

2 Einleitung

2.1 Die Blut-Hirn-Schranke

2.1.1 Aufbau und Funktion

Für die Funktion des Gehirns ist das Vorhandensein eines konstanten extrazellulären Milieus in der neuronalen Mikroumgebung von besonderer Bedeutung. Metabolische Schwankungen der Blutzusammensetzung und neurotoxische Substanzen dürfen nicht über den Blutkreislauf in das Gehirn gelangen, gleichzeitig muß jedoch die Nährstoffversorgung und die Entsorgung von Stoffwechselendprodukten gewährleistet sein. Den selektiven Stofftransport zwischen Blut und cerebralem Gewebe reguliert die Blut-Hirn-Schranke.

Das Kapillarendothel im Gehirn bildet die physiologische Grundlage der Blut-Hirn-Schranke. Diese Endothelzellen besitzen eine Reihe morphologischer und biochemischer Besonderheiten, die es vom Endothel anderer Blutgefäße des Körpers unterscheiden.

So sind Hirnkapillarendothelzellen durch sogenannte *tight junctions* zu einer lückenlosen Zellschicht miteinander verbunden. Durch diese festen Zell-Zell-Kontakte wird jeglicher parazellulärer Durchtritt von wasserlöslichen Substanzen verhindert, was sich in einem hohen transendothelialen Widerstand von $1500 - 2000 \Omega \text{ cm}^2$ ausdrückt (Butt et al., 1990). Darüber hinaus ist ein unselektiver transzellulärer Transport (Transcytose) durch eine sehr geringe Anzahl pinocytotischer Vesikel in den Endothelzellen stark eingeschränkt (Goldstein und Betz, 1986). Demgegenüber weist die relativ hohe Anzahl der Mitochondrien auf viele selektive (energieverbrauchende) Transportmechanismen hin.

Das Lumen des Kapillarrohres wird durch eine einzige Endothelzelle begrenzt (Abbildung 2.1). Auf der abluminalen Seite ist die Endothelzellschicht der Hirnkapillaren von einer kontinuierlichen Basallamina umgeben, in die Pericyten eingebettet sind. Die Pericyten bilden lange Fortsätze, die die Kapillaren umschließen. Sie bedecken ca. 20 % der Gefäßoberfläche und sitzen bevorzugt an den Kontaktstellen der Endothelzellen (D'Amore, 1990; Sims, 1986). Pericyten sind in ihrer Struktur und Funktion heterogen und werden auf den Kapillaren fast aller Organe gefunden. Aufgrund ihres hohen Gehaltes an kontraktilen Proteinen und ihrer Morphologie wird vermutet, das sie den Kapillarquerschnitt und damit den Blutdruck beeinflussen können. Da es keinen direkten Nachweis für ihre Kontraktilität gibt (Allt und Lawrenson, 2001), kann den Pericyten auch eine mögliche Funktion in der mechanischen Stabilisierung der Kapillaren zugesprochen werden.

Mit der Synthese und Freisetzung von Collagen, Laminin und Glycosaminoglycanen sind die Pericyten außerdem an der Bildung der Basalmembran beteiligt (Allt und Lawrenson, 2001). Eine weitere wichtige Funktion haben die Pericyten bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen. Durch Kontaktinhibierung von Endothelzellen sind sie unmittelbar an der Kontrolle der Angiogenese beteiligt (Wakui et al., 1997).

Welche Rolle die Pericyten bei der Bildung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke spielen, konnte bisher nicht geklärt werden. Von Frey et al. (1991) wurde jedoch gezeigt, daß Pericyten und Hirnkapillarendothelzellen *in vitro* und *in vivo* das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) exprimieren. γ -GT spielt vermutlich sowohl beim Aminosäuretransport als auch bei Entgiftungsreaktionen eine Rolle und ist spezifisch für die cerebralen Kapillaren.

Im Zusammenhang mit der Blut-Hirn-Schranke kommt den Pericyten eine wichtige Schutzfunktion zu, da sie in der Lage sind, Proteine aus dem Interstitium des Gehirns aufzunehmen und extrazelluläre bioaktive Peptide zu metabolisieren (Krause et al., 1993). Diese „second line of defense“ kann dazu beitragen, die Homöostase im Gehirn aufrecht zu erhalten, sollte es zu einer Dysfunktion der endothelialen Blut-Hirn-Schranke kommen.

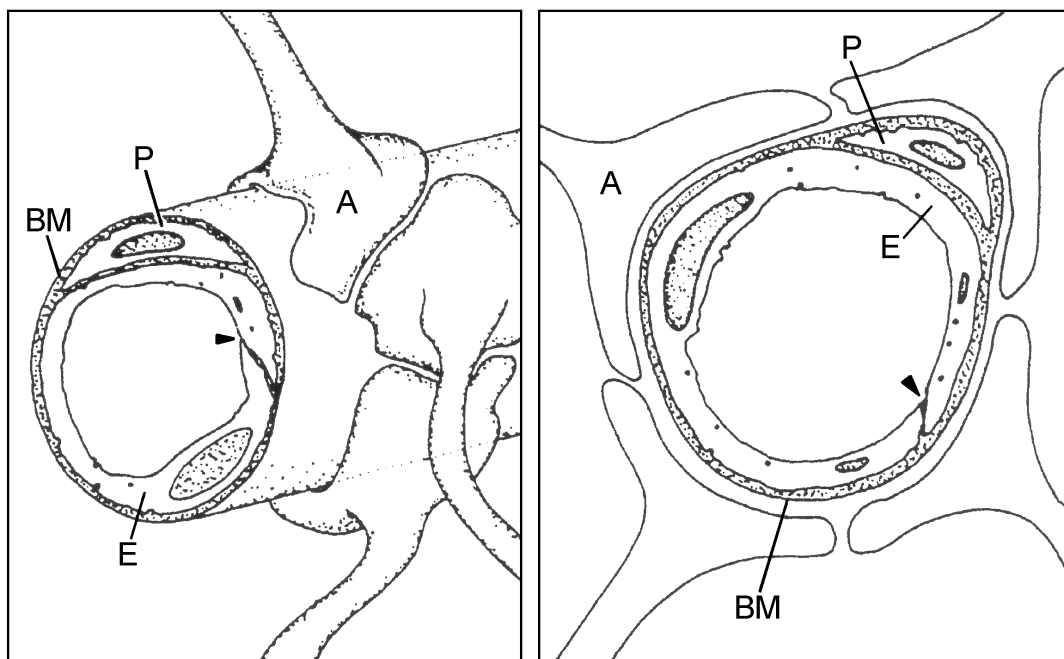


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke.

Die Gehirnkapillarendothelzellen (E), die zum großen Teil von den Endfüßchen der Astrozyten (A), Perizyten (P) und einer Basalmembran (BM) umhüllt werden, sind über *tight junctions* (Pfeil) lückenlos miteinander verbunden.

(Entnommen aus Allt und Lawrenson, 2001)

Auf der abluminalen Seite des Kapillarrohres ist die Basalmembran fast vollständig mit den Endfüßchen der Astrocyten besetzt. Diese Gliazellen üben eine Stützfunktion im Gehirn aus und versorgen Neuronen mit Nährstoffen. Daneben leisten die Astrocyten durch Regulation der extrazellulären Ionenkonzentration einen wichtigen Beitrag zum Erhalt der Homöostase (Kimelberg und Norenberg, 1989).

Astrocyten erfüllen selbst keine Schrankenfunktion. Sie beeinflussen jedoch durch Abgabe löslicher Faktoren die Bildung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke. So konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass Hirnkapillarendothelzellen während der Kultivierung dedifferenzierten und die Blut-Hirn-Schranke-spezifischen Eigenschaften verloren. In Kokultur mit Astrocyten oder in Astrocyten-konditioniertem Nährmedium hingegen kam es nicht zu diesem Effekt (Wolburg et al., 1994; El Hafny et al., 1996). Welche molekularen Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion führen ist noch unklar.

Endothelzellen scheinen ihrerseits wiederum einen induzierenden Einfluss auf Astrozyten auszuüben. Von Schroeter et al. (1999) wurde gezeigt, daß es in Kokulturen von Astrocyten und Endothelzellen zu einer vermehrten Expression von reduzierenden Enzymen in beiden Zelltypen kommt, was zu einem verbesserten Schutz der Blut-Hirn-Schranke vor oxidativem Stress führt.

2.1.2 Blut-Hirn-Schranke Marker

Zur Charakterisierung von Zellen oder Zellverbänden sind Marker geeignet, die sich spezifisch auf die Eigenschaften des betreffenden Zelltyps beziehen.

Während durch allgemeine Endothelmarker lediglich Blutgefäße vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden können, ermöglichen Marker für Blut-Hirn-Schranke Eigenschaften eine Unterscheidung der cerebralen Kapillaren von anderen Blutgefäßen.

Man unterscheidet morphologische, biochemische und immunchemische Marker. Als morphologische Marker für Hirnkapillaren gelten die bereits genannten, festen Zell-Zell-Kontakte, eine hohe Zahl an Mitochondrien und wenige pinozytische Vesikel.

Daneben gibt es zahlreiche sogenannte biochemische Marker, wie etwa die Alkalische Phosphatase (Risau et al., 1986) oder die γ -Glutamyltranspeptidase (Meister und Tate, 1976), mit denen eine Charakterisierung und die Beurteilung des Differenzierungsstatus von Hirnkapillarendothelzellen möglich ist.

Über immunchemische Methoden wurden ebenfalls verschiedene Markerproteine für die Blut-Hirn-Schranke identifiziert, wie etwa der Glucosetransporter GLUT 1 (Weiler-Güttler et al., 1989), das P-Glycoprotein (Cordon-Cardo et al., 1989) oder der Transferrin-Rezeptor (Jefferies et al., 1984).

2.1.3 Transportvorgänge an der Blut-Hirn-Schranke

Während Wasser, Sauerstoff und Kohlendioxid ungehindert durch die Zellschicht des Hirnendothels diffundieren können, stellt die dicht geschlossene Plasmamembran für hydrophile Substanzen eine Barriere dar. Um eine kontinuierliche Versorgung des Gehirns mit im Blut zirkulierenden Nährstoffen, Ionen und Metaboliten ebenso zu gewährleisten wie den Abtransport von (toxischen) Stoffwechselendprodukten, besitzt das cerebrale Endothel jedoch eine Reihe von spezifischen Transportmechanismen. Da die luminalen und die abluminalen Membran der gefäßbildenden Endothelzellen zum Teil mit unterschiedlichen Transportsystemen ausgestattet ist, ergeben sich Unterschiede in der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, so dass man von einem asymmetrischen Transport spricht (Goldstein und Betz, 1986).

Der selektive Durchtritt der unterschiedlichen Substanzen wird durch spezifische Carrier-Systeme oder durch Rezeptor-vermittelte Transcytose gewährleistet.

Bei den Carrier-Systemen wird zwischen aktivem Transport und erleichterter Diffusion unterschieden. Während der aktive Transport unter ATP-Verbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten stattfindet, handelt es sich bei der erleichterten Diffusion um eine energieunabhängige Gleichgewichtsreaktion entlang eines Konzentrationsgradienten.

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von Carrier-Systemen beschrieben. Zu den bisher bekannten gehören die Glucosetransporter GLUT 1 und GLUT 5, diese Transportsysteme sind in der luminalen und in der abluminalen Membran lokalisiert und versorgen durch erleichterte Diffusion das Gehirn mit Glucose. Daneben existieren an der Blut-Hirn-Schranke Transporter für saure und basische sowie für kationische Aminosäuren, Monocarbonsäuren, Amine und Nucleoside (Bradbury, 1993).

Für den Transport von großen, neutralen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tryptophan, die das Gehirn als Ausgangsverbindung für die Synthese von Neurotransmittern und Proteinen benötigt, ist beispielsweise das L-System notwendig (Sanchez del Pino et al., 1995). Dieses Transportsystem ist auf der luminalen und der abluminalen Membran der Hirnkapillaren

lokalisiert und befördert seine Substrate durch erleichterte Diffusion aus dem Blut ins Gehirn. Im Gegensatz dazu ist das A-System nur auf der abluminalen Membran zu finden und dort für den Transport kleiner, neutraler Aminosäuren, wie Alanin, Glutamin und Glycin verantwortlich. Diese Aminosäuren werden im Nervensystem synthetisiert und durch das A-System, einem Na^+ -Antiporter, in die Endothelzellen befördert. (Sanchez del Pino et al., 1995).

Zu den weiteren bisher beschriebenen Aminosäuretransportern gehören u.a. das luminal lokalisierte γ^+ -System, das für den Transport von basischen Aminosäuren (Lysin, Arginin, Ornithin) verantwortlich ist, das Na^+ -abhängige ASC-System (Alanin, Serin, Cystein) und ein Glutamattransporter (Stoll et al., 1993; Tayarani et al., 1987; Hutchison et al., 1985).

Einer der wichtigsten Efflux-Transporter, der in der Blut-Hirn-Schranke identifiziert wurde, ist das sogenannte P-Glycoprotein (Multi Drug Resistance Protein, Cordon-Cardo, 1989). Dieses kanalbildende Transmembranprotein wurde auf der luminalen Membran von Hirnkapillaren nachgewiesen und ist für die Ausschleusung zahlreicher kleiner, strukturell nicht verwandter Verbindungen aus der Zelle verantwortlich. Durch den retrograden Transport unpolarer, körperfremder Stoffe (lipophile Xenobiotika) aus den Endothelzellen zurück in die Blutbahn übernimmt P-Glycoprotein somit eine wichtige Entgiftungsfunktion im Gehirn.

Das sogenannte Brain Multidrug Resistance Protein (BMDP) wurde von Eisenblätter und Galla (2002) in porcinen Hirnkapillarendothelzellen identifiziert. Dieser zur ABC-Superfamilie gehörende Transporter hat große Homologie zum Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), das im Zusammenhang mit der Unempfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber chemotherapeutischen Reagenzien beschrieben wurde. Somit stellt BMDP möglicherweise einen weiteren wichtigen Efflux-Transporter des cerebralen Endothels dar.

Durch rezeptorvermittelte Transcytose werden Peptide, Proteine und andere große Moleküle durch Endothelzellen transportiert. Nach der rezeptorvermittelten Endocytose auf der luminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke, erfolgt die Diffusion des Ligand-Rezeptor-Komplexes durch das Cytoplasma der Endothelzelle und schließlich die rezeptorvermittelte Exocytose auf der abluminalen Seite der Blut-Hirn Schranke in das Interstitium.

Ein Beispiel für den Stofftransport durch rezeptorvermittelte Transcytose ist das Eisentransport-Protein Transferrin, das über den Transferrin-Rezeptor aus dem Plasma in die Kapillarendothelzelle gelangt und für die Versorgung des Gehirns mit Eisen von großer Bedeutung ist (Jefferies et al., 1984).

2.2 Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung Blut-Hirn-Schranke-spezifischer Proteine

Die biochemischen Eigenschaften eines bestimmten Zelltyps werden durch seine spezifische Proteinausstattung bestimmt. Die Identifizierung von Proteinen und Genen, deren Synthese gewebespezifisch im cerebralen Kapillarendothel stattfindet, ist daher für das Verständnis der funktionellen Besonderheiten der Blut-Hirn-Schranke unerlässlich.

Neben der Proteomanalyse, auf die ausführlich in Abschnitt 2.3 eingegangen wird, gibt es eine Reihe molekularbiologischer Methoden, die erfolgreich zur Identifizierung gewebespezifisch exprimierter Proteine eingesetzt werden.

Eine empfindliche Methode zur Identifizierung von Genen, die in verschiedenen Zellpopulationen in unterschiedlichem Maße exprimiert werden, ist das von Liang und Pardee (1992) beschriebene Differential Display von mRNA. Bei dieser Methode wird zunächst die gesamte zelluläre mRNA durch reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. In einer anschließenden PCR werden dann durch die Verwendung von bestimmten Primerkombinationen jeweils Anteile der Gesamtheit der cDNA Moleküle amplifiziert. Diese amplifizierten Anteile können in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt werden und spiegeln ein Profil der exprimierten Gene wieder. Aufgrund der gegenüber der Gesamt-RNA herabgesetzten Komplexität dieses Profils, können Unterschiede in der Expression bestimmter RNA Moleküle in den zu vergleichenden Zellpopulationen gefunden werden.

Für die Synthese der cDNA werden Oligo(dT)-Primer verwendet, die eine Synthese der 3'-Enden der Transkripte erlauben. Die Primer tragen an ihrem 3'-Ende zwei zusätzliche Nukleotide, von denen das vorletzte kein Thymin enthalten darf. Das heißt, es werden vier degenerierte Oligo(dT)-Primer-Gruppen verwendet, durch die in getrennten Reaktionen theoretisch jeweils ein Viertel der gesamten mRNA transkribiert werden kann.

Für die Amplifikation der cDNA werden ebenfalls die degenerierten Oligo(dT)-Primer eingesetzt. Als Gegenprimer werden üblicherweise Dekamere mit einer beliebigen Sequenz verwendet, die an verschiedene Stellen auf der cDNA binden können. Durch die Kombination der Oligo(dT)-Primer mit verschiedenen Dekameren ist es prinzipiell möglich, sämtliche zellulären Transkripte zu amplifizieren.

Für die Visualisierung der amplifizierten cDNA-Stränge durch Autoradiographie ist die Markierung der PCR-Produkte durch ein radioaktives Nukleotid notwendig. Durch den

Vergleich der Autoradiogramme von PCR-Produkten aus verschiedenen Geweben lassen sich differentiell exprimierte Gene nachweisen. Die interessierende cDNA kann aus dem Polyacrylamidgel isoliert und nach ihrer Reinigung kloniert und anschließend sequenziert werden. Der entgeltliche Nachweis für die unterschiedliche Expression in den zu vergleichenden Zellpopulationen kann dann durch eine Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe einer Real-time PCR erbracht werden. Bei der Real-time PCR erfolgt der Nachweis des PCR-Produktes zeitgleich mit der Amplifikation, wodurch eine Quantifizierung spezifischer cDNA Moleküle ermöglicht wird.

Obwohl die Methode des Differential Display sehr empfindlich ist und den Vergleich einer größeren Anzahl von Zellpopulationen ermöglicht, sind mit ihr auch Nachteile verbunden. So sind die unterschiedlich stark erscheinenden Banden im Polyacrylamidgel teilweise schlecht reproduzierbar. Daher sind mehrere Durchführungen des Experimentes notwendig, bevor eine endgültige Aussage über die Gültigkeit eines Expressionsmusters gemacht werden kann. Zudem werden häufig falsch positive Klone isoliert, die keine unterschiedlich exprimierten Gene repräsentieren. Trotz dieser Nachteile hat sich das Differential Display von mRNA als sehr erfolgreich erwiesen.

Zwei weitere Methoden zur Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Nukleinsäuren sind die differentielle Hybridisierung und die Subtraktionshybridisierung. Bei beiden Methoden wird zunächst von zwei zu vergleichenden Zellpopulationen die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die differentielle Hybridisierung werden die cDNA-Sequenzen radioaktiv markiert und gegen eine cDNA-Genbank hybridisiert, die von einer der beiden Zellpopulationen angelegt werden kann. Dabei werden sogenannte Plaque- oder Kolonielifts verwendet, die in doppelter Ausführung angefertigt werden, so daß die markierten cDNAs parallel gegen die gleichen Phagenplaques bzw. Bakterienkolonien hybridisiert werden können.

Die Subtraktionshybridisierung stellt eine Weiterentwicklung der differentiellen Hybridisierung dar. Bei dieser Methode wird RNA aus einem Vergleichsgewebe im Überschuss mit der cDNA der zu untersuchenden Zellpopulation hybridisiert. Nur die in beiden Populationen vorhandenen Nukleinsäuren bilden cDNA/RNA-Hybride, während die cDNAs übrigbleiben, für die kein komplementäres Transkript in der zu vergleichenden Zellpopulation existiert. Die Hybriddoppelstränge können durch Säulenchromatographie an Hydroxyapatit entfernt und die überschüssige RNA enzymatisch abgebaut werden. Gegenüber der differentiellen Hybridisierung hat die Subtraktionshybridisierung den Vorteil, dass stark exprimierte Transkripte durch mehrmalige Hybridisierung eliminiert werden können und so

seltene Transkripte angereichert werden. Diese werden kloniert und stehen dann als subtraktive cDNA-Bank für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Spezifisch in Hirnkapillarendothelzellen wurden mit dieser Methode beispielsweise Transkripte für den schon erwähnten Glucosetransporter GLUT-1 (Weiler-Güttler et al., 1989) oder das Apolipoprotein ApoA-1 (Möckel et al., 1994) gefunden. Ein wesentlicher Nachteil der Subtraktionshybridisierung ist, dass jeweils nur zwei Zellpopulationen miteinander verglichen werden können.

Einen sehr hohen Durchsatz bei der Bestimmung von differentiellen Gensequenzen hat die DNA-Chip-Technologie ermöglicht. Als Sensoren werden cDNA-Moleküle bekannter Sequenz in einem geordneten Raster auf einem Glasträger fixiert. Zu dieser Matrize wird als Sonde die zu untersuchende cDNA gegeben, die beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. Eine Hybridisierung an trägergebundene DNA-Moleküle wird dann durch ein Farbsignal an der entsprechenden Rasterposition angezeigt.

Für die Analyse differentiell exprimierter Gene werden cDNAs von zwei zu vergleichenden Zellpopulationen hergestellt und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Diese Sonden werden dann simultan mit den auf dem Chip fixierten cDNA-Molekülen einer der beiden zu vergleichenden Zellpopulationen hybridisiert. Anhand des Verhältnisses der Signalintensitäten der unterschiedlich markierten cDNAs kann eine Aussage über das Expressionslevel des entsprechenden Gens in den beiden Zellpopulationen gemacht werden.

Für die Herstellung von DNA-Chips gibt es prinzipiell zwei verschiedene Wege. Die DNA-Sequenzen können auf einem klassischen Wege synthetisiert und dann postsynthetisch auf das Chip-Substrat aufgebracht werden oder die Synthese der Sequenzen erfolgt direkt auf dem Chip. Auf diese Weise können DNA-Chips hergestellt werden, mit denen mehr als 10000 verschiedene Gene gleichzeitig analysiert werden können (Hunt und Livesey, 2000).

2.3 Proteomanalyse

Der Begriff Proteom bezeichnet die Gesamtheit der Proteine, die von einem Genom unter genau definierten Bedingungen exprimiert werden. Im Gegensatz zum Genom, das eine gut definierte, statische Größe darstellt, reflektiert das Proteom die Proteinexpression einer Zelle oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Es stellt somit eine Momentaufnahme dar, die durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden kann und daher eine hohe Dynamik und Variabilität aufweist. Der tatsächliche Stoffwechszustand einer Zelle oder eines Organismus, der sich aus den zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandenen Proteinen ergibt, kann demnach nicht über das Genom beschrieben werden, sondern ist nur über eine Analyse des Proteoms zugänglich.

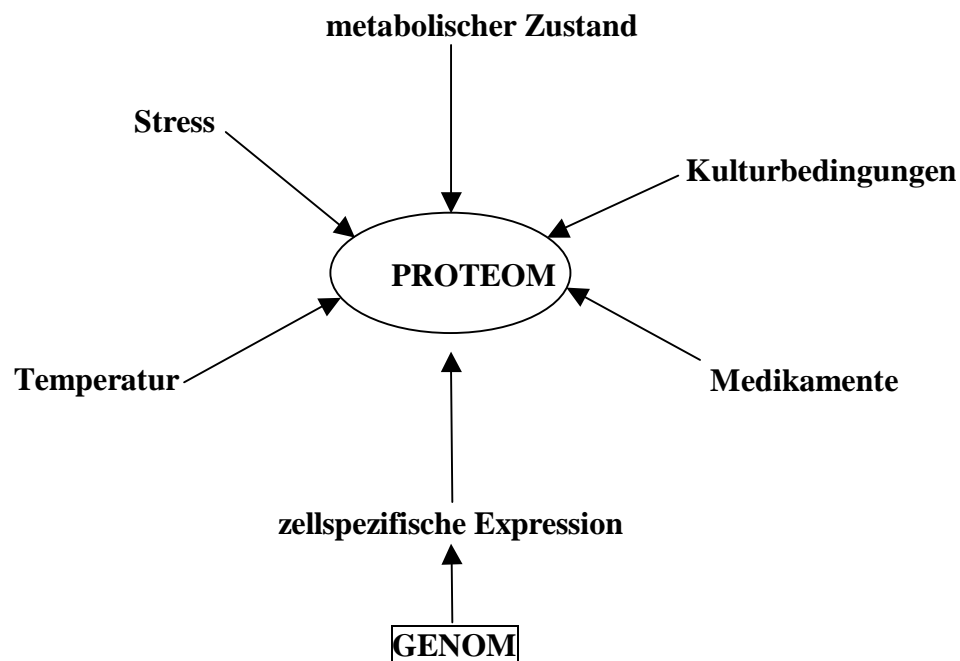


Abbildung 2.2: Das Proteinmuster einer Zelle oder eines Organismus ist einerseits abhängig von der zellspezifischen Genexpression, andererseits haben viele externe Faktoren, wie Temperatur, Stress, Pharmaka oder Kultivierungsbedingungen einen Einfluß auf die Proteinexpression.

Die Proteomanalyse liefert Informationen über die quantitativen Verhältnisse der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle oder einem Organismus vorhandenen Proteine. Da keine strikte Korrelation zwischen der Menge einer mRNA und der dazugehörigen Proteinmenge besteht (Anderson und Seilhamer, 1997), können diese Daten mit molekularbiologischen Techniken prinzipiell nicht erhalten werden. Ein Gen kann zudem durch alternatives Spleißen der prä-mRNA für viele verschiedene Genprodukte kodieren. Zusätzlich kann es noch zu einer Reihe von posttranslationalen Modifikationen kommen, die das entstandene Protein verändern, so dass aus einem Gen viele Proteine mit zum Teil völlig verschiedener Form und Funktion entstehen können. Aus diesem Grund können aus Nukleinsäuredaten alleine noch keine Aussagen über die zellulären Prozesse und Zusammenhänge auf Proteinebene gemacht werden. Vielmehr ist die Analyse des Proteoms notwendig, um das komplexe Netzwerk physiologischer Vorgänge zu verstehen.

Die Proteomanalyse findet sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der pharmazeutischen Industrie breite Anwendung. Die quantitative Erfassung der Proteinexpression wird als Expressionsproteomics bezeichnet, während sich die Funktionsproteomics mit der subzellulären Lokalisation und Protein-Protein-Interaktionen beschäftigt. Ziele dieser Technologien sind:

- Identifizierung krankheitsassoziierter Proteine
- Aufklärung von Wirkmechanismen
- Toxikologische Untersuchungen
- Proteomanalyse pathogener Mikroorganismen
- Optimierung von Fermentationsprozessen

Da in einer Zelle im Durchschnitt 10000 verschiedenen Proteine in stark unterschiedlichen Konzentrationen zu finden sind, stellt die Proteomanalyse eine außerordentlich komplexe Aufgabe dar.

Bei der sogenannten subtraktiven Proteomanalyse vergleicht man zwei oder mehrere unterschiedliche Zustände einer Zelle oder eines Organismus miteinander und versucht spezifische qualitative und quantitative Veränderungen zu identifizieren. Eine vergleichende Proteomanalyse ist jedoch nur sinnvoll, wenn die Unterschiede in den zu vergleichenden Zuständen genau definiert sind. Daher ist die genaue Definition der Ausgangsbedingungen sowie die Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse während der Probenvorbereitung und den Proteintrennungsschritten von entscheidender Bedeutung.

Für die Identifizierung von Proteinen, die beispielsweise mit der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten assoziiert sind, wird in einem vergleichenden Ansatz das Proteom im gesunden Zustand mit dem im kranken Zustand verglichen. Die differentiellen Proteine sind zum einen diagnostische Marker, zum anderen stellen sie potentielle Ziele für neue pharmakologische Wirkstoffe dar.

Die 1975 von Klose und O'Farrell unabhängig voneinander entwickelte zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE) stellt derzeit die einzige Möglichkeit zur reproduzierbaren Trennung von komplexen Proteinmischungen dar. Das hohe Auflösungsvermögen der 2-D PAGE beruht auf der Trennung nach unterschiedlichen Kriterien. In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt, während die zweite Dimension nach der Masse der Proteine trennt.

Üblicherweise werden die Proteine in den Proteinspots nach der Trennung durch die 2-D PAGE enzymatisch hydrolysiert, die entstandenen Peptide aus der Gelmatrix eluiert und anschließend durch MALDI- oder ESI-Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 2.4). Alternativ dazu kann auch eine Trennung der Peptide mittels Kapillarelektrophorese oder HPLC erfolgen und eine Aminosäure-Sequenzanalyse mit Edman-Sequenzierung oder ebenfalls massenspektrometrisch durchgeführt werden.

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse ist ein proteinspezifischer Satz von Peptidmassen, ein sogenannter Massenfingerprint. Anhand dieser Peptidmassen kann mit Hilfe von Nukleotid- oder Proteindatenbanken ein schon bekanntes Protein identifiziert werden. Dazu werden die in den Datenbanken gespeicherten Proteine theoretisch mit der vorgegebenen Protease hydrolysiert und so ein theoretisches Peptidmuster für jedes Protein erhalten, das mit den Peptidmassen der Probe verglichen werden kann. Je nach Ausmaß der Übereinstimmung zwischen den Peptidmassen der Probe und den theoretischen Werten, kann die Identifizierung des Proteins erfolgen.

Von Kim et al. (2002) wurden so beispielsweise 16 Proteine aus Hepatozyten identifiziert, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Leberkarzinomen stehen könnten. Andere Arbeiten beschäftigen sich mit der Identifizierung von Proteinen in der Cerebrospinalflüssigkeit (Sickmann et al., 2000) oder in Urin (Thongboonkerd et al., 2002). Von Benvenuti et al. (2002) wurden Veränderungen des Proteoms von Rattenembryo-Fibroblasten infolge der replikativen Seneszenz untersucht.

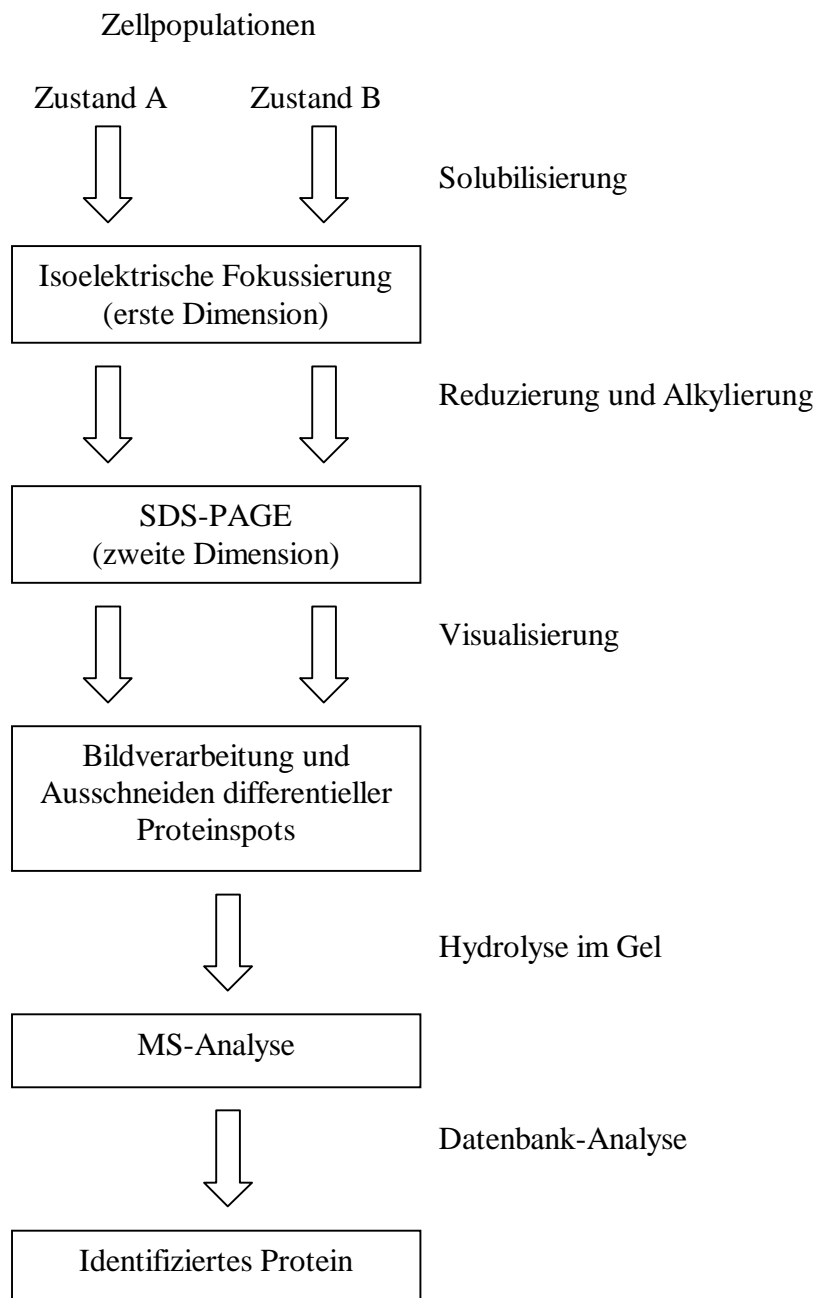


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der notwendigen Arbeitsschritte für die Identifizierung von Proteinen mittels 2D-Gelelektrophorese, enzymatischer Hydrolyse der Proteine und Massenspektrometrie.

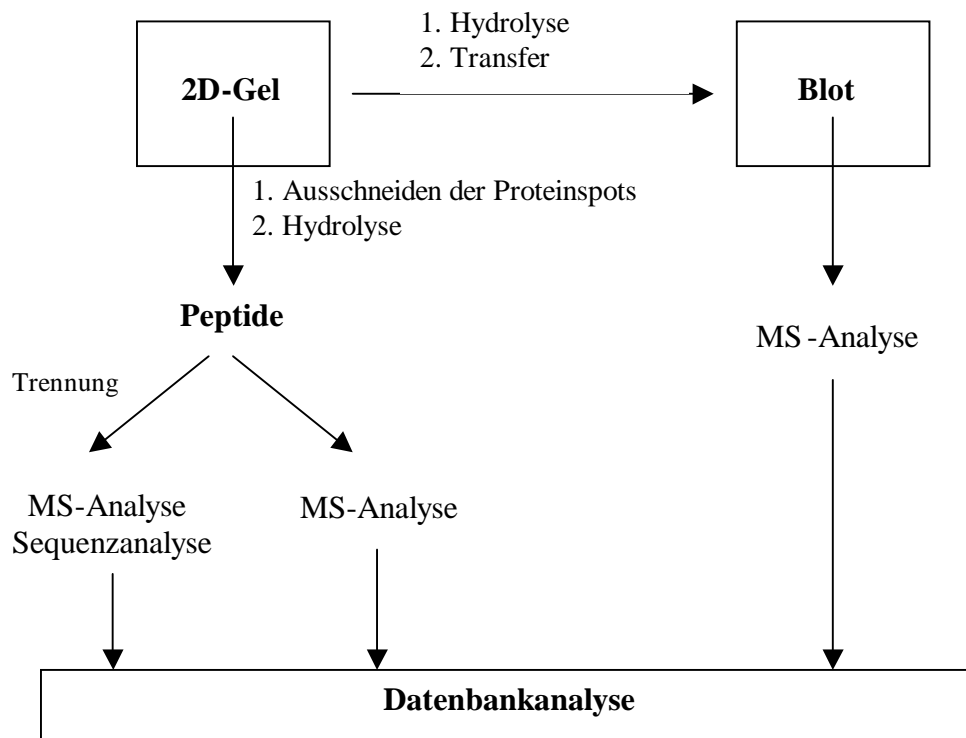


Abbildung 2.4: Möglichkeiten zur Identifizierung gelelektrophoretisch getrennter Proteine.

Alternativ zur Hydrolyse von aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinspots und Massenanalyse der entstandenen Peptide, kann das gesamte Gel in einer trypsinhaltigen Lösung inkubiert und so alle Proteine parallel hydrolysiert werden. Die resultierenden Proteinfragmente können dann auf eine PVDF-Membran geblottet werden, so dass die Hydrolyseprodukte der Proteine an diskreten Positionen auf der Membran lokalisiert sind. Nach der Behandlung mit Matrix-Lösung kann die Membran mit dem Laser des Massenspektrometers abgetastet und Peptidspektren aller geblotteten Proteine aufgenommen werden (Binz et al., 1999). Auf diese Weise können mehrere tausend Proteine gleichzeitig unter identischen Bedingungen bearbeitet und Verluste des Probenmaterials minimiert werden. Eine Verbesserung dieser Technik hinsichtlich der Hydrolyse von hochmolekularen und basischen Proteinen wurde durch Bienvenut et al. (1999) erreicht, indem die im Gel hydrolysierten Proteine während des Blotvorgangs durch eine modifizierte PVDF-Membran mit immobilisiertem Trypsin transferiert wurden.

2.3.1 Methoden der Proteomanalyse

Die Durchführung einer Proteomanalyse lässt sich in verschiedene Arbeitsschritte untergliedern:

- Probenvorbereitung
- Trennung der Proteine
- Bildverarbeitung und Quantifizierung der Proteine
- Proteinidentifizierung

2.3.1.1 Probenvorbereitung

Für eine sinnvolle Proteomanalyse ist die genaue Definition der Ausgangsbedingungen von entscheidender Bedeutung. Die quantitativen Verhältnisse, die die einzelnen Proteine zueinander aufweisen, dürfen weder bei der Probennahme, noch bei den Proteintrennungsschritten verändert werden. Die Probenvorbereitung kann nicht allgemein behandelt werden, da sie sehr vom Ausgangsmaterial und von der Fragestellung abhängig ist. Der Aufschluss der Zellen erfolgt in der Regel mit Hilfe der übliche Hilfsmittel, wie Ultraschall, Zermahlen in flüssigem Stickstoff, Dounce-Homogenisator oder French-Press und variiert je nach Ausgangsmaterial. Die Solubilisierung führt idealerweise dazu, dass alle Proteine des Ausgangsmaterials komplett gelöst, deaggregiert, denaturiert und reduziert vorliegen und direkt für die isoelektrische Fokussierung eingesetzt werden können. Fast alle Probenpuffer enthalten Harnstoff, ein Detergenz und ein reduzierendes Agens. Durch die Zugabe von Thioharnstoff kann die Löslichkeit von Membranproteinen erheblich verbessert werden (Rabilloud, 1998a). Da ionische Detergenzien nicht mit der IEF kompatibel sind, muss auf ungeladene oder zwitterionische Detergenzien zurückgegriffen werden. Sehr häufig wird das Sulfobetain CHAPS verwendet (Abbildung 2.5), ein Zwitterion, das Proteine gegenüber nichtionischen Detergenzien wesentlich effizienter solubilisiert (Hochstrasser, 1988) und in harnstoffhaltigen Puffern gut löslich ist. Sulfobetaine mit langen Alkylketten, wie N-Decyl-N,N-dimethyl-3-amino-1-propan sulfonat (SB 3-10) solubilisieren noch effizienter als CHAPS, sind jedoch in hohen Harnstoffkonzentrationen schlechter löslich (Rabilloud et al., 1990).

Von Chevallet et al. (1998) wurden weitere Sulfobetaine mit guter Löslichkeit synthetisiert (Abbildung 2.5). Als sehr effizient erwiesen sich C8Φ sowie das Amidosulfobetain ASB 14,

mit denen jeweils in Kombination mit Harnstoff und Thioharnstoff erfolgreich integrale Membranproteine aus *E. coli* (Molloy et al., 2000) und *Arabidopsis thaliana* (Santoni et al., 1999) solubilisiert wurden.

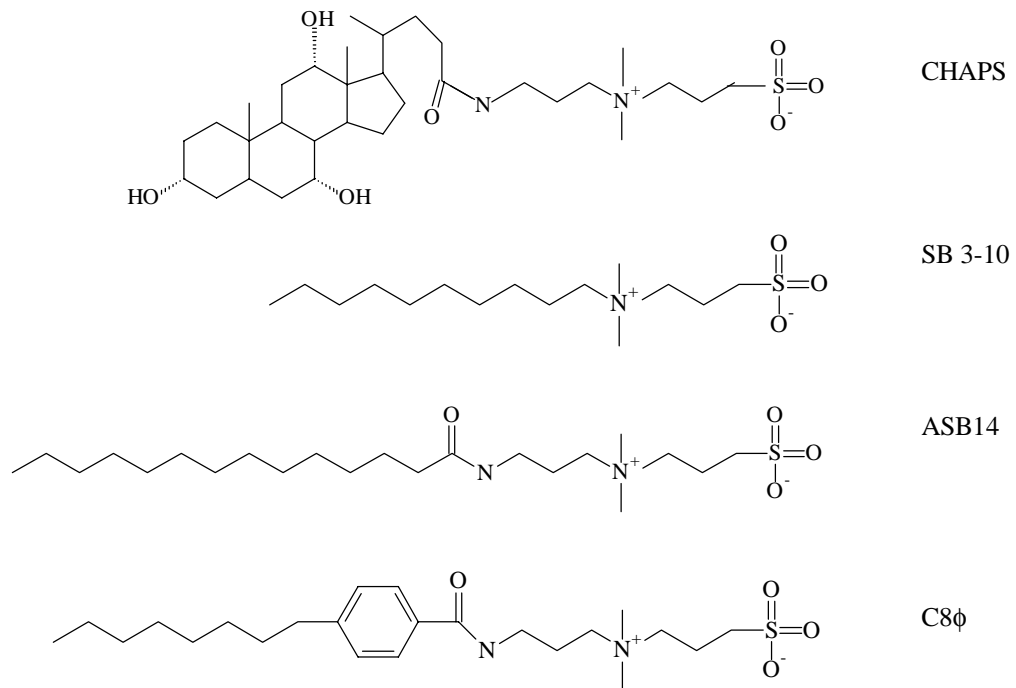


Abbildung 2.5: Strukturformeln einiger zwitterionischer Detergenzien, die bei der 2-D Elektrophorese verwendet werden (Molloy, 2000b).

Für die Reduktion von Disulfid-Bindungen, die bei vielen Proteinen für die vollständige Entfaltung notwendig ist, werden meist Dithiole, wie Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythriol (DTE) im Überschuss (bis zu 100 mM) verwendet.

Daneben finden vermehrt Phosphine wie z. B. Tributylphosphin (TBP) Anwendung, die im Gegensatz zu Thiolverbindungen stöchiometrisch reagieren und daher in geringeren Mengen (2 mM) eingesetzt werden können. Allerdings sind diese Verbindungen sehr giftig.

Die Verwendung von β -Mercaptoethanol kann sich nachteilig auf die isoelektrische Fokussierung im alkalischen Bereich des pH-Gradienten auswirken (Righetti et al., 1982) und ist daher nicht mehr üblich.

Da die Proteinmuster auf den 2-D Gelen ganzer Proteome äußerst komplex sind und es häufig zu Überlappungen einzelner Proteinspots kommt, kann es sinnvoll sein, vor der 2-D Elektrophorese eine Zell-Fraktionierung durchzuführen, um eine geringere Komplexität zu

erreichen und so auch schwach exprimierte Proteine darstellen zu können. Eine Fraktionierung in unterschiedliche Organellen kann durch Homogenisierung des Zellmaterials und anschließende differentielle Zentrifugation erreicht werden. Auf diese Weise wurden beispielsweise Plasmamembranen (Rouquie et al., 1997), Mitochondrien (Rabilloud et al., 1998b) und Zellkerne (Bacio und Durham, 1990) isoliert und ihre Proteine der Proteomanalyse zugänglich gemacht.

Molloy et al. (1998) erreichten eine Anreicherung von Membranproteinen mit der Durchführung von verschiedenen Solubilisierungsschritten. Dazu wurden *E. coli* Zellen in Tris-Puffer aufgeschlossen, die löslichen Proteine extrahiert und das Sediment mit 8 M Harnstoff, 4 % CHAPS und DTT solubiliziert. Nach einer Trennung von den unlöslichen Bestandteilen wurde das Sediment, das nur 10 % des Ausgangsmaterials ausmachte und reich an Membranproteinen war, in 5 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 2 % SB 3-10 und 2 mM TBP gelöst. Aus 2D-Gelen der letzten Fraktion konnten 11 Proteine der äußeren Membran von *E. coli* identifiziert werden, darunter 5 zuvor unbekannte.

Die von Ramsby und Makowski (1999) etablierte Methode der differentiellen Fraktionierung mit Detergenzien beruht auf der sukzessiven Solubilisierung von Zellen mit Digitonin, Triton X-100, einer Mischung aus Tween 80 und Desoxycholat und SDS. Dabei werden vier unterschiedliche Fraktionen erhalten: cytosolische Proteine, Proteine aus Membranen und Zellorganellen, Kernproteine und Proteine des Cytoskeletts. Das Verfahren, bei dem die Integrität der Mikro- und Intermediärfilamente des Cytoskeletts erhalten bleibt, hat gegenüber der Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation den Vorteil, dass relativ wenig Ausgangsmaterial benötigt wird.

Durch eine Solubilisierung mit Triton X-114 kann ebenfalls eine Anreicherung von Membranproteinen erreicht werden (Bordier, 1981). Triton X-114 Lösungen sind bei 4°C homogen und separieren bei Temperaturen über 30°C in eine detergentreiche und eine detergentarme Phase, die durch Zentrifugation voneinander getrennt werden können. Nach Bordier enthält die Triton-X-114-reiche Phase die integralen Membranproteine, während sich die löslichen Proteine in der detergentarmen Phase befinden. Die Effizienz der Phasenseparierung für die 2D-Gelelektrophorese wurde von Wissing et al. (2000) mit humanen Endothelzellen bestätigt. Dabei wurde der in die Membran integrierte VLDL-Rezeptor und das lösliche Hitzeschockprotein HSP 90, beide mit sehr ähnlicher Masse und isoelektrischem Punkt, exemplarisch beobachtet. Beide Proteine, die sich bei einem nicht fraktionierenden Aufschluss auf 2D-Gelen überlagern, konnten nach einer Phasenseparierung nahezu vollständig voneinander getrennt dargestellt werden.

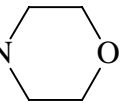
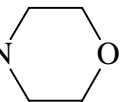
2.3.1.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist zur Zeit die einzige Trenntechnik, die in der Lage ist, genügend Trennraum für die Analyse von mehreren hundert Proteinen, wie sie in ganzen Zellen oder Geweben vorkommen, zur Verfügung zu stellen.

Im ersten Schritt der zweidimensionalen Trennung, der isoelektrischen Fokussierung, wandert ein Protein im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten, bis es an einen pH-Wert gelangt an dem seine Nettoladung Null ist (isoelektrischer Punkt). Nach O'Farrell (1975) wird der pH-Gradient im Fokussierungsgel durch die Verwendung sogenannter Trägerampholyte erzeugt. Dabei handelt es sich um heterogene Synthesegemische aus mehreren hundert amphoteren, niedermolekularen, aliphatischen Oligoamino-Oligocarbonsäuren, die nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes zu ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt wandern und auf diese Weise einen pH-Gradienten im Gel erzeugen. In Abhängigkeit von der Fokussierungszeit beginnt der so erzeugte Gradient allerdings in beide Richtungen, vor allem zur Kathode, zu wandern, wodurch der pH-Gradient seine Linearität verliert. Durch den sogenannten Kathodendrift der Trägerampholyte kommt es bei langen Fokussierungszeiten zudem zu einem Verlust der basischen Proteine. Um diesen Verlust zu kompensieren, führte O'Farrell (1977) die NEPHGE (Non Equilibrium pH Gradient Electrophoresis) ein, die nur kurze Fokussierungszeiten verwendet. Da die Proteine bei der NEPHGE ihren isoelektrischen Punkt nicht erreichen, ist die Reproduzierbarkeit dieser Methode allerdings gering.

Die Entwicklung der 2-D PAGE mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) von Westermeier et al. (1983) stellte eine wesentliche Verbesserung dieser Technik hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Auflösungsvermögen dar. Da immobilisierte pH-Gradienten fester Bestandteil des Fokussierungsgels sind, unterscheiden sie sich grundlegend von mit Trägerampholyten erzeugten pH-Gradienten, die erst im elektrischen Feld aufgebaut werden. Zur Herstellung von immobilisierten pH-Gradienten werden Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen, sogenannten Immobilinen (Tabelle 2.1) in die Gelmatrix einpolymerisiert. Um einen bestimmten pH-Wert zu puffern, benötigt man mindestens zwei verschiedenen Immobiline, eine Säure und eine Base. In der Praxis werden immobilisierte pH-Gradienten durch lineares Mischen von zwei unterschiedlichen Polymerisationslösungen mit einem Gradientenmischer erzeugt. Der pH-Wert wird durch das Mischungsverhältnis der Immobiline bestimmt.

Tabelle 2.1: Strukturformeln der Acrylamidderivate zur Herstellung von immobilisierten pH-Gradienten (Lottspeich, 1998).

Strukturformel	pK
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	3,6
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$	4,6
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}$ 	6,2
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 	7,0
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	8,5
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	9,3
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	10,3
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	12

Da der pH-Gradient kovalent an die Matrix gebunden ist, bleibt er während der gesamten Fokussierungsdauer unverändert, wodurch sich eine höhere Reproduzierbarkeit der Trennung gegenüber der Fokussierung mit Trägerampholyten ergibt (Corbett et al., 1994).

Zudem hat die isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten den Vorteil, dass auch basische Proteine erhalten bleiben, die aufgrund der Kathodendrift der Trägerampholyte verloren gehen.

Für die Trennung in der zweiten Dimension werden überwiegend SDS-Gele mit einem Puffersystem nach Lämmli (1970) verwendet. Die Elektrophorese kann entweder horizontal oder vertikal durchgeführt werden, wobei die Vertikalapparaturen bevorzugt werden, da sie eine hohe Parallelisierung bei relativ geringem Platzbedarf ermöglichen. Neben dem schon erwähnten Problem der Solubilisierung hydrophober Proteine erfährt die zweidimensionale Gelelektrophorese Einschränkungen aufgrund ihrer Trennbereiche. So lassen sich bisher weder sehr saure ($\text{pI} < 2$) noch sehr basische Proteine ($\text{pI} > 12$) trennen. In der zweiten

Dimension ist die Darstellung von Proteinen mit einer Molmasse von mehr als 150 kDa und weniger als 15 kDa ebenfalls stark eingeschränkt.

2.3.1.3 Visualisierung und Quantifizierung

Für eine Quantifizierung der Proteine müssen diese nach der Elektrophorese angefärbt werden. Alle heute üblichen Färbemethoden haben jedoch den Nachteil, dass eine zuverlässige und genaue Erfassung sehr kleiner Unterschiede in der Proteinmenge nicht möglich ist. Die Farbintensität variiert je nach Eigenschaft des Proteins und kann auch für verschiedene Proteinmengen unterschiedlich sein, so adsorbieren große Proteinmengen prinzipiell relativ weniger Farbstoffmoleküle als sehr kleine Proteinmengen (Neuhoff et al., 1990; Poehling und Neuhoff, 1981). Zudem werden außerhalb des linearen Färbereiches, der spezifisch für den jeweiligen Farbstoff ist, alle Proteine gleich stark angefärbt, wodurch sie nicht quantifizierbar sind. Für eine vollständige Erfassung und Quantifizierung aller Proteine eines komplexen Proteinmusters sind daher möglichst sensitive Farbstoffe notwendig, die zugleich in einem großen Bereich linear zur Proteinmenge anfärben.

Eine klassische Methode, für die es verschiedene Varianten von Färbeprotokollen gibt, verwendet den Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau (Merril, 1990). Häufig praktiziert wird die Methode nach Neuhoff et al. (1988), die den Farbstoff in seiner kolloidalen Form verwendet. Wenn die Färbung in konzentrierter Trichloressigsäure in Kombination mit Methanol durchgeführt wird, kann es allerdings zur Veresterung von Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Seitenketten kommen, wodurch sich die Interpretation von Massenfingerprints bei der späteren Analyse erschweren kann (Haebel et al., 1998). Zudem ist die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau nicht sehr sensitiv, so dass für die Visualisierung von geringen Proteinmengen alternative Färbemöglichkeiten vorzuziehen sind (Tabelle 2.2).

Wesentlich empfindlicher als die Coomassie-Färbung ist die Silberfärbung (Blum et al., 1987). Allerdings ist diese Methode nur bedingt kompatibel mit der massenpektrometrischen Analyse, da es durch die Verwendung von Glutaraldehyd bzw. Formaldehyd als Fixiermittel zum einen zu uneinheitlichen kovalenten Modifikationen an freien Aminogruppen kommen kann, zum anderen führt die Vernetzung der Proteine in der Gelmatrix dazu, dass keine effiziente Hydrolyse mehr möglich ist (Scheler et al., 1998). Eine Vorfärbung des Gels mit Coomassie-Brilliant-Blau soll die Silberfärbung verstärken (De Moreno et al., 1985)

Die Färbung mit Zincon und Ethylviolett (Choi et al., 2002) ist mit einer Nachweisgrenze von 8 - 15 ng ähnlich sensitiv wie die Coomassie-Färbung, so dass diese Färbung möglicherweise eine gute Alternative zur Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau darstellt. Die Verträglichkeit der Farbstoffe mit der massenspektrometrischen Analyse wurde jedoch bisher nicht untersucht.

Tabelle 2.2: Gegenüberstellung verschiedener Färbemethoden für Proteine in 2-D Gelen

Färbung	Nachweisgrenze [ng]	Linearer Bereich [ng]	Endpunkt-färbung ?	Kompatibel mit Massenspektrometrie ?
Sypro-Ruby TM (Berggren et al., 2000)	1 - 2	1 - 1000	Ja	Ja
Silberfärbung (Blum et al., 1987)	2 - 4	8 - 60	Nein	Nein
Ethylviolett/Zincon (Choi et al., 2002)	8 - 15	8 - 1000	Nein	Nicht bekannt
CBB (Neuhoff et al. 1988)	8 - 16	30 - 250	Ja	Ja

Der fluoreszierende Farbstoff Sypro-RubyTM färbt Proteinmengen von 1 - 1000 ng mit linear steigender Intensität an und hat eine mit der Silberfärbung vergleichbar hohe Sensitivität (Berggren et al., 2000). Aufgrund seiner guten Verträglichkeit mit der massenspektrometrischen Analyse ist dieser Farbstoff für die Visualisierung von 2D-Gelen ideal geeignet.

Für die Bildauswertung müssen die gefärbten 2-D Gele digitalisiert werden. In Abhängigkeit von der verwendeten Färbemethode werden dafür Densitometer, Fluoreszenz-Scanner oder Kamera-Systeme verwendet. Die Quantifizierung der digitalisierten Daten erfolgt mit Hilfe umfangreicher Software, die die Größe und Intensität der Proteinspots erfasst und die ermittelten Proteinmengen speichert. Durch den Vergleich mit Kontrollgelen können Unterschiede in den Proteinmustern verschiedener Zustände ermittelt werden. Auf diese Weise lassen sich differentiell exprimierte Proteine darstellen, aber auch unterschiedlich modifizierte Proteine oder unterschiedliche Proteinmengen auf bestimmte Bedingungen zurückführen.

Den differentiellen Vergleich unterschiedlicher Proben simultan in einem Gel ermöglicht die zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (DIGE, Alban et al., 2003). Bei diesem Verfahren werden die Proteine der zu vergleichenden Proben mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren markiert und vor der elektrophoretischen Trennung vereinigt. Der große Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit einen internen Standard mitzuführen, der mit einem weiteren Fluorophor markiert wird. Der interne Standard repräsentiert idealerweise alle Proteine der zu vergleichenden Proben, so dass es möglich ist die relativen Intensitäten jedes einzelnen Proteinspots zu ermitteln.

Durch die DIGE-Methode wird die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit differentieller Proteomanalysen erhöht und experimentell bedingte Schwankungen in den Proteinmustern der zu vergleichenden Gele können eliminiert werden.

2.3.1.4 Proteinidentifizierung

Die Massenspektrometrie zählt seit der Einführung der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS, Karas und Hillenkamp, 1988) und der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS, Fenn et al., 1989) zu den wichtigsten Methoden in der Proteinanalytik. Die Möglichkeit Proteinidentifizierungen in hoher Qualität und Quantität durchführen zu können, bedeutete gleichzeitig den Durchbruch für die Proteomanalyse.

Für die MALDI-Analyse wird die zu untersuchende Peptidmischung auf einem metallischen Probenträger mit einer niedermolekularen Matrix kokristallisiert. Die Matrix absorbiert die Lichtenergie des eingestrahnten Laserpulses und verdampft dabei schlagartig ins Vakuum. Nach der Anregung, typischerweise mit einem UV-Laser bei einer Wellenlänge von 337 nm, werden die Analytmoleküle von der expandierenden Matrixwolke mitgerissen und ionisiert, wobei es zur einfachen Protonierung und zur Deprotonierung der Analytmoleküle kommt. Die Matrizes, meist Zimtsäurederivate, wie beispielsweise 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure oder Benzoessäurederivate, wie 2,4-Dihydroxybenzoessäure, haben neben der Absorption des Laserlichts die Aufgabe die Probenmoleküle zu vereinzeln und eine Aggregation zu verhindern.

Die in der Gasphase befindlichen Molekülonen werden durch eine angelegte Spannung von 20 - 30 kV beschleunigt und separieren sich im Hochvakuum entlang einer feldfreien Driftstrecke aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluggeschwindigkeit, die durch ihr jeweiliges

m/z Verhältnis und die Stärke des Beschleunigungsfeldes bestimmt ist. Am Ende der Driftstrecke registriert ein Detektor das Eintreffen der Molekülonen, deren Flugzeit in erster Näherung proportional zur Wurzel des m/z Verhältnisses ist.

Bei der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektroskopie befindet sich die Probe im Gegensatz zur MALDI-MS in der flüssigen Phase und wird ionisiert, indem sie unter atmosphärischem Druck in einem elektrischen Feld fein versprüht wird. Im elektrischen Feld kommt es zu einem kontinuierlichen Lösungsmittelverlust der Tröpfchen durch Verdampfen, wobei die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt. Letztendlich entstehen vollständig desolvatisierte, gasförmige Molekülonen, deren Molekulargewichte mit einem Quadrupol-, Ionenfallen- oder Flugzeit-Massenanalysator bestimmt werden kann (Loo, 1997).

Die Proteinidentifizierung erfolgt üblicherweise mit einem Satz von Peptiden, der durch die sequenzspezifische Spaltung durch eine Protease entsteht (Lahm und Langen, 2000). Gewöhnlich wird hierfür Trypsin verwendet. Mit diesem sog. Massenfingerprint, kann mit Hilfe von Nukleotid- oder Proteindatenbanken ein schon bekanntes Protein identifiziert werden. Hierbei werden die gemessenen Werte mit den Peptidmassen der theoretischen Spaltprodukte aller Proteine einer Datenbank verglichen. Wenn das betreffende Protein bereits bekannt ist und nicht stark modifiziert vorliegt, ist so in den meisten Fällen bereits eine Proteinidentifizierung möglich. Für ein Mißlingen der Massenfingerprint-Analyse können Oxidation, posttranslationale Modifikationen, nichtenzymatische Fragmentierungen oder Peptide aus kontaminierenden Proteinen verantwortlich sein.

Durch die Fragmentierung von Peptiden im Massenspektrometer können wichtige zusätzliche Informationen über die Sequenz und posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen, Sulfatierungen, Methylierungen, Acetylierungen, Lipidierungen oder Glycosylierungen) erhalten werden. Bei einer modifizierten oder heterogenen Probe kann die Peptidfragmentierung zu Ergebnissen führen, da sie zur Proteinidentifizierung prinzipiell nur auf ein einzelnes Peptid angewiesen ist. Allerdings erhöhen mehrere analysierte Peptide die Zuverlässigkeit der Identifizierung.

Bei der MALDI-PSD-Analyse (post source decay) werden die nach der Ionisation entstehenden Peptidfragmente ermittelt, während bei der Tandem-Massenspektrometrie die Peptide unter Verwendung eines inerten Stossgases fragmentiert und anschließend nachgewiesen werden. In beiden Fällen erhält man ein Fragmentationsspektrum, das mit theoretisch ermittelten Fragmentationen der bekannten Proteine verglichen wird und so die

Identifizierung von Proteinen oder posttranslationalen Modifikationen ermöglicht (Gevaert und Vandekerckhove, 2000).

Bei der sogenannten MudPIT Technologie (Multidimensionale Protein Identifikationstechnologie, Link et al., 1999) werden die Proteine vor einer Trennung hydrolysiert. Es erfolgt dann eine Trennung der Peptide in einer Kapillarsäule, die zuerst mit C₁₈-Material und anschließend mit einem starken Kationenaustauscher gepackt wird. Die Peptide werden auf den Kationenaustauscher geladen und mittels ansteigender Salzstufengradienten in Zyklen eluiert. Je nach Komplexität der Probe werden bis zu 15 Salzstufen verwendet, um alle Peptide von der zweidimensionalen Säule zu waschen. Die Peptide werden dann einem Tandem-Massenspektrometer zugeführt und anhand ihres Fragmentationsspektrums analysiert.

MudPIT hat sich als leistungsstarke Technologie erwiesen, mit der die vollautomatische Analyse von Proteomen in hohem Durchsatz möglich ist (Washburn et al., 2001).

Integrale Membranproteine und schwach exprimierte Proteine können ebenso analysiert werden wie Proteine mit extremen isoelektrischen Punkten und hohen Molekulargewichten, die über die zweidimensionale Gelelektrophorese nicht zugänglich sind.

2.4 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die Proteomanalyse porciner Hirnkapillarendothelzellen. Dafür sollte zunächst die Präparation der Hirnkapillarendothelzellen optimiert werden, so dass Zellmaterial mit hoher Vitalität und Reinheit erhalten wird.

Das Zellmaterial sollte zur Anreicherung von Membranproteinen fraktionierend aufgeschlossen werden und die Fraktionen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese getrennt werden. Die Membranfraktion sollte mit einem geeigneten Gewebe verglichen werden, um so Proteine zu identifizieren, die spezifisch in Hirnkapillarendothelzellen exprimiert werden.

Um ein Vergleichsgewebe zu erhalten, sollte die Kultivierung von Hirnkapillarendothelzellen etabliert werden, da diese Zellen während der Kultivierung differenzieren und ihre Blut-Hirn-Schranke-Eigenschaften verlieren.

Differentielle Proteine sollten mittels MALDI-TOF-Analyse identifiziert werden. Die Identität differentiell exprimierter Proteine sollte auf mRNA-Ebene bestätigt und gegebenenfalls die gewebespezifische Expression mittels Northern-Blot-Analyse untersucht werden.