den Überstand in ein frische Eppendorf Cap überführen und mit einem Volumenteil 10 % TCA versetzen, 30 min auf Eis stehen lassen und anschließend bei 15.000 g für 5 min zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und das verbleibende Pellet 2-3 mal mit kalten Aceton (-20°C) waschen und jeweils erneut abzentrifugieren. Das Pellet in einer Speed-Vac oder für 2-3 h bei Raumtemperatur trocknen. Wenn verfügbar ist eine Speed-Vac vorzuziehen. Es ist empfehlenswert nach der Fällung eine Proteinbestimmung durchzuführen.

Die Hühnerhirnproben wurden mittels Ultraschallsonotrode 3 x 10 sec auf Eis homogenisiert, zur Lyse wurde folgender Puffer verwendet:

10 mM Tris, 5 mM EDTA, 320 mM Sucrose und 0,1 mM PMSF in Milli-Q Wasser

Isoelektrische Fokussierung

Aus dem Sortiment an unterschiedlichen IPG Ready Strips sind 7 cm, 18 cm und 24 cm Strips verfügbar. Die Fokussierung erfolgt mit der IPG-phor (Amersham). Die aufzutragende Proteinmenge ist abhängig von der IPG-Striplänge, vom pH-Bereich des IPG-Strips, von der Färbemethode und nicht zuletzt von der Probe selbst. Tabelle E-2 gibt eine Übersicht, die als Ausgangspunkt für eine Methodenentwicklung genommen werden kann.

| Strip Länge | pH-Bereich | Färbemethode | Proteinmenge | Proben Volumen |
|-------------|------------|--------------|--------------|----------------|
| 7 cm | 3-10 | Silber | 7,5 – 15 µg | 125 µl |
| 18 cm | 3 - 10 NL | Silber | 75 - 150 µg | 350 µl |
| 18 cm | 3 - 10 NL | Coomassie | 300 – 600 µg | 350 µl |
| 18 cm | 5 – 6 | Silber | 200 - 300 µg | 350 µl |
| 24 cm | 3 – 10 NL | Silber | 200 - 300 µg | 450 µl |
| 24 cm | 3 – 10 NL | Coomassie | 1000 µg | 450 µl |

Tab. E-2: Übersicht Proteinmengen und Probenvolumina für unterschiedliche IPG-Strips und Färbemethoden

Probenvorbereitung für die IEF

Ein Aliquot der Rehydrierlösung (Lösung A6) wird unmittelbar vor der Verwendung mit DTT (5 mg/ml) und IPG Puffer 0,5-1 % (Lösung A7) versetzt. Es wird eine entsprechende Menge der fertigen Rehydrierlösung in ein frisches Eppendorf Cap vorgelegt und mit Probe auf das für die Strip Länge erforderliche Volumen aufgefüllt (Beispielsweise 340 µl Rehydrierlösung + 10 µl Probe (10 µg/µl) für einen 18 cm 3-10 NL IPG-Strip). Diese Mischung lässt man für mindestens 1 h bei Raumtemperatur stehen, dabei gelegentlich durchmischen (3 x 2 sec mittels Vortexer). Anschließend 10 min bei 20.000 g zentrifugieren, um etwaige unlösliche Bestandteile abzutrennen.

IEF mit 7 cm und 18 cm Stripholdern

Nun wird die Mischung aus Rehydrierlösung und Probe in den Stripholder überführt (siehe Abbildung E-4) und gleichmäßig verteilt. IPG-Strip auftauen und die Schutzfolie von der mit „+“ gekennzeichneten Seite (Anode) abziehen. Den IPG-Strip mit der Gelseite nach unten in den Stripholder überführen, dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen unter dem IPG-Strip bilden.

Experimenteller Teil

Um den Strip während der Rehydrierung und Fokussierung vor Austrocknung zu schützen wird er mit ca. 1,5 ml (für 18 cm Strips) Drystrip Cover Fluid bzw. dickflüssigem Paraffin überschichtet. Dann wird der Stripholder mit einem Kunststoffdeckel verschlossen.



Abbildung E-4: Rehydrier Lösung in Stripholder pipettieren.

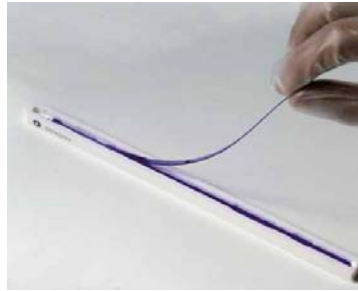


Abbildung E-5: IPG-Strip in Stripholder überführen.



Abbildung E-6: IPGphor mit Stripholdern.

Mit der IPGphor können bis zu 12 IPG-Strips gleichzeitig fokussiert werden. Die 7 cm IPG-Stripholder sind mit den in Abbildung E-4 gezeigten vergleichbar, hier liegt ebenfalls der IPG-Strip auf mit der Gelseite nach unten auf den Elektroden.

Rehydrierung und Fokussierung mit 24 cm Stripholdern

Mit den 24 cm Stripholdern können verschieden lange IPG-Strips fokussiert werden (7 – 24 cm), die Elektroden sind verschiebbar. Hier gibt es zwei Möglichkeiten Probe und Rehydrierlösung in den IPG-Strip einzubringen. Zum Einen analog der oben beschriebenen Prozedur. Probe und Rehydrierlösung werden gemischt und dann jedoch nicht direkt in den Stripholder überführt sondern in ein sog. „Rehydration-Tray“ pipettiert. Der Strip wird ebenfalls mit der Gelseite nach unten in das „Rehydration-Tray“ gegeben, mit dry-Strip cover-fluid überschichtet und für 12 h rehydriert. Das gleichzeitige einbringen von Rehydrierlösung und Probe in den Strip wird auch als „in-gel rehydration“¹⁶² bezeichnet. Nach Abschluß der Rehydrierung wird der Strip

aus dem „Rehydration-Tray“ genommen das anhaftende dry Strip cover fluid wird mit einer Küchen Rolle vorsichtig entfernt und der Strip mit der Gelseite nach oben in den 24 cm Stripholder überführt. An der Kathoden und Anoden Seite wird je ein in demineralisiertes Wasser (kein Milli-Q Wasser, ein geringer Anteil an Rest-Ionen ist erforderlich) getränkter Filterpapierstreifen auf die Geloberfläche gelegt, dann werden die Elektroden von oben auf dieses Filterpapier gedrückt. Der Strip wird jetzt mit dry Strip cover fluid bedeckt, als letzter Schritt bevor die Fokussierung starten kann wird der Kunststoffdeckel auf den Stripholder gegeben, dieser dient auch dazu die Elektroden auf das Filterpapier zu pressen. Bei salzhaltigen Proben oder bei engen pH-Gradienten können die Filterpapiere im Laufe der Fokussierung erneuert werden. Insbesondere im basischen Bereich kann es zu einem Abfall der DTT Konzentration kommen, um dem entgegen zu wirken kann man das Filterpapier auf der Kathoden Seite mit einer DTT Lösung tränken.

Neben der in-gel Rehydration gibt es auch noch die Möglichkeit des cuploadings. Hierbei wird der Strip in einem ersten Schritt lediglich mit der Rehydrierlösung (ohne Probe) rehydriert, der Strip wird analog der oben beschriebenen Prozedur in den Stripholder überführt und es werden zusätzlich zu den Elektroden die Cups auf die Geloberfläche aufgesetzt, in diese Cups wird die Probe pipettiert, die dann unter Spannung in den Strip wandert. Es ist darauf zu achten, dass das Volumen der Rehydrierlösung um das Volumen der Proben zu verringern ist (beispielsweise 370 µl Rehydrierlösung + 2 Cups a 40 µl Probe = 450 µl Gesamt).

Standard Protokolle für die Fokussierung

Für die folgenden Standardprotokolle wurde immer der maximale Stromfluß auf 50 µA begrenzt und die Temperatur auf 20°C eingestellt.

Die Dauer der einzelnen Schritte kann entweder als Zeit oder als Voltstundenintegral (Vhrs) festgelegt werden. Bei salzhaltigen Proben kann es vorkommen,

Experimenteller Teil

dass die maximale Spannung nicht erreicht wird. Ist in einem solchen Fall die Zeit und nicht das Voltstundenintegral vorgegeben, so kann es zu einer mangelhaften Fokussierung kommen. Prinzipiell sollte die Probe bei nicht Erreichen der eingegebenen Spannung zuvor entsalzt werden. Eine weitere Möglichkeit ist es zu Beginn durch langsames Ansteigen der Spannung die Ionen aus dem Strip zu entfernen.

Der letzte Schritt, der hier aufgeführten Standardprotokolle, ist immer als optional gekennzeichnet und dient lediglich dazu ein Zeitfenster für das Ende und damit die Entnahme der Strips zu haben. Die IPG-phor bietet zwei verschiedene Modi: Beim Gradient kommt es zu einem gleichmäßigen Anstieg der Spannung über der Zeit, bei Step-n-hold wird die Spannung unmittelbar auf den eingestellten Wert hochreguliert.

Es ist zu beachten, dass Proben nicht nur unter- sondern auch überfokussiert werden können.

18 cm IPG-Strips 3-10 NL

| Schritt | Spannung | Mode | Dauer |
|-------------------|----------|-------------|-------------|
| Rehydrierung | 0 V | - | 11-13 Std |
| IEF S1 | 1000 V | Gradient | 1 Std |
| IEF S2 | 2000 V | Gradient | 0,5 Std |
| IEF S3 | 4000 V | Gradient | 0,5 Std |
| IEF S4 | 8000 V | Gradient | 0,5 Std |
| IEF S5 | 8000 V | Step-n-hold | 72.000 Vhrs |
| IEF S6 (optional) | 2000 V | Step-n-hold | 0-3 Std |

7 cm IPG-Strips 3-10 L

| Schritt | Spannung | Mode | Dauer |
|-------------------|----------|-------------|-------------|
| Rehydrierung | 0 V | - | 11-13 Std |
| IEF S1 | 500 V | Gradient | 0,5 Std |
| IEF S2 | 1000 V | Gradient | 0,5 Std |
| IEF S3 | 8000 V | Gradient | 12.000 Vhrs |
| IEF S4 (optional) | 2000 V | Step-n-hold | 0-3Std |

24 cm IPG-Strips 3-10 NL oder 18 cm IPG-Strips narrow (eine pH-Stufe)

| Schritt | Spannung | Mode | Dauer |
|-------------------|----------|-------------|-----------|
| Rehydrierung | 0 V | - | 11-13 Std |
| IEF S1 | 150 V | Gradient | 0,5 Std |
| IEF S2 | 150 V | Gradient | 3 Std |
| IEF S3 | 300 V | Gradient | 3 Std |
| IEF S4 | 2000 V | Gradient | 1 Std |
| IEF S5 | 4000 V | Gradient | 0,5 Vhrs |
| IEF S7 | 8000 V | Gradient | 0,5 Std |
| IEF S8 | 8000 V | Step-n-hold | 9 Std |
| IEF S9 (optional) | 2000 V | Step-n-hold | 0-3 Std |

Tab. E-3: Protokolle für die Fokussierung

Weiterbearbeitung der IPG Strips nach der IEF

Nach Beendigung der IEF werden die Strips aus den Stripholdern genommen und das anhaftende Drystrip coverfluid mit einem Küchentuch entfernt. Es besteht nun die Möglichkeit, die Strips direkt weiterzubearbeiten und mit der Reequilibrierung zu beginnen oder aber die Strips bei -80°C zwischen zu lagern. Die Strips sollten, um ein reproduzierbares Vorgehen zu gewährleisten, immer eingefroren werden. Das Einfrieren bei -80°C wirkt sich positiv auf die Qualität der Gele aus, ein Einfrieren bei -20°C hingegen führt zu schlechteren Ergebnissen.

Reinigung der Stripholder

Unverzüglich nach der Fokussierung das DryStrip Coverfluid von den Stripholdern entfernen. Die Stripholder können über nacht in einer milden Detergens Lösung eingelegt werden und sind dann mit einer Zahnbürste und dem Amersham Reinigungsmittel sorgfältig zu reinigen. Um sämtlich Proteine zu entfernen, müssen die Stripholder anschließend für > 2 Std bei 250°C im Trockenschrank „gebacken“ werden. Dieser letzte Schritt ist bei den 24 cm Stripholdern nicht erforderlich, da hier die Geloberfläche des IPG-Strips mit der Oberfläche des Stripholders nicht in Kontakt kommt.

Acrylamid Trenngele

Grundsätzlich unterschieden werden lineare und Gradienten Gele, die Acrylamidkonzentration ist innerhalb gewisser Grenzen (ca. 4-20 %) variabel. Gradienten Gele bieten den Vorteil, dass auch hochmolekulare Proteine ins Gel eindringen können und gleichzeitig niedermolekulare Proteine zur Unterseite des Gels hin durch die sich stetig erhöhende Acrylamid-konzentration abgebremst werden.

Die Trenngele können einzeln oder mit einem sogenannten Multi-Gel-Gießstand gegossen werden. Um Gradienten Gele zu gießen benötigt man einen Gradienten Mischer, dieser besteht aus zwei Zylindern, einen für die Trenngellösung mit der höheren (schwere Lösung) und einen für die mit der niedrigeren (leichte Lösung) Acrylamidkonzentration. Beim Befüllen der Zylinder ist der Verbindungskanal geschlossen, beim Gießvorgang wird der Verbindungskanal geöffnet, sobald aus dem vorderen Zylinder Trenngellösung in den Gießstand läuft, gelangt Trenngellösung aus dem hinteren Zylinder durch den Verbindungskanal in den vorderen. Die Lösung im vorderen Zylinder muss mit einem Rührfisch durchmischt werden, es ist empfehlenswert auch im hinteren Zylinder einen Rührfisch zu plazieren, dies verhindert das Auspolymerisieren der Trenngellösung. Welcher Zylinder mit der schweren Lösung befüllt werden muss, richtet sich danach, ob die Gradienten Gele von oben oder von unten gegossen werden. Läuft die Trenngellösung von oben zwischen die Glasplatten, so muss die schwere Lösung in den vorderen Zylinder, beim Gießen von unten, in den hinteren.

Abbildung E-7 zeigt einen solchen Gießstand, bei dem hier gezeigten Aufbau werden die Gele von unten gegossen. Mit einem solchen Gießstand können bis zu 10 Gele (20 x 20 cm) gleichzeitig gegossen werden.

Es ist darauf zu achten, dass die Glasplatten absolut sauber sind und das Spacer und Glasplatten bündig sitzen.

Acrylamid ist in unpolymerisierter Form cancerogen, daher sind Handschuhe zu tragen (Nitrilhandschuhe), überschüssige Acrylamidlösungen umgehend polymerisieren und entsorgen.

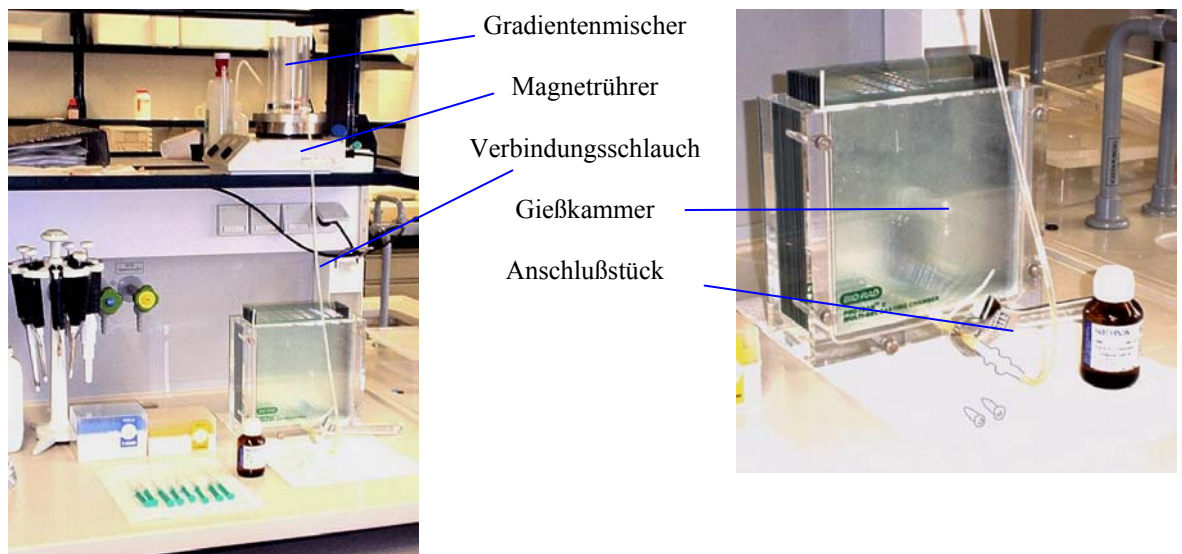


Abb. E-7: Gießstand zur Herstellung von Gradientengelen

Um ein 16 x 20 cm Trenngel zu gießen benötigt man ein Volumen von etwa 32 ml (um den gesamten Hohlraum zwischen den Glasplatten zu füllen würde man $20\text{ cm} \times 20\text{ cm} \times 1\text{ mm} = 40\text{ ml}$ benötigen). Es muss ein gewisser Raum für das Sammelgel und das anschließende Aufbringen des IPG-Strips freibleiben. Werden die Gele mit einem Multi Gel Gießstand gegossen muss das Totvolumen berücksichtigt werden, je nach Anzahl der Gele, für 4 Gele benötigt man insgesamt 160 ml, für 8 Gele 308 ml.

Das Anfertigen von Gelen für 24 cm Strips erfolgt analog, bei der Berechnung der notwendigen Volumina muss man die Tiefe der Spacer berücksichtigen (1 mm oder 1,5 mm).

Nach dem Gießen der Trenngele müssen diese mit Milli-Q Wasser oder mit wassergesättigtem Butanol überschichtet werden, zum Einen um eine glatte Geloberfläche zu schaffen und zum Anderen um ein vollständiges auspolymerisieren sicher zu stellen. Es ist wichtig die Gele rasch zu überschichten, damit es nicht zur Durchmischung des Gels mit der Überschichtungsflüssigkeit kommt muss ein ausreichender Dichteunterschied bestehen. Trenngele können ohne weiteres mit Wasser überschichtet werden, bei den Sammelgelen empfiehlt es sich hingegen wassergesättigtes Butanol zu

verwenden. Die Trenngele sollten mindestens 3 Stunden polymerisieren, besser über nacht. Damit es an der Grenzfläche zwischen Trenngel und dem überschichteten Wasser nicht zur Diffusion der Ionen aus dem Gel kommt, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, nach etwa 1 Stunde soviel Trenngelpuffer (Lösung B2) zuzusetzen, dass die beiden Phasen isoton sind.

Trenngele können bis zu einer Woche im Kühlschrank gelagert werden, dabei ist die Oberfläche vor Austrocknung zu schützen, überschichten und möglichst luftdicht einpacken.

Gießen der Sammelgele

Die Sammelgele sollten unmittelbar vor der 2. Dimension gegossen werden, am besten bevor man mit dem Reequilibrieren der IPG-Strips beginnt. Für ein 20 x 20 cm Gel reichen 5 ml 4 % T Sammelgel. Acrylamid (sollte Raumtemperatur haben), Sammelgelpuffer und Milli-Q Wasser zusammengeben, 6 min im Ultraschallbad entgasen, APS und TEMED direkt vor dem Gießen zugeben und gut durchmischen. Zuvor die Wasser Trenngelpuffer-Mischung von den Trenngelen abgießen und mit einem Filterpapier trocknen. Zum Gießen der Sammelgele empfiehlt es sich eine 5 ml Pipettenspitze zu verwenden, direkt im Anschluß zügig mit wassergesättigtem Butanol überschichten, darauf achten, dass man eine glatte Oberfläche erhält. Nach 3 min ist das Sammelgel auspolymerisiert. Zwischen dem Sammelgel und dem oberen Rand der vorderen Glasplatte sollte ein ausreichender Abstand verbleiben, um später den IPG-Strip einzubetten.

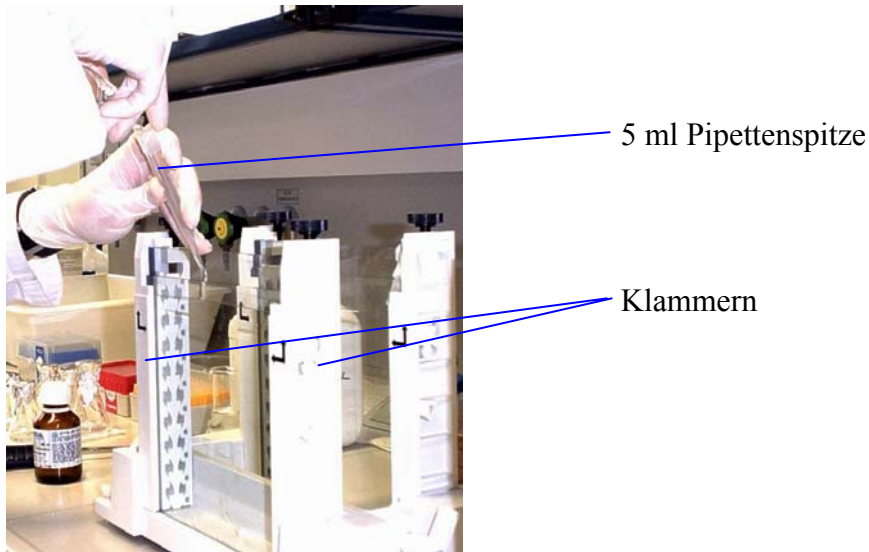


Abb. E-8: Gießstand für einzelne Gele

| Lösung | Trenngel 10 % (100ml) | Trenngel 12,5 % (100ml) | Trenngel 15 % (100ml) | Sammelgel 4 % (5 ml) |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Acrylamid Stock (B1) | 32.47 ml | 40,58 ml | 48,7 ml | 0,65 ml |
| Trenngelpuffer (B2) | 25.00 ml | 25 ml | 25 ml | - |
| Sammelgelpuffer (B3) | - | - | - | 1,25 ml |
| Milli-Q Wasser | 42.00 ml | 33,88 ml | 25,77 ml | 3,05 ml |
| APS (B4) | 62.50 μ l | 62.50 μ l | 62.50 μ l | 5 μ l |
| TEMED | 468.75 μ l | 468.75 μ l | 468.75 μ l | 50 μ l |

Tab. E-4: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgele

Reequilibrieren der IPG Strips

Die Reequilibrierung erfolgt in zwei Schritten, die IPG-Strips werden unmittelbar nach dem Auftauen 15 min in Reequilibrier Lösung + 1 % DTT (Lösung C2) anschließend 15 min in Reequilibrierlösung + 2,5 % IAA (Lösung C3, im Ultraschallbad lösen) geschwenkt. Bei der Reequilibrierung werden die Disulfide im ersten Schritt reduziert und anschließend acetyliert,

gleichzeitig erfolgt die Beladung der Proteine mit SDS. Es ist darauf zu achten, dass die vorgegebene Zeit eingehalten wird, werden die Strips zu lange equilibriert, kann es zum Verlust von Proteinen kommen. Das Reequilibrieren erfolgt im sog. Reequilibration Tray, für 18 cm IPG-Strips benötigt man jeweils 5 ml für 24 cm IPG-Strips 7,5 ml. Beim Wechsel der Reequilibrier Lösungen die Unterseite Strips mit einem Küchentuch abtrocknen. Um das anschließende Aufbringen der IPG-Strips auf das Sammelgel zu vereinfachen müssen 18 cm Strips entsprechend der Abbildung E-9 gekürzt werden.

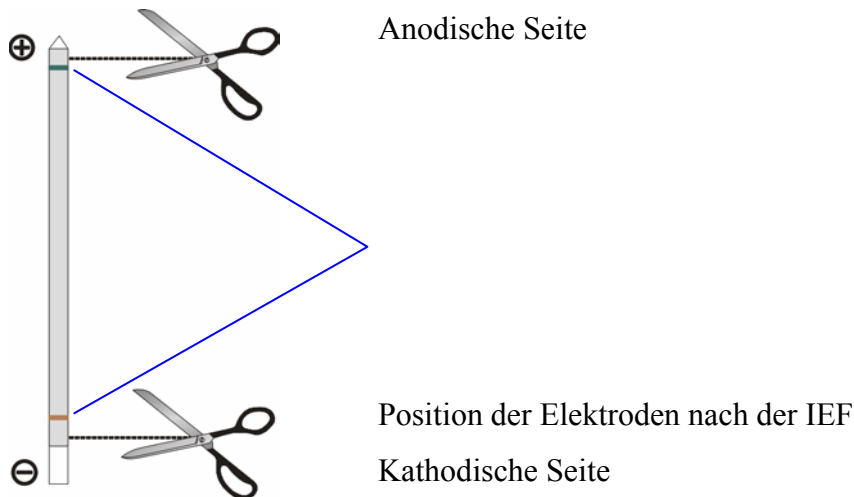


Abb. E-9: Kürzung der Strips nach der Reequilibrierung

2. Dimension – SDS PAGE

Während der Reequilibrierung die Agarose (Lösung C8) herstellen, dazu 100 mg + 18 ml Milli-Q Wasser unter Rühren erhitzen, nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hat 2 ml Kathodenpuffer 10fach (Lösung C6) zugeben. Bei den 24 cm Gelen ist es empfehlenswert einige Körnchen Bromphenolblau zuzugeben, um die Front der 2. Dimension besser zu sehen. Die Agarose Lösung wird benötigt um später den IPG-Strip zu fixieren.

Experimenteller Teil

Die wassergesättigte n-Butanol Lösung von den Sammelgelen abgießen und sorgfältig mit Milli-Q Wasser nachwaschen, anschließend mit einem Filterpapier trocknen (Geloberfläche nicht berühren).

Der Molekulargewichtstandard wird entsprechend Abbildung E-9 aufgebracht. Dazu Filterpapier doppelt falten und zwischen die Glasplatten schieben, den Molekulargewichtsstandard auf das Filterpapier pipettieren (1 µl für 20 x 20 cm Gele mit anschließender Silber Färbung, bei CoomassieFärbung 4 µl) und mit ca 2 µl Agarose (Lösung C8) fixieren. Die Molekulargewicht-Filterpads erst unmittelbar vor dem Start der 2. Dimension mit einem Spatel auf die Sammelgeloberfläche drücken, auf der rechten Seite positionieren, dabei etwa 1 cm Abstand zum Rand lassen.

Nachdem die Reequilibrierung der IPG-Strips abgeschlossen ist, Strips kurz in 1-fach Kathodenpuffer abwaschen, abstreifen und mit der Kunststoffseite an die hintere Glasplatte heften, dabei soll die anodische Seite nach rechts zeigen. Nun den IPG-Strip, nach Möglichkeit ohne Luftblasen einzuschließen, auf die Geloberfläche drücken. Dies funktioniert am besten, indem man mit 2 schmalen Spateln den IPG-Strip langsam von links nach rechts herunterdrückt. Die Kunststoffseite des IPG-Strips darf nicht vollständig trocken sein, da der Strip ansonsten nicht an der Glasscheibe heruntergeschoben werden kann. Als nächstes werden Strip und Molekulargewichtsstandard mit der Agaroselösung überschichtet, darauf achten, dass die Lösung nicht wärmer als 40-50°C ist. Kurz abwarten bis die Agarose erstarrt ist und dann die Gele in die entsprechende Kammer überführen.

Kühlung anschalten und auf 12°C einstellen. Für 20 x 20 cm Gele benötigt man pro Kammer (je 2 Gele) 4 l Anodenpuffer (Lösung C5) und etwa 0,75 l Kathodenpuffer (Lösung C7). Die Minigelkammer wird ohne Kühlung betrieben. Da man hier insgesamt nur etwa 1 l Elektrodenpuffer benötigt, kann die Kammer komplett mit Kathodenpuffer gefüllt werden. Im Anodenpuffer fehlt das Glycin, da es keinen Effekt hat und relativ teuer ist. Die Kammer für

die 24 cm Gele wird mit 4 l Anodenpuffer und etwa 1,5 l **2 fachen** Kathodenpuffer (Empfehlung Fa. Amersham) gefüllt.

| | Bedingungen | ca. Dauer [Std] |
|------------|-------------|-----------------|
| Mini Gele | 150 V | 1 |
| 20 cm Gele | 45 mA / Gel | 3,5 |
| 24 cm Gele | 2 W | 4 |

Tab. E-5: Parameter für die 2. Dimension

l

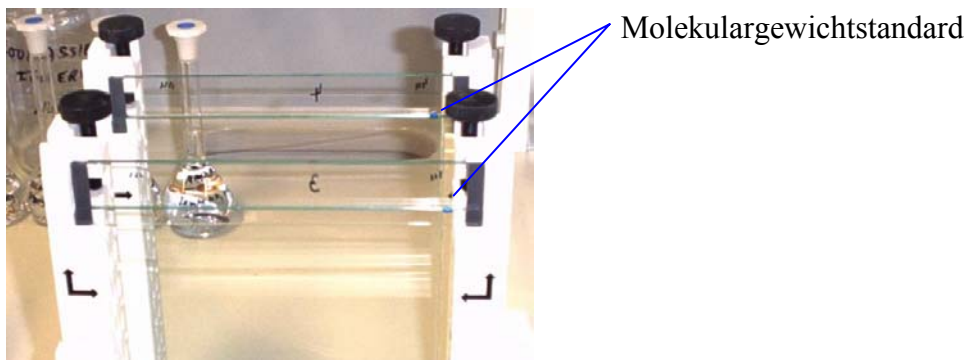


Abb. E-10: Aufbringen der IPG-Strips



Abb. E-11: Aufbringen der IPG-Strips Fortsetzung

1-D Gele

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch einige eindimensionale Gele angefertigt. Hierbei entfällt die isoelektrische Fokussierung, die Proben werden lediglich mittels SDS-PAGE nach Molekulargewicht getrennt. Es wurden nur 1-D Minigele hergestellt, die Vorgehensweise ist analog der oben beschriebenen, mit folgenden Unterschieden:

Maximal 5 µl der Probe wird nach Lyse und Proteinbestimmung zu 5 µl eines Lämmli Puffers gegeben, gegebenenfalls mit Milli-Q Wasser ad 10 µl aufgefüllt und für 10 min bei 95°C im Wasserbad erhitzt.

Beim Gießen des Sammelgels wird dieses nicht wie oben beschrieben mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet sondern durch einen 10 zahnigen Kamm, der in das noch unpolymersierte Sammelgel getaucht wird, werden 10 Taschen geformt. Die Minigele werden in die Kammer überführt, der Elektrodenpuffer wird zugegeben und in die bereits mit Elektrodenpuffer gefüllten Taschen wird die Mischung aus Probe und Lämmli Puffer, bzw. der Molekulargewichtstandard pipettiert. Alles weitere erfolgt analog zu den 2-DE Minigelen.

Beenden der 2. Dimension

Sobald die Bromphenolblau Front das untere Ende des Trenngels erreicht hat, ist die 2. Dimension beendet. Power supply ausschalten und die Gele aus der Kammer und aus der Halterung herausnehmen. Wie in Abbildung E-12 gezeigt wird einer der Spacer entfernt und mit einer Kunststoff-Spachtel die obere Glasplatte vorsichtig abgehoben. Das Gel bleibt in der Regel auf der größeren Glasplatte kleben, kann aber auch an der kleinen haften bleiben. Als nächstes wird mit einem Messer das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und entsorgt. Zur Orientierung sollte eine Ecke des Gels abgeschnitten werden, am besten unten auf der basischen Seite. Nun kann das Gel in den Fixierer überführt und gefärbt werden.

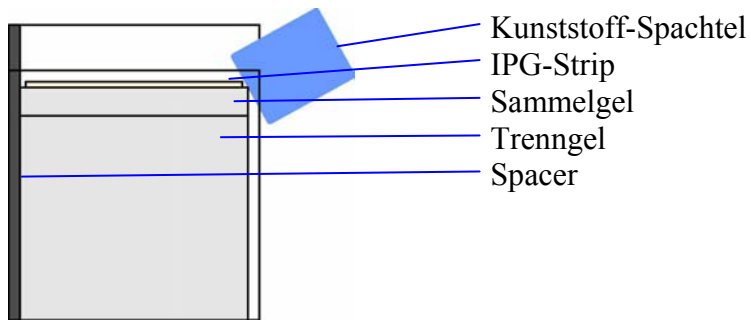


Abb. E-12: Nach der 2. Dimension, Trennung des Gels von den Glasplatten

Silberfärbung nach Blum¹²¹

Es sollten nur reagent-grade Chemikalien verwendet werden. Die Leitfähigkeit des deionisierten oder destillierten Wassers sollte 2 μS nicht übersteigen.

In eine Färbewanne können zwei Gele gefärbt werden. Für 20 x 20 cm Gele werden pro Farbe Schale 400 ml der jeweiligen Lösung benötigt. Der Fixierer kann zweimal verwendet werden, alle anderen Lösungen nur einmal. Formaldehyd erst unmittelbar vor der Verwendung zusetzen. Während der Färbung sollten die Färbeschalen zur Durchmischung auf eine Schüttelplatte gestellt werden.

| Schritt | Lösung | Dauer |
|---------|---------------------------|------------------------------|
| 1 | Fixierer (Lösung D1) | > 1h (bis über nacht) |
| 2 | Ethanol 30 % (v/v) | 20 min |
| 3 | Ethanol 30 % (v/v) | 20 min |
| 4 | Milli-Q Wasser | 20 min |
| 5 | Sensitizer (Lösung D3) | 1 min |
| 6 | Deminearalisiertes Wasser | 3 x 20 sec |
| 7 | Silberlösung (Lösung D4) | 20 min |
| 8 | Demineralisiertes Wasser | 3 x 20 sec |
| 9 | Entwickler (Lösung D5) | etwa 5 min |
| 10 | Glycin Stop (Lösung D6) | 5 min |
| 11 | Demineralisiertes Wasser | >3 x 10 min (bis über nacht) |

Tab. E-6: Färbeprotokoll zur Silberfärbung nach Blum¹²¹

Entsorgung der Silberlösung: Die Lösung in eine konzentrierte Kochsalzlösung geben und als Silberchlorid fällen.

Coomassie Färbung nach Neuhoff et al⁴⁴.

Als erstes wird der Coomassie brilliant blue G 250 Farbstoff umkristallisiert, dazu werden 3-4 g des Farbstoffs in 250 ml 7,5 % Essigsäure gelöst und auf 60-70°C erwärmt. Dann wird festes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 30 % (g/v) eingerührt. Nach abkühlen auf Raumtemperatur kann der ausfallende Farbstoff durch Filtration oder Zentrifugation gewonnen werden.

Stamm Lösung I (Lösung E-2) erhält man indem man das Präzipitat in 100 ml warmem Methanol vollständig löst und anschließend 200 ml Aceton hinzugibt.

Stamm Lösung II (Lösung E-3) besteht aus 100 g Ammoniumsulfat die in 500ml Milli-Q Wasser gelöst werden. Zu dieser Mischung gibt man langsam und unter rühren 20 g konzentrierte Phosphorsäure, dann wird mit Milli-Q Wasser ad 800 ml aufgefüllt

Die Färbelösung (Lösung E-4) wird vor Gebrauch hergestellt indem man 200 ml Stammlösung II mit 20 ml Stammlösung I und 20 ml Methanol versetzt und gut durchmischt. Diese Lösung sollte nicht filtriert werden und kann mehrfach verwendet werden.

| Schritt | Lösung | Dauer |
|---------|--------------------------------|------------|
| 1 | Fixierer 12 % TCA (Lösung E-1) | > 1h |
| 2 | Färbelösung (Lösung E-4) | über Nacht |
| 3 | Waschen (Lösung E-5) | 1-3 min |
| 4 | Spülen mit 25 % MeOH (v/v) | max. 1 min |
| 5 | Stabilisierung in (Lösung E-7) | > 1 |
| 6 | Waschen mit Mill-Q Wasser | 3 x 20 min |

Tab. E-7: Färbeprotokoll Coomassie nach Neuhoff⁴⁴

Schritt 6 wurde dem ursprünglichen Protokoll angefügt und dient dazu Ammoniumsulfat aus dem Gel zu waschen. Da ansonsten der Scanner kontaminiert wird und das Ammoniumsulfat beim Trocknen der Gele auskristallisiert.

Digitalisieren der Gele und Softwareauswertung

Das Einscannen der Gele erfolgt mittels des Biorad Densitometers GS 710. Dazu werden die feuchten Gele auf den zuvor kalibrierten Scanner gelegt und mit mittlere Auflösung gescannt. Um das Zerreißen der Gele zu verhindern

den Scanner mit demineralisiertem Wasser benetzen. Je nach verwendeter Färbemethode wird über die Software der entsprechende Filter gewählt.

Die Gelauswertung erfolgt mit PD-Quest 6.1.0, näheres zur Benutzung kann dem Handbuch oder dem Lernprogramm zur Software entnommen werden. Kurz zur allgemeinen Verwendung der Software; nachdem Scannen erfolgt die Detektion der Spots mittels des „Spot detection wizards“. Es wird der kleinste, der schwächste noch zu detektierende sowie der größte Spot ausgewählt, zusätzlich wird ein repräsentativer Bereich des Gels markiert, anhand dessen der Hintergrund bestimmt wird. Nach Auswahl der Parameter erfolgt die Spot Detektion und die Hintergrund Subtraktion. Durch diesen Vorgang werden neben dem Scan ein sog. Image erzeugt und ein weiterer File der lediglich die Spots in einer nach Gauß optimierten Form enthält. Mehrere Gele können miteinander verglichen werden, hierzu wird ein Matchset erstellt. Eines der Gele dieses Matchsets wird zum Master erklärt. Da korrelierende Proteine nicht immer auf der gleichen Koordinate liegen, werden durch Bestimmen von Landmarks (signifikante Spots die auf den Gelen übereinstimmen), Unregelmäßigkeiten zwischen den Gelen ausgeglichen. Die Software kann nun nach Unterschieden in den Spotmustern suchen, diese werden graphisch dargestellt. Die Software bietet weiter die Möglichkeit zur Quantifizierung und zu verschiedenen Normalisierungen sowie zum Datenexport. Außerdem können Matchsets in Form sog „higher level Matchsets“ miteinander verglichen werden. Bleibt anzumerken, dass es stets einer sorgfältigen Nachbearbeitung und Kontrolle der Software Ergebnisse bedarf.

Konservierung der Gele

Die Konservierung der Gele erfolgt mit dem Hoefler SE 1200 Easy Breeze™ System, die feuchten Gele werden zwischen Cellophanfolie verpackt und getrocknet. In dieser Form können die Gele über mehrere Jahre gelagert werden und es besteht die Möglichkeit zu einem späteren Zeitpunkt Proteine

aus diesen Gelen auszuschneiden, tryptisch zu verdauen und mittels MALDI-MS zu analysieren.

Tryptischer Verdau MALDI-MS

Das Protokoll für den tryptischen Verdau basiert auf der Arbeit von Shevchenko et al.⁴⁶ sowie von Gharahdaghi et al.⁴⁸ der Zusatz von Formaldehyd bei der vorhergehenden Silberfärbung sollte reduziert (halbiert) werden⁴⁷.

Es können sowohl Silber als auch Coomassie gefärbte Gele verwendet werden. Bei den Coomassie gefärbten Gelen findet durch die geringere Empfindlichkeit bereits eine „Vorauswahl“ statt, außerdem werden bei Coomassie Gelen in der Regel größere Proteinmengen aufgetragen, dadurch steigt die Erfolgswahrscheinlichkeit, was aber nicht heißt, dass man die interessanten Proteine findet.

Die Schritte 0.1-0.3 im folgenden Protokoll beziehen sich nur auf Silber gefärbte Spots.

Experimenteller Teil

| Schritt | Beschreibung | Vol. | Zeit | Temp. |
|---------|---|----------------------|--------------------------|----------------|
| 0.1 | Spot ausschneiden, möglichst klein. Bei getrockneten Gelen den mit einer Rasierklinge ausgeschnittenen Spot kurz in Milli-Q Wasser tauchen und die Cellophanfolie abziehen. | | | |
| 0.2 | Entfärben der silbergefärbten Proben: Frische Lösung aus 1 Teil 30 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) (9.9 mg/ml) und 1 Teil 100 mM Natriumthiosulfat zu Gelstück geben. | 100 µl | 10 min | RT |
| 0.3 | Entfärbelösung vorsichtig entfernen und 3 × mit Milli-Q Wasser waschen. | 400 µl | 3 × 15 min | RT |
| 1. | Stücke auf 1 mm ³ schneiden (auch ein Kontrollstück ohne Probe!). 3 × mit 50 % ACN / 25 mM NH ₄ HCO ₃ pH 8.0 waschen. | 400 µl | 3 × 15 min | RT |
| 2. | Gelstücke in ACN (HPLC grade) dehydrieren, ACN entfernen (2 ×). | 100 µl | 2 × 10 min | |
| 3. | Gelstücke in der Speedvac trocknen. | | 15- 20 min | |
| 4. | Reduktion der Disulfidbrücken mit 10 mM DTT (6.16 mg / 4 ml) in 100 mM NH ₄ HCO ₃ (frisch), danach auf RT abkühlen. | Gel decken 100 µl | 1 Std. | 56° C |
| 5. | Alkylierung mit 55 mM IAA (20.35 mg / 2ml) in 100 mM NH ₄ HCO ₃ (frisch) im Dunkeln mit gelegentlichem Vortexen. | Gel decken 100 µl | 45 min | RT |
| 6. | Waschen mit 100 mM NH ₄ HCO ₃ (3 ×). | 100 µl | 3 × 5 min | RT |
| 7. | Durch Schütteln in ACN die Gelstücke dehydrieren und wieder quellen lassen in 100 mM NH ₄ HCO ₃ (2 ×). Erneut dehydrieren in ACN. | 100 µl | (2+1) × 5 min | RT |
| 8. | Gelstücke in der Speedvac trocknen. | | ca. 20 min | |
| 9. | Verdau-Puffer zugeben (50 mM NH ₄ HCO ₃ , 5 mM CaCl ₂ , 12.5 ng/µl Trypsin.* | Gel bedecken | 45 min | auf Eis |
| 10. | Überstand entfernen und mit Puffer (50 mM NH ₄ HCO ₃ , 5 mM CaCl ₂) ersetzen. | 5-10 µl decken | Über Nacht | 37° C |
| 11. | Zentrifugieren bei 15'000 g, Überstand sammeln. Peptide 1 × mit 20 mM NH ₄ HCO ₃ und 3 × mit 5 % Ameisensäure / 50 % ACN extrahieren (15'000 g). | | 1 × 20 min 3 × 20 min | RT |
| 12. | Die vereinigten Extrakte in der Speedvac trocknen. | | 20 min | |

Tab. E-8: Protokoll zum tryptischen Verdau

*Trypsin-Lösung:

25 µg Trypsin-Lyophilisat (Roche Trypsin „Sequencing Grade“) in 200 µl
1 mM HCl lösen, in 20 µl-Aliquots bei -80° C einlagern.

Vor Gebrauch (im Eisbad, um Trypsin-Autolyse zu verhindern):

1 Aliquot (20 µl) + 100 µl 100 mM NH_4HCO_3
+ 70 µl H_2O
+ 10 µl 100mM CaCl_2

→ 200 µl Trypsin-Lsg. mit 12,5 ng/µl in 50 mM NH_4HCO_3 und 5 mM CaCl_2 .

Zip Tip's[®] bieten die Möglichkeit die Peptide aus dem oben beschriebenen tryptischen Verdau zu entsalzen.

MALDI-MS Messung

Entsprechend der Empfehlung der Fa. Kratos wurde eine Sandwich Präparation unter Verwendung von gesättigter α -Cyano Zimtsäure in 50 % Acetonitril mit 0,1 % TFA angefertigt. Das Target muss mehrfach beschossen werden, um gute Spektren zu erhalten, dies dient dazu die oberen Kristallschichten abzutragen.

CAF-MALDI

CAF steht für chemically assisted fragmentation, zur Durchführung benötigt man den Ettan[™] CAF[™] MALDI Sequencing Kit.

Alle Schritte langsam und sorgfältig durchführen, die notwendigen Lösungen frisch bereiten und maximal 2 tryptische Verdau gleichzeitig bearbeiten.

Experimenteller Teil

In-gel Verdau

Der Verdau wird wie oben beschrieben durchgeführt. Etwa 20 % der resultierenden Peptidlösung sollten für einen regulären Peptidfingerprint verwendet werden, der Rest wird für die CAF-Sequenzierung weiterverarbeitet. Da im Verlauf der CAF-Derivatisierung mit sehr kleinen Volumina gearbeitet wird, empfiehlt es sich 0,5 bzw. 0,2 ml Eppendorf Caps zu verwenden.

Lysinschätzung

Im ersten Schritt werden die Lysine geschützt (dies ist nicht zwingend erforderlich, lässt man die Lysinschätzung weg, können jedoch nur noch Peptide mit einem C-terminalen Arginin sequenziert werden).

1. Peptide in der Speed Vac trocknen.
2. 0,9 mg des Lysine modifiers mit 10 µl Milli-Q Wasser versetzen und durch mehrfaches aufziehen mit einer Pipette mischen.
3. 2 µl der unter 2. hergestellten Lösung werden mit 8 µl Lysine modifier buffer versetzt, diese Mischung frisch herstellen und zu den getrockneten Peptiden gegeben. Sorgfältig durchmischen, um die Peptide in Lösung zu bringen.
4. 2 h bei 37°C inkubieren.
5. Die geschützten Peptide in der Speed-Vac trocknen.
6. 3 µl einer 5 % TFA Lösung und 2 µl Milli-Q Wasser zugeben (der pH-Wert dieser Lösung sollte unter 4 liegen)

Peptide in Zip Tips C₁₈ überführen

1. Zip Tip mit 50 % Acetonitril / 0,5 % TFA benetzen, dazu 5 x diese Lösung mit einer 20 µl Pipette aufziehen und wieder auslassen.
2. Die Zip Tip Spitze durch 2 maliges Waschen mit 0,1 % TFA equilibrieren.
3. Die oben vorbereitete Probe, durch 10 maliges langsames Aufziehen und Auslassen an die RP-18-Phase des Zip Tips binden.

Sulfonierung des N-terminus unter Verwendung des CAF-Reagenzes

Die Sulfonierung sollte mit maximal 2 Proben gleichzeitig durchgeführt werden. Das CAF-Reagenz wird in 10 Einzeldosen zu je 6 mg geliefert. Da das CAF-Reagenz in Wasser äußerst labil ist sollte es innerhalb von 10 min verarbeitet werden. Die 6 mg sollten in 6-10 Portionen aufgeteilt werden. Den Angaben des Herstellers entsprechend sollte 1 mg pro Umsetzung verwendet werden, verwendet man $> 0,3$ mg des CAF-Reagenzes, so ist dies ausreichend. Das CAF-Reagenz muss genau eingewogen werden.

1. Unmittelbar vor der Inkubation wird das CAF-Reagenz Lösung in einem 0,2 ml Eppendorf Cap frisch zubereitet. Pro 0,1 mg CAF-Reagenz werden 1 μ l des CAF-buffers zugesetzt. Anschließend wird sorgfältig durchmischt.
2. Werden zwei Proben gleichzeitig bearbeitet, ist die erforderliche Menge an CAF-Reagenz Lösung auf zwei Eppendorf Caps zu verteilen.
3. Durch 10 maliges aufziehen und auslassen wird die CAF-Reagenz Lösung nun auf das mit dem Peptid beladene Zip Tip aufgebracht.
4. Die Lösung wird für 3 min auf der Zip Tip Phase belassen, dabei darauf achten, dass die Lösung oberhalb der Zip Tip Phase zu sehen ist.
5. Das CAF-Reagenz von der Zip Tip Phase ablassen.
6. Zum Stoppen der Reaktion. Jeweils 0,5 μ l der Stop Lösung zur restlichen CAF-Reagenz Lösung geben, diese sorgfältig durchmischen und anschließend 10 mal mit der ZIP Tip Pipette aufziehen und ablassen.
7. Waschen des Zip Tips mit 0,1 % TFA, 5 mal aufziehen und ablassen.
8. Eluieren der Probe mit 3 μ l 50 % Acetonitril / 0,5 % TFA in ein 0,2 ml Eppendorf Cap.

MALDI-TOF

Umkristallisieren der alpha-Cyano-Zimtsäure-Matrix

Dazu die Matrix in warmem Ethanol lösen, kräftig schütteln, bei 15.000 rpm für 5 min zentrifugieren, den Überstand in ein frisches Eppendorf Cap überführen und 2 Teile Milli-Q Wasser zugeben. Zur Ausfällung für 2 Std in

Experimenteller Teil

einen Kühlschrank geben, erneut bei 15.000 rpm für 5 min zentrifugieren, den Überstand verwerfen und das Sediment 2 mal mit kaltem Wasser (4°C) waschen. Im Anschluß in der Speed-Vac trocknen.

Messen der CAF-Proben

Sandwich Probenvorbereitung, wie oben beschrieben. Die derivatisierten Proben bei möglichst geringer Laser Energie vermessen. Das so erhaltene Spektrum mit dem des underivatisierten Protein Verdaus Vergleichen. Die Massendifferenz muss 136 Da betragen, enthält das Peptid ein Lysin so beträgt die Massendifferenz 178 Da. Mit den auf diese Weise identifizierten Kandidaten für eine Sequenzierung wird wie folgt verfahren:

1. Unter Verwendung der Chromatogramm Funktion wird nach Bereichen auf dem Target gesucht in denen dieses Peptid gehäuft vorkommt.
2. Nun kann unter Verwendung des selektierten Bereiches und des Ion gates ein Peptid isoliert werden (Massenintervall des Ion gates auf +/-20 Da einstellen).
3. Folgende Einstellung vornehmen Data Collection → Data Storage → Accumulate → 10. Es werden immer 10 Laser shots zu einem Profile aufaddiert.
4. Langsam die Laserenergie erhöhen, bis das Peptid zu fragmentieren beginnt. Die Energie kann solange weiter erhöht werden, bis man ein ungünstiges Verhältnis zwischen Signal und Rauschen erhält.

Rekonstitution der Probe

Durch die o. g . Vorgehensweise wird die Probe auf dem Target relativ schnell verbraucht. Um eine Neuverteilung der Peptide auf dem Target zu bekommen, gibt man 0,5 µl 50 % Acetonitril / 0,1 % TFA auf das Target, wartet 10 s, gibt dann weitere 0,5 µl Acetonitril / 0,1 % TFA zu und verteilt die Probe durch mehrfaches aufziehen und ablassen mit der Pipette.

Interpretation der Spektren

1. Die Sequenz des vermuteten Proteins wird unter Processing → Sequence Calculator eingefügt, anschließend den Button Generate Peak markers drücken.
2. Die Parameter unter Processing → Peak clean up → Smothing → Width and Baseline optimieren.
3. Zur Kennzeichnung der Sequenz die beiden ersten signifikanten Signale, die um die Masse einer Aminosäure auseinander liegen, markieren. Durch betätigen der rechten Maus Taste Annotate und dann <PRO> auswählen.

Deglycosylierung von rh-EPO

Die Deglycosylierung erfolgt enzymatisch.

Lösung 1

Das Lyophyllisat der rekombinanten N-Glycosidase F (Fa. Roche 1365185, 100 Units) wird in 100µl Milli-Q Wasser gelöst (100mM Natriumphosphat, 25mM EDTA, pH 7,2) - Lagerung bei 2-8 °C

Lösung 2

O-Glycosidase Fa. Roche (1347101) BSA frei, (25 mU/50µl)

Lösung 3

Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* (500 mU / 50 µl), Sigma.

Lösung 4

0,66 % SDS , 3,3 % Chaps

Neorecormon[®] 10.000 I.E. (Fa. Roche, Ch.B.: 760168-06) wurde mittels des Pierce Slide a Lyzer[®] Systems dialysiert, dazu wurden 600 µl 3 x für eine Stunde in 450 µl Milli-Q Wasser dialysiert.

Jeweils 60 µl des dialysierten Neorecormons[®] wurden, entsprechend der unten aufgeführten Tabelle, mit den Enzymen und einer Detergenismischung versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

| Probe Nr. | Abspaltung von: | Vol EPO dialysiert | Vol Lsg1 | Vol Lsg2 | Vol Lsg3 | Vol Lsg4 | Vol Gesamt |
|-----------|--|--------------------|----------|----------|----------|----------|------------|
| 1 | Sialinsäuren | 60 µl | | | 1,64 µl | 12 µl | 73,64 µl |
| 2 | Sialinsäuren O-Glycoside | 60 µl | | 5 µl | 1,64 µl | 13 µl | 79,64 µl |
| 3 | Sialinsäuren N-Glycoside | 60 µl | 6 µl | | 1,64 µl | 13 µl | 80,64 µl |
| 4 | Sialinsäuren O-Glycoside N-Glycoside | 60 µl | 6 µl | 5 µl | 1,64 µl | 14 µl | 86,64 µl |

Tab. E-9: Pipettierschema zur Deglycosylierung von rh-EPO

Western blot Bcl_xL

Das Blotten der Gele sowie die Entwicklung der Western blots erfolgten im Allgemeinen Krankenhaus (AKH), in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Pehamberger. Es wurde ein Chemolumineszenzkit der Fa. Tropix und das am AKH entwickelte Protokoll verwendet.

Nach der 2. Dimension wurden die Mini-Gele in Methanol / Milli-Q Wasser 20:80 überführt und darin zum AKH gebracht.

Die Gele werden 10 min im Blottingpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) equilibriert. In der Zwischenzeit die PVDF-Membran (Millipore IPVH 202 00, 0,45µm) durch kurzes Schwenken in Methanol rehydratisieren und anschließend durch schwenken in Blottingpuffer equilibrieren.

Zum Blotten wird eine Biorad Mini Trans Blot Cell verwendet. Filterpapiere entsprechend zuschneiden und ein Sandwich aus Schwamm, 3 x Filterpapier, Gel, Membran, 3 x Filterpapier, Schwamm zusammensetzen. Dabei darauf

Experimenteller Teil

achten, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden. Den Kühlkern einsetzen und bei 100 V für eine Stunde blotten.

Die Membran wird nun für 10 min in PBS-Tropix gewaschen (8,23 g Na_2HPO_4 , 2,35g $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 4,0 g HCl ad 1000 ml Milli-Q Wasser) und anschließend mit Blockinglösung (0,2 % I-Block, 0,1 % Tween 20 in PBS-Tropix, zur Herstellung PBS Tropix auf 60°C erwärmen, I-Block zusetzen, Tween 20 erst nach dem Abkühlen zugeben) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es kann wahlweise auch über Nacht im Kühlschrank inkubiert werden.

Detektion: Antikörper in Blockinglösung verdünnen und bei Raumtemperatur 1 Std inkubieren. Pro Membran werden 5 ml Antikörperverdünnung benötigt. Es wurde ein polyclonaler Bclx Antikörper (Transduction Laboratories, Lexington, KY) verwendet (Endkonzentration 2 µg/ml).

2 x 10 min in Blockinglösung waschen.

Als sekundären Antikörper wird ein goat anti-rabbit Antikörper 1:10.000 in Blockinglösung verdünnt und die Membran für 30 min inkubiert.

3 x 10 min in Blockinglösung waschen.

2 x 5 min in Assay Puffer (2,63 g Diethanolamin, 0,05 g MgCl_2 Milli-Q ad 250 ml, pH 10,0) waschen.

Die Membranen 5 min in je 2,85 ml CSPD (Tropix) + 150 µl Nitroblock inkubieren.

Membran abtupfen und in Klarsichtumschlag überführen.

In einer Filmkassette Hyperfilm (Amersham) für 1-30 min belichten und anschließend entwickeln.

Tricine-Gele¹³¹

Im Gegensatz zum Laemmli System wird beim Tricine-SDS-PAGE System Tricine anstelle des Glycins verwendet. Im Vergleich zum Laemmli System lassen sich hiermit auch niedermolekulare Peptide und Proteine.

Es wurden lineare 10 % T mit einem 4 % T Sammelgel gegossen. Dieses System eignet sich Proteine bis zu 5 kDa aufzutrennen.

Puffer:

10 fach Tricine-Anodenpuffer: 1,0 M Tris, mit HCl auf pH 8,9 einstellen.

10 fach Tricine-Kathodenpuffer: 1,0 M Tris, 1,0 M Tricine, 1 % SDS, pH 8,25 (muss nicht eingestellt werden).

3 fach Tricine-Gel Puffer 3,0 M Tris 0,3 % SDS, mit HCl auf pH 8,45 einstellen.

Acrylamid Stock (49,5 % T, 3 % C) 48,0 g Acrylamid + 1,5 g Bisacrylamid ad 100 ml Milli-Q Wasser.

| Puffer / Lösung | Sammelgel 4 % T | Trenngel 10 % T, 3 % C |
|-------------------------|-----------------|------------------------|
| Acrylamid Stock | 1 ml | 6 ml |
| Tricine-Gel Puffer (3x) | 3 ml | 10 ml |
| Glycerol | - | 3 g |
| Milli-Q Wasser ad | ad 12 ml | ad 30 ml |
| APS 10 % | 90 µl | 150 µl |
| TEMED | 9 µl | 15 µl |

Tab. E-10: Übersicht zur Herstellung der Tricine-Gele nach Schägger

Von Schägger und Jagow wurden weitere Trenngel-Zusammensetzungen beschrieben. So können durch Erhöhung der Acrylamidkonzentration auf 16,5 % T, der Bisacrylamid Konzentration auf 6 % und durch Zusatz von 6 M

Experimenteller Teil

Harnstoff zum Trenngel, auch noch sehr kleine Proteine und Peptide, mit einem Molekulargewicht bis zu 1 kDa aufgetrennt werden.

Die Vorbereitung der IPG-Strips für die 2. Dimension erfolgt wie bei der Standard-Laemmli SDS-PAGE. Es müssen lediglich die oben beschriebenen Tricine-Kathoden und Tricine-Anodenpuffer verwendet werden. Außerdem muss die Agarose zum Überschichten der Strips mit dem 10 fach Tricine-Kathodenpuffer angesetzt werden.

| Spannung | Dauer |
|------------------------|--------|
| 30 V | 20 min |
| 150 V – 280 V Gradient | 2 h |
| 280 V | > 4 h |

Tab. E-11: Spannungsprogramm unter Kühlung 12°C

Lösungen

Lösungen zur Probenaufarbeitung und für den Bradford-Assay

| | | Konzentration | Menge |
|-----------|-------------------------------------|---------------|-------------|
| Lösung A1 | 3 M Natriumchlorid, pH 7,4 | | |
| | Natriumchlorid | 3 M | 52,65 g |
| | Salzsäure 6 M | | ad pH 7,4 |
| | Milli-Q Wasser | | ad 300,0 ml |
| Lösung A2 | 150 mM Natriumchlorid-Lösung | | |
| | 3 M Natriumchlorid pH 7,4 (A1) | 150 mM | 1,00 ml |
| | Milli-Q Wasser | | ad 20,0 ml |
| Lösung A3 | Lysis-Puffer (-20°C) | | |
| | Harnstoff | 8 M | 24,04 g |
| | Thioharnstoff | 2 M | 7,61 g |
| | Triton-X 100 | 0,5 % (v/v) | 250 µl |
| | CHAPS | 2 % (w/v) | 1,000 g |
| | EDTA | 5 mM | 0,093 g |
| | PMSF (frisch zusetzen) | 20 nM | |
| | Milli-Q Wasser | | ad 50,0 ml |
| Lösung A4 | Lysis-Puffer, fertig | | |
| | Dithiothreitol (frisch zusetzen) | 5 mg/ml | 5 mg |
| | Lysis-Puffer (A3) | | 1,000 ml |
| Lösung A5 | Bradford -Reagenz-Lösung | | |
| | Coomassie Brilliant Blau G 250 | 0,1 mg/ml | 25 mg |
| | Ethanol absolut | 5 % (v/v) | 12,5 ml |
| | Phosphorsäure 85 % | 10 % (v/v) | 25 ml |
| | Milli-Q Wasser | | ad 250,0 ml |

Experimenteller Teil

| | | | |
|-----------|---------------------------------------|---------------|-------------|
| Lösung A6 | Rehydrier-Lösung, Stock(-20°C) | | |
| | Harnstoff | 8 M | 12,00 g |
| | Thioharnstoff | 2 M | 3,80 g |
| | CHAPS | 4 % (w/v) | 1,00 g |
| | Triton-X-100 | 0,5 % (v/v) | 0,13 g |
| | Bromophenol blau 1 % (w/v) | 0,005 % (w/v) | 125,00 µl |
| | Milli-Q Wasser | | ad 25,00 ml |
| Lösung A7 | Rehydrier-Lösung, fertig | | |
| | Dithiothreitol (frisch zusetzen) | 0,5 % (w/v) | 5,0 mg |
| | IPG-Puffer (frisch zusetzen) | 0,5 % (v/v) | 5,0 µl |
| | Rehydration-Lösung | | 1,000 ml |

Lösungen für die Herstellung der Acrylamidgele

| | | Konzentration | Menge |
|-----------|--|---------------|------------|
| Lösung B1 | Acrylamid-Stock-Lösung (4°C) | | |
| | Acrylamid 2X | 30 % (w/v) | 120,00 g |
| | N,N'-Methylenbisacrylamid 2X | 0,8 % (w/v) | 3,20 g |
| | Milli-Q Wasser | | ad 400 ml |
| Lösung B2 | Trenngelgel-Puffer | | |
| | Tris(hydroxymethyl)aminomethan | 1,5 M | 90,75 g |
| | Natriumdodecylsulfat | 1 % (w/v) | 2,00 g |
| | Salzsäure 6 M | | ad pH 8,8 |
| | Milli-Q Wasser | | ad 500 ml |
| Lösung B3 | Sammelgel-Puffer | | |
| | Tris(hydroxymethyl)aminomethan | 0,5 M | 6,06 g |
| | Natriumdodecylsulfat | 0,4 % (w/v) | 0,40 g |
| | Salzsäure 6 M | | ad pH 6,8 |
| | Milli-Q Wasser | | ad 100 ml |
| Lösung B4 | 10 % Ammoniumpersulphat (-20°C) | | |
| | Ammoniumpersulphat (APS) | 10 % (w/v) | 5,00 g |
| | Milli-Q Wasser | | ad 50,0 ml |

Lösungen für SDS-PAGE

| | | Konzentration | Menge |
|-----------|--|---------------|--------------|
| Lösung C1 | Reequilibrier-Lösung (-20°C) | | |
| | Tris pH 8,8 (mit HCl einstellen) | | 1,21g |
| | Harnstoff | 6 M | 72,07 g |
| | Glycerol | 30 % (w/v) | 69,0 ml |
| | Natriumdodecylsulfat | 2 % (w/v) | 4,00 g |
| | Bromphenol blau 1 % (w/v) | 0,005 % (w/v) | 1,00 ml |
| | Milli-Q Wasser | | ad 200 ml |
| Lösung C2 | Reequilibrier-Lösung mit DTT | | |
| | Reequilibrier-Lösung | | 5,0 ml |
| | Dithiothreitol (frisch zusetzen) | 5 mg/ml | 50 mg |
| Lösung C3 | Reequilibrier-Lösung mit IAA | | |
| | Reequilibrier-Lösung | | 5,0 ml |
| | Iodacetamid (frisch zusetzen) | 25 mg/ml | 125 mg |
| Lösung C4 | 10x Anoden- Puffer, Stock-Lösung | | |
| | Tris(hydroxymethyl)aminomethan | 250 mM | 30,20 g |
| | Natriumdodecylsulfat | 1 % (w/v) | 10,00 g |
| | Milli-Q Wasser | | ad 1000 ml |
| Lösung C5 | Anoden-Puffer | | |
| | 10x Anoden-Puffer, Stock-Lösung (C4) | | 100,0 ml |
| | Milli-Q Wasser | | to 1000,0 ml |
| Lösung C6 | 10x Kathoden-Puffer, Stock-Lösung | | |
| | Tris(hydroxymethyl)aminomethane | 250 mM | 30,20 g |
| | Glycin | 384 mM | 144,20 g |
| | Natriumdodecylsulfat | 1 % (w/v) | 10,00 g |
| | Milli-Q Wasser | | to 1000 ml |
| Lösung C7 | Kathoden-Puffer | | |
| | 10x Kathoden-Puffer, Stock-Lsg (C6) | | 100,0 ml |
| | Milli-Q Wasser | | to 1000,0 ml |

Experimenteller Teil

| | | | |
|-----------|-------------------------------------|-------------|---------|
| Lösung C8 | Agarose-Lösung | | |
| | Agarose | 0,5 % (w/v) | 0,100 g |
| | 10x Kathoden-Puffer, Stock-Lsg (C6) | | 2,00 ml |
| | Milli-Q Wasser | | 18,0 ml |

Silber-Färbelösungen (Blum et al.¹²¹)

| | | Konzentration | Menge |
|-----------|--|---------------|-------------|
| Lösung D1 | Fixier-Lösung | | |
| | Essigsäure (96 %) | 10 % (v/v) | 80,0 ml |
| | Methanol | 40 % (v/v) | 320,0 ml |
| | Milli-Q Wasser | | ad 800,0 ml |
| Lösung D2 | Wasch-Lösung | | |
| | Ethanol | 30 % (v/v) | 240,0 ml |
| | Milli-Q Wasser | | ad 800,0 ml |
| Lösung D3 | Sensitizer-Lösung | | |
| | Natriumthiosulfat | 0,2 g/l | 160 mg |
| | Milli-Q Wasser | | ad 800,0 ml |
| Lösung D4 | Silber-Lösung | | |
| | Silbernitrat | 2,0 g/l | 1,60 g |
| | 37 % (w/v) Formaldehyd (frisch zusetzen) | 0,2 ml/l | 160 µl |
| | Milli-Q Wasser | | ad 800,0 ml |
| Lösung D5 | Entwickler-Lösung | | |
| | Natriumcarbonat | 30 g/l | 24,00 g |
| | Natriumthiosulfat | 5 mg/l | 4 mg |
| | 37 % (w/v) Formaldehyd (frisch zusetzen) | 0,5 ml/l | 400 µl |
| | Milli-Q Wasser | | ad 800,0 ml |
| Lösung D6 | Stop-Lösung | | |
| | Glycin | 5 g/l | 4,00 g |
| | Milli-Q Wasser | | ad 800,0 ml |

Coomassie-Färbelösungen (Neuhoff et al.⁴⁴)

| | | Konzentration | Menge |
|-----------|--|-------------------------------|--------------------------------|
| Lösung E1 | Fixier-Lösung Trichloressigsäure Milli-Q Wasser | 12 % (w/v) | 96,0 g ad 800,0 ml |
| Lösung E2 | Stammlösung I Coomassie Brilliant Blau G 250 Essigsäure 7,5 % (v/v) Ammoniumsulphat | 1,4 % (w/v) 30 % (w/v) | 3,50 g 250,0 ml 75,00 g |
| | Coomasie Blau-Präzipitat Methanol Aceton | 33,3 % (v/v) 66,7 % (v/v) | 100,0 ml 200,0 ml |
| Lösung E3 | Stammlösung II Ammoniumsulphat Phosphorsäure Milli-Q Wasser | 12,5 % (w/v) 2,5 % (w/v) | 40,00 g 8,00 g ad 320 ml |
| Lösung E4 | Coomasie Blau-Färbelösung Coomasie Blau-Lösung I, Stock Färbelösung II, Stock Methanol | | 20,0 ml 200,0 ml 30,0 ml |
| Lösung E5 | Wasch-Lösung I Tris(hydroxymethyl)aminomethane Phosphoric acid Milli-Q Wasser | 0,1 M adjust to pH 6,5 | 12,10 g ad 1000,0 ml |
| Lösung E6 | Wasch-Lösung II Methanol Milli-Q Wasser | 25 % (v/v) | 25,0 ml ad 100,0 ml |
| Lösung E7 | Stabilisier-Lösung Ammoniumsulfat Milli-Q Wasser | 20 % (w/v) | 200,00 g ad 1000,0 ml |

Lösungen für MALDI-TOF Probenaufbereitung^{46,48}

| | | Konzentration | Menge |
|-----------|--|---------------|-------------|
| Lösung F1 | Entfärbe-Lösung (nur bei Silberfärbung) | | |
| | 30mM Kaliumhexacyanoferrat | | 1,000 ml |
| | 100mM Natriumthiosulfat | | 1,000 ml |
| Lösung F2 | Wasch-Lösung 1 | | |
| | Acetonitril | 50 % (v/v) | 500,0 µl |
| | 25mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 8.0 | | ad 1,000 ml |
| Lösung F3 | Reduzier-Lösung | | |
| | Dithiothreitol (frisch zusetzen) | 10 mM | 3,1 mg |
| | 100mM Ammoniumhydrogencarbonat | | ad 2,000 ml |
| Lösung F4 | Alkylier-Lösung | | |
| | Iodacetamid (frisch zusetzen) | 55 mM | 20,4 mg |
| | 100mM Ammoniumhydrogencarbonat | | ad 2,000 ml |
| Lösung F5 | Waschl-Lösung 2 | | |
| | Ammoniumhydrogencarbonat | 100 mM | 790,0 mg |
| | Milli-Q Wasser | | 100,00 ml |
| Lösung F6 | Trypsin-Lösung (-80°C) | | |
| | Trypsin | 0,125 µg/µl | 25 µg |
| | 1 mM Salzsäure | | 200,0 µl |
| Lösung F7 | Verdaupuffer mit Trypsin | | |
| | Trypsin-Lösung | 12,5 ng/µl | 20,0 µl |
| | 100mM Ammoniumhydrogencarbonat | 50 mM | 100,0 µl |
| | 100mM Calciumchlorid | 5 mM | 10,0 µl |
| | Milli-Q Wasser | | 70,0 µl |

| | | | |
|------------|----------------------------------|-------------|--------------|
| Lösung F8 | Verdaupuffer ohne Trypsin | | |
| | 100mM Ammoniumhydrogencarbonat | 50 mM | 100,0 µl |
| | 100mM Calciumchlorid | 5 mM | 10,0 µl |
| | Milli-Q Wasser | | 90,0 µl |
| Lösung F9 | Extraktions-Lösung 1 | | |
| | Ammoniumhydrogencarbonat | 20 mM | 159 mg |
| | Milli-Q Wasser | | ad 100,00 ml |
| Lösung F10 | Extraktions-Lösung 2 | | |
| | Ameisensäure | 5 % (v/v) | 5,00 ml |
| | Acetonitril | 50 % (v/v) | 50,0 ml |
| | Milli-Q Wasser | | ad 100,00 ml |
| Lösung F11 | Proben-Lösung | | |
| | Acetonitril | 50 % (v/v) | 500 µl |
| | Trifluoressigsäure | 0,1 % (v/v) | 1,0 µl |
| | Milli-Q Wasser | | ad 1,000 ml |

Lösungen für die ZipTip-Entsalzung

| | | Konzentration | Menge |
|-----------|-------------------------------|---------------|-------------|
| Lösung G1 | Benetzung-Lösung | | |
| | Acetonitril | 50 % (v/v) | 500 µl |
| | Milli-Q Wasser | | ad 1,000 ml |
| Lösung G2 | Equilibrier-Lösung | | |
| | Trifluoressigsäure | 0,1 % (v/v) | 1,0 µl |
| | Milli-Q Wasser | | ad 1,000 ml |
| Lösung G3 | Proben-Lösung | | |
| | Extrahierte Peptide (trocken) | | |
| | Trifluoressigsäure | 0,5 % (v/v) | 5,0 µl |
| | Milli-Q Wasser | | ad 1,000 ml |
| Lösung G4 | Eluier-Lösung | | |
| | Trifluoressigsäure | 0,1 % (v/v) | 1,0 µl |
| | Methanol | 5 % (v/v) | 50,0 µl |
| | Milli-Q Wasser | | ad 1,000 ml |

Experimenteller Teil

Die Temperaturangaben, die sich in Klammer hinter den Lösungsbezeichnungen finden, beziehen sich auf die empfohlene Lagerungstemperatur, fehlt diese Angabe so können die Lösungen bei Raumtemperatur gelagert werden oder sind direkt vor der Verwendung frisch herzustellen.

Veröffentlichungen zu dieser Arbeit

W. Schlags, M. Walther, M. Masree, M. Kratzel, C. R. Noe, B. Lachmann:
„Towards validating a method for 2-DE/silver staining“, Electrophoresis
2005, 26, S. 2461-2469

W. Schlags, B. Lachmann, C. R. Noe: **„Two dimensional electrophoresis of
Recombinant Human Erythropoietin“**, Bioforum International 2002, 6,
S. 318-320

W. Schlags, B. Lachmann, M. Walther, M. Kratzel and C. R. Noe: **„Two-
dimensional electrophoresis of recombinant human Erythropoietin: A
future method for the European Pharmacopoeia?“**, Proteomics 2002, 2,
S. 679-682

Poster

W. Schlags, J. Lenco, B. Lachmann, M. Kratzel, K. Geißler, L. Öhler, C. R.
Noe: **“Differential proteomics for Leukemia – a focus on method
development and sample preparation –“** Poster at EUFEPS Conference,
New Safe Medicines Faster, 20-23.10.2002, Stockholm

W. Schlags, B. Lachmann, M. Walther, A. van Treeck, M. Kratzel and C. R.
Noe: **“Two dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass
spectrometry of recombinant human Erythropoietin“**, Poster at EUFEPS
Conference on Optimising Biotech Medicines: Rational development of
therapeutic Proteins, 13-15.05.2002, Berlin

Veröffentlichungen

W. Schlags, B. Lachmann, A. van Treeck, M. Kratzel und C. R. Noe:
„Analytik verschiedener rekombinanter Arzneistoffzubereitungen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese“, Poster at Analytica Conference, 23.-25.04.2002, München

W. Schlags, B. Lachmann, M. Walther, M. Masree, M. Kratzel and C. R. Noe:
Two dimensional electrophoresis of recombinant human Erythropoietin - A future method for the European Pharmacopoeia?“, Poster 32, Proteomic Forum 16.-19.09.2001, ISBN 3-936175-00-4, S. 121, München

W. Schlags, M. Walther, M. Kratzel, M. Masree, C. R. Noe: **"Towards validating a method for 2D-Electrophoresis"**, Poster 45, „From Genome to Proteome“, 04.-07.09.2000, Siena

Vorträge

B. Lachmann, W. Schlags: **„Rekombinante Arzneistoffe – ein Überblick“**, Sommerakademie der Österreichischen Apothekerkammer, 21.-23.06.2002, Pörschach

W. Schlags, B. Lachmann, M. Kratzel, M. Walther, C. R. Noe: **„The impact of Two-dimensional electrophoresis on the analysis of recombinant drugs“**, ÖPHG-Tagung, 23.-25.09.2001, Scientia Pharmaceutica, 69 (3), S. 27-28

W. Schlags, M. Walther, M. Kratzel, C. R. Noe: **"Implementing Quality Assurance in 2-D Gelelectrophoresis - a pharmaceutical approach -"**, Diskussionsvortrag DPhG Jahrestagung 04.-07.10.2000, Archiv der Pharmazie Supplement 2/00, Vol. 333, S. 9

Co-Betreute Diplomarbeiten

Nikolaus Frick: **„Functional Plant-Proteomics: Zweidimensionale Gelelektrophorese verschiedener Dioscorea-Spezies zur Auffindung von Enzymen der Diosgenin-Biosynthese“**, Universität Wien, 2002

Juraj Lenčo: **„Cancer Proteomics: Two Dimensional Electrophoresis for the detection of proteinexpression changes in Leukemia“**, Universität Wien und Faculty of Pharmacy in Hradec Králové Charles University of Prague, 2002

Kateřina Viktorová, **„Leukemia Proteomics: Strategies to break down complexity“**, Universität Wien und Faculty of Pharmacy in Hradec Králové Charles University of Prague, 2003

Literatur-Verzeichnis

1. Steiner, S. & Anderson, N. L. Pharmaceutical proteomics. *Ann N Y Acad Sci* **919**, 48-51 (2000).
2. Burbaum, J. & Tobal, G. M. Proteomics in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 427-33. (2002).
3. Seliger, B. & Kellner, R. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics* **2**, 1641-51. (2002).
4. Steiner, S. *et al.* Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver. *Electrophoresis* **21**, 2129-37 (2000).
5. Steiner, S. & Witzmann, F. A. Proteomics: applications and opportunities in preclinical drug development. *Electrophoresis* **21**, 2099-104. (2000).
6. Fella, K. *et al.* Use of two-dimensional gel electrophoresis in predictive toxicology: identification of potential early protein biomarkers in chemically induced hepatocarcinogenesis. *Proteomics* **5**, 1914-27 (2005).
7. Jones, M. B. *et al.* Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* **2**, 76-84. (2002).
8. Li, J., Zhang, Z., Rosenzweig, J., Wang, Y. Y. & Chan, D. W. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* **48**, 1296-304. (2002).
9. Young, D. S. & Tracy, R. P. Clinical applications of two-dimensional electrophoresis. *J Chromatogr A* **698**, 163-79. (1995).
10. Fey, S. J. & Larsen, P. M. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 26-33. (2001).

11. Rabilloud, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10. (2002).
12. Rais, I., Karas, M. & Schagger, H. Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* **4**, 2567-71 (2004).
13. Raymond, S. & Weintraub, L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711 (1959).
14. O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-21. (1975).
15. Klose, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-43 (1975).
16. Klose, J. & Spielmann, H. Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4. *Biochem Genet* **13**, 707-20. (1975).
17. Czempel, W., Klose, J. & Bass, R. Mammalian mitochondrial ribosomes: characterization of ribosomal proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *FEBS Lett* **62**, 259-62. (1976).
18. Bjellqvist, B. *et al.* Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**, 317-39 (1982).
19. Gorg, A., Weiss, W. & Dunn, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-85 (2004).
20. Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51 (2001).
21. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
22. Abbott, A. And now for the proteome. *Nature* **409**, 747. (2001).

Literatur

23. Abbott, A. Human Proteome Index launched. *Nature* **409**, 3. (2001).
24. Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D. & Hochstrasser, D. F. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics* (Springer Verlag, Berlin, 1997).
25. Gavin, A. C. *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-7. (2002).
26. Ho, Y. *et al.* Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-3. (2002).
27. Hanash, S. Samir Hanash discusses how HUPO aims to globalize proteomics research. *Drug Discov Today* **7**, 797-801. (2002).
28. Lottspeich, F. & Zorbas, H. *Bioanalytik* (Spektrum Verlag, 1998).
29. Amersham. 2-D Electrophoresis Principles and Methods. *Broschüre 80-6429-60*, 80.
30. Westermeier, R. (1999).
31. Schlags, W., Lachmann, B., Walther, M., Kratzel, M. & Noe, C. R. Two-dimensional electrophoresis of recombinant human erythropoietin: a future method for the European Pharmacopoeia? *Proteomics* **2**, 679-82. (2002).
32. Ornstein, L. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* **121**, 321-49 (1964).
33. Davis, B. J. Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci* **121**, 404-27 (1964).
34. Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**, 815-20 (1967).
35. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
36. Rabilloud, T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol* **112**, 9-19 (1999).

37. Chevallet, M. *et al.* New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 1901-9. (1998).
38. Rabilloud, T., Gianazza, E., Catto, N. & Righetti, P. G. Amidosulfobetaines, a family of detergents with improved solubilization properties: application for isoelectric focusing under denaturing conditions. *Anal Biochem* **185**, 94-102. (1990).
39. Rabilloud, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two- dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 758-60. (1998).
40. Gorg, A., Postel, W., Domscheit, A. & Gunther, S. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis* **9**, 681-92. (1988).
41. Gorg, A., Boguth, G., Obermaier, C. & Weiss, W. Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis* **19**, 1516-9. (1998).
42. Gorg, A. *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-53. [pii] (2000).
43. Patton, W. F. Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **771**, 3-31. (2002).
44. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-62 (1988).
45. Rabilloud, T. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* **112**, 297-305 (1999).

Literatur

46. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-8 (1996).
47. Richert, S. *et al.* About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 909-16 (2004).
48. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S. & Mische, S. M. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**, 601-5. (1999).
49. Patton, W. F., Lim, M. J. & Shepro, D. Protein detection using reversible metal chelate stains. *Methods Mol Biol* **112**, 331-9 (1999).
50. Rabilloud, T., Strub, J. M., Luche, S., van Dorsselaer, A. & Lunardi, J. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**, 699-704 (2001).
51. Lamanda, A., Zahn, A., Roder, D. & Langen, H. Improved Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics* **4**, 599-608 (2004).
52. Loo, R. R. *et al.* Virtual 2-D gel electrophoresis: visualization and analysis of the E. coli proteome by mass spectrometry. *Anal Chem* **73**, 4063-70. (2001).
53. Loo, J. A. *et al.* High sensitivity mass spectrometric methods for obtaining intact molecular weights from gel-separated proteins. *Electrophoresis* **20**, 743-8. [pii] (1999).
54. Wulfschlegel, J. D. *et al.* New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* **1**, 1205-15. (2001).
55. Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P. & Felschow, D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and

- biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 587-92. (2002).
56. Binz, P. A. *et al.* A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images. *Anal Chem* **71**, 4981-8. (1999).
57. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4 (1979).
58. Liu, B. & Marks, J. D. Applying phage antibodies to proteomics: selecting single chain Fv antibodies to antigens blotted on nitrocellulose. *Anal Biochem* **286**, 119-28. (2000).
59. Alban, A. *et al.* A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **3**, 36-44. (2003).
60. Bernhardt, J., Buttner, K., Scharf, C. & Hecker, M. Dual channel imaging of two-dimensional electropherograms in *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **20**, 2225-40 (1999).
61. Steinberg, T. H. *et al.* Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots. *Proteomics* **1**, 841-55 (2001).
62. Smolka, M., Zhou, H. & Aebersold, R. Quantitative protein profiling using two-dimensional gel electrophoresis, isotope-coded affinity tag labeling, and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **1**, 19-29. (2002).
63. Rabilloud, T. *Proteome Research, Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods* (Springer, Berlin, 2000).
64. Tanaka, K., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. & Yoshida, T. in *Proc. Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*, 185-188 (Osaka Japan, 1987).
65. Yoshida, T., Tanaka, K., Ido, Y., Akita, S. & Yoshida, Y. *Mass Spectroscopy (Japan)* **36**, 59 (1988).

Literatur

66. Tanaka, K. *et al.* Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by laser ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151-153 (1988).
67. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299-301 (1988).
68. Bahr, U., Deppe, A., Karas, M. & Hillenkamp, F. Mass spectrometry of synthetic polymers by UV-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation. *Anal. Chem.* **64**, 2866-2869 (1992).
69. Mamyrin, B. A., Karatajev, V. J., Smikk, D. V. & Zagulin, V. A. *Soviet Phys. JETP* **37**, 45-48 (1973).
70. Vestal, M. L., Juhasz, P. & A., M. S. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1044-1050 (1995).
71. Amersham. Ettan CAF MALDI Sequencing Kit. *Product Brochure* **71-5024-09** (2003).
72. Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C. & Appel, R. D. Proteomics and its trends facing nature's complexity. *Proteomics* **2**, 807-12. (2002).
73. Harrison, P. M., Kumar, A., Lang, N., Snyder, M. & Gerstein, M. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Res* **30**, 1083-90. (2002).
74. Roberts, G. C. & Smith, C. W. Alternative splicing: combinatorial output from the genome. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 375-83. (2002).
75. Langen, H. in *Proteomic Forum* (Munich, Germany, 1999).
76. Internet.: <http://abrf.org/index.cfm/dm.home>. .
77. Alberts, B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* **92**, 291-4 (1998).
78. Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-6 (1989).

79. Uetz, P. *et al.* A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-7 (2000).
80. Santoni, V., Molloy, M. & Rabilloud, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054-70. [pii] (2000).
81. Luche, S., Santoni, V. & Rabilloud, T. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3**, 249-53 (2003).
82. Tastet, C., Charmont, S., Chevillet, M., Luche, S. & Rabilloud, T. Structure-efficiency relationships of zwitterionic detergents as protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3**, 111-21 (2003).
83. Molloy, M. P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem* **280**, 1-10. (2000).
84. Vuong, G. L. *et al.* Improved sensitivity proteomics by postharvest alkylation and radioactive labelling of proteins. *Electrophoresis* **21**, 2594-605. (2000).
85. Klose, J. Genotypes and phenotypes. *Electrophoresis* **20**, 643-52. (1999).
86. Gauss, C., Kalkum, M., Lowe, M., Lehrach, H. & Klose, J. Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis* **20**, 575-600. (1999).
87. Craven, R. A., Totty, N., Harnden, P., Selby, P. J. & Banks, R. E. Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *Am J Pathol* **160**, 815-22. (2002).
88. Banks, R. E. *et al.* The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis--preliminary findings. *Electrophoresis* **20**, 689-700. [pii] (1999).

Literatur

89. Cordwell, S. J., Nouwens, A. S., Verrills, N. M., Basseal, D. J. & Walsh, B. J. Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* **21**, 1094-103. [pii] (2000).
90. Molloy, M. P., Herbert, B. R., Williams, K. L. & Gooley, A. A. Extraction of Escherichia coli proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 701-4 (1999).
91. Herbert, B. & Righetti, P. G. A turning point in proteome analysis: sample prefractionation via multicompartment electrolyzers with isoelectric membranes. *Electrophoresis* **21**, 3639-48. (2000).
92. Gorg, A. *et al.* Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels. *Proteomics* **2**, 1652-7. (2002).
93. Wang, Y. Y., Cheng, P. & Chan, D. W. A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis. *Proteomics* **3**, 243-8 (2003).
94. Fountoulakis, M. *et al.* Depletion of the high-abundance plasma proteins. *Amino Acids* **27**, 249-59 (2004).
95. Wildgruber, R. *et al.* Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of Saccharomyces cerevisiae proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 2610-6. (2000).
96. Dissertation: Winkler, J. Rückgratmodifizierte Antisense Oligonukleotide und Konjugate mit 2' Aminomodifikationen. *Department of Medicinal-Pharmaceutical Chemistry Univ. Vienna* (2003).
97. Dissertation: Masree, M. Proteomanalyse des menschlichen Uterus. *Pharmazeutische Chemie Univ. Frankfurt a. M.* (2004).
98. Diplomarbeit: Frick, N. Functional Plant-Proteomics: Zweidimensionale Gelelektrophorese verschiedener Dioscorea-Species

- zur Auffindung von Enzymen der Diosgenin Biosynthese. *Department of Medicinal-Pharmaceutical Chemistry Univ. Vienna* (2002).
99. Diplomarbeit: Lenco, J. Cancer Proteomics - Two Dimensional Electrophoresis for the Detection of Proteinexpression Changes in Leukemia. *Department of Medicinal-Pharmaceutical Chemistry Univ. Vienna* (2002).
100. Diplomarbeit: Viktorova, K. Leukemia Proteomics - Strategies to break down complexity. *Department of Medicinal-Pharmaceutical Chemistry Univ. Vienna* (2003).
101. Bellairs, R. & Osmond, M. *The Atlas of Chick Development* (Academic Press, San Diego, 1998).
102. Patras, G., Qiao, G. G. & Solomon, D. H. On the mechanism of background silver staining during sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 2039-45 (1999).
103. Westermeier, R. Isoelectric focusing. *Methods Mol Biol* **59**, 239-48 (1996).
104. Westermeier, R. Isoelectric focusing. *Methods Mol Biol* **244**, 225-32 (2004).
105. Kyhse-Andersen, J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-9 (1984).
106. Conneely, O. M., Kettelberger, D. M., Tsai, M. J., Schrader, W. T. & O'Malley, B. W. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J Biol Chem* **264**, 14062-4 (1989).
107. Cho, S. Y. *et al.* An integrated proteome database for two-dimensional electrophoresis data analysis and laboratory information management system. *Proteomics* **2**, 1104-13. (2002).

Literatur

108. Tonge, R. *et al.* Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1**, 377-96. (2001).
109. Nishihara, J. C. & Champion, K. M. Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis* **23**, 2203-15. (2002).
110. Damerval, C. Quantification of silver-stained proteins resolved by two-dimensional electrophoresis: genetic variability as related to abundance and solubility in two maize lines. *Electrophoresis* **15**, 1573-9. (1994).
111. Giometti, C. S., Gemmell, M. A., Tollaksen, S. L. & Taylor, J. Quantitation of human leukocyte proteins after silver staining: a study with two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **12**, 536-43. (1991).
112. Corbett, J. M., Dunn, M. J., Posch, A. & Gorg, A. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* **15**, 1205-11. (1994).
113. Blomberg, A. *et al.* Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **16**, 1935-45. (1995).
114. Harrison, H. H., Miller, K. L., Dickinson, C. & Daufeldt, J. A. Quality assurance and reproducibility of high-resolution two-dimensional electrophoresis and silver staining in polyacrylamide gels. *Am J Clin Pathol* **97**, 97-105. (1992).
115. Schlags, W. *et al.* Towards validating a method for two-dimensional electrophoresis/silver staining. *Electrophoresis* **26**, 2461-9 (2005).
116. Kromidas, S. *Validierung in der Analytik* (Wiley-VCH, Weinheim, 1999).

117. Feuerpfeil, J., Heigl, F. & Wiedling, H. *Praktische Stochastik* (Bayrischer Schulbuchverlag, 1994).
118. Lorenz, R. *Grundbegriffe der Biometrie* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1996).
119. Tonella, L. *et al.* New perspectives in the Escherichia coli proteome investigation. *Proteomics* **1**, 409-23 (2001).
120. Horwitz, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.* **54**, 67-76 (1982).
121. Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99 (1987).
122. Dingermann, T. *Gentechnik Biotechnik* (WVG, Stuttgart, 1999).
123. Palmiter, R. D. *et al.* Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300**, 611-5 (1982).
124. Blauen-Institut. Transgene Nutztiere: Landwirtschaft - Gene Pharming - Klonen. *SAG Studienpapier* www.blauen-institut.ch (2000).
125. Pierce, J. G. & Parsons, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* **50**, 465-95 (1981).
126. Suganuma, N., Matzuk, M. M. & Boime, I. Elimination of disulfide bonds affects assembly and secretion of the human chorionic gonadotropin beta subunit. *J Biol Chem* **264**, 19302-7 (1989).
127. Feng, W. *et al.* The asparagine-linked oligosaccharides of the human chorionic gonadotropin beta subunit facilitate correct disulfide bond pairing. *J Biol Chem* **270**, 11851-9 (1995).
128. Driancourt, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* **55**, 1211-39 (2001).
129. Coulibaly, S. *et al.* Expression and characterization of functional recombinant bovine follicle-stimulating hormone (boFSHalpha/beta)

Literatur

- produced in the milk of transgenic rabbits. *Mol Reprod Dev* **63**, 300-8 (2002).
130. Belitz, H.-D. & Grosch, W. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (Springer, Berlin, 1987).
131. Schagger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79 (1987).
132. Higuchi, M. *et al.* Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J Biol Chem* **267**, 7703-9. (1992).
133. Greenberg, N. M. *et al.* Expression of biologically active heterodimeric bovine follicle-stimulating hormone in milk of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8327-31 (1991).
134. Sattler, M. *et al.* Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**, 983-6 (1997).
135. Clem, R. J. *et al.* Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 554-9 (1998).
136. Xue, L. *et al.* Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV radiation-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6925-30 (2002).
137. Heere-Ress, E. *et al.* Bcl-X(L) is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. *Int J Cancer* **99**, 29-34 (2002).
138. Wacheck, V. *et al.* Bcl-x(L) antisense oligonucleotides radiosensitise colon cancer cells. *Br J Cancer* **89**, 1352-7 (2003).
139. Jansen, B. *et al.* Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* **356**, 1728-33 (2000).
140. Winkler, J. *et al.* A novel concept for ligand attachment to oligonucleotides via a 2'-succinyl linker. *Nucleic Acids Res* **32**, 710-8 (2004).

141. Arzneibuchkommission. Europäisches Arzneibuch. **3** (1997).
142. Watson, J. D. & Crick, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-8 (1953).
143. Rader, R. *Biopharmaceutical Products in the U.S. Market* (Biotechnology Information Institute, Rockville, 2001).
144. Goeddel. (US, 1986).
145. Gitlin, G. *et al.* Isolation and characterization of a monomethioninesulfoxide variant of interferon alpha-2b. *Pharm Res* **13**, 762-9 (1996).
146. Inoue, N., Takeuchi, M., Ohashi, H. & Suzuki, T. The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnol Annu Rev* **1**, 297-313 (1995).
147. Takeuchi, M. *et al.* Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **263**, 3657-63. (1988).
148. Jelkmann, W. Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug. *Curr Pharm Biotechnol* **1**, 11-31. (2000).
149. Lasne, F. & de Ceaurriz, J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* **405**, 635 (2000).
150. Arzneibuchkommission. Europäisches Arzneibuch. **4** (2002).
151. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch* (Gryter, Berlin, 2004).
152. Topbas, O. F., Jehle, R., Sinha, P. & Rustow, B. An electrophoretic study of vitamin E status and expression of heat shock proteins in alveolar type II and liver cells. *Electrophoresis* **21**, 3552-7 (2000).
153. Roche-AG. Personal Communication. (2001).
154. Keough, T., Youngquist, R. S. & Lacey, M. P. A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsource decay matrix-assisted

Literatur

- laser desorption ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7131-6 (1999).
155. Centon. *Venimmun Gebrauchsinformation* (, Marburg, Germany, 1998).
156. Zolg, J. W. & Langen, H. How industry is approaching the search for new diagnostic markers and biomarkers. *Mol Cell Proteomics* **3**, 345-54 (2004).
157. Begemann, M. *Praktische Hämatologie* (Thieme, Stuttgart, 1999).
158. Marshall, T. & Williams, K. M. Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria. *Electrophoresis* **20**, 1307-24 (1999).
159. Pieper, R. *et al.* Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* **4**, 1159-74 (2004).
160. Milstein, C., Clegg, J. B. & Jarvis, J. M. Immunoglobulin lambda-chains. The complete amino acid sequence of a Bence-Jones protein. *Biochem J* **110**, 631-52 (1968).
161. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
162. Rabilloud, T., Valette, C. & Lawrence, J. J. Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **15**, 1552-8. (1994).
163. *The Cell*, 4. Edition, chapter **24**, Garland Science, New York.

Lebenslauf

Name: Wolfgang Schlags

Familienstand: ledig

Wohnort: Marktstrasse 34, D-56727 Mayen

Geburtsdatum: 26.09.1972

Eltern: Wolfgang Schlags (Apotheker)
Barbara Schlags geb. Kreuzberg (Sportlehrerin)

Geschwister: Markus, Stephanie, Susanne

Schulbildung: 1979-1983 St. Clemens Grundschule, Mayen
1983-1992 Megina Gymnasium, Mayen
1992 Abitur

Bundeswehr: 07/1992 – 06/1993 Grundausbildung in
Gerolstein und Würzburg, Verwendung als
Sanitäter in Mayen (HG).

Studium: 1993-1997 Studium der Pharmazie in Freiburg
1995 1. Staatsexamen
1997 2. Staatsexamen

Prakt. Ausbildung: 11/1997-04/1998 Godeffroy Apotheke in
Hamburg Blankenese (Dr. R. Sandmann)
05/1998-10/1998 Bayer AG Leverkusen
Entwicklung Analytik, HPLC-Automation (D.I.
Wortig). Installation, Qualifizierung einer HPLC-
gekoppelten TPW II (Tablet Processing Work-
station II) und Methodenentwicklung für
Bay 13-9952.
1998 3. Staatsexamen
14.12.1998 Approbation als Apotheker

Lebenslauf

- Auslandsaufenthalt: 01-04/1999 Tätigkeit bei Bayer Brasil in Sao Paulo, Abteilung GMP und Dokumentation, Erstellung einer Access Datenbank zur Dokumentenverwaltung.
- Berufstätigkeit: Reichskronen Apotheke in Mayen, als angestellter Apotheker 11/1998 – 12/2003. Zum 01.2004 Übernahme der Reichskronen Apotheke als Pächter.
- 08/1999-04/2000 wissenschaftlicher Assistent an der J. W. Goethe-Universität, Inst. f. Pharm. Chemie. Betreuung des Biochemie Praktikums.
- 01/2000-09/2003 Vertragsassistent am Inst. für Pharm. Chemie der Universität Wien. Betreuung des Praktikums zur quantitativen Analytik, Co-Betreuung von Diplomarbeiten.
- Promotion: 06/1999-12/1999 am Institut f. Pharm. Chemie, J. W. Goethe-Universität, Prof. C. R. Noe
- 01/2000 Umzug nach Wien und Aufbau des Proteom-Labors in Wien, Fortsetzung der Arbeit bei Prof. Noe.
- Freiberufliche Tät.: Beratungstätigkeit, insbesondere für die PharmaConGmbH (Schärding, Österreich) und die Produkem Kft (Budapest/Vac, Ungarn). Mitwirkung bei der GMP Implementierung für die Wirkstoffproduktion der Produkem Kft, Erstellung einer Access Datenbank für Qualitätssicherung und Warenwirtschaft. 07/2002 Mitgründung der Pharmatec Kft mit Sitz in Budapest.

QM-Auditor: 10/2004 Berufung zum QM-Auditor durch die Landesapothekerkammer Rhlp, Abnahme von Zertifizierungsaudits in Apotheken nach DIN EN ISO 9001:2000.

Meine akademischen Lehrer waren

während des Studiums:

Prof. Dr. A. W. Frahm, Prof. Dr. H. H. Otto, Prof. Dr. B. Wunsch, Prof. Dr. H. Rimpler, Prof. Dr. K.-H. Bauer, Prof. Dr. R. Schubert, Prof. Dr. K. Starke, Prof. Dr. R. Jackisch, Prof. Dr. K. Aktories.

während der Promotion:

Prof. Dr. C. R. Noe, Prof. Dr. D. Steinhilber