

## 1. Einleitung

### 1.1 Proteine und Proteomforschung – Allgemeines

Proteine sind für die Funktionen zahlreicher biologischer Prozesse von entscheidender Bedeutung. Sie kontrollieren Wachstum und Differenzierung, wirken als Katalysatoren (Enzyme), transportieren andere Moleküle, spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr und vermitteln die neuronale Erregungsleitung.

In den zahlreichen Genomforschungsprojekten der letzten Jahre wurden die Genome verschiedenster Lebewesen, unter anderem die von Maus und Mensch, weitgehend entschlüsselt. Die ermittelten Gensequenzen ermöglichen es nun zwar, die Aminosäurefolge der Proteine zu identifizieren, der jeweilige Funktionszustand der Proteine, sowie ihre Abundanz und subzelluläre Lokalisierung kann jedoch aus der Kenntnis der Gensequenzen nicht eindeutig abgeleitet werden. So haben zahlreiche Studien in den letzten Jahren gezeigt, dass die Menge des jeweils exprimierten Proteins nicht durch die quantitative Bestimmung seiner m-RNA vorausgesagt werden kann: Die m-RNA-Konzentrationen eines Proteins können unverändert bleiben, während sich die Zahl der exprimierten Proteinmoleküle um den Faktor zwanzig verändert (z.B. Gygi et al. 1999b). Umgekehrt kann die Konzentration eines Proteins unverändert bleiben, dessen m-RNA-Konzentrationen jedoch zu - oder abnehmen.

Weiterhin werden die spezifischen Funktionszustände bestimmter Proteine häufig durch posttranslationale Modifikationen bestimmt (Mata et al. 2005). Bedeutsame posttranslationale Veränderungen sind zum Beispiel Phosphorylierungen, Glycosylierungen, Sulfatierungen oder Acetylierungen. Auch aus diesem Grunde kann die Funktion eines spezifischen Proteins nicht alleine durch die Kenntnis der m-RNA-Menge vorhergesagt werden.

Für eine zuverlässige Quantifizierung und funktionelle Charakterisierung von Proteinen genügt die Kenntnis der Konzentrationen der m-RNA daher nicht, sondern es müssen die Proteine selbst näher charakterisiert werden. Dies ist die Aufgabe der PROTEOMFORSCHUNG, welche sich zum Ziel gesetzt hat, möglichst viele Proteine eines Organismus, einer Zelle oder einer subzellulären Struktur zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren.

Die verschiedenen Techniken der Proteomforschung (s.u.) erlauben die Auftrennung, Identifizierung und potenziell auch die Quantifizierung von hunderten bis tausenden verschiedener Proteine in einem Versuchsansatz. Dies eröffnet völlig neue Perspektiven für die physiologische und biomedizinische Forschung, denn die Erforschung physiologischer Vorgänge wie Schlafen, Lernen oder Altern, beruhte bisher in der Regel auf der Untersuchung einzelner,

oft sehr verschiedener biochemischer oder physikalischer Parameter, welche zumeist nur sehr schwer oder überhaupt nicht in einem logischen inhaltlichen Zusammenhang interpretiert werden konnten.

Auch die medizinische Forschung konzentrierte sich bisher fast ausschließlich auf einzelne, den jeweils geltenden Hypothesen entsprechende biochemische Parameter, ohne dass dabei die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen patho- und biochemischen Einzelbefunden immer befriedigend erkannt werden konnten. Als ein Beispiel für das „Nebeneinander“ verschiedenster Befunde und Hypothesen können die Forschungsergebnisse zur depressiven Erkrankung („endogene Depression“) angeführt werden. Die Pathogenese dieser Erkrankung wurde in den letzten Jahrzehnten mit verschiedenen Neurotransmittersystemen (z.B. Noradrenalin und Serotonin), mit spezifischen Hormonsystemen (z.B. Steroidhormone und Schilddrüsenhormone), mit einer gestörten Neurogenese oder auch mit verschiedenen, durch bildgebende Verfahren nachgewiesenen pathologischen Auffälligkeiten in Zusammenhang gebracht (Übersicht bei Berton and Nestler 2006).

Der quantitative Vergleich des Proteoms zwischen erkranktem und gesundem Gewebe eröffnet die Chance, neue Erkenntnisse über die Zusammenhänge der verschiedenen bisher identifizierten pathogenetischen Einzelparameter zu gewinnen. Dies gilt für eine Vielzahl von Erkrankungen, deren Ätiologie und Pathogenese bis heute nicht oder nur ungenügend verstanden wird, wie z.B. Tumorerkrankungen, rheumatische Erkrankungen, sowie zahlreiche Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS).

Schließlich können mit der Methode der Proteomforschung die bisher noch unbekanntem Wirkungsmechanismen verschiedenster Medikamente sowie auch deren Nebenwirkungen besser verstanden werden. Ein weiterer großer Vorteil der Proteomforschung besteht darin, dass krankheitsrelevante Proteine oder biochemische Effekte von Medikamenten entdeckt werden können, die bisher noch nicht im Rahmen einer entsprechenden Hypothese diskutiert und daher noch nie untersucht worden sind.

## 1.2 Methoden der Proteomforschung

### 1.2.1 Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese

Die wichtigste Methodik der Proteomanalyse ist bis heute die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE oder 2D-Gelelektrophorese). Diese Methodik der Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde bereits vor fast 50 Jahren beschrieben (Raymond and Weintraub 1959). Im Jahre 1975 zeigten Klose und O'Farrell - unabhängig voneinander - dass Proteine mit Hilfe der so genannten isoelektrischen Fokussierung (IEF) entsprechend ihrer Ladung getrennt werden können (Klose 1975; O'Farrell 1975). Bei der isoelektrischen Fokussierung, die die erste Dimension der 2D-Gelelektrophorese darstellt, wandern die Proteine in einem Polyacrylamidgel bis zu jenem Punkt eines pH-Gradienten, an dem sie keine Nettoladung mehr tragen (isoelektrischer Punkt,  $pI$ ). In der zweiten Dimension werden die Proteine dann nach der von Laemmli 1970 entwickelten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihren Molekulargewichten getrennt (Laemmli 1970, Übersicht bei; Görg et al. 2004).

Klose und O'Farrell verwandten Trägerampholyte zur Erzeugung eines pH-Gradienten. Dazu werden Trägerampholyte mit Acrylamid gemischt und aus dieser Mischung IEF-Gele hergestellt. Bei dieser Art der Elektrophorese wandern die negativ geladenen Ampholyte zur Anode (positiv geladener Pol) und die positiv geladenen zur Kathode (negativ geladener Pol). Man erhält so während der isoelektrischen Fokussierung einen kontinuierlichen pH-Gradienten, der allerdings durch die Zusammensetzung der Probe beeinflusst werden kann.

Anfang der 80er Jahre entwickelte Bjellquist die so genannten immobilisierten pH-Gradienten (IPG). Bei dieser Methode werden Immobiline (Acrylamidderivate mit sauren oder basischen funktionellen Gruppen) in ein Acrylamidgel eingebaut (Bjellquist et al. 1982). Durch kontinuierliches Verändern des Mischungsverhältnisses beim Herstellen der Gele entsteht ein linear ansteigender pH-Gradient, der im elektrischen Feld konstant bleibt und nicht durch die Proteinprobe beeinflusst wird.

Die auf Trägerampholyten beruhende Technik zur Auftrennung der Proteine (Übersicht bei Klose 1999) führte in den letzten Jahren im Bereich der Physiologie, sowie insbesondere auf dem Gebiet der Hirnforschung zu originellen und interessanten Ergebnissen (z.B. Enard et al. 2002; Klose et al. 2002). Mit dieser Technik kann eine sehr hohe Zahl von Proteinspots, nämlich zwischen 8000 und 10000, auf den 2D-Gelen dargestellt werden (z.B. Gauss et al. 1999). Im Gegensatz dazu werden bei der auf immobilisierten pH-Gradienten beruhenden Technik im Durchschnitt nur zwischen 500 und 1500 Spots pro Gel visualisiert. Auch Quantifizierungen des

Proteoms sind mit der Trägerampholyt-Methode möglich (Enard et al. 2002; Challapalli et al. 2004; Zabel et al. 2006). Andererseits ist heute allgemein akzeptiert, dass die IPG-Technik im Vergleich mit der Trägerampholyt-Methode die Intergelvarianz verringert. Da die Technik der Quantifizierung des Proteoms einer von zwei Hauptschwerpunkten der vorliegenden Dissertation ist, wurden die hier beschriebenen Experimente mit immobilisierten pH-Gradienten durchgeführt. In den letzten zehn bis fünfzehn Jahren wurde die Technik der 2D-Gelelektrophorese von immer mehr Arbeitsgruppen angewandt. Die Anzahl der in diesem Zusammenhang publizierten Studien wuchs exponentiell. Dieser „Boom“ wurde erst durch die Entwicklung immer sensitiverer und zuverlässigerer massenspektrometrischer Techniken, welche die Identifizierung der Proteinspots erlauben, ermöglicht (Aebersold et al. 1987; Aebersold and Mann 2003; Domon and Aebersold 2006).

### **1.2.2 Eindimensionale (1D)-Gelelektrophorese**

Eine weitere Methode der Proteomforschung ist die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE oder 1D-Gelelektrophorese) nach Laemmli (Laemmli 1970). Die Proteine werden dabei durch Erhitzen für fünf Minuten bei 95°C mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen und entsprechend ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld aufgetrennt. Diese Methodik ist deutlich weniger zeitaufwendig als die 2D-Gelelektrophorese, die Auftrennung der Proteine ist jedoch deutlich schlechter. Die auf den 1D-Gelen visualisierten Banden können eine Vielzahl von Proteinen mit der jeweils gleichen Masse enthalten. Während die Identifizierung dieser Proteine durch neue massenspektrometrische Techniken, wie LC-MS/MS inzwischen weitgehend möglich ist, ist eine Quantifizierung der in den Banden enthaltenen Proteine mit konventionellen Färbemethoden (z.B. Coomassie Brilliant Blue (CBB) oder Sypro Ruby) auf Grund der Überlagerungen nicht möglich.

### **1.2.3 Massenspektrometrische Methoden zur Proteomanalyse („Shot-Gun“)**

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden entwickelt, welche Proteine aus einem Proteingemisch nicht mit Hilfe von Gelen, sondern ausschließlich mit Hilfe chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden trennen und identifizieren (Washburn et al. 2001; Ho et al. 2002; MacCoss et al. 2002; Wu and Yates III 2003). Das Prinzip dieser Methoden beruht darauf, durch tryptischen Verdau der Proteine entstandene Peptide zunächst chromatographisch so weitgehend wie möglich voneinander zu trennen, um sie dann in möglichst hoher Zahl

massenspektrometrisch identifizieren zu können. Diese so genannten „Shot-Gun“-Ansätze können auch Proteine identifizieren, die bei der 2D-Gelelektrophorese unterrepräsentiert sind, z.B. transmembrane Proteine (TMP), stark basische Proteine und sehr niedrig abundante Proteine (s.u.). Da in dieser Dissertation mit der Methodik der 2D-Gelelektrophorese gearbeitet wurde, werden die Vorzüge und Nachteile der „Shot-Gun“-Verfahren hier nicht ausführlich dargestellt, sondern im weiteren Verlauf beim jeweiligen inhaltlichen Zusammenhang (z.B. Membranproteine oder Quantifizierung) speziell diskutiert.

In meiner Arbeitsgruppe wird seit mehreren Jahren die Methodik der 2D-Gelelektrophorese aufgebaut. Ziel dieser Arbeiten ist es, das Proteom des Gehirns möglichst umfassend untersuchen zu können. Die 2D-Gelelektrophorese ist jedoch bis heute mit einigen gravierenden methodischen Problemen behaftet. So sind z.B. die Probleme der Darstellung transmembraner Proteine (TMP) auf den 2D-Gelen oder auch zuverlässige quantitative Vergleiche der Proteine zwischen zwei Stichproben bisher nicht befriedigend gelöst (Übersicht bei Görg et al. 2004). Die in dieser Dissertation beschriebenen Experimente dienen dazu, Lösungen für einige relevante Probleme der 2D-Gelelektrophorese zu erarbeiten.

### **1.3 Probleme der 2D-Gelelektrophorese**

#### **1.3.1 Darstellung transmembraner Proteine (TMP)**

Hydrophobe, transmembrane Proteine (TMP) durchspannen die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran mit einer oder mehreren transmembranen Domänen (TMH), welche von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten gebildet werden. Die vollständige Sequenzierung der Genome einiger Spezies lässt vermuten, dass ca. 30% der Proteine einer Zelle transmembrane Domänen enthalten (Wallin and von Heijne 1998). Für die Neurophysiologie des Zentralnervensystems (ZNS) sind TMP von herausragender Bedeutung: Alle Rezeptoren und Transporter von Neurotransmittern, sowie die zahlreichen Ionenkanäle besitzen transmembrane Domänen. Als Beispiel für an Ionenkanäle gekoppelte Rezeptoren seien hier die Familien der GABA- und Glutamat-Rezeptoren genannt. Die an G-Proteine gekoppelten Rezeptoren besitzen ebenfalls transmembrane Domänen, z.B. die Subtypen des noradrenergen, des serotonergen oder des colinergeren Rezeptors. Einige dieser Rezeptoren stehen im Mittelpunkt von Hypothesen über die Pathogenese neuropsychiatrischer Erkrankungen und den biochemischen

Wirkungsmechanismen von Neuro-Psychopharmaka (Übersicht bei Berton and Nestler 2006; Svenningsson et al. 2006).

Deshalb wäre es wünschenswert, eine möglichst hohe Zahl an TMP auf den 2D-Gelen darzustellen. In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass Proteine mit transmembranen Domänen nur ganz vereinzelt auf 2D-Gelen nachgewiesen werden können und dass diese in fast allen Fällen nur eine oder zwei transmembrane Domänen besitzen. Proteine mit fünf, zehn oder gar zwanzig transmembranen Domänen wurden meines Wissens noch nie auf 2D-Gelen identifiziert.

Diese unbefriedigende Darstellung von TMP auf 2D-Gelen wird bei der Analyse des Proteoms von Gehirngewebe besonders deutlich.

Die Arbeitsgruppe von Klose veröffentlichte 1999 die bis heute vermutlich umfassendste Proteomanalyse des Gehirns. Die Proteomanalyse von Mausgehirnen ergab auf 2D-Gelen 8776 Proteinspots. Von den mit Massenspektrometrie identifizierten Proteinen hatte keines eine transmembrane Domäne (Gauss et al. 1999). Dieses Ergebnis ist allerdings in sofern nicht überraschend, als die Autoren die Proteomanalysen aus den Überständen und nicht aus den Membranfraktionen der Gehirne durchgeführten. Fountoulakis et al. (2002) analysierten Homogenate des Kortex von menschlichen Föten. Circa 1700 der insgesamt etwa 3000 Proteinspots wurden mit Massenspektrometrie identifiziert. Auch in dieser Untersuchung wurde kein TMP gefunden (Fountoulakis et al. 2002). Auch die Arbeitsgruppen von Edgar et al. (2000), sowie Yang et al. (2004), welche Homogenate von menschlichem Hippocampus (post-mortem) mittels 2D-Gelelektrophorese untersuchten, identifizierten kein TMP (Edgar et al. 2000; Yang et al. 2004).

Zur Erzielung einer besseren Darstellung der Membranproteine wurden in den letzten Jahren zunehmend nicht mehr Gewebhomogenate, sondern subzelluläre Fraktionen untersucht in denen Membranen angereichert sind (z.B. Witzmann et al. 2005; Schindler et al. 2006). Diese Membrananreicherungen können z.B. über die Subfraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen werden, bei welcher einzelne Zellkompartimente anhand ihrer unterschiedlichen Größe und Dichte getrennt werden. Eine der Fraktionen, die bei der Subfraktionierung von Gehirngewebe entsteht, sind die so genannten Synaptosomen, welche aus präsynaptischen Nervenendigungen bestehen, an denen so genannte „postsynaptic densities“ angeheftet sind. Auch aus diesen membranangereicherten Geweben konnten jedoch nur wenige TMP auf 2D-Gelen identifiziert werden. So konnten z.B. Jimenez et al. (2002) bei der Analyse von Synaptosomen aus dem optischen Lobus des Tintenfisches keine TMP auf 2D-Gelen darstellen (Jimenez et al. 2002). In der Arbeit von Coughenour et al. (2004) wurden bei

der Proteomanalyse von synaptischen Vesikeln des Rattenvorderhirns die beiden TMP Synaptotagmin und VAMP1 identifiziert. Beide enthalten je eine transmembrane Domäne (Coughenour et al. 2004). Liberatori et al. (2004) untersuchten Synaptosomen des Kortex von Meerschweinchen und konnten auf 2D-Gelen ein TMP sichtbar machen (einen spannungsabhängigen Ionenkanal) (Liberatori et al. 2004). Auch in der Arbeit von Yoshimura et al. (2004) wurde nur ein NMDA-Rezeptor und ein Glutamat-Rezeptor identifiziert (Yoshimura et al. 2004). Li et al. (2004) untersuchten die „postsynaptic densities“ des Rattenvorderhirns. Unter den ca. 250 identifizierten Proteinspots befand sich kein TMP (Li et al. 2004).

Mehrere Arbeitsgruppen haben versucht, durch spezifische Extraktionsmethoden die Darstellung von TMP auf 2D-Gelen zu verbessern. Molloy et al. beschrieben 1998 ein Verfahren der „sequenziellen Extraktion“ in drei Stufen. Membranen von E.coli wurden zuerst mit Tris Base, dann in einer Kombination von Urea, CHAPS, Tris Base und DTT und schließlich zusätzlich mit Thiourea und als Reduktionsmittel TBP in drei verschiedene Fraktionen extrahiert. Die von den Autoren aufgelisteten „Membranproteine“ sind jedoch Membran-assoziierte und keine transmembranen Proteine (Molloy et al. 1998). Deshusses et al. (2003) verwandten Trifluorethanol und Chloroform zur besseren Extraktion der TMP. Sie konnten acht TMP aus E. coli Membranen identifizieren (Deshusses et al. 2003). Everberg et al. (2004) extrahierten die Mitochondrien von Hefe in einem wässrigen Zweiphasensystem aus Polyethylenglycol und Triton X-114 bzw. Dodecylmaltosid. Auf den 2D-Gelen besaßen jedoch nur zwei der 19 identifizierten Proteine eine transmembrane Domäne (Everberg et al. 2004). In Bezug auf das Zentralnervensystem (ZNS) war die Darstellung von TMP ebenfalls nicht erfolgreicher. Friso und Wikström (1999) reicherten Membranproteine aus dem Kleinhirn des Schweins durch Waschung mit Urea oder Natriumchlorid an. Sie untersuchten außerdem verschiedene Extraktionsbedingungen, wie z.B. die Kombination des Detergenz CHAPS mit den denaturierenden Substanzen Urea und Thiourea. Unter den 56 aus dem 2D-Gel identifizierten Proteinen waren drei TMP, alles Rezeptoruntereinheiten des Glutamat-Rezeptors (Friso and Wikström 1999). Carboni et al. (2002) untersuchten ebenfalls die Effektivität der Extraktion von Membranproteinen mit verschiedenen Detergenzien und Detergenzienkombinationen: Z.B. die Kombination von Natriumdesoxychololat und NP-40, von Urea, Thiourea und CHAPS sowie von Urea, Thiourea und ASB-14. Die Proteinspots auf den entsprechenden Gelen wurden nicht mit Massenspektrometrie identifiziert. Jedoch konnte mittels Immunoblot ein Glutamat-Rezeptor und ein dopaminergischer Rezeptor nachgewiesen werden (Carboni et al. 2002). Spezifische Anreicherungsverfahren von Membranen, wie z.B. die Waschung mit Natriumcarbonat

(„Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Stripping“) führten ebenfalls nicht zur Identifizierung einer ausreichenden Zahl von Membranproteinen auf 2D-Gelen (Fujiki et al. 1982; Coughenour et al. 2004).

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass es bisher nicht gelungen ist, die transmembranen Proteine des Gehirns in befriedigender Weise auf 2D-Gelen darzustellen. In einigen Arbeiten konnten wenige, hochabundante Rezeptoren, wie z.B. Glutamat-Rezeptor Subtypen identifiziert werden. Andere Rezeptorklassen (noradrenerge, serotonerge, colinerge etc.) sowie z.B. die für die Gehirnfunktion außerordentlich wichtigen Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase oder Ionenkanäle konnten bisher nicht auf 2D-Gelen nachgewiesen werden.

Die Gründe für die unzureichende Darstellung TMP sind bisher nicht genau bekannt. Die am häufigsten geäußerte Auffassung besteht darin, dass die TMP während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) an ihrem isoelektrischen Punkt (pI) präzipitieren, fest im Gel haften bleiben und daher nicht auf das 2D-Gel zu übertragen sind (Übersicht bei Rabilloud et al. 1999; Übersicht bei Görg et al. 2004). Experimente, die diese Hypothese beweisen, wurden nach meiner Kenntnis bisher nicht publiziert.

Ein weiterer Grund könnte darin zu suchen sein, dass TMP niedrig abundant sind und daher auf den 2D-Gelen von höher abundanten, löslichen Proteinen überlagert werden.

Außerdem ist die Mehrheit der TMP basisch (Schwartz et al. 2001) und die Fokussierung und Auftrennung der basischen Proteine ist bei der 2D-Gelelektrophorese bis heute problematisch (Übersicht bei Görg et al. 1997; Görg et al. 2004). Weiterhin sind TMP auf Grund ihres hydrophoben Charakters möglicherweise mit den gängigen Extraktionsmethoden bzw. den dabei gewählten Detergenzien nicht ausreichend in Lösung zu bringen. Schließlich könnte ein Teil des Problems auch in Schwierigkeiten bei der massenspektrometrischen Identifizierung liegen. Das üblicherweise beim Proteinverdau verwendete Enzym Trypsin schneidet das Protein hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin. Transmembranregionen haben jedoch wenige dieser hydrophilen Aminosäuren und daher auch weniger Spaltungsstellen. Die aus dem Verdau resultierenden Fragmente sind für die Analyse selbst dann oft viel zu groß (van Montfort et al. 2002; Eichacker et al. 2004).

Die unbefriedigende Darstellung von TMP auf 2D-Gelen führte in den letzten Jahren zur Entwicklung zahlreicher neuer methodischer Ansätze.

Mehrere Arbeitsgruppen identifizierten TMP nach vorheriger Auftrennung in der *1D-Gelelektrophorese* (Walikonis et al. 2000; Stevens et al. 2003). Peng et al. (2004) konnten nach Auftrennung von Rattenvorderhirngewebe auf der *1D-Gelelektrophorese* durch LC-MS/MS 27 Rezeptoren und Ionenkanäle mit transmembranen Domänen identifizieren (Peng et al. 2004). Blondeau et al. (2004) identifizierten 18 TMP aus synaptischen Vesikeln des Rattenhirns

(Blondeau et al. 2004). In anderen Organen war die Identifizierung von TMP nach Aufreinigung mittels *1D-Gelelektrophorese* noch erfolgreicher: Cao et al. (2006) identifizierte 120 TMP aus Plasmamembranen der Rattenleber (Cao et al. 2006).

Die Methode der Vortrennung durch *1D-Gelelektrophorese* ist jedoch für quantitative Gruppenvergleiche nicht gut geeignet, da in den Proteinbanden des 1D-Gels in der Regel zahlreiche Proteine enthalten sind. Eine Quantifizierung ist hier allerdings dann möglich, wenn die Proteine verschiedener Stichproben mit unterschiedlichen Isotopen markiert werden (s.u.) und das Proteingemisch aus beiden Stichproben massenspektrometrisch analysiert wird.

Verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten zur Darstellung transmembraner Proteine die Cetyltrimethylammoniumbromid-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (CTAB-PAGE oder CTAB-Gelelektrophorese) (Akin et al. 1985; Akins et al. 1992; Navarre et al. 2002; Buxbaum 2003). Das kationischen Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) extrahiert und belädt die Proteine mit einer positiven Ladung, die im Anschluss eine Auftrennung auf Polyacrylamidgelen anhand des Molekulargewichtes ermöglicht. So fand Buxbaum (2002) Membran-Glycoproteine auf 1D-Gelen und Pritchard et al. berichteten 1985, dass die Extraktion von Oberflächenglycoproteine aus Nematoden ausschließlich mit CTAB gelang (Pritchard et al. 1985). Allerdings verunmöglicht eine Überlagerung der Proteine in den sich bildenden Banden auch hier eine quantitative Analyse (s.o.).

Auch die Methodik der Benzyldimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (16-BAC PAGE oder 16-BAC-Gelelektrophorese) wurde mit dem Ziel der verbesserten Darstellung von TMP entwickelt (MacFarlane 1983). Bei dieser Methodik werden die Proteine mit Hilfe des kationischen Detergenz Benzyldimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC) extrahiert, entsprechend ihrem Molekulargewicht in der ersten Dimension aufgetrennt, anschließend mit SDS beladen und in der zweiten Dimension nochmals nach Molekulargewicht getrennt. So identifizierten z.B. Schindler et al. (2006) 26 TMP aus Rattenhirnstammextrakten (Schindler et al. 2006). Hartinger et al. (1996) identifizierten vier TMP, darunter eines mit 12 transmembranen Domänen, aus synaptischen Vesikeln des Rattenhirns (Hartinger et al. 1996). Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch ebenfalls darin, dass die Spots auf einem relativ schmalen, diagonalen Streifen eines Acrylamidgels sichtbar gemacht werden, wodurch die Spotauftrennung mangelhaft ist und auf Grund zahlreicher Überlagerungen wiederum eine zuverlässige Quantifizierung erschwert wird.

Auch die von Schägger Mitte der 90er Jahre entwickelte Methode der „Blue native Elektrophorese“ erlaubt eine verbesserte Darstellung von TPM (Schägger and Ohm 1995; Rais et al. 2004). Bei dieser Methode werden die Membranen mit einem milden Detergenz (z.B.

Digitonin) mit dem Ziel extrahiert, intakte Proteinkomplexe zu erhalten. Diese werden an Coomassie Brilliant Blue (CBB) gebunden und anschließend in der ersten Dimension anhand der Komplexgröße aufgetrennt. In einem zweiten Elektrophoreseschritt werden dann die Einzelproteine - mit SDS beladen - auf einem Acrylamidgel (parallel zur 2D-Gelelektrophorese) separiert. Mit Hilfe dieser Methode identifizierte die Arbeitsgruppe von Schägger mehrfach TMP aus mitochondrialen Fraktionen. Auch Reifschneider et al. (2006) konnten 27 TMP aus den Mitochondrien von verschiedenen Rattengeweben darstellen (Reifschneider et al. 2006). Ob diese ursprünglich für die Analyse von Mitochondrien entwickelte Methode auch für die Auftrennung TMP aus Gehirngewebe geeignet ist, kann im Moment noch nicht sicher beurteilt werden. Meddows et al. (2001) konnten NMDA-, GABA- und Acetylcholin-Rezeptoren mittels „Blue native Elektrophorese“ darstellen (Meddows et al. 2001). Mir ist bisher keine Arbeit bekannt, welche über die Auftrennung einer höheren Zahl von TMP aus Gehirngewebe berichtet hätte. Abgesehen davon werden die Proteine bei dieser Methode auf den 2D-Gelen nicht als runde Spots, sondern oft mehr als horizontale Streifen dargestellt. Zusätzlich sind häufig horizontale „Background-Verschmierungen“ des Farbstoffes auf den Gelen zu sehen. Aus diesen Gründen eignet sich die Methode - zumindest in ihrem momentanen Entwicklungsstadium - ebenfalls nicht für quantitative Gruppenvergleiche.

Die weitaus beste Auftrennung TMP aus Gehirngewebe erfolgte durch eine Kombination chromatographischer und massenspektrometrischer Techniken. Besonders eindrucksvoll ist hier die Arbeit von Wu et al. (2003), welche mit der so genannten „Multidimensional Protein Identification Technology“ (MudPIT) insgesamt 1610 Proteine aus Rattenhirnhomogenaten identifizierten. 454 dieser Proteine (28,2%) besitzen transmembrane Domänen. Besonders interessant bei dieser Arbeit ist die Identifizierung von mehreren Dutzend Proteinen mit mehr als zehn transmembranen Domänen. Drei Proteine hatten 21 transmembrane Domänen, dabei handelte es sich um Kaliumkanäle (Wu et al. 2003). Fünfzehn TMP konnten durch chromatographische Vorreinigung und Sequenzierung mit ESI-IT/MS (Electrospray Ionisation-Ion Trap/MS) in synaptischen Rattenhirnmembranen gefunden werden (Stevens et al. 2003). Schrimpf et al. (2003) identifizierten sechs Rezeptoren und drei Transmitter-Rezeptoren mit transmembranen Domänen aus Synaptosomen des Maushirns durch „Isotopen-codierte Affinitätskennzeichnung“ (ICAT) und anschließender Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) (Schrimpf et al. 2005). Nielsen et al. (2005) identifizierten im Kortex bzw. im Hippocampus der Maus 700-800 Proteine, davon wurden 60%-66% als „Membranproteine“ gekennzeichnet, unter denen wiederum einige Glutamat- und GABA-Rezeptoren zu finden waren. Im Übrigen wird in

dieser Arbeit aber nicht differenziert, ob es sich bei diesen „Membranproteinen“ um TPM oder membranassoziierte Proteine handelt (Nielsen et al. 2005).

Zusammenfassend können durch diese „Shot-Gun-Ansätze“ deutlich mehr TMP identifiziert werden, als mittels der 2D-Gelelektrophorese. Dies ist jedoch im Bezug auf quantitative Vergleichsuntersuchungen von im Moment noch begrenztem Wert, da durch „Shot-Gun-Ansätze“ immer nur Stichproben von  $n=1$  miteinander verglichen werden können (s.u.).

Als Schlussfolgerung kann festgehalten werden, dass es bis heute keine Methode der Proteomforschung vermag, quantitative Vergleichsuntersuchungen mit einer ausreichenden Zahl von TMP des Zentralnervensystems durchzuführen.

### **1.3.2 Quantitative Vergleiche verschiedener Stichproben**

In diesem Abschnitt wird auf Probleme bei der quantitativen Differenzierung von Proteinen eingegangen, welche auf 2D-Gelen mit „konventionellen Methoden“ wie Silberfärbung, Coomassie Brilliant Blau (CBB) oder Sypro Ruby visualisiert werden.

#### **1.3.2.1 Quantitativer, statistischer Vergleich der Proteine zweier Stichproben durch 2D-Gelelektrophorese**

Quantitative Vergleiche auf der Basis der 2D-Gelelektrophorese sind bisher mit gravierenden Mängeln behaftet (Übersichten bei Moritz and Meyer 2003; Righetti et al. 2004). Das Hauptproblem besteht darin, dass das Spotmuster der Proteine auf Grund verschiedener methodischer Faktoren (s.u.) von Gel zu Gel unterschiedlich ausfallen kann. Diese mangelhafte Replizierbarkeit der Gele beeinträchtigt die richtige Zuordnung der Spots verschiedener Gele zueinander („matchen“) und schränkt damit die Validität quantitativer Gruppenvergleiche mit Hilfe statistischer Tests deutlich ein.

Die im September 2006 veröffentlichten Ergebnisse der Pilotstudien des „Brain Proteom Projekt“ der Human Proteom Organisation (HUPO BPP) zeigen, dass Ergebnisse quantitativer Vergleichsuntersuchungen zwischen unterschiedlichen Laboratorien sehr schlecht replizierbar sind. In diesen Studien haben fünf Labore die quantitativen Unterschiede in der Proteinexpression in den Homogenaten von Mausgehirnen in drei Entwicklungsstadien untersucht (am 16. Embryonaltag, am 7. und am 56. postnatalen Tag). Von allen Arbeitsgruppen wurden mit der Methodik der 2D-Gelelektrophorese insgesamt 551 Proteine als signifikant verändert beschrieben. Davon waren jedoch 436 Proteine in jeweils nur einem Labor verändert

und nur ein einziges Protein wurde von allen Arbeitsgruppen als signifikant verändert charakterisiert (Carrette et al. 2006; Fröhlich et al. 2006; Reidegeld et al. 2006).

In der Literatur finden sich einige Hinweise auf die möglichen Ursachen der mangelnden Reproduzierbarkeit von quantitativen Vergleichen auf der Basis von 2D-Gelen (Übersicht bei Righetti et al. 2004; Zhou et al. 2005).

So beschrieben z.B. Zhou et al. (2005), dass während der in-Gel-Rehydrierung der Proteine zur Beladung der IPG-Streifen der ersten Dimension zwischen 44% und 80% der eingesetzten Proteinmenge verloren gehen können. Weitere 17% bis 27% können während der Equilibrierung zwischen der ersten und der zweiten Dimension verloren gehen. Wenn das Ausmaß dieser Verluste von Gel zu Gel variiert, so könnte dies eine zuverlässige Quantifizierung erschweren oder sogar verunmöglichen.

Mehrere Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren berichtet, dass die Wahl der Software, welche zur Spottedektion und zur quantitativen Analyse verwendet wird, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann (Nishihara and Champion 2002; Rosengren et al. 2003; Wheelock and Buckpitt 2005). Eine Vielzahl weiterer Faktoren könnte für die unbefriedigende Replizierbarkeit von 2D-Gelen verantwortlich sein: Die Art der Probenvorbereitung (welches Detergenz und welche denaturierende Substanz wird benutzt?), die Qualität der Proteinbestimmung (welche enthaltenen Substanzen interferieren mit welcher Farbreaktion?), die Qualität der IPG-Streifen der ersten Dimension (gleich bei verschiedenen Herstellern?), die spezifische Methodik zur Visualisierung der Spots auf dem 2D-Gel (z.B. Silber, Coomassie Brilliant Blau (CBB) oder Sypro Ruby), und schließlich die Reliabilität bei der Gelauswertung durch eine entsprechende Software.

Bis heute gibt es noch keine systematische Untersuchung über die Frage, welche Faktoren tatsächlich für die mangelhafte Replizierbarkeit von 2D-Gelen verantwortlich sind. Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Dissertation besteht deshalb darin, mögliche Ursachen für die hohe Intergelvarianz herauszufinden und nach Möglichkeit zu beseitigen, mit dem Ziel, quantitative Gruppenvergleiche durch 2D-Gelelektrophorese besser durchführen zu können. Die Zuverlässigkeit quantitativer Gruppenvergleiche soll insbesondere mit Hilfe von „Power-Analysen“ überprüft werden. Bei einer „Power-Analyse“ werden zwei Gruppen einer bestimmten Anzahl an Gelen mit zwei verschiedenen Proteinlademengen (z.B. 200 µg und 300 µg pro Gel) beladen. Anschließend wird berechnet, welcher Prozentsatz der analysierten Proteinspots sich signifikant zwischen den beiden Gruppen unterscheidet. Derartige „Power-Analysen“ wurden meines Wissens bisher noch nicht publiziert. Ihre Durchführung ist jedoch die Voraussetzung dafür, den Grad der Zuverlässigkeit von quantitativen Vergleichsuntersuchungen

auf der Basis von 2D-Gelen zu verstehen. Darauf wird auch in der Fachliteratur immer häufiger hingewiesen (z.B. Wilkins et al. 2006).

Vor der Beschreibung der entsprechenden Experimente werden hier in Kurzform noch weitere Methoden vorgestellt, welche mit dem Ziel der besseren Quantifizierung des Proteoms entwickelt wurden.

### **1.3.2.2 Quantitative Analyse mittels 2D-„Difference-gel-electrophoresis“ (DIGE)**

Im Jahre 1997 beschrieben Ünlü et al. eine Methode, bei der die Proteinproben vor der Elektrophorese mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen, so genannten „Cy Dyes“, gelabelt werden (Ünlü et al. 1997). Dabei werden die quantitativ zu vergleichenden Stichproben und ein interner Standard mit jeweils einem der drei verfügbaren „Cy Dyes“ markiert, anschließend gemischt und dann mit der Methodik der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Da die verschiedenen Farbstoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen zu Fluoreszenz angeregt werden, können die Spots zwei verschiedener Stichproben und eines internen Standards auf demselben Gel visualisiert werden, die „Zwischengelvarianz“ fällt dabei weg. Somit können allerdings auch nur Stichproben von jeweils  $n=1$  mit einander verglichen werden. Sobald die Stichprobengröße  $n=1$  übersteigt ergibt sich wiederum das Problem der „Zwischengelvarianzen“, denn das Verhältnis der Intensitäten der Proteine aus zwei verschiedenen Stichproben („Ratio“) variiert deutlich von Gel zu Gel (Karp et al. 2004). Dieselbe Arbeitsgruppe berechnete, dass auf Grund der hohen Intergelvarianzen der „Ratios“ vier DIGE-Gele erforderlich wären, um 100%ige Unterschiede in den Spotintensitäten bei 80% aller Spots zu messen. Insgesamt 18 Gele wären nötig, um 25%ige Differenzen in den Spotintensitäten bei 80% der Spots zu detektieren. Dies bedeutet einen enormen Aufwand, welcher nicht nur aus arbeitstechnischen sondern auch aus finanziellen Gründen (die DIGE-Reagenzien sind sehr teuer) nicht von jeder Arbeitsgruppe erbracht werden kann. In meiner Dissertation wurden daher die Versuche beschrieben, die Quantifizierung von mit konventionellen Methoden (s.o.) markierten Proteinspots zu verbessern.

### **1.3.2.3 Quantifizierung durch massenspektrometrische Methoden („Shot-Gun“)**

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuer Methoden entwickelt, die die Quantifizierung von Proteinen aus verschiedenen Stichproben ohne die Anfertigung von Gelen, allein durch chromatographische und massenspektrometrische Methoden ermöglicht. Gygi et al. berichteten 1999 über eine Methode, bei welcher Proteine an ihren Cystein-Resten, mit so genannten "Isotope-coded Affinity Tags" (ICAT) markiert und massenspektrometrisch quantifiziert werden

konnten. Die Proteine beider Stichproben werden, nach der Markierung mit den ICAT-Reagenzien, gemischt und tryptisch verdaut. Da sich die beiden ICAT-Reagenzien in ihrer Masse um acht Dalton unterscheiden, erscheinen sie in der Massenspektrometrie als dicht hintereinander geschaltetes „Peptid-Paar“ und können anhand der Intensitäten der beiden Peaks quantitativ verglichen werden (Gygi et al. 1999a).

Seit der Publikation der Arbeit von Gygi et al. (1999) wurde eine Vielzahl neuer Methoden zur Quantifizierung von Proteinen durch massenspektrometrische Techniken entwickelt. Die wichtigsten Beispiele sind die Kopplung der Proteine an aminreaktive „Isobaric Tag-Reagenzien“ (iTRAQ) (Ross et al. 2004), die so genannte „Protein Sequenz Tag Technology“ (PST) (Kuhn et al. 2005), sowie eine Reihe von Methoden, bei denen die Quantifizierung ohne Isotopenbindung allein auf Grund der Verhältnisse der Peakintensitäten zwischen zwei verschiedenen massenspektrometrischen Durchgängen erfolgt (z.B. Wang et al. 2006)

Das Problem der Varianz zwischen verschiedenen massenspektrometrischen Analysen wird bei den auf Isotopen beruhenden Methoden dadurch umgangen, dass die Proteingemische aus zwei Stichproben im selben massenspektrometrischen Durchgang analysiert werden können.

All diese viel versprechenden neuen Techniken weisen jedoch bis heute ebenfalls zahlreiche Mängel auf (Übersichten bei Julka and Regnier 2004; Righetti et al. 2004). So können bisher nur Stichproben von  $n=1$  miteinander verglichen werden. Dies verunmöglicht reguläre statistische Gruppenvergleiche, Veränderungen der Spotintensitäten können nur durch relativ willkürliche Kriterien, wie Verdopplung oder Verdreifachung, definiert werden. Quantitative Vergleiche größerer Stichproben sind nur eingeschränkt möglich, da bei verschiedenen massenspektrometrischen Durchgängen nicht immer dieselben Proteine identifiziert werden. So beschrieben Ilias et. al. (2005), dass bei drei Replikatläufen der selben Probe nur zwischen 35% und 48% der Peptide (abhängig von der massenspektrometrischen Technik) in allen drei Durchgängen gemeinsam gefunden wurden (Ilias et al. 2005). Nach meiner Kenntnis wurden deshalb bisher auch keine Studien publiziert, bei welchen Stichproben von größer als  $n=1$  massenspektrometrisch quantitativ unterschieden wurden. Weiterhin können quantitative Veränderungen von posttranslationalen Modifikationen nur dann erfasst werden, wenn genau jenes Peptid, an welchem die Modifikation stattgefunden hat, in der massenspektrometrischen Analyse erfasst wird. Dieses ist jedoch bislang nur bei einem sehr kleinen Prozentsatz aller analysierten Peptide gelungen. In der Arbeit von Wu et. al. (2003) wurden nur bei 51 von 1610 Proteinen posttranslationale Modifikationen identifiziert, das heißt bei nur etwas mehr als 3% aller Proteine (Wu et al. 2003). Dies bedeutet, dass die Erfassung von posttranslationalen

Modifikationen mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden allein beim gegenwärtigen Stand der Technik nur äußerst eingeschränkt möglich ist. Mit der Technik der 2D-Gelelektrophorese können derartige Quantifizierungen hingegen gut durchgeführt werden, da Proteine mit unterschiedlichen posttranslationalen Veränderungen auch in unterschiedlichen Spots abgebildet werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle heute angewandten Techniken zur Quantifizierung des Proteoms mit deutlichen methodischen Mängeln behaftet sind.

## 2. Fragestellung

Das Ziel der hier beschriebenen Experimente ist eine Verbesserung der Methodik der 2D-Gelelektrophorese im Hinblick auf die folgenden zwei „Problembereiche“:

- a) Darstellung transmembraner Proteine (TMP): Ziel der vorliegenden Arbeit war es, möglichst viele Proteine mit transmembranen Domänen auf den 2D-Gelen darzustellen. Falls dies nicht gelingt, sollte die Frage näher untersucht werden, warum diese Proteine nicht auf 2D-Gelen zu visualisieren sind und wo sie während der komplexen methodischen Prozedur der 2D-Gelelektrophorese verbleiben.
- b) Quantitative Vergleichbarkeit. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde versucht, einige der Ursachen für die bisher mangelhafte Reproduzierbarkeit von 2D-Gelen zu erkennen und nach Möglichkeit zu beseitigen. Ziel dieses Teiles der Arbeit war es, die Reproduzierbarkeit der Gele in soweit zu verbessern, dass auch quantitative Unterschiede von weniger als 100% zwischen zwei Gruppen von Gelen zuverlässig statistisch erfasst werden können.