

Analyse des Oberflächenproteoms von Hirnkapillarendothelzellen

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Diplom-Biologe Thomas H. Oppolzer
aus Darmstadt

| | |
|-----------------------------|---------------------------|
| Berichterstatter: | Professor Dr. H.G. Gassen |
| Mitberichterstatter: | Professor Dr. P. Layer |
| Tag der Einreichung: | 16.12.2003 |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 06.02.2004 |

Darmstadt 2003

D17

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis Dezember 2003 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Gassen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Gassen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und die lehrreichen Sitzungen.

Für die Übernahme des Korreferates möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P. Layer bedanken.

Frau Dr. Sabine Wolf danke ich persönlich für ihren hilfreichen Beitrag zu dieser Arbeit. Zusätzlich möchte ich ihr stellvertretend für die Explora GmbH für die Bereitstellung der Arbeitsgeräte und -materialien danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Martina Jäger für die geduldige und kompetente Betreuung. Sie trug einen großen Anteil zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Dr. Frank Runge danke ich für die Unterstützung während der Exkursionen in die Welt der organischen Synthese.

Den Postdocs Thorsten Bangsow, Bernhard Pelzer und Heiko Stöltzing danke ich für Rat, Tat und die Vermittlung so mancher Technik.

Meinen Mitdoktoranden Stefan Märten und Patrick Pankert danke ich für freundschaftliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Firma Explora und des Institutes möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit auch außerhalb der Labore danken. Speziell Dominik Jordan danke ich für die in Labor 401 entstandene Freundschaft.

Verena Weimer, Uta Frieling, Petra Gruhn, Christina Tritt und Alexander Stermann danke ich für ihre Mitarbeit während ihrer Praktika.

Herrn Otto Fuchs möchte ich stellvertretend für die Mitarbeiter der Werkstatt für die Instandhaltung der Gerätschaften und die Hilfe bei technischen Problemen danken.

Meinen Eltern und meinen Großmüttern danke ich dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglichten. Sie unterstützten mich in allen Belangen und glaubten immer an mich.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Deniz Atiker für die tatkräftige Unterstützung, für die Geduld und für vieles mehr von ganzem Herzen bedanken.

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Endothel und Blut-Hirn-Schranke | 3 |
| 2.1.1 | Aufbau der Hirnkapillaren | 4 |
| 2.1.2 | Transport an der BHS | 5 |
| 2.1.3 | Aufbau und Struktur der tight junctions | 6 |
| 2.1.3.1 | Proteine der tight junctions | 8 |
| 2.1.3.2 | Regulation der tight junctions | 15 |
| 2.2 | Proteomanalyse | 16 |
| 2.2.1 | Methoden der Proteomanalyse | 17 |
| 2.2.1.1 | Trennmethoden | 18 |
| 2.2.1.2 | Markierungsmethoden | 23 |
| 2.2.1.3 | Fraktionierungsmethoden | 28 |
| 2.3 | Aufgabenstellung | 31 |
| 3 | Material | 33 |
| 3.1 | Chemikalien | 33 |
| 3.2 | Sonstige Materialien | 34 |
| 3.3 | Geräte | 36 |
| 3.4 | Spezielle Materialien | 38 |
| 3.4.1 | Bakterienstämme, Plasmide und Säugerzellen | 38 |
| 3.4.2 | Referenzen und Größenstandards | 39 |
| 3.4.3 | Oligonukleotide | 40 |
| 3.4.4 | Antibiotika, Medien und Puffer | 40 |
| 4 | Methoden | 42 |
| 4.1 | Proteinchemische Methoden | 42 |
| 4.1.1 | Proteinbestimmung mit RotiQuant | 42 |
| 4.1.2 | Konzentrierung von Proteinlösungen | 42 |
| 4.1.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 43 |
| 4.1.4 | Färbemethoden für SDS-Polyacrylamid-Gele | 45 |
| 4.1.4.1 | Färbung mit Sypro-Ruby | 45 |
| 4.1.4.2 | Modifizierte Silberfärbung nach Blum | 45 |
| 4.1.4.3 | Coomassie-Färbung nach Neuhoff | 46 |
| 4.1.5 | Elektrotransfer von Proteinen | 47 |
| 4.1.6 | Färbemethoden für Blotmembranen | 48 |
| 4.1.6.1 | Ponceau-S-Färbung | 48 |
| 4.1.6.2 | Immunchemische Färbung von Blotmembranen | 48 |
| 4.1.6.3 | Affinitätsfärbung von Blotmembranen | 50 |
| 4.2 | Methoden der Zellkultur | 51 |
| 4.2.1 | Isolierung von Hirnkapillarendothelzellen | 51 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.2.2 | Kultivierung von Zellen | 54 |
| 4.2.2.1 | Kollagenierung von Kulturgefäßen | 54 |
| 4.2.2.2 | Aussaat von BMEC | 55 |
| 4.2.2.3 | Passagieren von Zellen | 55 |
| 4.2.2.4 | Kultivierung von C6-Zellen | 56 |
| 4.2.3 | Zellfärbungen | 57 |
| 4.2.3.1 | Vitalitätsfärbung von Zellen | 57 |
| 4.2.3.2 | Fixieren von Zellen | 58 |
| 4.2.3.3 | Immunfluoreszenzfärbung von Zellen | 58 |
| 4.2.3.4 | Affinitätsfärbung von Zellen | 60 |
| 4.3 | Massenspektrometrische Methoden | 61 |
| 4.3.1 | Probenvorbereitung | 62 |
| 4.3.1.1 | Hydrolyse von Proteinen | 62 |
| 4.3.1.2 | Anreicherung von Peptiden | 62 |
| 4.3.2 | MALDI-MS im Reflektor-Modus | 63 |
| 4.4 | Chemische Synthesen | 65 |
| 4.4.1 | Darstellung von ϵ -Aminocapronsäure | 65 |
| 4.4.1.1 | Hydrolyse von Caprolactam | 65 |
| 4.4.1.2 | Reinigung der ϵ -Aminocapronsäure | 65 |
| 4.4.2 | Synthese von Iminobiotinylaminocapronsäure | 67 |
| 4.4.2.1 | Kopplung von ϵ -Aminocapronsäure an Iminobiotin | 68 |
| 4.4.2.2 | Reinigung der Iminobiotinylaminocapronsäure | 68 |
| 4.4.3 | Synthese von Sulfo-NHS-Iminobiotinylaminocapronsäure | 70 |
| 4.5 | Markierung und Anreicherung von Proteinen | 71 |
| 4.5.1 | Markierung löslicher Polypeptide | 71 |
| 4.5.1.1 | In-situ Aktivierung | 71 |
| 4.5.1.2 | Aktivierter Ester | 73 |
| 4.5.1.3 | Quantifizierung der Markierung | 73 |
| 4.5.2 | Markierung von Zelloberflächenproteinen | 74 |
| 4.5.2.1 | Permeabilisierung von Zellen | 75 |
| 4.5.3 | Anreicherung markierter Proteine | 76 |
| 4.5.3.1 | Zellaufschluss | 76 |
| 4.5.3.2 | Affinitätschromatographie ImBAS-markierter Proteine | 76 |
| 4.6 | Molekularbiologische Methoden | 77 |
| 4.6.1 | Agarose-Gelelektrophorese | 77 |
| 4.6.2 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 78 |
| 4.6.3 | Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA | 79 |
| 4.6.3.1 | Standard-PCR | 80 |
| 4.6.3.2 | Bakterien-PCR | 81 |
| 4.6.4 | Reinigung von Nukleinsäuren | 82 |
| 4.6.4.1 | Reinigung von PCR-Produkten | 82 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.6.4.2 | Elution von DNA aus Agarose | 83 |
| 4.6.4.3 | Isolierung von Plasmid-DNA | 83 |
| 4.6.5 | Sequenzierung von Nukleinsäuren | 84 |
| 4.6.5.1 | Sequenzierungsreaktion | 84 |
| 4.6.5.2 | Reinigung der Sequenzierungsansätze | 85 |
| 4.6.6 | Klonierung von DNA | 86 |
| 4.6.6.1 | Ligation von DNA-Fragmenten | 86 |
| 4.6.6.2 | Transformation elektrokompetenter Zellen | 87 |
| 4.6.6.3 | Kultivierung von Bakterien | 88 |
| 5 | Ergebnisse | 89 |
| 5.1 | Chemische Synthesen | 89 |
| 5.1.1 | Hydrolyse von Caprolactam | 89 |
| 5.1.1.1 | Hydrolyse von D0-Caprolactam | 89 |
| 5.1.1.2 | Hydrolyse von D10-Caprolactam | 89 |
| 5.1.2 | Synthese von ImBAS | 89 |
| 5.1.2.1 | Synthese von D0-ImBAS | 90 |
| 5.1.2.2 | Synthese von D10-ImBAS | 90 |
| 5.1.2.3 | Reinigung von ImBAS-Varianten | 90 |
| 5.1.3 | Synthese von Sulfo-NHS-ImBAS | 93 |
| 5.2 | Quantifizierung der Markierung | 95 |
| 5.3 | Hydrolyse markierter Peptide | 97 |
| 5.4 | Differentielle Markierung von Peptiden | 98 |
| 5.5 | Präparation und Kultur der BMEC | 100 |
| 5.6 | Oberflächenmarkierung von vitalen Zellen | 105 |
| 5.7 | Anreicherung ImBAS-markierter Proteine | 107 |
| 5.7.1 | Konzentrationsbestimmung der eluierten Proteine | 108 |
| 5.7.2 | SDS-PAGE angereicherter Proteine | 108 |
| 5.7.3 | Präparative SDS-PAGE | 110 |
| 5.8 | Identifizierung der angereicherten Proteine | 111 |
| 5.8.1 | MALDI-MS-Analyse der Proteine | 111 |
| 5.8.2 | Identifizierung der Proteine mittels Datenbankrecherche | 113 |
| 5.9 | Validierung der Identifizierungen | 119 |
| 5.9.1 | Plexin B1 | 119 |
| 5.9.2 | MRP2 (<i>Canalicular multispecific organic anion transporter</i>) | 121 |
| 5.9.3 | MMP10 (<i>matrix metalloproteinase 10</i>) | 124 |
| 5.9.4 | ATP7b (<i>copper-transporting ATPase 2</i>) | 126 |
| 6 | Diskussion | 131 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 153 |

| | |
|---------|--|
| 2D-PAGE | Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| A | Adenosin, Alanin, Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| ABC | ATP binding cassette |
| AOEC | Aorta Endothelzellen |
| APB | Amersham Pharmacia Biotech |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BCC | N-Benzyl-N'-cyclohexylcarbodiimid |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| BMEC | Hirnkapillarendothelzelle (brain microvessel endothelial cell) |
| bp | Basenpaare |
| CCA | α -Cyano-4-hydroxymizsäure |
| d | 2'-Desoxyribo |
| D | Deuterium |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4'-6-Diamidin-2-phenylindol Hydrochlorid |
| DCC | N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid |
| Do | Esel (donkey) |
| ds | doppelsträngig |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| DVB | Divinylbenzen |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid |
| EDT | 1,2-Ethandithiol |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| g | Gramm, Erdbeschleunigung |
| Glut | Glucose-Transporter |
| Gt | Ziege (goat) |
| GUK | guanylate kinase like |
| HPLC | high performance liquid chromatography |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| Hu | Mensch (human) |
| i. Vak. | im Vakuum |
| ICAT | isotope coded affinity tag |
| IEF | isoelektrische Fokussierung |
| ImBAS | Iminobiotinylaminocaprinsäure |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| JAM | junctional adhesion molecule |
| KAT | Kationenaustauscher |
| l | Liter |
| m | milli, 10^{-3} |
| M | Molar, mol/l |
| m/z | Masse-Ladungsverhältnis (Thomson) |
| MALDI | Matrix-assoziierte Laser-Desorption-Ionisation |
| MDCK | Madin-Darby canine kidney |
| min | Minute |
| MS | Massenspektrometrie |
| Ms | Maus |
| MudPIT | multi dimensional protein identification technology |
| MWCO | molecular weight cut off (Größenausschlussgrenze) |
| NBT | p-Nitrotetrazoliumblausäure |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| nLC | nano liquid chromatography |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid |
| P-Gp | P-Glycoprotein |
| PhIAT | phosphoprotein isotope coded affinity tag |
| PMF | peptide mass fingerprint |
| PTM | posttranslationale Modifikation |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| Rb | Kaninchen (rabbit) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (revolution per minute) |
| Rt | Ratte |
| s | Sekunden |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SNHS | Sulfo-N-Hydroxysuccinimid |
| ss | einzelsträngig (single stranded) |
| SV | Säulenvolumen |
| Tab. | Tabelle |
| TEER | transendothelial electrical resistance |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TER | transepithelial electrical resistance |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Th | Thomson |
| TLCK | N α -p-Tosyl-L-lysin-chloro-methylketon |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TZ | Tischzentrifuge |
| UV | Ultra-Violett |
| V | Volt |
| v/v | Volumenanteile (volume per volume) |
| w/v | Massenanteile (weight per volume) |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid |
| ZNS | zentrales Nervensystem |
| ZO | zonula occludens |

1 Zusammenfassung

Das Vertebratengehirn stellt das am höchsten spezialisierte bekannte Organ dar. In seiner Funktion ist es extrem abhängig von einem konstanten physiologischen Milieu. Die Stabilität eines solchen Milieus, die Homöostase, ist vor allem zum Schutz des neuronalen Gewebes erforderlich. Zum einen muss die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und Sauerstoff garantiert werden, andererseits muss das neuronale Gewebe vor potentiell im Blut gelösten Giftstoffen geschützt werden. Diese komplexe Schutz- und Versorgungsfunktion wird durch das kapilläre System des Gehirns wahrgenommen. Dessen mikrovaskuläres Endothel wird aufgrund seiner Schrankenfunktion als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet. Das Proteom der Hirnkapillarendothelzelle (BMEC) bedingt deren spezifische Eigenschaften und somit direkt die Selektivität der Blut-Hirn-Schranke.

Die BHS ist vor allem aus pharmakologischer und medizinischer Sicht von Bedeutung. Spezielles Interesse gilt dabei der luminalen Plasmamembran der mikrovaskulären Hirnkapillarendothelzellen. Diese Membran stellt für im Blut gelöste Substanzen die erste Barriere bei der Passage der BHS dar. Die Proteine dieser Zellmembran sind maßgeblich beteiligt an zellulärer Kommunikation, an Transportprozessen und an der Ausbildung der *tight junctions*. Die Charakterisierung des Oberflächenproteoms der BMEC verspricht ein besseres Verständnis der Schrankenfunktion und könnte Wege zu deren pharmakologischen Modulation aufzeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Oberflächenproteom von BMEC analysiert. Hierzu wurde ein neuartiges Reagenz entwickelt, das die selektive Markierung der Oberflächenproteine lebender Zellen und die schonende Anreicherung ihrer Membranproteine ermöglichte. Die hierfür synthetisierte SNHS-ImBAS (Sulfo-NHS-Iminobiotinylaminocaprinsäure) zeigte deutliche Vorteile gegenüber konventionellen Biotinylierungsreagenzien, sowohl auf der Ebene der Probenvorbereitung, als auch auf der Ebene der MALDI-MS-Analytik. Dieses zum Patent angemeldete Reagenz erwies sich in den durchgeführten Arbeiten als nicht cytotoxisch und als nicht membrangängig. Um es zur Analyse des Oberflächenproteoms vitaler BMEC einsetzen zu können, wurde dieser Zelltyp aus dem hochkomplexen Organ Gehirn isoliert und kultiviert. Die Kontrolle des Zellmaterials erfolgte mittels immunchemischer Nachweise von Markerproteinen. Nach einer präparativen Oberflächenmarkierung von BMEC wurden die Membranproteine angereichert und im SDS-Gel getrennt. Mittels eigens etablierter Affinitätsfärbungen konnten die selektiven Eigenschaften des Reagenzes und die erfolgreiche Anreicherung markierter Proteine belegt werden. Die Identifizierung der angereicherten Proteine erfolgte mittels MALDI-Massenspektrometrie und anschließender Datenbank-Recherche. Hierbei wurden insgesamt 45 Proteine identifiziert. Für die Hälfte dieser Proteine war eine Lokalisation an der

Zelloberfläche beschrieben. Die Funktion und Lokalisation bei einem weiteren Viertel der Proteine waren unbekannt. Für die restlichen Proteine war eine intrazelluläre Lokalisation beschrieben.

Die Expression von vier der identifizierten Proteine mit bekannter Funktion wurde mit ergänzenden Methoden in BMEC bestätigt. Hierbei handelte es sich um den Rezeptor Plexin B1, die sekretierte Protease MMP10 und die Transportproteine MRP2 (ABCC2) und ATP7b. Der zuletzt aufgeführte Kupfer-Transporter ATP7b konnte in verschiedenen Isoformen nachgewiesen werden, die sich von den humanen Sequenzen zum Teil deutlich unterschieden.

2 Einleitung

2.1 Endothel und Blut-Hirn-Schranke

Das Endothel stellt eine einlagige Zellschicht dar, die bei Vertebraten alle Blut- und Lymphgefäße auskleidet. In Geweben mit besonders hohem, unkontrolliertem Stoffaustausch tritt die Endothelschicht der Blutgefäße in Form eines diskontinuierlichen oder fenestrierten Endothels auf, dessen interzelluläre Lücken einen freien, diffusionsgetriebenen Stoffaustausch zwischen Gefäßlumen und umgebenden Gewebe ermöglichen.

In Organen oder Geweben, in denen eine strikte Kontrolle des Stoffaustausches nötig ist, bilden Endothelzellen eine kontinuierliche, dichte Zellschicht. Diese auch Schrankenendothel genannte Struktur ist gekennzeichnet durch *tight junctions*, d. h. durch besonders enge Zell-Zell-Kontakte, die keine interzellulären Lücken aufweisen. Das Gefäßlumen wird so von dem Interstitium des umgebenden Gewebes räumlich vollständig getrennt. Gewebe mit Schrankenfunktion sind bislang unter anderem im Plexus choroidei, in den Testes, an der Plazenta und in Hirnkapillaren beschrieben worden.

Das Vertebratengehirn stellt das am höchsten spezialisierte bekannte Organ dar. Um die Funktion des Gehirns als zentrales Steuerorgan einwandfrei zu gewährleisten, ist die Aufrechterhaltung der Homöostase im neuronalen Gewebe unbedingt erforderlich. Zum einen muss die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und Sauerstoff garantiert werden, andererseits muss das neuronale Gewebe vor potentiell im Blut gelösten Giftstoffen geschützt werden. Zudem ist es für die synaptische und nicht-synaptische Kommunikation innerhalb des Gehirns unerlässlich, dass temporäre Änderungen der Zusammensetzung der interstitiellen Flüssigkeit als Signal im neuronalen Gewebe erhalten bleiben. Diese komplexe Schutz- und Versorgungsfunktion wird durch das kapilläre System des Gehirns wahrgenommen. Hierbei gelten die Adergeflechte der Plexus choroidei als Sitz der Blut-Liquor-Schranke. Es ist der Ort der Bildung des Liquor cerebrospinalis, der Flüssigkeit, die in den vier Hirnventrikeln und im Subarachnoidalraum enthaltenen ist und die das zentrale Nervensystem (ZNS) gegen Stoß und Druck von außen schützt. Die Plexus choroidei unterbinden den freien Stoffaustausch zwischen Blut und Liquor cerebrospinalis und kontrollieren über aktive Transportprozesse dessen Zusammensetzung.

Das kapilläre System der das Gehirn versorgenden Blutgefäße grenzt Blut- und Gehirnkompartment voneinander ab. Das Endothel dieser Kapillaren bildet die Kontakt- und Austauschfläche zwischen dem ZNS und dem Blutkompartiment. Die besonderen Eigenschaften der mikrovaskulären Hirnkapillaren werden in ihrer Gesamtheit als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet. Dieses Schrankenendothel hält, gemeinsam mit den Epithelien des Plexus choroidei, die optimale Versorgung des Gehirns aufrecht.

Die Kapillarendothelien des Gehirns stellen beim Mensch mit ca. 20 m² Kapillaroberfläche eines der größten Schrankengewebe (Petty und Lo, 2002) dar. Sie unterscheiden sich aufgrund ihres hohen Spezialisierungsgrades von den Kapillaren anderer Gewebe. So sind nur wenige pinocytotische Vesikel in den Zellen zu finden. Dies in Kombination mit der hohen Zahl an Mitochondrien lässt auf eine hohe Transportleistung aufgrund kontrollierter, energieabhängiger Transportprozesse schließen. Die Zellen dieses kontinuierlichen Endothels sind durch *tight junctions* verbunden, was den freien parazellulären Stoffaustausch wasserlöslicher Substanzen zwischen Blut und Hirnparenchym unterbindet. Daraus resultiert der charakteristische hohe *transendotheliale Widerstand* (TEER) von 1500-2000 Ohm*cm² bei Hirnkapillaren im Vergleich zu 22-52 Ohm*cm² bei Kapillaren aus Plazenta (Huber, et al., 2001). Zusätzlich ermöglichen die *tight junctions* die polarisierte Organisation der Zellmembran (van Meer und Simons, 1986).

2.1.1 Aufbau der Hirnkapillaren

Die mikrovaskulären Hirnkapillaren weisen einen Durchmesser von 3 bis 10 µm auf und durchziehen das menschliche Gehirn auf einer Länge von schätzungsweise 600 km (Miller, 2002). Das Kapillarrohr wird durch Endothelzellen gebildet, die lückenlos miteinander durch *tight junctions* verbunden sind und das Lumen vollständig abgrenzen (Abb. 1). Dieses Kapillarrohr ist von einer proteinreichen Matrix, der Basalmembran, umschlossen. Neben Kollagen IV, Laminin und Fibronektin enthält diese Matrix auch Proteoglykane wie z. B. Heparansulfat. In diese Basalmembran mit eingebettet findet man mit den Perizyten einen weiteren Kapillar-assoziierten Zelltyp. Hierbei handelt es sich um polymorphe Zellen, welche die Hirnkapillaren zu 20-30% bedecken (Sims, 1986). Dabei befinden sie sich vorzugsweise über den *tight junctions* der Endothelzellen. Die Perizyten stehen mit den Endothelzellen über *gap junctions* in Verbindung. Somit ist ein Austausch kleiner Moleküle und Ionen zwischen den beiden Zelltypen und somit gegenseitige Beeinflussung möglich.

Ein dritter Zelltyp, die Astrozyten, ist ebenfalls am Aufbau der Hirnkapillaren beteiligt. Die sog. Astrozyten-Endfüßchen, d. h. die Ausläufer dieser gliären Zellen, besetzen die Kapillaren auf der Gehirn-zugewandten Kapillarseite zu ca. 90% (Rubin und Staddon, 1999). Diese großen sternförmigen Zellen werden auch als Makroglia bezeichnet. Sie stehen über zahlreiche Fortsätze sowohl mit den Kapillaren, als auch mit den Nervenzellen in Verbindung und sind zudem zur Phagozytose befähigt. Dieser Zelltyp trägt nicht direkt zur Schrankenfunktion der BHS bei. Durch Abgabe löslicher Faktoren ist er aber in der Lage, die Schrankeneigenschaften im benachbartem Endothel zu induzieren (Sobue, et al., 1999).

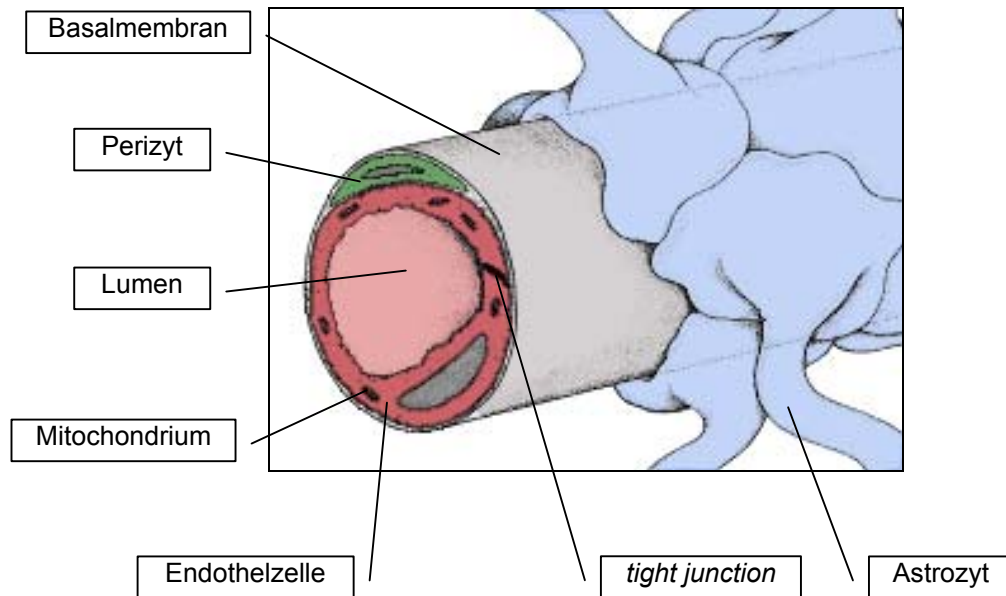


Abb. 1 Hirnkapillarrohr mit Endothelzelle, Perizyt und aufsitzenden Endfüßchen der Astrozyten, nach Goldstein und Betz (1986)

2.1.2 Transport an der BHS

Die Schrankenfunktion der Hirnkapillarendothelzelle schlägt sich in ihrem Proteom nieder. Sie exprimiert die funktionellen Proteine verschiedener selektiver Transportsysteme, um eine ausreichende Versorgung des Gehirns gewährleisten zu können. Da die parazelluläre Diffusion an der BHS sehr stark eingeschränkt ist, sind spezielle Transportproteine nötig. Diese transportieren Nährstoffe, Metabolite und Hormone sowohl vom Kapillarlumen in die Endothelzelle, als auch über die basolaterale Membran in das Gehirn. Der Transport zwischen Blut und Gehirn findet dabei nicht über zwei identisch ausgestattete Membranen statt. Die Transportproteine sind vielmehr asymmetrisch auf die Membranen verteilt (Betz, et al., 1980).

Da das Gehirn 98% seines Energiebedarfs mit Glucose deckt, weisen die Membranen der Hirnkapillarendothelzellen eine hohe Anzahl ionenunabhängiger Hexosetransporter auf. Sowohl in der luminalen Membran, als auch in der abluminalen Membran wurden die Transportertypen Glut1 und Glut5 nachgewiesen (Mantych, et al., 1993; Weiler-Güttler, et al., 1989).

Der Transport der verschiedenen Aminosäuren an der BHS erfolgt durch verschiedene, zum Teil nur auf einer Membran präsentierte Proteine. Das L-System hat eine hohe Affinität zu großen, neutralen Aminosäuren wie Tryptophan, Phenylalanin und Leucin, wohingegen seine Affinität zu Alanin oder Glutamin gering ist (Sanchez del Pino, et al., 1995). Dieses Transportsystem ist in beiden Membranbereichen zu finden (Smith, et al., 1987). Es

akzeptiert auch das zur Parkinson-Therapie eingesetzte L-DOPA, das den Mangel an Dopamin im Gehirn beheben soll. Da Dopamin selbst nicht über die BHS transportiert wird, erfolgt die Gabe der Dopamin-Vorstufe L-DOPA als sog. *Prodrug*.

Als Beispiel eines rein abluminalen Transportsystems sei das A-System genannt. Hierbei handelt es sich um einen Na^+ -abhängigen Co-Transporter für Glycin und Aminosäuren mit kurzen, linearen oder polaren Seitenketten. Diese Aminosäuren verlassen die Endothelzelle anschließend über das L-System in das Kapillarlumen (Betz und Goldstein, 1978).

Neben diesen Transportsystemen, die der Versorgung des Hirnparenchyms dienen, sind an den Membranen der Hirnkapillarendothelzellen auch Transporter mit direkter Schutz- oder Entgiftungsfunktion zu finden. Als ein Beispiel sei an dieser Stelle das P-Glycoprotein (P-Gp) aufgeführt. Dieses auch MDR1 genannte Protein gilt als funktionelle Ursache der *multi drug resistance* maligner Zellen (Juliano und Ling, 1976). Nach dem Nachweis seiner Lokalisation an der BHS konnte seine Funktion als *drug efflux*-Pumpe in BMEC-Primärkultur gezeigt werden (Tatsuta, et al., 1992). Dieser energieabhängige Transporter transportiert toxische Substanzen zurück in das Lumen der Kapillare und schützt somit das Parenchym des Gehirns. Er akzeptiert dabei von kleineren Molekülen, wie dem Antihistaminikum Cimetidin (252 Da), über Cyclosporin A (1200 Da) auch größere Moleküle wie das Antibiotikum Gramicidin (1700 Da) als Substrat. Die rein luminal Lokalisation des P-Gp wird derzeit diskutiert.

2.1.3 Aufbau und Struktur der tight junctions

Die Kompartimentierung, d. h. die räumliche Trennung von Reaktionsräumen in Organismen erfordert selektive Schichten. Auf Zellebene teilen Membranen die Zelle in verschiedene Kompartimente auf. Auf der Ebene komplexerer Organismen trennen selektive Zellschichten die Kompartimente unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander ab. Solche zellulären Barrieren spielen bei Vertebraten eine zentrale Rolle in der Abgrenzung des interzellulären Raumes in epithelialen und endothelialen Geweben. So werden z. B. die Tubuli der Niere durch epitheliale Zellverbände ausgekleidet oder die Hirnkapillaren durch endotheliale Zellschichten gebildet.

Die Zellverbände werden dabei durch verschiedene sich ergänzende Arten der Zell-Zell-Verbindung gebildet. Die als zonula adhaerens oder auch *adherens junctions* bezeichnete Strukturen umschließen die Zellen in der Form eines Gürtels und halten diese als Verband zusammen. *Adherens junctions* werden von transmembranen Glykoproteinen der Cadherin-Superfamilie gebildet. Hierbei handelt es sich um Ca^{2+} -abhängige Rezeptoren, die bei benachbarten Zellen über homotypische Interaktionen adhäsive Komplexe bilden (Petty und Lo, 2002). Die Glykoproteine der *adherens junctions* sind über cytoplasmatische Ankerproteine mit dem Cytoskelett verbunden. An dieser Verankerung sind die Proteine

β -Catenin, γ -Catenin und p120^{ctn} beteiligt, die Mitglieder der sog. Armadillo-Protein-Familie darstellen. Die Bindung dieses Cadherin-Catenin-Komplexes an das α -Aktin des Cytoskelettes erfolgt über α -Catenin (Abb. 6). Diese Art des Zell-Zell-Kontaktes vermittelt keine Selektivität des parazellulären Stoffaustausches. Allerdings werden die Zellschicht-stabilisierenden Eigenschaften der *adherens junctions* als Voraussetzung für die Ausbildung der selektiven *tight junctions* angesehen (Petty und Lo, 2002).

Der zonula occludens oder auch *tight junctions* genannte Typ der Zell-Zell-Verbindung ist sowohl bei polarisierten Zellen des Epithels als auch des Endothels zu finden.

Die Struktur der *tight junctions* wurde bereits vor 40 Jahren intensiv durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie (EM) untersucht (Farquhar und Palade, 1963). Die Doppelmembran der Zellen brechen bei der Probenvorbereitung in eine sog. *P-face* und eine *E-face* auseinander, die dann mit Hilfe eines Elektronenmikroskops untersucht werden. Die *P-face*, die protoplasmatische Schicht der Membran, zeigt dabei auf Höhe der *tight junctions* ein Set kontinuierlicher paralleler Stränge, die in die Membran eingelagert sind. Die *E-face*, also die extrazytoplasmatische Membranschicht, zeigt zu den Strängen der *P-face* korrespondierende Furchen.

Die *tight junction*-Stränge einer Zelle assoziieren lateral mit Strängen auf benachbarten Zellen, um gepaarte Stränge von ca. 10 nm Dicke zu bilden (Abb. 2, links). Die Zellen treten hierbei in ihren apikalen Membranbereichen in einen festen Kontakt, bei dem der interzelluläre Raum versiegelt wird. Diese Kontaktstellen werden *kissing points* genannt und verschließen den Zellzwischenraum lokal. Die *kissing points* sind dabei als Aufsicht auf einen solchen gepaarten Strang zu werten (Abb. 2, rechts).

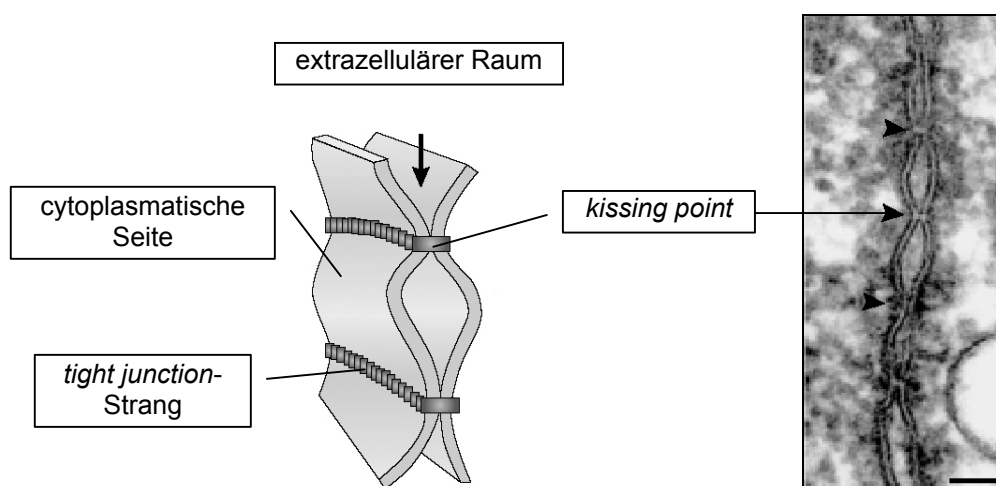


Abb. 2 Struktur der *tight junctions*, — : 50 nm, nach Tsukita et al. (2001)

Die Kontaktstellen bilden dabei ringförmige Strukturen, die die Zellen in ihrem apikalen Bereichen vollständig umschließen. Somit wird eine Barriere gegen parazelluläre Diffusion geschaffen. Man spricht in diesem Zusammenhang von der *gate*-Funktion der *tight junctions*, bildlich gesehen also von einem Tor, das die parazelluläre Passage von Substanzen verhindert oder zumindest einschränkt.

2.1.3.1 Proteine der *tight junctions*

Das 65 kD Phosphoprotein **Occludin** (lat. *occludo*: verschließen) war das erste identifizierte *tight junction*-assoziierte Transmembranprotein, das an der Ausbildung der *tight junction*-Stränge beteiligt ist (Furuse, et al., 1993). Es konnte in vielen Endothelien und Epithelien nachgewiesen werden (Hirase, et al., 1997), zudem wurde seine Expression in Astrozyten und Neuronen in-vitro gezeigt (Bauer, et al., 1999). Über Expression des Proteins in Occludin-defizienten Fibroblasten aus Ratte konnte die Beteiligung des Proteins an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten bestätigt werden. Das gebildete Protein zeigte hierbei eine Kolo-kalisation mit dem ebenfalls exprimierten cytosolischen Protein ZO-1 an den Kontaktstellen der Zellen. Diese Zell-Zell-Kontakte waren bei Expression von Occludin in ihrer Stabilität unabhängig von der Ca^{++} -Konzentration. Dies ließ auf einen Cadherin-unabhängigen Kontakt der Zellen schließen (van Itallie und Anderson, 1997).

Occludin repräsentiert ein integrales Membranprotein mit vier Transmembranbereichen und zwei extrazellulären Schleifen mit je ca. 45 Aminosäureresten (Balda und Matter, 2000). Sowohl der *N-Terminus* (66 Reste) als auch der *C-Terminus* (255 Reste) liegen dabei innerhalb der Zelle vor (Abb. 3). Die erste extrazelluläre Schleife enthält zu ca. 60% Tyrosin- und Glycinreste. Ihr wird eine wichtige Rolle beim Ausbilden von Zell-Zell-Kontakten zugeschrieben. So konnte in-vitro gezeigt werden, dass die Zugabe eines synthetischen Peptides, das diesem Proteinbereich entspricht, die Zell-Zell-Adhäsion inhibiert (van Itallie und Anderson, 1997). Die Zugabe eines Peptides, das dem Proteinbereich der zweiten extrazellulären Schleife entspricht, zeigte in in-vitro Versuchen an Epithelzellen keine Beeinträchtigung des adhärenenten Verhaltens. Es erhöhte jedoch die Permeabilität der Zellschicht (Wong und Gumbiner, 1997). Zusammengenommen wurden diese Ergebnisse so interpretiert, dass die erste extrazelluläre Schleife des Occludins über homotypische Interaktion mit Occludinen benachbarter Zellen an den adhärenenten Eigenschaften der Zellen beteiligt ist und die zweite Schleife zur *gate*-Funktion der *tight junctions* beiträgt.

Hirnkapillarendothelzellen zeigen einen polaren Aufbau ihrer Zellmembran, d. h. ihre apikalen und basolateralen Membranen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Membranproteinen und Lipiden.

Die Funktion der *tight junctions* als Barriere gegen freie Diffusion der Membrankomponenten innerhalb der Membran wurde bereits in den 80er Jahren vorgeschlagen (Dragsten, et al.,

1981) und gilt noch immer als Arbeitshypothese. Diese Eigenschaft *der tight junctions* wird dabei auch als *fence-Funktion* (engl. fence: Zaun) bezeichnet. Die heteropolymeren Stränge *der tight junctions* umschließen ringförmig den apikalen Membranbereich der Zelle. Durch Interaktion der Stränge benachbarter Zellen wird der wässrige, extrazelluläre Raum zwischen den Zellen an den sog. *kissing points* aufgehoben. Membranproteine mit extrazellulären Domänen können diese Einzäunung durch die *tight junction*-Stränge nicht überwinden und ihre Lokalisation bleibt somit auf z. B. die apikale Membran beschränkt. Experimentell bestätigt werden konnte die *fence-Funktion* der *tight junctions* bisher nur für die lipidöse Zusammensetzung der Membran. In Experimenten mit MDCK-Zellen (*Madin-Darby canine kidney*-Zellen) wurden verschiedene Occludinvarianten exprimiert, der apikalen Membran fluoreszenzmarkierte Sphingomyeline zugegeben und deren Verteilung verfolgt. In Zellen, die eine Occludinmutante ohne cytosolische Domänen exprimierten, war keine Einschränkung der intramembranösen Diffusion zu beobachten (Balda, et al., 1996). Somit ist eine Beteiligung des Occludins an der *fence-Funktion* der *tight junctions* bezogen auf die Lipide der Zellmembran anzunehmen.

In *knock-out*-Experimenten an Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass auch Occludindefiziente Zellen *tight junctions* ausbilden können. Diese Zellkontakte waren dabei immer noch in der Lage, die parazelluläre Diffusion eines Markermoleküls geringen Molekulargewichtes zu unterbinden (Saitou, et al., 1998). Dies führte zu der Identifizierung weiterer *tight junction*-assoziiierter Transmembranproteine.

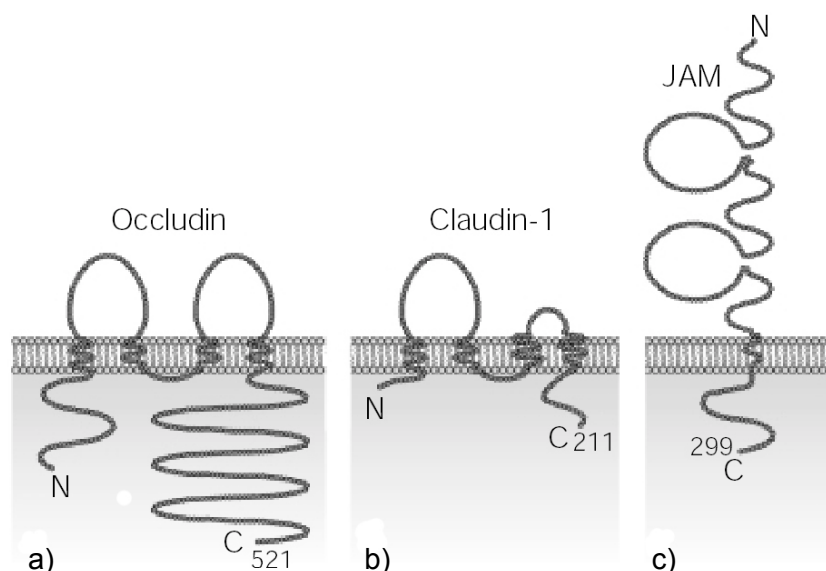


Abb. 3 Integrale Membranproteine der *tight junctions*, nach Tsukita et al. (2001)
 a) Occludin
 b) Claudin-1 als Vertreter der Claudinfamilie
 c) JAM (*junctional adhesion molecule*)

So konnte die Beteiligung der **Claudine** (lat. claudere: schließen) der Typen 1 und 2 an der Ausbildung der *tight junctions* in Epithelzellen gezeigt werden (Furuse, et al., 1998). Die Isoformen Claudin 3 bis 8 konnten in nachfolgenden Untersuchungen ebenfalls an *tight junctions* nachgewiesen werden (Morita, et al., 1999). Mittlerweile wurden in *Homo sapiens* und *Mus musculus* ca. 24 Vertreter dieser als Claudin-Familie zusammengefassten Proteingruppe gefunden bzw. aufgrund von Sequenzvergleichen postuliert. So sind derzeit in der *Swiss-Prot*-Datenbank die humanen Claudine der Typen 1 bis 20 annotiert.

Claudine sind eine Gruppe von Proteinen mit 20-25 kDa und stellen die Hauptkomponente der *tight junctions* dar. Vertreter der Proteinfamilie wurden z. B. in Endothel, Epithel und Oligodendrozyten nachgewiesen. Sie zeigen dabei aber im Gegensatz zu Occludin eine Gewebe-spezifische Expression (vgl. Tab. 1) (Tsukita, et al., 2001). Die Expression von Claudin-5 konnte in allen untersuchten Geweben bestätigt werden. Sie ist dabei allerdings ausschließlich auf Endothelzellen beschränkt und war in Epithelzellen nicht nachzuweisen. Die Expression von Claudin-1 in Endothelzellen der Hirnkapillaren wird zwar diskutiert, jedoch sind in diesem Zelltyp Claudin-5 und Claudin-12 als Hauptkomponenten der *tight junctions* anzusehen (Morita, et al., 1999; Nitta, et al., 2003).

Tab. 1 Gewebe-spezifische Expression von Claudinen, nach Tsukita et al. (2001)

| Claudin | Synonym | Herz | Gehirn | Lunge | Leber | Niere | Testis | andere Gewebe |
|---------|--------------|------|--------|-------|-------|-------|--------|------------------------------------|
| 1 | | + | + | + | + | + | + | |
| 2 | | - | - | - | + | + | - | |
| 3 | RVP1 | - | - | + | + | + | +/- | |
| 4 | CPE-R | - | - | + | - | + | - | |
| 5 | TMVCF | + | + | + | + | + | + | Gefäßendothel |
| 6 | | - | - | - | - | - | - | embryonales Gewebe |
| 7 | | - | - | + | - | - | +/- | |
| 8 | | - | - | - | +/- | + | +/- | |
| 11 | OSP | - | + | - | - | - | + | Oligodendrozyten Sertoli-Zellen |
| 14 | | - | - | - | + | + | ? | Haar-Zellen des Corti-Organ |
| 16 | Paracellin 1 | - | - | - | - | + | ? | Henle'sche Schleife |

+ : detektiert , +/- : schwach detektiert , - : nicht detektiert , ? : nicht untersucht

Die Mitglieder der Claudin-Familie weisen auf Proteinebene Sequenzhomologien von 30% auf. Es finden sich dabei keine Sequenzübereinstimmungen mit Occludin, die Claudine

ähneln diesem jedoch strukturell (Abb. 3). So verfügen sie ebenfalls über vier Transmembranbereiche und zwei extrazelluläre Schleifen. Die Größe der Schleifen ist dabei jedoch, mit ca. 54 Aminosäuren bei der ersten Schleife und 15-28 Aminosäuren bei der zweiten Schleife, unterschiedlich. Der cytoplasmatisch vorliegende *C-Terminus* weist eine Länge von 27 Resten auf. Alle Mitglieder der Claudin-Familie weisen *C-terminal* die Aminosäurekombination Tyrosin-Valin auf (Morita, et al., 1999). Diese Sequenz interagiert mit cytosolischen *tight junction*-Proteinen und ist so beteiligt an der Ausbildung des sog. submembranösen Plaques der *tight junctions*. Claudin-12 verfügt über keinen *C-terminalen* Valin-Rest und stellt somit die einzige bekannte Ausnahme dar (Tsukita, et al., 2001).

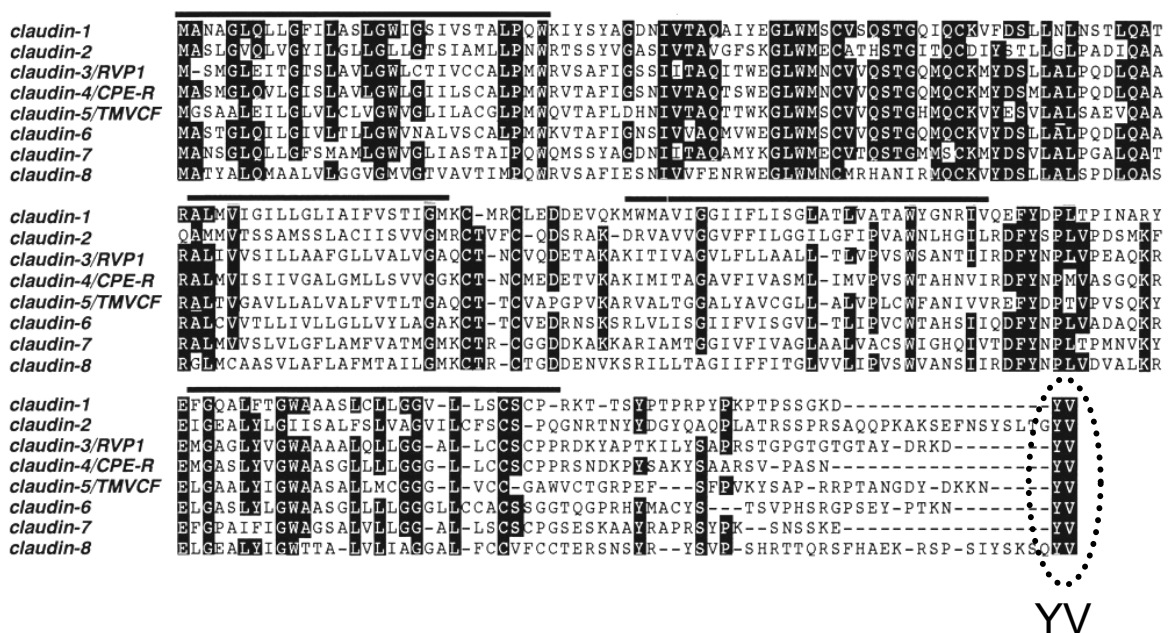


Abb. 4 Sequenzvergleich der Claudine 1-8 aus Maus, homologe Bereiche sind dunkel unterlegt, die Balken geben die möglichen Transmembranbereiche an, nach Morita et al. (1999)

Die unterschiedlichen Zellschichten, die *tight junctions* ausbilden, zeigen bezüglich ihrer parazellulären Selektivität große Unterschiede. Ein Faktor, der diese Selektivität beeinflusst, ist die Anzahl der *tight junction*-Stränge. Allerdings zeigen epitheliale MDCK-Zellen des Typs I, trotz gleicher Stranganzahl, ca. 40fach höhere transepitheliale Widerstände als MDCK-Zellen des Typs II (Stevenson, et al., 1988). Der Einfluss weiterer Faktoren, welche die Selektivität der Barriere modulieren ist somit anzunehmen.

Das Permeabilitätsverhalten der *tight junctions* ist auch von der Interaktion der beteiligten *tight junction*-Stränge abhängig. Es variiert mit den beteiligten Claudinen und deren Kombination (Huber, et al., 2001). Die parazelluläre Selektivität der Barriere wird durch die

verschiedenen Claudintypen vermittelt. Ein Beispiel hierfür ist die familiäre Hypomagnesiämie. Eine Ursache der Ausbildung dieser vererbten Störung der renalen Magnesiumrückresorption ist in der Mutation des Claudins-16 zu sehen. Dieser auch Paracellin-1 genannte Claudintyp wird in adulten Individuen ausschließlich in dem aufsteigendem Teil der Henle'schen Schleife exprimiert, dem Ort der Gradientengetriebenen Rückresorption von Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen. Bei den betroffenen Patienten unterbleibt diese Mg^{2+} -Aufnahme und die Ionen werden mit dem Urin ausgeschieden (Simon, et al., 1999). Die Aufnahmeraten von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen sind weniger betroffen, da diese auch an anderer Stelle in der Niere rückresorbiert werden. Dieser pathologische Phänotyp wird so interpretiert, dass Claudin-16 in den *tight junctions* des betreffenden, gesunden Nierenepithels Kationen-selektive Kanäle bildet. Die Aminosäuresequenz des Claudin-16 ist ein Indiz, das diese Hypothese unterstützt. Dieser Claudintyp verfügt in seinen extrazellulären Schleifen über die größte Anzahl azider Aminosäurereste aller Claudine. Der Einfluss dieser extrazellulären Schleifen auf die Passage von Ionen durch die *tight junctions* wird derzeit diskutiert. In-vitro konnte ein solcher Einfluss bereits bei Claudin-4 und Claudin-15 gezeigt werden. In MDCK-Zellen wurde ein in der extrazellulären Schleife modifiziertes Claudin-4 exprimiert. Dieses zeichnete sich durch den Austausch eines Lysin-Restes gegen einen Asparaginsäure-Rest an Position 65 aus. Die untersuchten MDCK-Zellen wiesen daraufhin gegenüber dem Wildtyp erhöhte Permeabilitäten für Na^+ -Ionen auf (Colegio, et al., 2002). In einem zweiten Experiment erfolgte die Expression eines variierten Claudin-15 in MDCK-Zellen. Bei diesem Ansatz wurden in der ersten extrazellulären Schleife des Claudin-15 drei azide Aminosäuren durch basische Aminosäurereste ersetzt. Die resultierenden Zellen zeigten gegenüber dem Wildtyp eine Verschiebung der selektiven Permeabilität von Na^+ - zu Cl^- -Ionen. Dies lieferte Indizien dafür, dass Claudine Ladungsabhängige Kanäle im parazellulären Raum bilden können.

Claudin-5 stellt neben Claudin-12 die Hauptkomponente der *tight junctions* in Hirnkapillarendothelzellen dar. Aufschluss über die Funktionen der beiden Claudintypen konnte über *knock-out*-Experimente erhalten werden. In Claudin-5-defizienten Mäusen wurde dabei kein Zusammenbruch der *tight junction*-Morphologie festgestellt. Die Hirnkapillarendothelzellen zeigten jedoch eine starke Änderung der parazellulären Selektivität (Nitta, et al., 2003). Aufgrund der beibehaltenen Claudin-12-Expression zeigten die Hirnkapillaren unveränderte Entwicklung und Morphologie. Veränderungen bezüglich der polarisierten Organisation der Zellmembran der Endothelzellen wurden nicht festgestellt. Die Barriere wirkte jedoch in der Art eines Molekularsiebes mit einer Ausschlussgröße von ca. 800 Da. So war die parazelluläre Permeabilität für kleine Moleküle, wie z. B. Biotinylierungsreagenzien (< 500 Da) erhöht, ohne die Diffusion von Plasmaproteinen in das

Parenchym zu zulassen. Die direkte Beteiligung des Claudin-5 an der Ausbildung der hohen parazellulären Selektivität der Hirnkapillarendothelzellen ist somit anzunehmen.

Das 40 kD Protein **JAM** (*junctional adhesion molecule*) ist ein weiteres *tight junction*-assoziiertes Transmembranprotein (Martin-Padura, et al., 1998). Dieses Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie verfügt über eine Transmembrandomäne und zwei extrazelluläre Ig-Schleifen (Abb. 3). Gegenwärtig sind drei Varianten des Proteins (Jam-1, 2 und 3) beschrieben (Aurrand-Lions, et al., 2001).

JAM ist durch homotypische Interaktion an dem adhäsiven Verhalten von Epithelien und Endothelien beteiligt. In Gefrierbruch-EM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass das Protein lateral mit dem Claudin-Rückgrat der *tight junction*-Stränge von Endothelzellen assoziiert ist. Die Expression von JAM in einer Fibroblasten-Linie, die zuvor keine *tight junctions* zeigt, führte nicht zur Bildung dieser Art des Zell-Zell-Kontaktes (Tsukita, et al., 2001). Die Beteiligung des Moleküls an der Extravasation von Monozyten wird derzeit diskutiert. So ist es möglich, mit anti-JAM-Antikörpern die Transmigration von Leukozyten *in vivo* und *in vitro* zu unterbinden (Martin-Padura, et al., 1998).

Ein *C-terminaler* Valin-Rest vermittelt die Bindung des cytosolischen vorliegenden *C-Terminus* mit der PDZ1-Domäne des ZO-1. JAM ist somit involviert in die Ausbildung des submembranösen Plaques der *tight junctions*.

Es sind mehrere Proteine beschrieben, die mit der cytosolischen Oberfläche der *tight junction*-Stränge interagieren. Das 220 kDa Protein ZO-1 (zonula occludens Protein 1) war das erste identifizierte *tight junction*-assoziierte cytosolische Protein (Stevenson, et al., 1986). Mittels Immunpräzipitation konnten die weiteren Proteine ZO-2 (160 kDa) und ZO-3 (130 kDa) identifiziert werden. Diese drei Proteine weisen Sequenzähnlichkeiten auf, so verfügen sie über drei PDZ-Domänen (PDZ-1, 2 und 3), eine SH3-Domäne und über eine *guanylate kinase like*-Domäne (GUK) (Abb. 5). Aufgrund der GUK-Domäne werden die ZO-Proteine auch als MAGUK-Proteinfamilie zusammengefasst (*membrane associated guanylate kinase homologues*) (Tsukita, et al., 2001). Die GUK-Domäne vermittelt jedoch keine Guanylat-Kinase-Aktivität.

Die verschiedenen Protein-Domänen der ZO-Proteine vermitteln die Bindung der *tight junction*-Stränge mit den Aktinfasern des Cytoskeletts der Zelle. Hierzu können alle ZO-Proteine über ihre PDZ-1-Domäne Claudine binden, ZO-1 und ZO-2 weisen dabei zusätzlich Bindestellen für Aktinfilamente auf (Itoh, et al., 1999). Diese Interaktion mit Claudinen erfolgt hierbei über deren *C-Terminus*, der mit einer Ausnahme (Claudin-12), immer mit Valin endet. Über die PDZ-2-Domänen sind zudem Wechselwirkungen des ZO-1 mit ZO-2 oder ZO-3 möglich. Über seine SH3-Domäne ist ZO-1 zudem in der Lage, mit dem Transkriptionsfaktor ZONAB zu interagieren.

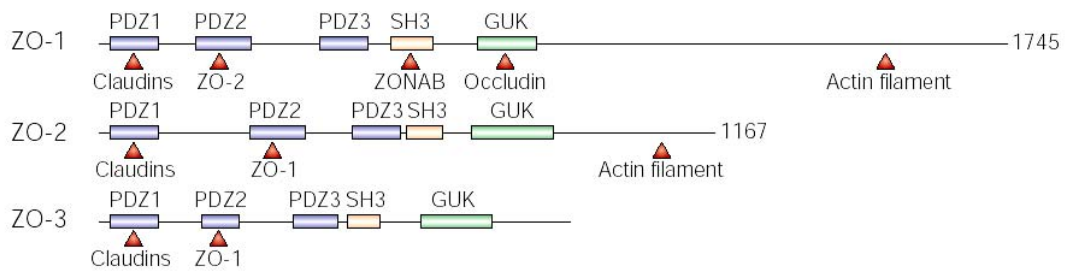


Abb. 5 Proteine der *tight junctions* mit PDZ-Domänen, Tsukita et al. (2001)

Dass die GUK-Domäne die Bindung der ZO-Proteine an Occludin vermittelt, konnte schon früh nach dessen Entdeckung gezeigt werden (Furuse, et al., 1994).

Die Interaktionen der Transmembranproteine der *tight junctions* mit dem Cytoskelett wird über die ZO-Proteine vermittelt und führt zur Bildung eines großen makromolekularen Komplexes an der cytosolischen Oberfläche der *tight junctions*. Dieser Komplex wird auch als submembranöser *tight junction*-Plaques bezeichnet. Mit diesem Komplex sind auch andere Proteine assoziiert, die keine PDZ-Domänen aufweisen, deren unterstützende oder regulierende Funktion jedoch diskutiert wird.

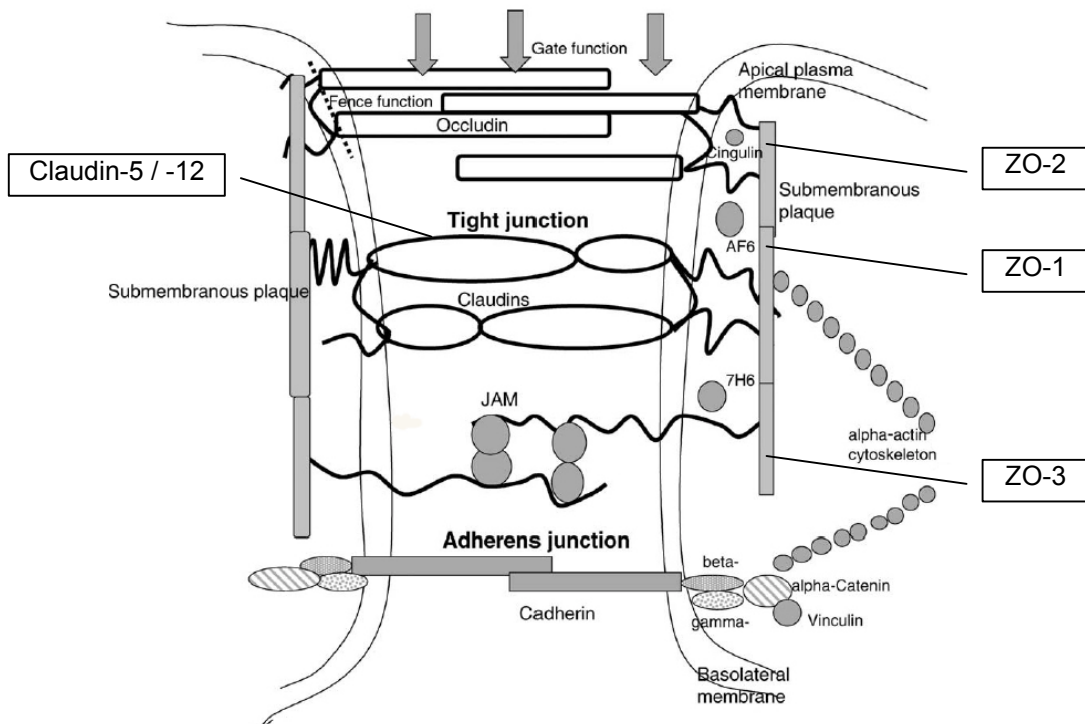


Abb. 6 Schema der *tight junctions* an Hirnkapillarendothelzellen, nach Petty und Lo (2002)

Cingulin ist ein Phosphoprotein von 140-160 kDa Größe, das ebenfalls am *tight junction*-Plaques lokalisiert ist. Der *N-Terminus* des Proteins ist in der Lage, ZO-Proteine, Myosin sowie AF6 zu binden. Der *C-Terminus* des Cingulins hingegen bindet an Myosin und ZO-3. Diese Bindeeigenschaften lassen eine Beteiligung des Cingulins an der Verknüpfung des *tight junction*-Plaques mit dem Cytoskelett vermuten (Cordenonsi, et al., 1999).

7H6 ist ein 155 kDa Phosphoprotein, das im submembranösen Plaques der *tight junctions* gefunden wurde. In Folge eines ATP-Mangels in der Zelle dissoziiert 7H6 reversibel vom Komplex, wobei gleichzeitig ein Anstieg der parazellulären Permeabilität zu beobachten ist (Mitic und Anderson, 1998). Da ZO-1 hingegen mit dem submembranösen Komplex assoziiert bleibt, wurden 7H6 regulierende Eigenschaften zugewiesen.

Eine schematische Zusammenfassung aller oben aufgeführten Proteine in einem Modell der *tight junctions* an Hirnkapillarendothelzellen ist in Abb. 6 dargestellt.

2.1.3.2 Regulation der *tight junctions*

Tight junctions sind keine passiven Strukturen, die ausschließlich den interzellulären Raum versiegeln. Sie sind vielmehr dynamische Zell-Zell-Kontakte mit aufwendiger Architektur, deren Veränderung in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielt. Es werden mehrere Mechanismen der Permeabilitätskontrolle an den *tight junctions* diskutiert. Neben der allgemeinen Änderung der Cytoskelettarchitektur gibt es viele Hinweise auf eine Regulation über posttranslationale Modifikationen der *tight junction*-Proteine oder deren Degradation (Gloor, et al., 2001).

Die *tight junction*-Stränge stehen über den submembranösen Plaques mit den Elementen des Cytoskelettes in Verbindung. Mehrere Studien zeigen, dass die Integrität der *tight junctions* direkt von der strukturellen Organisation des Aktins im Cytoskelett abhängig ist. Aktinzerstörende Substanzen, wie z. B. Cytochalasin D, führen zur Zerstörung der *tight junctions* und somit zum Verlust ihrer Barrierenfunktion (Stevenson und Begg, 1994).

Auf der Ebene der posttranslationalen Modifikationen spielt die Phosphorylierung der Transmembranproteine und der cytosolischen Proteine der *tight junctions* eine wichtige Rolle. Sowohl Occludin als auch ZO-1 werden an ihren Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert (Sakakibara, et al., 1997). Ferner wurde gezeigt, dass nach der Zerstörung der *tight junctions* ihr Wiederaufbau verstärkt mit der Phosphorylierung des Occludins an seinen Serin- und Tyrosin-Resten einhergeht (Tsukamoto und Nigam, 1999). In existierenden *tight junctions* hingegen führt die Gabe von Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren zur Degradation des Occludins und zu erhöhter Permeabilität (Wachtel, et al., 1999).

An *tight junctions* wurden zudem zwei atypische PKC-Isoformen und deren spezifisches Bindeprotein ASIP (*atypical PKC isotype-specific interacting protein*) gefunden. Diese Proteine sind in Epithelzellen an der Ausbildung der *tight junctions* und der Zellpolarität

beteiligt (Izumi, et al., 1998). ZO-1 alleine verfügt über 34 Konsensussequenzen für die Phosphorylierung des Proteins durch Phosphokinase C (PKC). Deshalb wurde für ZO-1 eine Beteiligung an der Kopplung von PKC-Signal-Kaskaden an die submembranösen Plaques der *tight junctions* postuliert (Huber, et al., 2001). Die Beteiligung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über PKC-Signalkaskaden an der Regulation der Permeabilität wird dabei ebenso diskutiert, wie die Rolle des cAMP-Spiegels der Zelle (Petty und Lo, 2002).

Bei einem Absenken der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann in Epithelzellen eine Permeabilitätszunahme beobachtet werden. Zudem beeinflusst die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die homotypische Interaktion der Cadherine der *adherens junctions*. Die Zellschicht-stabilisierenden Eigenschaften der *adherens junctions* werden als Voraussetzung für die Ausbildung der selektiven *tight junctions* angesehen.

2.2 Proteomanalyse

Der Begriff Proteom beschreibt das gesamte Proteinäquivalent eines Genoms unter genau definierten Bedingungen ("PROTEins expressed by a genOM"). Er umschreibt somit die Gesamtheit der Proteinexpression einer Zelle oder eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt. Das Genom ist eine statische Größe, die in jedem Entwicklungszustand eines Organismus oder einer Zelle unverändert vorliegt. Wie in einem Buch ist die Erbinformation durch Abfolge und Anzahl der Nukleotide streng definiert. Im Gegensatz zu diesem statischen Gebilde stellt das Proteom eines Organismus ein hochdynamisches Netzwerk von Proteinen dar. Dieses Proteinnetzwerk ist abhängig von der gewebe- bzw. zellspezifischen Genexpression. Zusätzlich haben viele Parameter, z. B. Stress, Stoffwechsellage, Einwirkungen von Pharmaka, Zell-Zell-Interaktionen oder Temperatur einen Einfluss auf die Proteinexpression (Abb. 7).

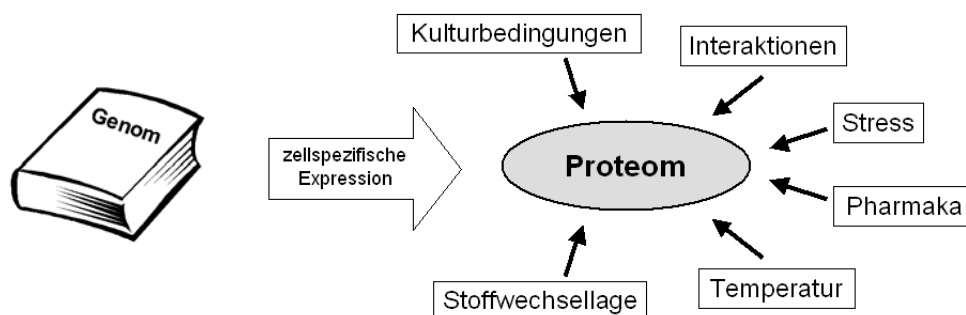


Abb. 7 Einflüsse auf das Proteom einer Zelle

Abhängig von den Stoffwechsel- und Umgebungsbedingungen kann das Gleichgewicht zwischen Proteinbiosynthese und Proteindegradation in der einzelnen Zelle stark variieren.

Die Analyse des Proteoms kann aufgrund dessen Variabilität nur Momentaufnahmen des Proteinmusters zu bestimmten Zeitpunkten liefern. Aussagen über biochemische Zusammenhänge oder Regulierungsmechanismen des Proteinnetzwerkes können nur über den Vergleich verschiedener Proteinmuster zu verschiedenen Zeiten abgeleitet werden.

Zwischen der Menge einer spezifischen mRNA und der Menge des dadurch kodierten Proteins in der Zelle besteht keine direkte und strikte Korrelation (Anderson und Seilhamer, 1997). Die mRNA kann somit kein repräsentatives Untersuchungsobjekt der Proteomanalyse darstellen, sondern allenfalls ergänzende Informationen liefern. Zudem können anhand der Nukleinsäuredaten keine direkten Aussagen über posttranslationale Ereignisse abgeleitet werden.

Schätzungen gehen derzeit davon aus, dass in einer Zelle jeweils ca. 10.000 Gene exprimiert werden. Aufgrund posttranslationaler Modifikationen (PTM) der Proteine dürfte die Anzahl der tatsächlich vorliegenden Proteinspezies pro Zelle um einiges größer sein. Es sind bisher über 200 verschiedene Arten der PTM bekannt (Aebersold und Goodlett, 2001). Neben zum Beispiel Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Acetylierung oder der Verknüpfung mit Membranankern, spielt auch das Prozessieren von Enzymen durch limitierte Proteolyse eine wichtige Rolle im Proteinhaushalt. Zudem können Proteine in Konzentrationsbereichen von 10^1 bis 10^6 Kopien pro Zellen vorliegen. Neben der aus den PTM resultierenden Komplexität des Proteoms stellt diese unterschiedliche Häufigkeit hohe Anforderungen an die eingesetzte Analytik.

2.2.1 Methoden der Proteomanalyse

Die gegenwärtigen Ansätze in der Proteomanalyse werden von drei Basistechnologien getragen, der Proteinchemie, der Massenspektrometrie und der Bioinformatik. Zunächst erfolgt die Trennung des komplexen Proteingemisches mittels Methoden der Proteinchemie. Dieser Trennung vor- oder nachgeschaltet ist in der Regel eine enzymatische Hydrolyse der Proteine. Anschließend wird mit Hilfe von Methoden der Massenspektrometrie (MS) eine für das jeweilige Protein bzw. Proteingemisch spezifische Liste von Peptidmassen, der sog. *peptide mass fingerprint* (PMF) erstellt. Zusätzlich können hier auch Informationen über die Sequenz der jeweiligen Peptide erhalten werden. Durch den Einsatz von Methoden der Bioinformatik können diese Massenlisten mit den Annotationen aus Protein- und DNA-Datenbanken verglichen werden. Die Proteine werden dabei anhand ihrer spezifischen PMF den in-silico erzeugten theoretischen Massen der Datenbank-Annotationen zugeordnet und somit identifiziert.

Die Entwicklung der Proteomanalytik ist getrieben durch die Entwicklungen der drei beteiligten Basistechnologien. Der Stand der Technik und die gegenwärtigen Entwicklungen auf dem Gebiet der Proteinchemie und ihrer Verknüpfung zur Massenspektrometrie soll im Folgenden dargestellt werden.

2.2.1.1 Trennmethoden

Die **2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (2D-PAGE) stellt die erste Technik dar, die eine Trennung von bis zu 10.000 Proteinen ermöglicht. Die Proteine werden hierbei zunächst mittels einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte (pI) getrennt. In der anschließenden SDS-PAGE, der sog. zweiten Dimension, werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes separiert. Diese hochauflösende Trenntechnik wurde bereits 1975 beschrieben (Klose, 1975; O'Farrel, 1975). Die Reproduzierbarkeit der Trennung wurde mit der Verwendung immobilisierter pH-Gradienten in der ersten Dimension entscheidend verbessert (Bjellqvist, et al., 1982). Die Einführung von „gespreizten“ pH-Gradienten, d. h. von immobilisierten pH-Gradienten mit einer pH-Einheit Unterschied auf einer Länge von 24 cm, verbesserte die Auflösung der 2D-Gele in jüngerer Zeit entscheidend (Wildgruber, et al., 2000).

Einschränkungen erfährt die Methode allerdings aufgrund ihrer Trennbereiche. Während der isoelektrischen Fokussierung kann bisher keine Trennung von Proteinen erfolgen, deren pI-Werte unter 2 und über 12 (Görg, et al., 2000) liegen. Die zweite Dimension der Trennung liefert hingegen keine Informationen über Proteine, die Molekulargewichte unterhalb von 5 kDa aufweisen. Zudem ist die Auflösung der SDS-PAGE oberhalb eines Molekulargewichtes von 200 kDa stark eingeschränkt. Zusätzliche Limitationen erfährt die Methode bezüglich ihrer Auflösung von Membranproteinen. In der ersten Dimension ist nur der Einsatz nicht-ionischer bzw. zwitterionischer Detergenzien möglich. Die Löslichkeit eines Proteins ist zudem bei Vorliegen eines pH-Wertes, der seinem pI-Wert entspricht, am niedrigsten. Zusammengenommen führen diese Probleme, hydrophobe Proteine zu solubilisieren, zu verminderter Trennleistung der 2D-PAGE speziell bei Membranproteinen (Rabilloud, 2003). In Studien, die einzelne Proteine betreffen, können die Bedingungen der Solubilisierung zum Teil optimiert werden. Bei der parallelen Erfassung des gesamten Proteoms ist dies jedoch nur beschränkt möglich.

Die mit 2D-PAGE erhaltenen Proteinmuster werden zur weiteren Auswertung unter Verwendung verschiedener Färbemethoden visualisiert. Die resultierenden komplexen Proteinmuster können dann Computer-unterstützt verglichen werden. Die Proteinsignale werden anschließend aus dem Gel geschnitten, enzymatisch hydrolysiert und der Analyse mittels Methoden der Massenspektrometrie zugeführt.

Die am häufigsten zum Einsatz kommenden Färbetechniken umfassen Färbung mit Coomassie Blau, Silberfärbung und den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen. Die Intensität der Färbungen ist dabei zum Teil jedoch von den chemischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins abhängig. Ein weiterer Nachteil sind die begrenzten dynamischen Bereiche der Färbungen. Dies ist eine Limitation der 2D-PAGE bezüglich der Auflösung sog. *low abundance* Proteine, d. h. von Proteinen geringer Kopienzahl. Zusätzlich können durch die Färbung Kontaminationen oder Artefakte in die Probe eingebracht werden, die die spätere MS-Analytik stören.

Differentielle Färbeansätze können den Vergleich verschiedener Proteinmuster deutlich erleichtern. Hierbei werden die zu vergleichenden Proben getrennt voneinander chemisch mit je einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend gemischt. Die vereinigten Proben werden in einem 2D-Gel getrennt, und die Fluoreszenzintensitäten bei zwei verschiedenen Excitationswellenlängen detektiert. Somit wird eine Diskriminierung der Proben während der 2D-PAGE, z. B. aufgrund unterschiedlicher Laufzeiten oder Fokussierungsdauer, ausgeschlossen. Diese DIGE (*difference gel electrophoresis*) genannte Methodik ermöglicht den direkten Vergleich der Proben anhand der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten. Ausschlaggebend ist hierbei, dass die eingesetzten Markierungsreagenzien identische Massen- und pI-Änderungen in die Proben einbringen. Zum Einsatz kommen hierbei aminoreaktive Succinimidyl-Ester von Fluoreszenzfarbstoffen (Tonge, et al., 2001). Mit den Derivaten der Fluorophore Cy2, Cy3 und Cy5 stehen drei Markierungsvarianten zur Verfügung. Somit ist der Vergleich dreier Proben in einem 2D-Gel möglich.

Eine alternative Fluoreszenzfärbung mit *Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain* (PQD) ermöglicht es, spezifisch phosphorylierte Proteine im Polyacrylamid-Gel zu detektieren (Steinberg, et al., 2003). Hierbei bindet der Farbstoff an phosphorylierte Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste. Es konnte gezeigt werden, dass mit dieser Färbung 1-2 ng des Pentaphosphoproteins β -Casein im SDS-Gel detektiert werden können. Die Färbeprozedur umfasst nur einen Schritt und beeinträchtigt nicht die anschließende MALDI-MS-Analyse der Proteine. Durch den ergänzenden Einsatz einer allgemeinen Protein-Fluoreszenzfärbung (z. B. Sypro-Ruby), ist es möglich, in einem Gel die Phosphoproteine und nicht phosphorylierten Proteine in ihrer Kombination zu detektieren.

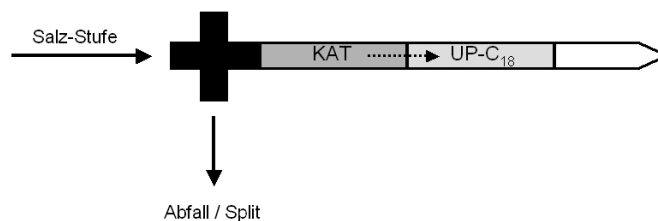
Ein Vorteil der 2D-PAGE ist ihre Kombinierbarkeit mit klassischen proteinchemischen Blotverfahren. So können die 2D-Gele auf Membranen geblottet werden, um sie z. B. einer immunchemischen Detektion zu unterziehen. Ferner können die Proteine *N-terminal* sequenziert werden. Auch ist auf der Membran die Detektion von Glykosylierungen der Proteine möglich.

Aufgrund der aufgeführten Limitationen der 2D-PAGE, wurden verstärkt Methoden zur Proteomanalytik entwickelt, die 2D-Gele vermeiden oder sogar auf Gelelektrophorese vollständig verzichten. Diese Ansätze nutzen leistungsfähige chromatographische Methoden zur Separation der komplexen Proben auf Peptidebene. Zur Verwendung kommen hierbei meist ESI-Massenspektrometer, da diese direkt mit chromatographischen Systemen gekoppelt werden können. In dieser **nLC-ESI-MS/MS** (*nano liquid chromatographie-ESI-MS/MS*) genannten Technik werden Nano-Säulen zur Umkehrphasen-Chromatographie eingesetzt, die Durchmesser von 50-100 µm bei Flussraten von 100-200 nl/min aufweisen. Die Proben werden enzymatisch hydrolysiert, auf eine Vorsäule geladen und dann mit einem Acetonitrilgradienten auf der Trennsäule getrennt. Die Elution der Peptide erfolgt direkt in das ESI-Massenspektrometer, wo die Peptidmassen bestimmt werden, und ggf. durch MS/MS-Messungen die Sequenz der Peptide ermittelt wird. Um die Komplexität der Ausgangsprobe zu reduzieren, kann die Probe zuvor einer SDS-PAGE unterzogen werden. Diese Gele sind weitaus geeigneter, basische und hydrophobe Proteine zu trennen als 2D-Gele. Das Gel wird anschließend in Stücke geschnitten, die mehrere Proteine enthalten. Nach der enzymatischen Hydrolyse werden die Peptidgemische der einzelnen Gelbanden mittels nLC-ESI-MS/MS analysiert. Diese Methoden-Kombination eignet sich besonders zur Analyse von Membranproteinen. Mit ihr konnten z. B. 392 Proteine einer Probe angereicherter Chloroplasten-Membranen aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (Froehlich, et al., 2003).

Ein Ansatz, der komplett auf Gelelektrophorese verzichtet, ist die Kombination von multidimensionaler Chromatographie mit ESI-MS/MS. Diese auch **MudPIT** (*multi dimensional protein identification technology*) genannte Technik kombiniert die Separation komplexer Peptidgemische mittels Kationenaustausch- und Umkehrphasen-Chromatographie. Die Peptide werden hierbei zunächst auf einen starken Kationenaustauscher geladen, dann erfolgt iterativ die schubweise Elution der Peptide durch Salz-Stufen unterschiedlicher Konzentrationen auf das Umkehrphasen-Material. Jeweils anschließend an eine Elutionsstufe erfolgt die Trennung der Peptide auf der Trennsäule mit einem Gradienten von Acetonitril. Die Elution der Peptide erfolgt wie bei der klassischen nLC-ESI-MS/MS direkt in das Massenspektrometer. In den ersten Arbeiten mit dieser Technik wurden biphasische Säulen eingesetzt, die sowohl das Kationenaustausch- als auch das Umkehrphasen-Material enthielten (Abb. 8). Hierbei war es möglich, in einem Lauf über 100 Proteine des ribosomalen Komplexes von *Saccharomyces cerevisiae* zu identifizieren (Link, et al., 1999). Das Beladen des Kationenaustauschers (KAT) und die Elution mittels der Salz-Stufe hatte hierbei allerdings *off-line* zu erfolgen, d. h. ohne direkte Kopplung an das Massenspektrometer. In einer automatisierten Anwendung dieser Technik auf Gesamtproteinproben aus *Saccharomyces cerevisiae*, erfolgte nach dem Beladen des

Kationenaustauschers die gesamte Messung *on-line*. Hierbei wurde der Ansatz in einen löslichen Teil und zwei unlösliche Teile aliquotiert. Die löslichen Proteine wurden einer Hydrolyse mit Trypsin unterzogen. Die nicht-löslichen Komponenten wurden einer Hydrolyse mit Bromcyan zugeführt. Bromcyan spaltet Proteine *C-terminal* von Methionin-Resten, die sich häufig in hydrophoben Bereichen von Proteinen befinden. Alle drei Fraktionen wurden je in einem MudPIT-Lauf analysiert. Hierbei wurden jeweils 13 Stufenelutionen mit steigenden Konzentrationen an Ammoniumacetat durchgeführt. In diesem Ansatz konnten insgesamt 1.484 verschiedene Proteine identifiziert werden.

a)



b)

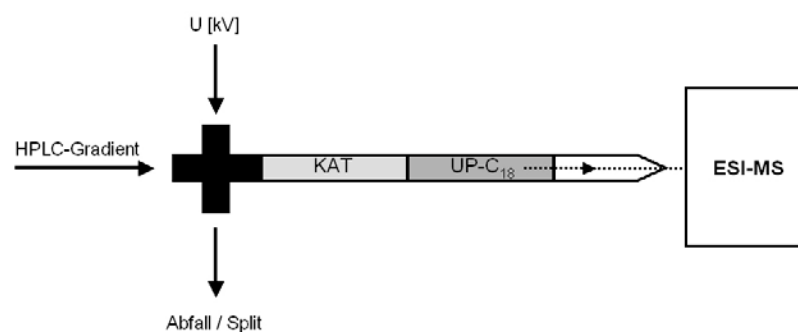
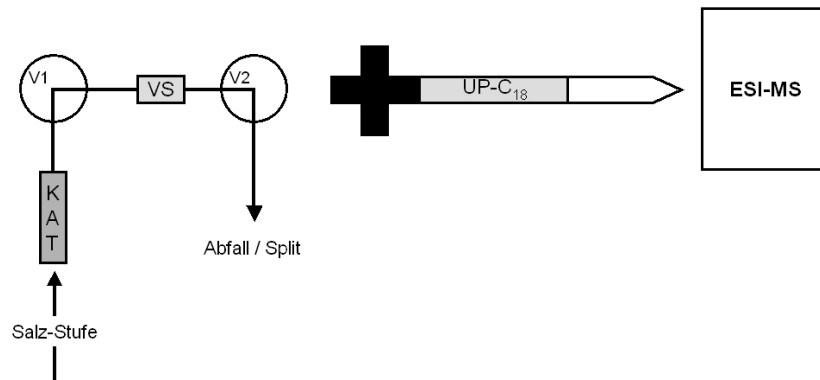


Abb. 8 Biphasische Säule im MudPIT-Ansatz nach Link et al. (1999), Probe dunkel unterlegt,
 a) Elution der Probe mit einer Salz-Stufe vom Kationenaustauscher auf die Trennsäule
 b) Trennung der Probe auf Trennsäule (UP-C₁₈) mit anschließender ESI-MS/MS-Analyse

Es handelte sich u. a. um 131 Membranproteine mit drei oder mehr vorhergesagten Transmembrandomänen. Zudem wiesen 43% der Proteine einen theoretischen $pI > 11$ auf (Washburn, et al., 2001). Somit konnten speziell Proteine identifiziert werden, deren Trennung mittels 2D-PAGE stark limitiert ist. Der MudPIT-Ansatz kann auch ohne biphasische Säulen, unter Verwendung zweier getrennter Säulen, durchgeführt werden (Abb. 9). Die einzelnen Chromatographie-Schritte werden dabei mit Hilfe mehrerer Ventilblöcke gesteuert. Hierbei werden die Peptide zunächst auf einen starken Kationenaustauscher geladen, dann erfolgt die schubweise Elution der Peptide durch Salz-

Stufen unterschiedlicher Konzentrationen auf das Umkehrphasen-Material einer Vorsäule. Jeweils anschließend an eine Stufenelution erfolgt die Trennung der Peptide auf der Trennsäule mit direkter Elution in das ESI-Massenspektrometer. Mit diesem Aufbau ist es möglich konventionelle Ionenaustausch-Nano-Säulen einzusetzen. Zudem ist der Wechsel von der MudPIT-Schaltung zu einer eindimensionalen nLC-ESI-MS/MS-Schaltung ohne Umbau möglich.

a)



b)

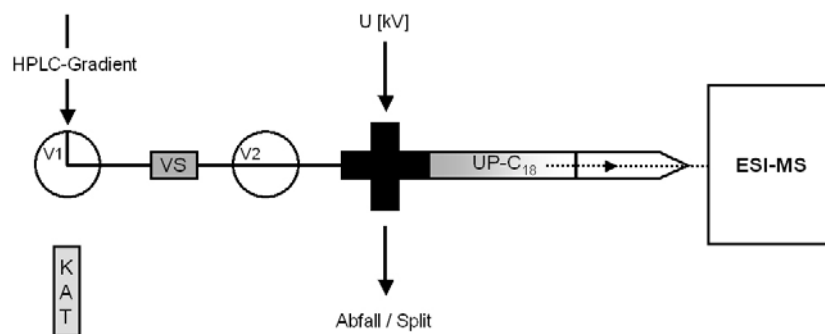


Abb. 9 MudPIT-Ansatz mit getrennten Säulen, Probe dunkel unterlegt; V1 und V2: Ventilblöcke,
 a) Elution der Probe mit Salz-Stufe vom Kationenaustauscher auf die Vorsäule (VS)
 b) Trennung der Probe auf Trennsäule (UP-C₁₈) mit anschließender ESI-MS/MS-Analyse

Trotz des hohen Auflösungsvermögens weist auch der MudPIT-Ansatz Limitationen auf. Die Analyse einer Probe liefert nur Momentaufnahmen des Proteinmusters zu einem bestimmten Zeitpunkt. Aussagen über biochemische Zusammenhänge oder Regulierungsmechanismen innerhalb des Proteinhaushaltes können jedoch nur über den Vergleich verschiedener Proteinmuster abgeleitet werden. Ein solcher differentieller Ansatz ist mit reinen MudPIT-Daten nur aufwendig auswertbar. So können aus den Identifizierungen virtuelle Karten auf Protein- oder Peptidebene angefertigt und verglichen werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine hohe Reproduzierbarkeit der Trennung. Dies stellt wie bei der 2D-PAGE ein

Problem dar. Alternativ können Markierungsstrategien verfolgt werden, welche die MudPIT-Methodik ergänzen.

2.2.1.2 Markierungsmethoden

Speziell die Markierung der Proben durch das Einbringen nicht-radioaktiver, stabiler Isotope spielt in Kombination mit der Massenspektrometrie eine wichtige Rolle. Da sich diese Isotope chemisch annähernd identisch verhalten, ist anhand der Spektren eine relative Quantifizierung der Signale möglich.

Eine einfache Variante einer solchen Markierung ist die Durchführung der enzymatischen Hydrolyse der Proben in H_2^{18}O (Schnölzer, et al., 1996). Hierbei werden ^{18}O -Atome in die freiwerdenden *C-Termini* der Peptide inkorporiert. Die resultierenden Peptide einer derartigen Probe weisen eine Massenzuwachs von 2 Da gegenüber den korrespondierenden Peptiden einer konventionell hydrolysierten Probe auf. Die beiden Proben werden vereinigt und einer MS-Analyse unterzogen. Im Massenspektrum erscheinen korrespondierende Peptide als Signalkaare mit einer Massendifferenz von 2 Da. Diese geringe Massendifferenz kann allerdings dazu führen, dass sich Signalmuster aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung von ^{13}C überschneiden.

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist der Zeitpunkt der Markierung im analytischen Prozess. Im Ablauf aus Proteinextraktion, ggf. Proteinseparierung, Hydrolyse und MS-Analyse erfolgt die Markierung erst spät. Die Diskriminierung der beiden Proben speziell auf der Ebene der Probenvorbereitung, d. h. bei Zellaufschluss und Proteinextraktion, ist möglich und verfälscht die quantitative Auswertung.

Die **metabolische Markierung** stellt hingegen den frühest möglichen Zeitpunkt des Einbringens einer Markierung in die Probe dar. Schon dem lebenden Organismus werden Isotopen-markierte Metabolite angeboten, die dieser in der Proteinbiosynthese einsetzt. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass differentiell markierte Zellen schon vor der Probenvorbereitung vereinigt werden können. Somit wird jede Diskriminierung der Proben, z. B. während der Proteinsolubilisierung, ausgeschlossen. Für diese Methode beschrieben ist die Verwendung der stabilen Isotope ^{13}C , ^{15}N oder ^2H (D) (Romijn, et al., 2003). Auf den Einsatz radioaktiv-markierter Substanzen soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden, da sich dieser auf die Kombination mit Gel-gestützten Verfahren beschränkt. Er kann daher eher als eine sensitive Alternative zur Färbung der Gele angesehen werden.

Speziell der Einsatz deuterierter Aminosäuren in der Zellkultur stellt einen einfachen Ansatz der metabolischen Markierung dar. Zelllinien werden in Standard-Medien kultiviert, denen eine essentielle Aminosäure fehlt. Diese wird in Form eines stabilen Isotopes dem Medium zugesetzt. Durch die Verwendung deuterierten Leucins (Leu-D3) wurde z. B. die Differenzierung muriner Myoblasten in Zellkultur untersucht (Ong, et al., 2002). Der

einheitliche Massenzuwachs pro eingebauter deuterierter Aminosäure ermöglicht die relative Quantifizierung der Signale. Zusätzlich liefert er Informationen über die Zusammensetzung der Peptide und trägt so zur verlässlichen Identifizierung der Proteine bei.

Die Limitation der metabolischen Markierung ist ihre Beschränkung auf Organismen, die unter definierten, kontrollierbaren Bedingungen kultiviert werden. So ist der Einsatz für Hefen, Bakterien, adhärente Zelllinien oder auf den Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Romijn, et al., 2003). Größere Organismen, Gewebe oder gar klinische Proben sind dieser Methode nicht zugänglich. Ein Charakteristikum der aufgeführten Methoden liegt darin, dass sie die Komplexität der Probe eher erhöhen als erniedrigen.

Eine Verringerung der Proben-Komplexität hingegen kann durch die **ICAT** genannte Variante der differentiellen Markierung zweier Proben erreicht werden. ICAT steht für *isotope coded affinity tag* und ermöglicht die selektive, differentielle Detektion Cystein-haltiger Peptide. Da Cystein in Proteinen eine durchschnittliche Häufigkeit von 2-3% aufweist, bewirkt die Selektivität der Markierung eine Verringerung der Komplexität der Probe um mindestens eine Größenordnung.

Das ICAT-Reagenz besteht aus drei funktionellen Komponenten (Gygi, et al., 1999). Es verfügt über eine thiolreaktive Gruppe, die selektiv die kovalente Bindung des Moleküls an Sulfhydrylgruppen reduzierter Cystein-Reste vermittelt. Eine Biotin-Gruppe stellt ein weiteres funktionelles Element dar. Dank der starken Interaktion des Biotins mit Streptavidin oder Avidin ermöglicht diese Komponente die Anreicherung ICAT-markierter Peptide mittels Affinitätschromatographie. Dieser sog. Affinitätsanker ist über eine Polyethylenglycol-Gruppe mit der thiolreaktiven Gruppe verbunden. Diese als *linker* bezeichnete Verbindungsgruppe wird in zwei verschiedenen Varianten eingesetzt (Abb. 10). Die leichte Variante des ICAT weist dabei keine Deuterierung auf. In der schweren Variante des ICAT hingegen sind im *linker* an acht Positionen Wasserstoffatome durch Deuteriumatome ersetzt. Die Varianten des ICAT zeigen also einen Massenunterschied von acht Dalton. Korrespondierende Peptid-Paare eines differentiellen Ansatzes können aufgrund dieser stabilen Differenz auf der Ebene von MS-Spektren erkannt werden.

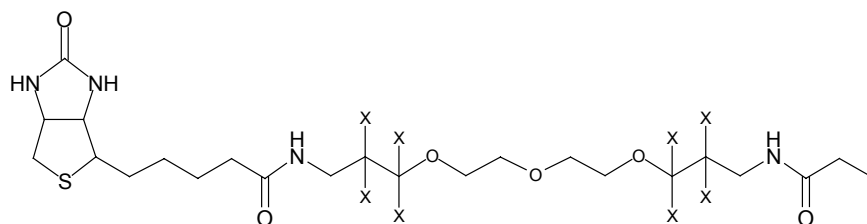


Abb. 10 ICAT-Reagenz, X = H : leichte Variante, X = D : schwere Variante, nach Gygi et al. (1999)

Der Ablauf eines ICAT-Experimentes umfasst mehrere Schritte (Abb. 11). Die Probenvorbereitung der zu vergleichenden Proben erfolgt zunächst getrennt. Nach dem Zellaufschluss und der Extraktion der Proteine, werden die Proben jeweils unter denaturierenden Bedingungen reduziert. Die somit zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen der Cysteine werden nun mit einer ICAT-Variante pro Probe markiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Dithiothreitol gestoppt, das mit überschüssigem Markierungsreagenz reagiert und dieses bindet. Nun werden die zu vergleichenden Proben vereinigt. Vor der weiteren Analytik werden eventuell störende Chemikalien oder Nebenprodukte aus dem Ansatz entfernt. Hierbei kommen chromatographische Methoden zum Einsatz.

Die vereinigte Probe wird nun einer enzymatischen Hydrolyse mit Trypsin unterzogen. Aus dem resultierenden Peptidgemisch werden dann mittels Affinitätschromatographie an monomerem Avidin die markierten Peptide angereichert. Das Peptidgemisch wird nun mittels nLC-ESI-MS/MS oder MudPIT massenspektrometrisch analysiert. Proteine, die in beiden Proben gleich stark vertreten sind, ergeben nach der Hydrolyse Peptide mit identischer Häufigkeit. Enthalten diese Peptide Cystein-Reste, werden sie angereichert und ergeben auf der Ebene der Spektren Peptid-Paare gleicher Intensität. Diese Peptid-Paare sind anhand ihrer Massendifferenz von acht Dalton zu erkennen (Abb. 11, unten rechts). Proteine, die in den Proben unterschiedlich häufig sind, ergeben im MS-Spektrum hingegen Peptidpaare unterschiedlicher Intensitäten (Abb. 11, unten links). In der ersten Arbeit mit dieser Technik wurde die Proteinexpression von *Saccharomyces cerevisiae* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen verglichen (Gygi, et al., 1999). Bei späteren Arbeiten erfolgte die Kombination der ICAT-Technik mit MudPIT-Ansätzen. So wurden z. B. die Mikrosomenfraktionen unterschiedlich differenzierter HL-60-Zellen verglichen (Han, et al., 2001). Hierbei konnten alle 491 identifizierten Proteine einer relativen Quantifizierung unterzogen werden.

Alternativ wird der ICAT-Ansatz auch mit 2D-PAGE kombiniert. Hierbei werden die vereinigten markierten Proben einer Proteinfällung unterzogen, um störende Chemikalien oder Nebenprodukte aus dem Ansatz zu entfernen. Anschließend werden die Proteine resuspendiert und im Gel getrennt. Visualisierte Proteinsignale werden aus dem Gel geschnitten, hydrolysiert und mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden analysiert. Auf eine Anreicherung der markierten Peptide wird hierbei aufgrund der geringeren Komplexität des Peptidgemisches meist verzichtet. Die erhaltenen Spektren weisen dann neben den differentiell markierten Peptid-Paaren auch singuläre Signale auf, die von Peptiden ohne Cystein-Rest stammen.

Eine Limitation des ICAT-Ansatzes ist dessen geringer dynamischer Bereich. Die Signalverhältnisse der korrespondierenden Peptid-Paare sind nur in Verhältnissen von eins zu zehn bis eins zu 20 detektierbar. Bei größeren Unterschieden erscheint das dominante

Peptid als singuläres Signal. Im Vergleich dazu weisen Fluoreszenz-Färbungen von z. B. 2D-Gelen dynamische Bereiche von bis zu vier Größenordnungen auf. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist der späte Zeitpunkt der Markierung im analytischen Prozess. Die Diskriminierung der beiden Proben beim Zellaufschluss, bei der Proteinextraktion, Reduktion oder Markierung ist möglich und kann die quantitative Auswertung verfälschen.

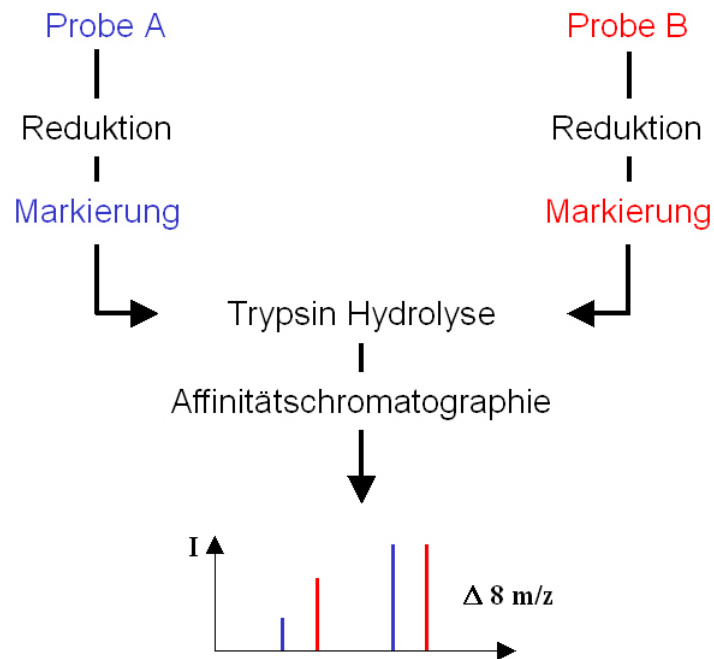


Abb. 11 Schematischer Ablauf der ICAT-Methode, Markierung mit leichter ICAT-Variante ist in blau, Markierung mit schwerer ICAT-Variante ist in rot dargestellt

Die Möglichkeit über Affinitätsanker gezielt spezifische Peptide anzureichern ist als Stärke der ICAT-Technik zu werten. Ähnliche Strategien sind für die Untersuchung von phosphorylierten Proteinen beschrieben. Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten in Proteinen stellt eine wichtige posttranslationale Modifikation dar. Mittels dieser werden innerhalb der Zelle enzymatische Aktivitäten reguliert oder Signale in komplexen Kaskaden weitergeleitet. Das Erfassen von Phosphoproteinen oder -peptiden mit den Methoden der Proteomforschung stellt sich allerdings als schwierig dar. Die relative Häufigkeit von Phosphopeptiden ist, bezogen auf nicht-phosphorylierte Peptide, gering. Zudem kann die negativ geladene Phosphatgruppe die konventionelle MS-Analyse im Positiv-Modus beeinträchtigen oder schon während der Ionisierung vom Peptid dissoziieren (Morrison, et al., 2002). Einen der ICAT-Methodik ähnlichen Ansatz zur Analyse von Phosphopeptiden stellt die **PhiAT**-Methode (*phosphoprotein isotope-coded affinity tag*) dar. Diese erlaubt nach dem spezifischen Einbringen einer Isotopen-kodierten Markierung die

Anreicherung der Phosphopeptide (Goshe, et al., 2001). Die Markierung ist ein dreistufiger Prozess und basiert auf der spezifischen Modifizierung von Phosphoserin- oder Phosphothreonin-Resten. Die Phosphatgruppen werden dabei durch ein Biotinderivat ersetzt. Der Reaktionsablauf ist in Abb. 12 am Beispiel der Biotinylierung eines Phosphoserin-Restes dargestellt. Zunächst erfolgt unter basischen Bedingungen eine β -Eliminierung der Phosphatgruppe. Es folgt eine Addition von 1,2-Ethandithiol (EDT) an das entstandene Alken. Die ursprünglich phosphorylierte Position trägt somit nun eine freie Sulfhydrylgruppe. Diese kann mit einem thiolreaktiven Biotinderivat (PEO-Iodacetyl-biotin) markiert werden, das dem ICAT-Reagenz ähnelt. Eine Isotopen-kodierte Markierung kann durch Verwendung der deuterierten Variante des EDT (D4-EDT) eingeführt werden.

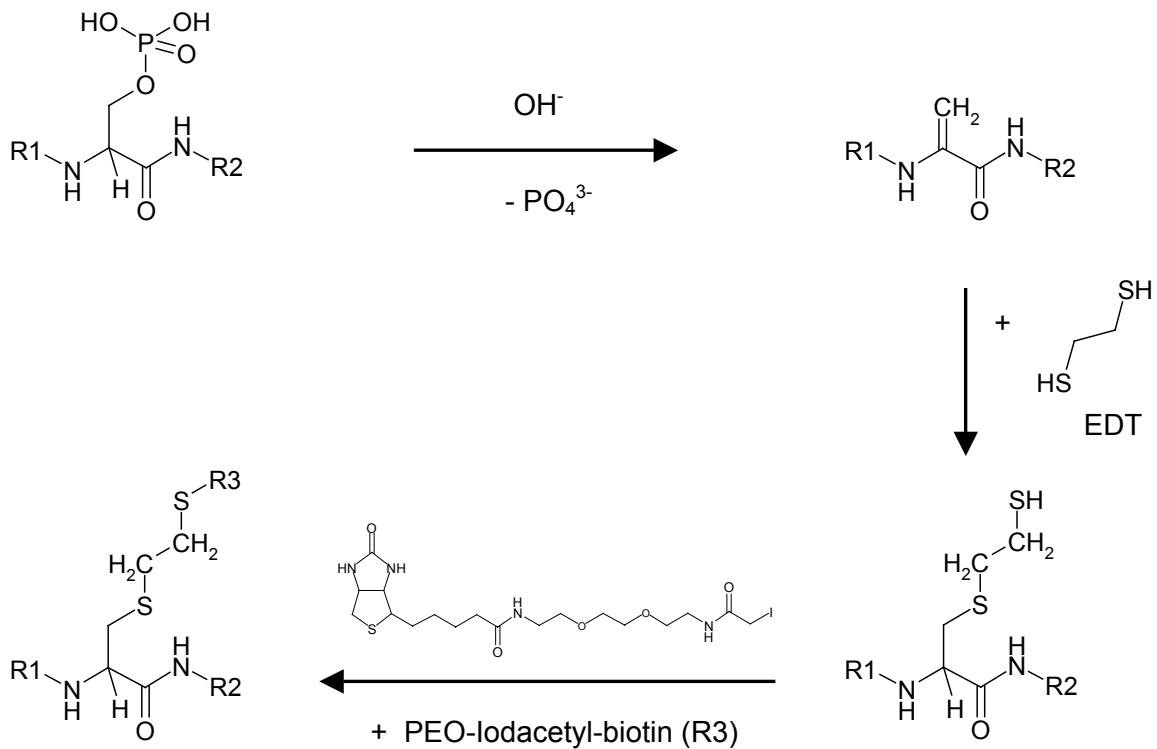


Abb. 12 PhIAT-Ansatz zur spezifischen Biotinylierung von phosphorylierten Serin- oder Threonin-Resten, am Beispiel eines Phosphoserin-Restes

Zwei zu vergleichende Proben werden differentiell markiert, vereinigt und enzymatisch hydrolysiert. Die spezifisch markierten Peptide werden über Affinitätschromatographie an monomerem Avidin angereichert und mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Isotopen-Verhältnisse erlauben Rückschlüsse auf die relative Quantität der phosphorylierten Peptide in den beiden Proben. Die Kombination der PhIAT-Methode mit nLC-ESI-MS/MS ermöglicht

über eine gezielte Anreicherung die Identifizierung auch von Phosphopeptiden, die in geringen Konzentrationen in der Probe auftreten (Goshe und Smith, 2003).

Cystein- und Methionin-Reste können während der Markierung zu unerwünschten Nebenreaktionen führen. Eine Behandlung der Probe mit Perameisensäure führt zur Oxidation dieser Gruppen und inaktiviert diese dadurch. Eine entscheidende Limitation dieser differentiellen Anreicherung von Phosphopeptiden ist, dass sie Phosphotyrosylgruppen nicht erfasst.

Bei den in der Proteomforschung angewandten Markierungsstrategien spielen stabile Isotope eine wichtige Rolle. Die relative Quantifizierung von Peptiden basiert dabei auf der Derivatisierung der Proteine mit Markierungsreagenzien, die sich in ihrem Isotopengehalt unterscheiden. Speziell deuterierte Substanzen kommen aus Kostengründen sehr häufig zum Einsatz. Sie zeigen weitestgehend identisches physikalisches und chemisches Verhalten im Vergleich zu ihren nicht-deuterten Varianten. In chromatographischen Trennungen allerdings ist der sog. **Isotopen Effekt** zu beobachten (Zhang, et al., 2002). Dieser beschreibt das Phänomen, dass ein differentiell markiertes Peptidpaar während der Umkehrphasen-Chromatographie kein einheitliches Retentionsverhalten zeigt. Die Elution der Peptide erfolgt aufgelöst oder zumindest verzögert. Der Isotopen Effekt erschwert somit die differentielle Analytik, sofern sich diese auf chromatographische Methoden stützt. Diese Beeinträchtigung tritt hauptsächlich bei deuterierten Peptiden auf und wurde bei ^{13}C -markierten Peptiden noch nicht beobachtet (Romijn, et al., 2003). Um dieses Problem bei der Kombination der ICAT-Technik mit MudPIT oder nLS-ESI-MS/MS zu umgehen, wurde ein alternatives Markierungsreagenz (cICAT) entwickelt. Dieses ist nicht deuteriert, seine schwere Variante weist aber neun ^{13}C -Atome auf. Die beiden Varianten zeigen somit eine Massendifferenz von neun Dalton. Zusätzlich verfügt das Reagenz über eine säurelabile Spaltstelle, weshalb es als *cleavable ICAT* (cICAT) bezeichnet wird.

2.2.1.3 Fraktionierungsmethoden

Das Proteom einer Zelle oder eines Gewebes repräsentiert ein komplexes Proteinnetzwerk, dessen Analyse hohe Anforderungen an die eingesetzte Methodik stellt. Die oben beschriebenen elektrophoretischen oder chromatographischen Methoden werden eingesetzt, um Proteingemische von einigen tausend bis zehntausend Proteinspezies zu trennen, die zudem in ihrer Häufigkeit um mehrere Größenordnungen variieren. Um diese enorme Komplexität zu verringern, kommen verschiedene Fraktionierungsmethoden zum Einsatz. Es werden dabei sog. Subproteome erstellt, die jeweils einen Ausschnitt des Gesamtproteoms abbilden. Ein einfacher, oben schon erwähnter, Ansatz besteht in der Verwendung von engen pH-Gradienten in der 2D-PAGE. Eine Vorfraktionierung der Probe kann zusätzlich durch eine vorgeschaltete isoelektrische Fokussierung (IEF) erreicht werden. Der Einsatz

von Sephadex-Material als granuläre Matrix in einer Flachbett-IEF ermöglicht dabei die verlustfreie Trennung einer komplexen Probe nach pI-Werten. Die einzelnen Fraktionen dieser Trennung können dann direkt in der ersten Dimension der 2D-PAGE eingesetzt werden (Görg, et al., 2002). Mit dieser Art der Vorfraktionierung nach pI-Werten erhält man keine zusätzlichen Informationen über die Zielproteine, sie dient hauptsächlich der Verbesserung der Trennung.

Die Fraktionierung der zu trennenden Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation hingegen ermöglicht die Darstellung sog. Subproteome. Die Aufteilung des Proteoms einer Zelle in die Proteinnetzwerke seiner einzelnen zellulären Komponenten verringert die Komplexität der zu analysierenden Proteinmuster. Dabei erhält man zusätzliche Informationen, da die untersuchten Proteine in einem funktionellen Kontext verbunden sind.

Im einfachsten Fall wird das Aufteilen des Gesamtproteoms durch einen **fraktionierenden Aufschluss** der Zellen bzw. des Gewebes angestrebt. Die Zellen werden dabei in mehreren Schritten mit verschiedenen Detergenzien behandelt und die Proteine fraktioniert solubilisiert. Dieser Ansatz zeigt aber meist eine breite Verteilung speziell der häufigen cytosolischen Proteine auf alle Fraktionen.

Die **subzelluläre Fraktionierung** ermöglicht die getrennte Analyse des Proteoms einzelner Organellen (Huber, et al., 2003). Hierbei werden Organellen auf der Basis ihrer physikalischen Eigenschaften isoliert. Jede Organellen-Population weist spezifische Charakteristika bezüglich Größe, Dichte oder Ladung auf. Zur Fraktionierung der Organellen werden häufig Zentrifugationstechniken angewandt. Diese ermöglichen eine schnelle Fraktionierung von Zellhomogenaten. Durch z. B. eine Zentrifugation bei 3000x g und eine nachfolgende Ultrazentrifugation (100.000x g) des Überstandes, kann die Fraktionierung eines Zellhomogenates in Nuclei, Membransediment und lösliche Fraktion erreicht werden. Der alternative Einsatz von Dichtegradienten-Zentrifugation ist beschrieben für die Trennung des Homogenates in:

- 1) Nuclei, schwere Mitochondrien, cytoskelettale Komponenten und Plasmamembran,
- 2) leichte Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen,
- 3) Golgi-Vesikel, Endosomen, Mikrosomen und Endoplasmatisches Retikulum,
- 4) Cytosol.

Trotz der starken Anreicherung der jeweiligen Organellen, sind gegenseitige Kontaminationen der Fraktionen zu beobachten. Speziell Proteine des Endoplasmatischen Retikulums sind in allen Fraktionen zu finden (Huber, et al., 2003).

Die Kompartimentierung, d. h. die räumliche Trennung von Reaktionsräumen in der Zelle, ist Voraussetzung vieler physiologischer Prozesse. Auf Zellebene teilen Membranen die Zelle in verschiedene Kompartimente auf. Die Proteinausstattung dieser intrazellulären Barrieren ist

für viele physiologische Prozesse entscheidend und somit von großem Interesse. Die Proteine der mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen Membranfraktionen können durch Extraktionsverfahren isoliert werden. Hierbei ist zum Teil eine Trennung in integrale und periphere Membranproteine möglich.

Die Isolierung integraler Membranproteine mittels Natriumcarbonat-Extraktion (Pasquali, et al., 1997) konnte am Beispiel muriner Epithelzellen gezeigt werden. Die Kombination dieser Extraktionsstrategie mit der hoch auflösenden MudPIT-Methode wurde kürzlich beschrieben (Wu, et al., 2003). Angereicherte Golgi-Vesikel aus Lebergewebe wurden bei physiologischen pH-Werten einer unspezifischen Hydrolyse mit Proteinase K unterzogen. Die extrazellulären Domänen der Membranproteine wurden somit hydrolysiert. Nachfolgend wurden die Vesikel einer Natriumcarbonat-Extraktion (pH 11) unterzogen und eine zweite Hydrolyse mit Proteinase-K durchgeführt. Bei den vorliegenden hohen pH-Werten hydrolysiert das Enzym die vorhandenen Proteine unspezifisch zu Peptiden von sechs bis 20 Aminosäuren Länge. Peptide dieser Größe eignen sich besonders zur Analyse mittels MudPIT. Durch die fehlende Spezifität der Proteinase K wurde eine Vielzahl sich überlappender Peptide erhalten. Mit der folgenden MudPIT-Analyse wurden dadurch Identifizierungen mit hohen Sequenzabdeckungen erreicht. Hierbei konnten die löslichen Proteine und die intrazellulären Domänen von Membranproteinen erfasst werden. In einem parallelen Ansatz wird die gleiche Probe mit einer einmaligen Proteinase-K-Behandlung bei hohem pH-Wert hydrolysiert. In der nachfolgenden MudPIT-Analytik können die löslichen Proteine und sowohl die intrazellulären als auch die extrazellulären Domänen der Membranproteine erfasst werden. Durch den Vergleich beider Ansätze können Informationen über die Lokalisation der Membranproteine und ihre relative Topologie erhalten werden.

Bei einer alternativen bzw. ergänzenden Extraktionsstrategie kommt das Detergenz Triton X-114 zum Einsatz. Dieses ist bei 4°C wasserlöslich, formt bei 20°C aber unlösliche Micellen und zeigt eine Trennung zwischen wässriger und Detergenzphase. Hydrophile Proteine bleiben in der wässrigen Phase, während integrale Membranproteine in der Detergenzphase gefunden werden (Santoni, et al., 1999). Beide Extraktionsstrategien sind sowohl mit 2D-PAGE als auch mit gelfreien Methoden der Proteomanalytik kombinierbar.

Die Plasmamembran stellt eine Barriere dar, welche die Zelle von ihrer Umgebung trennt und schützt. Membranproteine sind dabei wichtige Komponenten, die an Transportfunktionen, Zell-Zell-Kontakten oder an der Signalweiterleitung beteiligt sind. Die an der Zelloberfläche präsentierten Proteine sind dabei von entscheidender funktioneller Bedeutung. Die bisher aufgeführten Fraktionierungsmethoden ermöglichen nicht die selektive Anreicherung der Plasmamembran bzw. ihrer Membranproteine. Einen alternativen Ansatz stellt die **Oberflächenmarkierung** von Zellen dar. Hierbei werden wasserlösliche Markierungsreagenzien eingesetzt, welche die Membranen lebender Zellen nicht passieren

können. Die Markierung bleibt somit auf die Zelloberfläche beschränkt. Verfügen die eingesetzten Reagenzien zusätzlich über einen Affinitätsanker, ist die selektive Anreicherung der markierten Membranproteine möglich. Zum Einsatz können hierbei z. B. Sulfo-N-hydroxysuccinimid (SNHS)-Derivate des Biotins kommen. Diese aminreaktiven SNHS-Ester des Biotins sind nicht-membrangängig und binden kovalent an ϵ -Aminofunktionen von Lysin-Resten und an freie *N-Termini*. Die derart markierten Proteine können, nach einem Zellaufschluss, mittels Affinitätschromatographie angereichert werden.

Die Markierung einer nicht-adhärenenten Zelllinie mit nachfolgender 2D-PAGE wurde kürzlich beschrieben (Jang und Hanash, 2003). Die Zellen wurden mit Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert, die Membranproteine angereichert, in 2D-Gelen getrennt und mittels MALDI-MS und nLC-ESI-MS/MS identifiziert. Da die Markierung auf *N-Termini* und Lysin-Reste beschränkt ist, kommt es aufgrund der Markierung zu einer Blockierung dieser basischen Gruppen.

2.3 Aufgabenstellung

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist vor allem aus pharmakologischer und medizinischer Sicht von Bedeutung. Spezielles Interesse gilt dabei der luminalen Plasmamembran der mikrovaskulären Hirnkapillarendothelzellen (BMEC). Diese Membran stellt für im Blut gelöste Substanzen die erste Barriere bei der Passage der BHS dar. Die Proteine dieser Zellmembran sind maßgeblich beteiligt an zellulärer Kommunikation, an Transportprozessen und an der Ausbildung der *tight junctions*. Die Kenntnis der Membranproteine der BMEC ist daher der Schlüssel zum Verständnis der Schrankenfunktion. Die Charakterisierung des Oberflächenproteoms der Hirnkapillarendothelzellen könnte somit Wege zur pharmakologischen Modulation der BHS aufzeigen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Aufklärung dieses Oberflächenproteoms geleistet werden.

Die konventionellen Methoden der Proteomanalytik weisen allerdings gerade bezüglich der Trennung von Membranproteinen Limitationen auf. In der vorliegenden Arbeit sollte eine neue Methode zur Charakterisierung des Oberflächenproteoms von vitalen Zellen entwickelt werden. Diese Methodik sollte mittels Oberflächenmarkierung von Zellen die selektive Anreicherung und Identifizierung von Membranproteinen ermöglichen. Hierbei sollte eine subzelluläre Fraktionierung aufgrund der Zugänglichkeit der Oberflächenproteine der BMEC erfolgen. An ein zu entwickelndes neues Markierungsreagenz bestanden mehrere Anforderungen. Zum einen sollte es nicht membrangängig sein und keine cytotoxischen Eigenschaften aufweisen. Ferner sollte die Zellmarkierung unter physiologischen Bedingungen ohne zusätzliche vorbereitende Behandlung der Zellen erfolgen können. Zudem war es nötig, dass die Markierung mit der MALDI-Massenspektrometrie kompatibel war, da diese in Kombination mit Datenbank-Recherchen zur Identifizierung der Proteine

beitragen sollte. Neben der Synthese des Markierungsreagenzes und der Etablierung der Methodik, sollte die Präparation des eigentlichen Untersuchungsobjektes, der BMEC, erfolgen. Hierzu sollte im Rahmen dieser Arbeit die Isolierung der BMEC aus dem hochkomplexen Organ Gehirn etabliert werden. Die Bedingungen der Zellkultur sollten dabei mit den durchzuführenden Markierungen vereinbar sein.

Die Expression der mit obiger Methodik identifizierten Proteine sollte mit ergänzenden analytischen Methoden in BMEC bestätigt werden. Dies sollte erfolgen, um die Methode zu validieren und um zur Aufklärung der Schrankenfunktion der BMEC beizutragen.

3 Material

3.1 Chemikalien

| | |
|--------------------------------------|--|
| Allgemeine Laborchemikalien | Applichem, Fluka, Merck, Roth und Sigma |
| Acetonitril <i>p. a.</i> | Roth |
| Adultes bovines Rinderserum | PAA |
| Agar | Sigma |
| Agarose | Sigma |
| Ameisensäure <i>p. a.</i> | Merck |
| Aminocaprinsäure | Merck |
| Aminocaprinsäure, SigmaUltra | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumperoxodisulfat | Merck |
| BCC | Fluka |
| BCIP | Sigma |
| Bromphenolblau | Merck |
| Casein | Roth |
| Caprolactam (D10, 98%) | Cambridge Isotope Laboratories |
| Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail | Roche |
| Coomasie G-250 | Serva |
| α -Cyanozimtsäure | Sigma |
| DAPI | Serva |
| Desoxynukleotide | Gibco BRL |
| Dextran (\bar{M} = 144 kg/mol) | Sigma |
| Digitonin | Fluka |
| EDC | Pierce |
| EDTA | Roth |
| Ethidumbromid | Gibco BRL |
| EZ-Link™ NHS-Iminobiotin | Pierce |
| EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin | Pierce |
| Fluoresceindiacetat | Fluka |
| Fötale bovines Rinderserum | Biochrom |
| Formaldehyd | AppliChem |
| Glycin | AppliChem |
| Glycerin | Roth |
| Hefeextrakt | Roth |

| | |
|--|--------------------|
| Hi-Di™ formamid | PE Biosystems |
| HPLC-H ₂ O | Roth |
| Immersionsöl | Merck |
| IPTG | AppliChem |
| Kaisers Glyceringelatine | Merck |
| Kollagen G | Biochrom |
| Levamisol (Tetramisol Hydrochlorid) | Sigma |
| NBT | Sigma |
| PEG 4000 | Roth |
| Percoll | Sigma |
| Ponceau S | Roth |
| Propidiumiodid | Sigma |
| Roti-Block | Roth |
| Rotiphorese 30 | Roth |
| Roti-Quant | Roth |
| SDS | Roth |
| Silbernitrat | Roth |
| Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat | Roche |
| Sulfo-NHS | Pierce |
| Sypro-Ruby | Genomics Solutions |
| TEMED | AppliChem |
| TLCK | Sigma |
| Trichloressigsäure <i>p.a.</i> | Roth |
| Triton X-100 | Fluka |
| Tris | Roth |
| Trypton | Roth |
| Tween 20 | Roth |
| X-Gal | AppliChem |
| Xylencyanol | Roth |

3.2 **Sonstige Materialien**

Allgemeine Materialien

| | |
|--------------------------|-------------------------------|
| Deckglässchen | Fisher Scientific, LaFontaine |
| Elektroporationsküvetten | EquiBio |
| Impfösen | Sarstedt |
| Kanüle (22G) | Braun |

| | |
|--|----------------------------------|
| Kulturröhrchen | Sarstedt |
| MonoQ-Säulengehäuse | Amersham Pharmacia Biotech (APB) |
| Objekträger | LaFontaine |
| Probenröhrchen (15 u. 20 ml) | Greiner, Sarstedt |
| Reaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5 u. 2 ml) | Eppendorf, Sarstedt |
| Reaktionsgefäße, silikonisiert (0,5, 1,5 u. 2 ml) | Biozym |
| Rollmesser | Monopol |
| Säulen (15 ml, 20 ml) | BioRad |
| Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²) | Nunc |
| Zellkulturplatten (12x 3,5 cm ²) | Nunc |
| Zellschaber | Dispenser |
| Zentrifugenröhrchen | Kontron, Sarstedt, Greiner |

Membranen, Filter und Säulenmaterialien

| | |
|--|----------------------------------|
| Faltenfilter | Merck |
| Filterpipettenspitzen | Biozym |
| Gel-Blotting Paper (GB002) | Schleicher&Schuell |
| Membranfilter (0,45 µm) | Schleicher&Schuell |
| Macro-Pep Q-Säulenmaterial | BioRad |
| µRP C ₂ /C ₁₈ St 4.6/100 Säule | Amersham Pharmacia Biotech (APB) |
| Nitrocellulose-Membran (0,2 µm) | Schleicher&Schuell |
| Nucleosil-Säulenmaterial (C ₁₈ 120-5µm) | Macherey&Nagel |
| PVDF-Membran, BioTrace (0,45 µm) | Pall Filtron |
| Streptavidin Sepharose [®] | Amersham Pharmacia Biotech (APB) |
| ZIPTIP [®] -Pipettenspitzen | Millipore |

Enzyme

| | |
|---|-----------|
| Benzonase (≥ 25 U/µl) | Merck |
| Bovines Serum Albumin | Sigma |
| Dispase II, Neutral Protease | Roche |
| DNase I (RNase-frei) | Gibco BRL |
| Hot Start Taq-Polymersae | Qiagen |
| Kollagenase D | Roche |
| Taq-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> | Gibco BRL |
| Trypsin (<i>porcin</i> , TPCK behandelt) | Promega |
| Trypsin (Viralex), 0,25 % (w/v) | PAA |

Antikörper

| | |
|--|--------------------------|
| anti- α -smooth muscle-Aktin-IgG (Rb) | Chemicon |
| anti-GLUT1-IgG (Rb) | Chemicon |
| anti-MMP10-IgG _{2b} (Ms) | Chemicon |
| anti-MRP2-IgG (Gt) | Santa Cruz Biotechnology |
| anti-vWF-IgG (Rb) | Dako |
| anti-ZO1-IgG (Rt) | Chemicon |
| anti-rb-IgG-IgG (Gt) | |
| mit Cy3 konjugiert | Jackson ImmunoResearch |
| anti-rt-IgG-IgG (Gt) | |
| mit Cy3 konjugiert | Jackson ImmunoResearch |
| anti-ms-IgG1-IgG (Gt) | |
| mit Cy2 konjugiert | Jackson ImmunoResearch |
| anti-rb-IgG / whole molecule (Gt) | |
| mit Alkalische Phosphatase konjugiert | Sigma |
| anti-ms-IgG / whole molecule (Gt) | |
| mit Alkalische Phosphatase konjugiert | Pharmingen |

Systeme

| | |
|---|---------------|
| ABI Prism [®] BigDye [™] Terminator | |
| Cycle Sequencing Ready Reaction Kits | PE Biosystems |
| BCA-Proteinbestimmung | Pierce |
| HotStarTaq DNA Kit | Qiagen |
| pGEM [®] -Teasy Vector System I | Promega |
| QIAprep [®] Miniprep | Qiagen |
| QIAquick [®] PCR Purification Kit | Qiagen |

3.3 Geräte**Allgemeine Geräte**

| | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| Äkta basic Chromatographie-System | Amersham Pharmacia Biotech (APB) |
| ABI Prism 310 Genetic Analyzer | Applied Biosystems |
| Axiovert 200-Fluoreszenzmikroskop | Zeiss |
| Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur | PeqLab |
| Blaulichttisch | Molecular Probes |
| Brutschrank | Binder |
| DNA engine DYAD | MJ Research |

| | |
|---|----------------------------------|
| DNA engine OPTICON | MJ Research |
| Durchlicht-Scanner | Umax |
| Färbeschale (lichtdicht) | Werkstatt, TU-Darmstadt |
| FLA-5000 (Fluoreszenzscanner) | Fuji |
| Gelelektrophoreseapparatur | Werkstatt, TU-Darmstadt |
| GeneQuant pro (UV/VIS-Spektralphotometer) | Amersham Pharmacia Biotech (APB) |
| Gefrierschrank (-80°C) | Revco |
| Geltrockner | Biometra |
| Hamilton-Spritze | Hamilton-Bonaduz |
| Heizblock | Stuart Scientific |
| IDA (Agarose-Geldokumentation) | Raytest |
| Immunschüttler | Heidolph |
| Membranvakuumpumpe | Vacuubrand |
| Micro Pulser (Elektroporator) | BioRad |
| Mikroskop Wilovert S | Hund |
| pH-Meter | WTW |
| Rotavapor-R Rotationsverdampfer | Büchi |
| Schüttler HS 501D | Janke & Kunkel |
| Spannungsgeräte | Werkstatt, TU-Darmstadt |
| Sterilwerkbank | Heraeus |
| Ultraschallbad Sonovex RK106 | Bandelin |
| Vacuum controller 24 | Vacuubrand |
| Vortexer | Janke & Kunkel |
| Voyager-DE™ PRO Bioelectrometry Workstation | PE Biosystems |
| Wasserbad | GFL |
| Western-Blot-Apparatur | BioRad |

Zentrifugen

| | |
|----------------------------|--------------------|
| Centrifuge 5417R | Eppendorf |
| Centrifuge 5810 | Eppendorf |
| LE-80K | Beckman |
| Megafuge | Heraeus |
| Mikroliter Tischzentrifuge | Fischer Scientific |
| Sorval RC-5B | DuPont |
| Speed-Vac Univapo 150 H | Uniequip |
| Variofuge RF | Heraeus |

Computerprogramme und Datenbanken

Data Explorer

Applied Biosystems

Isis/Draw 2.4

MDL Information Systems

Lasergene

DNASTAR Inc.

EMBL: European Molecular Biology Laboratory,
Data Library Nucleotide Sequence Database, Heidelberg
<http://www.embl-heidelberg.de>
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

NCBI: National Center for Biotechnology Information, USA
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

SWISS-PROT: Department de Biochimie Medicale
Centre Medical Universitaire, Genf, Schweiz
<http://www.swissport.com>

Expasy: ExPASy Molecular Biology Server
Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)
<http://www.expasy.ch>

3.4 Spezielle Materialien

3.4.1 Bakterienstämme, Plasmide und Säugerzellen

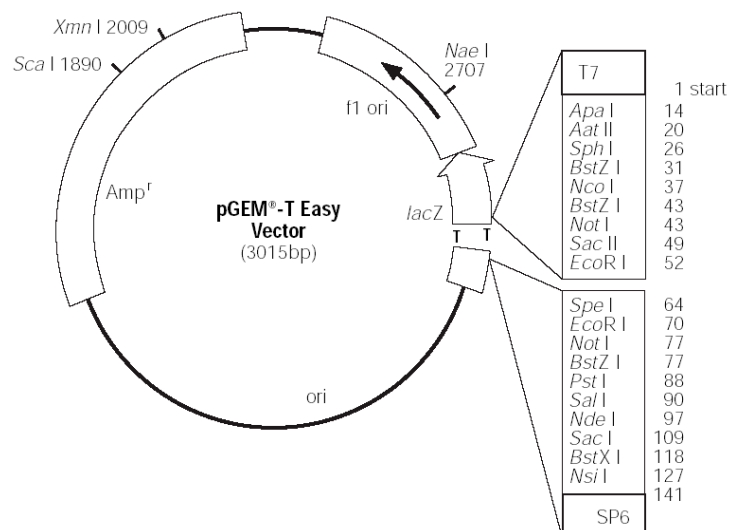
E. coli DH5 α

Invitrogen

Genotyp :

 $F^- \phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk^-, mk^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$
pGEM[®]-T Easy

Promega

Abb. 13 pGEM[®]-T Easy-Vektor

C6-Zellen, glialer Zellstamm aus Ratte
Schweinegewebe

American Type Culture Collection
Fa. Bayer, Bensheim

3.4.2 Referenzen und Größenstandards

Referenzen

Kalibriersubstanzen-MALDI-MS

PE Biosystems

Standard 1 und 2

| | | |
|----------------------|--------------------|---------------|
| des-Arg1-Bradykinin | M+H ⁺ = | 904,4681 m/z |
| Angiotensin 1 | M+H ⁺ = | 1296,6853 m/z |
| Glu1-Fibrinopeptid B | M+H ⁺ = | 1570,6774 m/z |
| ACTH (1-17) | M+H ⁺ = | 2093,0867 m/z |
| ACTH (18-39) | M+H ⁺ = | 2465,1989 m/z |
| ACTH (7-38) | M+H ⁺ = | 3657,9294 m/z |
| Insulin, bovin | M+H ⁺ = | 5730,6087 m/z |

Pep1

Thermo Hybaid

Acetyl-NH-ATSYLTAKASRAR

M+H⁺ = 1437,7809 m/z

Größenstandards

Precision-Proteinmarker (mit StrepTaq)

BioRad

250 kD
150 kD
100 kD
75 kD
50 kD (Orientierungsbande)
37 kD
25 kD
15 kD
10 kD

100 bp DNA-Leiter

Gibco BRL

| | |
|---------|--------|
| 2072 bp | 800 bp |
| 1500 bp | 700 bp |
| 1400 bp | 600 bp |
| 1300 bp | 500 bp |
| 1200 bp | 400 bp |
| 1100 bp | 300 bp |
| 1000 bp | 200 bp |
| 900 bp | 100 bp |

3.4.3 Oligonukleotide

MWG Biotech

| Name | Sequenz | Annealingtemperatur [°C] |
|--------------|---------------------------|--------------------------|
| ABCC2_1 | gcctgagctggatctggtgctgaa | 61 |
| ABCC2_2 | gtcgtggagcccaatggaagcaat | |
| ATP7B_1870_1 | cccaacgctcatcacttggaccac | 58 |
| ATP7B_1870_2 | gggcgtgtcgaagaatgtcacagg | |
| ATP7B_2350_1 | acgtgggcaatgacaccactttgg | 55,2 |
| ATP7B_2350_2 | ggcttgccctcccttgatgaggatg | |
| pGEM_1 | cgactcactatagggcgaattg | 58 |
| pGEM_2 | cgttggatgcatagcttgagta | |
| PlxnB1_1 | aaccctgaggaaccagcacacca | 71 |
| PlxnB1_2 | tccccatctgcaccgtgaactcag | |

3.4.4 Antibiotika, Medien und Puffer

Antibiotika

| | |
|---|----------|
| Ampicillin | Sigma |
| Penicillin / Streptomycin (10.000 U / 10.000µg/ml) | Biochrom |
| Gentamycin (10 mg/ml) | Biochrom |

Medien

| | |
|---|----------|
| Medium M199 Earle's, 2,2 g/l NaHCO ₃ , 0,177 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin | Biochrom |
| DMEM / Ham's F12 (1:1), 0,648 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin | Biochrom |

| | | |
|-----------|------------------------|-------------|
| LB-Medium | 1 % (w/v) | Casein |
| pH 7,5 | 0,5 % (w/v) | Hefeextrakt |
| | 0,5 % (w/v) | NaCl |
| | pH mit NaOH einstellen | |

| | | |
|------------|----------------------------------|-------------------|
| SOC-Medium | 2 % (w/v) | Casein |
| pH 7,0 | 0,5 % (w/v) | Hefeextrakt |
| | 10 mM | NaCl |
| | 2,5 mM | KCl |
| | nach dem Autoklavieren zusetzen: | |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | MgSO ₄ |
| | 20 mM | Glukose |

| | | |
|---------|--|------|
| LB-Agar | 1,5 % (w/v) | Agar |
| | in LB-Medium, autoklavieren. Antibiotika erst zugeben, wenn Lösung auf unter 60°C abgekühlt ist | |

Puffer

| | | |
|-------------------|--------|------------|
| 50fach TAE-Puffer | 2 M | Tris |
| pH 8,0 | 1 M | Essigsäure |
| | 100 mM | EDTA |

| | | |
|----------------|--------|--|
| Earle's-Puffer | 5 mM | KCl |
| pH 7,2 - 7,4 | 1 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 120 mM | NaCl |
| | 0,8 mM | MgCl ₂ * 6 H ₂ O |
| | 1,6 mM | CaCl ₂ * 2 H ₂ O |
| | 5,4 mM | D-Glukose |

nach dem Autoklavieren pH mit 7,5 % (w/v) NaHCO₃ einstellen

| | | |
|--------------------------|--------|----------------------------------|
| PBS ⁻ -Puffer | 3 mM | KCl |
| pH 7,2 - 7,4 | 1,5 mM | KH ₂ PO ₄ |
| | 8 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 140 mM | NaCl |

| | | |
|---------------------------|---------|--|
| PBS ²⁺ -Puffer | 2,7 mM | KCl |
| pH 7,2 - 7,4 | 1,47 mM | KH ₂ PO ₄ |
| | 8,1 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 137 mM | NaCl |
| | 1,03 mM | MgCl ₂ * 6 H ₂ O |
| | 0,88 mM | CaCl ₂ * 2 H ₂ O |

4 Methoden

4.1 Proteinchemische Methoden

4.1.1 Proteinbestimmung mit RotiQuant

(Bradford, 1976)

Diese Art der Bestimmung von Proteinkonzentrationen beruht auf der Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blau G250. Bei der Adsorption des Farbstoffes an basische Reste des Proteins verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe kann somit durch den Vergleich ihrer Absorptionsänderungen bei 595 nm mit der eines Proteinstandards bestimmt werden.

| | |
|-------------------------|--|
| RotiQuant-Arbeitslösung | 1:5 Verdünnung der RotiQuant-Lösung |
| Proteinstandards | 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 und 0,2 mg/ml BSA in Probenpuffer |
| Referenz | jeweiliger Probenpuffer |

Vor der Verwendung der Arbeitslösung war diese zu filtrieren. Jeweils 20 µl Probe, Proteinstandard oder Probenpuffer wurden in einer Plastikkuvette vorgelegt. Dann wurde je 1 ml RotiQuant-Arbeitslösung zugegeben und die Küvette mehrmals invertiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gegen die Referenzpufferprobe gemessen. Aus den Werten der BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Probe ermittelt wurde.

4.1.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentratoren wurden entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengebaut und zum Spülen der Membran mit 1 ml aqua dest. zentrifugiert. Die Proben wurden dann in einem Konzentrator mit einem MWCO von 3 kDa bei 3000x g und 10°C (JA-20 Rotor, Beckman) in einer Beckman-Zentrifuge auf das gewünschte Volumen eingeeengt. Die Dauer der Zentrifugation war abhängig vom Volumen und der Konzentration der Lösung sowie von der Ausschlussgröße der verwendeten Membran. Nach der Verwendung wurden die Konzentratoren mit aqua dest. gespült und in 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Die Gelelektrophorese ist eine der effektivsten Trennverfahren für kolloidale und makromolekulare Stoffe. Das Prinzip beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die Trennung selbst erfolgt sowohl nach Molekülgröße als auch nach elektrophoretischer Beweglichkeit.

Weisen die Moleküle identische Ladung-Masse-Verhältnisse und ähnliche Formen auf, erfolgt die Trennung ausschließlich gemäß der molekularen Massen. Diese Bedingungen sind in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und eines Reduktionsmittels gegeben. Proteine binden SDS in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS pro g Protein, dies entspricht etwa einem SDS-Molekül pro zwei Aminosäureresten. Die Eigenladung der Proteine wird dabei durch die negativen Ladungen der SDS-Moleküle maskiert. Die Proteine werden durch das SDS in eine stabähnliche Form gezwungen und weisen zudem eine einheitliche Ladungsdichte auf. Die Matrix des verwendeten Polyacrylamids behindert die Wanderung großer Moleküle stärker als die kleiner Moleküle. SDS-PAGE trennt Proteine somit entsprechend ihrer molekularen Massen. Das verwendete Trennsystem mit diskontinuierlichen pH-Verlauf entsprach einem modifiziertem System nach Laemmli (1970).

| | | |
|--------------------------|--------------|------------------------|
| Rotiphorese 30 | 30 % (w/v) | Acrylamid |
| | 0,8 % (w/v) | Bisacrylamid |
| Sammelgelpuffer (SGP) | 0,5 M | Tris |
| pH 6,8 | 0,4 % (w/v) | SDS |
| Trenngelpuffer (TGP) | 3 M | Tris |
| pH 8,85 | 0,4 % (w/v) | SDS |
| APS-Lösung | 10 % (w/v) | Ammoniumperoxodisulfat |
| Elektrophoresepuffer | 50 mM | Tris |
| pH-Wert nicht einstellen | 0,1 % (w/v) | SDS |
| | 190 mM | Glycin |
| Auftragspuffer | 1 M | Tris |
| pH 8,0 , 4fach | 25 % (v/v) | Glycin |
| | 7,5 % (w/v) | SDS |
| | 12,5 % (v/v) | β-Mercaptoethanol |

| | | | |
|-----------------|------|----|-----------------|
| Trenngel | 4 | ml | Rotiphorese 30 |
| 12 % T, 2,6 % C | 2,5 | ml | Trenngelpuffer |
| | 3,5 | ml | aqua bidest. |
| | (50 | µl | APS-Lösung) |
| | (5 | µl | TEMED) |
| Sammelgelgel | 1 | ml | Rotiphorese 30 |
| 3 % T, 2,6 % C | 1,5 | ml | Sammelgelpuffer |
| | 3,5 | ml | aqua bidest. |
| | (36 | µl | APS-Lösung) |
| | (3 | µl | TEMED) |

Es wurden Glasplatten der Größe 10 cm x 10 cm verwendet. Zwischen die Platten wurden Abstandshalter von 1 mm Dicke eingesetzt und die Kanten mit heißer 1 % (w/v) Agaroselösung abgedichtet. Alternativ hierzu wurden Protean II Gelelektrophoreseapparaturen verwendet, die nach Anweisung des Herstellers (BioRad) zusammengesetzt wurden. Alle Glasplatten wurden vor Gebrauch mit 2-Propanol und aqua dest. gereinigt.

Die Polymerisationslösung des Trenngels wurde mit Ultraschall entgast, mit APS-Lösung und TEMED supplementiert und zwischen die Platten gegossen. Die Polymerisationslösung wurde sofort mit 30 % (v/v) 2-Propanol überschichtet, um den Kontakt der Lösung mit Luftsauerstoff zu verhindern. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das 2-Propanol entfernt und das Trenngel mit der frischen Polymerisationslösung des Sammelgels überschichtet, in das ein Taschenformer eingesetzt wurde. Das vollständig polymerisierte Gel wurde, nach Entnahme des Taschenformers in eine Elektrophorese-Apparatur eingebaut und deren Kammern mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

Die Proteinproben wurden mit $\frac{1}{4}$ ihres Probenvolumens an Auftragspuffer versetzt und zehn min bei 90°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden diese 1 min bei 10.000x g zentrifugiert und mit einer Hamiltonspritze in die Probenaschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte 15 min bei 100 V und dann bei 180 V bis die Lauffront die Unterkante des Gels erreicht hatte.

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel gefärbt (4.1.4), auf eine Membran geblottet (4.1.5) oder zerschnitten und einer partiellen Hydrolyse mit Trypsin unterzogen (4.3.1.1).

4.1.4 Färbemethoden für SDS-Polyacrylamid-Gele

4.1.4.1 Färbung mit Sypro-Ruby

Die Sypro-Ruby-Protein-Färbelösung beinhaltet einen fluoreszierenden Metall-Chelat Farbstoff, der Ruthenium als Bestandteil eines organischen Komplexes aufweist. Die Exzitation des Farbstoffs zeigt Maxima bei 300 nm und 480 nm, die Wellenlänge des emittierten Lichtes liegt bei 618 nm. Das Fluoreszenzsignal des an Proteine angelagerten Farbstoffs kann somit auf einem Blaulichttisch sichtbar gemacht werden oder nach Anregung mit einem Blaulichtlaser mit geeigneten Filtern mit einem Scanner detektiert werden.

| | | |
|-----------------|------------|------------|
| SR-Fixierlösung | 40 % (v/v) | Methanol |
| | 10 % (v/v) | Essigsäure |

Nach der SDS-PAGE wurden die Glasplatten auseinandergebaut, das Gel kurz mit aqua dest. gewaschen und dann eine Stunde in SR-Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel in einem lichtdichten Gefäß mit Sypro-Ruby-Färbelösung vollständig bedeckt und mindestens eine Stunde bei RT langsam geschüttelt. Die Standardfärbung umfasste eine Inkubation in der Färbelösung über Nacht. Vor der Detektion der Proteinsignale mit der Hilfe eines Laser-Fluoreszenzscanners (FLA-5000), wurde das Gel kurz in SR-Fixierlösung geschwenkt.

| | | | |
|------------|-------------|--------|----|
| Detektion: | Anregung | 473 | nm |
| | Filter | 575 | nm |
| | Auflösung | 100 | µm |
| | Verstärkung | HV 400 | |

4.1.4.2 Modifizierte Silberfärbung nach Blum

(Blum, et al., 1987)

Diese Färbemethode basiert auf der Reduktion der Silberionen des Silbernitrates zu elementarem Silber. Der Reduktion geht die Adsorption der Silberionen an Proteinen voraus. Die nachfolgende Färbereaktion ist somit auf die Geloberfläche beschränkt. Bei dieser sensitiven Färbung (bis 10 ng Protein / Bande) handelt es sich um keine Endpunktmethode, so dass die Entwicklung der Färbung gestoppt werden muss. Zudem ist das Färbeergergebnis abhängig von der Aminosäurezusammensetzung der Zielproteine.

| | | | | |
|--------------|---------------------|-----|-------------------------------|--|
| Fixieren | 60 | min | 50 % (v/v) 12 % (v/v) | Ethanol Essigsäure |
| Waschen 1 | 2x 20 | min | 50 % (v/v) | Ethanol |
| Quellen | 10 | min | | aqua bidest. |
| Imprägnieren | 1 | min | 0,02 % (w/v) | Na ₂ S ₂ O ₃ |
| Waschen 2 | 3x 10 | s | | aqua bidest. |
| Färben | 20 | min | 0,2 % (w/v) 0,05 % (v/v) | AgNO ₃ Formaldehyd |
| Waschen 3 | 3x 10 | s | | aqua bidest. |
| Entwickeln | bis Banden sichtbar | | 6 % (w/v) 0,05 % (v/v) | Na ₂ CO ₃ Formaldehyd |
| Waschen 4 | 3x 10 | s | | aqua bidest. |
| Abstoppen | > 10 | min | 1,25 % (w/v) 0,625 % (v/v) | Tris Essigsäure |

Nach Abschluss der Färbung wurden die Gele mit der Hilfe eines Durchlichtscanners dokumentiert oder auf Filterpapier getrocknet.

4.1.4.3 Coomassie-Färbung nach Neuhoff

(Neuhoff, et al., 1988)

| | | |
|-------------------|----------------------------|---|
| CBBG-Fixierlösung | 12 % (w/v) | Trichloressigsäure |
| Waschlösung | 8 % (w/v) 1,88 % (v/v) | Ammoniumsulfat Phosphorsäure, 85 % (v/v) |
| Stammlösung I | 10 % (w/v) 2,35 % (v/v) | Ammoniumsulfat Phosphorsäure, 85 % (v/v) |
| Stammlösung II | 5 % (w/v) | Coomassie Brilliantblau G 250 |

Das Gel wurde mindestens eine Stunde in CBBG-Fixierlösung inkubiert, anschließend 30 Sekunden in der Waschlösung geschwenkt und über Nacht in der Färbelösung inkubiert. Das Gel wurde in 25 % (v/v) Methanol bis zum gewünschten Signal-Hintergrund-Verhältnis entfärbt und mit der Hilfe eines Durchlichtscanners dokumentiert.

Die Färbelösung wurde frisch aus Stammlösung I (39,2 ml), Stammlösung II (0,8 ml) und Methanol (10 ml) angesetzt. Dies entspricht folgender Zusammensetzung:

| | |
|--------------|-------------------------------|
| 0,08 % (w/v) | Coomassie Brilliantblau G 250 |
| 1,88 % (v/v) | Phosphorsäure, 85 % (v/v) |
| 8 % (w/v) | Ammoniumsulfat |
| 20 % (v/v) | Methanol |

4.1.5 Elektrotransfer von Proteinen

(Khyse-Anderson, 1984)

Beim Elektro-Blotting werden die Proteine eines SDS-Gels elektrohoretisch auf eine Membran übertragen. Neben Nylonmembranen finden hauptsächlich PVDF- und Nitrocellulose-Membranen Anwendung. Letztere können allerdings aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Edman-Chemie nicht einer Sequenzanalyse vorangestellt werden. Die chemisch stabilere PVDF-(Polyvinylidenfluorid)-Membran hingegen kann auch in der Edman-Sequenzanalyse eingesetzt werden.

| | | |
|---------------------------|-------------|------------------------------|
| Anodenpuffer 1 (A1) | 300 mM | Tris |
| pH 10,4, nicht einstellen | 20 % (v/v) | Methanol |
| Anodenpuffer 2 (A2) | 25 mM | Tris |
| pH 10,4, nicht einstellen | 20 % (v/v) | Methanol |
| Kathodenpuffer (K) | 25 mM | Tris |
| pH 9,4, nicht einstellen | 40 mM | ϵ -Aminocaprinsäure |
| | 20 % (v/v) | Methanol |
| | 0,1 % (w/v) | SDS |

Entsprechend der Größe des Gels wurden sieben 3MM-Filterpapiere und eine Membran zugeschnitten. Sollte auf eine PVDF-Membran geblottet werden, musste diese vor ihrer Verwendung zehn Sekunden in Methanol inkubiert werden, da trockene PVDF-Membranen von wässrigen Lösungen nicht benetzt werden.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit aqua bidest. abgespült und zwischen Membran und Filterpapiere geschichtet. Die Filterpapiere und die Membran wurden zuvor mit verschiedenen Puffern getränkt. Die Reihenfolge der Schichten ausgehend von der Anodenplatte war: zwei Filterpapiere in A1, zwei Filterpapiere in A2, Membran in A2, Gel, drei Filterpapiere in K. Der Blotvorgang fand bei einer Spannung von maximal 25 V für 75

Minuten statt. Die eingestellte Stromstärke war mit $2,5 \text{ mA/cm}^2$ von der Größe des Gels abhängig. Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran gefärbt oder zwischen Filterpapieren getrocknet.

4.1.6 Färbemethoden für Blotmembranen

4.1.6.1 Ponceau-S-Färbung

(Harlowe und Lane, 1988)

Die Ponceaurotfärbung ist eine schnelle, empfindliche und reversible Färbemethode, die vor immunchemischen Färbungen durchgeführt werden kann. Die Nachweisgrenze liegt bei 50 ng bis 150 ng Protein je Bande.

| | | |
|------------------|-------------|--------------------|
| Ponceau-S Lösung | 0,2 % (w/v) | Ponceau-S |
| | 2 % (w/v) | Trichloressigsäure |

Die trockene Blotmembran wurde zehn Minuten in Ponceau-S-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in aqua dest. entfärbt, bis Banden sichtbar waren. Gefärbte Membranen können durch längere Einwirkzeiten wässriger Lösungen wieder vollständig entfärbt werden.

4.1.6.2 Immunchemische Färbung von Blotmembranen

(Harlowe und Lane, 1988)

Bei dieser Immunfärbung werden Proteine auf einer Blotmembran mit spezifischen Antikörpern und einer nachfolgenden Farbreaktion detektiert.

| | | | |
|-------------|------|---------|----------|
| TBST-Puffer | 10 | mM | Tris |
| pH 8,0 | 150 | mM | NaCl |
| | 0,05 | % (v/v) | Tween 20 |

| | | |
|-------------|-----------|------------------|
| TBST-Blotto | 5 % (w/v) | Magermilchpulver |
| | | in TBST-Puffer |

| | | | |
|-----------|-----|----|-------------------|
| AP-Puffer | 100 | mM | Tris |
| pH 9,5 | 100 | mM | NaCl |
| | 5 | mM | MgCl ₂ |

| | | | |
|-----------------------|---|---------|----------------------------------|
| Stopp-Puffer | 20 | mM | Tris |
| pH 7,0 | 5 | mM | EDTA |
| NBT-Lösung | 50 | mg/ml | Nitro Blue Tetrazolium |
| | 70 | % (v/v) | Dimethylformamid |
| BCIP-Lösung | 50 | mg/ml | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat |
| | 100 | % (v/v) | Dimethylformamid |
| Substratlösung | 66 µl NBT-Lösung | | |
| | 33 µl BCIP-Lösung | | |
| | mit AP-Puffer ad 10 ml | | |
| Erstantikörperlösung | Verdünnung der Antikörper (s. Tab. 2) mit TBST-Puffer | | |
| Zweitantikörperlösung | Verdünnung der Antikörper (s. Tab. 3) mit TBST-Puffer | | |

Tab. 2 Erstantikörper der immunchemischen Färbung

| Antikörper | Wirt | Spezifität | Verdünnung |
|------------|------|------------|------------|
| anti-MMP10 | Ms | MMP10 (Hu) | 1:200 |
| anti-MRP2 | Gt | MRP2 (Hu) | 1:200 |

Tab. 3 Zweitantikörper der immunchemischen Färbung

| Antikörper | Wirt | Spezifität | Verdünnung |
|--------------|------|------------|------------|
| anti-Gt / AP | Rb | IgG (Gt) | 1:5000 |
| anti-Ms / AP | Gt | IgG (Ms) | 1:5000 |

Um unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran zu verhindern, mussten die noch freien Proteinbindungsstellen der Membran blockiert werden. Anschließend wurde die Membran mit den verschiedenen Antikörperlösungen inkubiert. Bei den verwendeten Zweitantikörpern handelte es sich um Antikörper-Konjugate mit dem Enzym Alkalische Phosphatase. Dieses Enzym setzte die Substrate NBT und BCIP zu einem präzipitierenden, violetten Farbstoff um. Das Optimum der Alkalischen Phosphatase liegt im alkalischen Milieu, weshalb vor der Substratreaktion mit AP-Puffer (pH 9,5) umgepuffert werden musste.

| | | | |
|------------------|---------------------|-----|-----------------------|
| Waschen 1 | 5 | min | TBST-Puffer |
| Blocken | 30 | min | TBST-Blotto |
| Waschen 2 | 2x 5 | min | TBST-Puffer |
| Erstantikörper | 2 | h | Erstantikörperlösung |
| Waschen 3 | 3x 5 | min | TBST-Puffer |
| Zweitantikörper | 1 | h | Zweitantikörperlösung |
| Waschen 4 | 3x 5 | min | TBST-Puffer |
| Umpuffern | 5 | min | AP-Puffer |
| Substratreaktion | bis Banden sichtbar | | Substratlösung |
| Stoppen | > 10 | min | Stopp-Puffer |

Die Substratreaktion wurde bei der gewünschten Signalintensität durch Zugabe des Stopp-Puffers beendet. Anschließend wurden die Membranen zwischen Filterpapieren getrocknet.

4.1.6.3 Affinitätsfärbung von Blotmembranen

Diese Methode wurde angewandt, um biotinylierte, iminobiotinylierte oder ImBAS-markierte Proteine auf Blotmembranen mit der Hilfe des Alkalische-Phosphatase-Systems zu detektieren. Zum Einsatz kam hierbei ein Enzym-Streptavidin-Konjugat. Die Bedingungen der Färbungen sind ähnlich der unter 4.1.6.2 beschriebenen, sie sind jedoch auf die pH-abhängige Interaktion zwischen Streptavidin und Iminobiotinderivaten abgestimmt.

Block-Lösung 1 : 10 Verdünnung von Rotiblock (10x Konzentrat)

Bindepuffer 50 mM NH_4HCO_3
 pH 10,0 500 mM NaCl
 0,05 % (v/v) Triton X-100

Stopp-Puffer 20 mM Tris
 pH 7,0 5 mM EDTA

Konjugat-Lösung 1 % (w/v) BSA
 Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (1 : 8000)
 in Bindepuffer

Substratlösung 66 μl NBT-Lösung
 33 μl BCIP-Lösung
 mit AP-Puffer ad 10 ml

| | | | |
|------------------|---------------------|-----|-----------------|
| Waschen 1 | 3x 5 | min | TBST-Puffer |
| Blocken | 60 | min | Block-Lösung |
| Waschen 2 | 2x 10 | min | Bindepuffer |
| Binden | 60 | min | Konjugat-Lösung |
| Waschen 3 | 2x 5 | min | Bindepuffer |
| Umpuffern | 10 | min | AP-Puffer |
| Substratreaktion | bis Banden sichtbar | | Substratlösung |
| Stoppen | > 10 | min | Stopp-Puffer |

Die Substratreaktion wurde bei der gewünschten Signalintensität durch Zugabe des Stopp-Puffers beendet. Anschließend wurden die Membranen zwischen Filterpapieren getrocknet und dokumentiert.

4.2 Methoden der Zellkultur

4.2.1 Isolierung von Hirnkapillarendothelzellen

(Mischek, et al., 1989)

Die Isolierung von Kapillarendothelzellen (BMEC) des mikrovaskulären Systems aus porcinem Gehirn erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Mischek. Dabei wurden mehrere enzymatische Hydrolysen mit verschiedenen Zentrifugationstechniken kombiniert. Alle verwendeten Materialien und Geräte wurden vor Gebrauch sterilisiert. Das während der Präparation verwendete Medium M199 enthielt keine Antibiotika oder Seren.

| | | |
|---|--------------------------------------|--|
| Dextran-Lösung pH 7,2 | 15 % (w/v) | Dextran T150 in Earle's Puffer, autoklavieren |
| 10x Medium M199 | Pulver für 1 l Medium M199 ad 100 ml | |
| Percoll-Lösung A (1,08 g/cm ³) | 74 ml | PBS ⁻ -Puffer |
| | 100 ml | Percoll |
| | 11,1 ml | 10x Medium M199 |
| Percoll-Lösung B (1,04 g/cm ³) | 196 ml | PBS ⁻ -Puffer |
| | 49,1 ml | Percoll |
| | 4,9 ml | 10x Medium M199 |

| | | | |
|----------------------------|----------------------|---------|----------------------------------|
| Kollagenase-Lösung A | 90 | mg | Collagenase D |
| erst vor Gebrauch ansetzen | 9 | mg | TLCK |
| | in 12 ml Medium M199 | | |
| Kollagenase-Lösung B | 90 | mg | Collagenase D |
| erst vor Gebrauch ansetzen | 36 | µl | Benzonase |
| | in 12 ml Medium M199 | | |
| Puffer A | 3,3 | M | NH ₄ Cl |
| | 125 | mM | KCl |
| | 20 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 4,4 | mM | KH ₂ PO ₄ |
| | 2,5 | % (w/v) | Glukose |
| Puffer B | 52 | mM | MgCl ₂ |
| | 13 | mM | MgSO ₄ |
| | 80 | mM | CaCl ₂ |
| Puffer C | 845 | mM | NaHCO ₃ |
| Erythrozyten-Lyse-Puffer | 900 | µl | Puffer A |
| | 450 | µl | Puffer B |
| | 225 | µl | Puffer C |
| | 21 | ml | aqua bidest. |

Eine Präparation von Hirnkapillarendothelzellen aus schlachtfischem Schweinegehirn ging von 37 Hirnhälften aus. Das Gewebe wurde in sterilem Earle's Puffer auf Eis transportiert, erneut mit Earle's Puffer gewaschen und bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert. Nach dem Entfernen von Kleinhirn, Plexus chorioideus, Hirnhaut, äußeren Blutgefäßen sowie Teilen der weißen Substanz, wurden die Cortices mit einem Rollmesser zerkleinert. Das Gewebe wurde mit etwas Medium M199 in zwei 2000 ml Bechergläsern gesammelt, das Leergewicht der Gläser inklusive Medium wurde zuvor bestimmt. Die Gewebesuspension wurde langsam auf Magnetrührern gerührt, bis alle Hirnhälften verarbeitet waren. Nach der Zugabe von 5 mg Dispase II pro Gramm Gewebe wurde die Gewebesuspension mit Medium M199 auf

insgesamt 1800 ml aufgefüllt, auf vier 600 ml Bechergläser verteilt und drei Stunden unter langsamem Rühren bei 37°C inkubiert.

Während der Dispase-Hydrolyse wurden zwölf Percoll-Dichtegradienten vorbereitet. Hierzu wurden in 50 ml-Röhrchen 15 ml Percoll-Lösung A vorgelegt, mit 20 ml Percoll-Lösung B vorsichtig überschichtet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Nach Beendigung der Dispase-Hydrolyse wurden in 18 Zentrifugationsbechern (250 ml) je 100 ml 15 % (w/v) Dextran-Lösung vorgelegt und dann 100 ml der Gewebesuspension zugegeben. Die Ansätze wurden 10 min kräftig geschüttelt und anschließend 10 min bei 8630x g in einem JA-14-Rotor (7500 rpm, Beckmann-Zentrifuge) bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Kapillarsedimente jeweils mit 7,5 ml warmen Medium M199 resuspendiert und auf drei Spinnerflaschen gleichmäßig verteilt. Jeder Spinnerflasche wurde 4 ml Kollagenase-Lösung A und 12 ml Medium M199 zugegeben. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C unter langsamen Rühren. Nun wurde jeder Spinnerflasche 4 ml Kollagenase-Lösung B zugegeben und weitere 75 min unter obigen Bedingungen inkubiert.

Die Kollagenase-Hydrolyse wurde beendet, indem der Inhalt jeweils einer Spinnerflasche auf drei sterile 50 ml-Röhrchen verteilt (je ca. 22,5 ml) und mit Medium M199 ad 45 ml aufgefüllt wurde. Es folgte eine Zentrifugation der Ansätze für 10 min bei 110x g (740 rpm, Centrifuge 5810), um die Zellen zu sedimentieren. Die Überstände wurden verworfen, die Sedimente zunächst vereinigt und dann auf drei 50 ml-Röhrchen verteilt. Dem Auffüllen der Ansätze mit Medium auf 45 ml folgte erneut eine Zentrifugation unter obigen Bedingungen. Die Überstände wurden wieder verworfen und die Zellsedimente jeweils in 40 ml Medium resuspendiert. Jeder der vorbereiteten Dichtegradienten wurde mit 10 ml der Zellsuspension vorsichtig überschichtet und es folgte eine Dichtegradientenzentrifugation für 10 min bei 1811x g ohne Bremse (3000 rpm, Centrifuge 5810). Nach der Zentrifugation waren drei Banden sichtbar, wobei die Hirnkapillarendothelzellen die mittlere voluminöse, rötliche Bande darstellten. Die unterste Bande war stark rot gefärbt und wurde durch Erythrozyten gebildet. Bei der obersten Bande handelte es sich um eine fettreiche Schicht nahe der Oberfläche, die viele Zelltrümmer enthielt. Die mittleren Banden aller Ansätze wurden mit einer sterilen Pasteurpipette aus den Gradienten abgezogen und auf vier 50 ml-Röhrchen verteilt. Jedes Röhrchen wurde mit Medium auf 40 ml aufgefüllt und 10 min bei 110x g (740 rpm, Centrifuge 5810) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Sedimente vereinigt und erneut mit 40 ml Medium gewaschen.

Um die Kontamination mit Erythrocyten zu verringern, wurde das Zellsediment einer Erythrozyten-Lyse unterzogen. Hierzu wurde 18 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer mit 4,5 ml Earle's-Puffer versetzt und zur Behandlung der Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit 9 ml dieser Lösung resuspendiert und zügig sedimentiert (10 min, 110x g). Diese Behandlung

Tab. 5 Kollagenierung von Kulturgefäßen

| Kulturgefäß | Waschvolumen [ml] | Restvolumen [ml] |
|--------------------------------|----------------------|---------------------|
| T175-Flasche | 12 | 2,5 |
| T75-Flasche | 6 | 1 |
| Kavität (3,5 cm ²) | 1 | 0,2 |

Die Kulturgefäße wurden mit Kollagenlösung ausgespült, wobei nach dem Abziehen der Lösung die oben angegebenen Restvolumina in den Gefäßen verblieben. Es folgte eine Inkubation der Gefäße für mindestens zwei Tage bei 37°C. Vor der Verwendung der Gefäße wurde die restliche Lösung ohne zusätzlichen Waschschrift entfernt.

4.2.2.2 Aussaat von BMEC

Da isolierte BMEC traubenartige Zellhaufen bilden, war eine exakte Zellzählung mittels Zählkammer nicht möglich. Die Zellpräparationen wurden deshalb nach einem standardisiertem Verfahren ausgesät.

Das Zellsediment der Isolierung von Hirnkapillarendothelzellen (4.2.1) wurde mit 40 ml Kulturmedium resuspendiert. In 28 T175-Flaschen wurden je 19 ml Medium vorgelegt und dann 1,4 ml der Zellsuspension zugegeben. Sollten die Zellen in zwei 12-Loch-Kulturplatten ausgesät werden, wurden 700 µl der Zellsuspension mit Kulturmedium ad 25 ml aufgefüllt. In jeder Kavität wurde 1 ml Medium vorgelegt, dann erfolgte die Zugabe von 1 ml der verdünnten Zellsuspension. Die Kulturgefäße wurden langsam in Form einer Acht bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in den Kulturflaschen zu erreichen. Nach einer Inkubation von 15 min in der Sterilbank, erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen in einem Brutschrank über Nacht. Am nächsten Tag (Tag 1) erfolgte ein Wechsel des Mediums, um nicht-adhärenente Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die so erhaltenen Primärkulturen waren in der Regel am Tag 3 bis zur Konfluenz gewachsen.

4.2.2.3 Passagieren von Zellen

Das Passagieren kultivierter Zellen erfolgte unter Einsatz der Protease Trypsin. Da serumhaltige Medien Trypsininhibitoren beinhalten, mussten die Zellen vor der Hydrolyse mit Puffer gewaschen werden. Hierzu wurde steriler PBS⁻-Puffer verwendet, der weder Ca²⁺- noch Mg²⁺- Ionen enthält. Das Lösen der Zellen wurde somit begünstigt, da diese bivalenten Ionen die Zelladhäsion verstärken.

Trypsinlösung 0,25 % (w/v) Trypsin in PBS⁻-Puffer

Die im Folgenden aufgeführten Volumina beziehen sich auf T175-Flaschen, die hauptsächlich Verwendung fanden. Die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml PBS⁻-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Kulturflaschen hochkant gestellt, 7,5 ml PBS⁻-Puffer vorgelegt und 2,5 ml warme Trypsinlösung zugegeben. Die Flaschen wurden in die Waagrechte gebracht, so dass die Trypsin-Verdünnung den Zellrasen gleichmäßig bedeckte. Nach einer Inkubation von 2 min wurden die Flaschen gegen eine Tischkante geschlagen, um die Zellen vom Untergrund zu lösen. Sobald die Zellen, bis auf kleinere Kluster, abgelöst waren, mussten die Flaschen wieder senkrecht gestellt und die Hydrolyse zügig durch Zugabe von 10 ml serumhaltigen Medium gestoppt werden. Die Zellsuspensionen zweier Kulturflaschen wurden in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt und die Zellen 10 min bei 110x g (740 rpm, Centrifuge 5810) sedimentiert. In vier neuen Kulturflaschen wurde währenddessen 20 ml Kulturmedium vorgelegt. Das Zellsediment wurde nun mit 8 ml Medium vorsichtig resuspendiert und zu je 2 ml auf die vier Kulturflaschen verteilt. Die Flaschen wurden langsam in Form einer Acht bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Kulturflasche zu erreichen. Nach einer Inkubation von 15 min in der Sterilbank erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen in einem Brutschrank.

Das oben angegebene 1:2-Verhältnis der Aufteilung der Zellen zweier Flaschen auf vier neue Flaschen bezieht sich auf die erste Passage von BMEC. Die zweite Passage von BMEC wurde in einem Verhältnis von 1:1,5 durchgeführt.

4.2.2.4 Kultivierung von C6-Zellen

Bei den C6-Zellen handelt es sich um Glioma-Zellen aus Ratte. Die Kultivierung dieses Zellstammes erfolgt in nicht-beschichteten Kulturgefäßen unter Verwendung des serumhaltigen Mediums M 199 in Gegenwart von Antibiotika (s. Tab. 4). Das Passagieren der Zellen erfolgte wie für BMEC beschrieben, allerdings mit einem 1:3-Verhältnis der Aufteilung der Zellen auf neue Kulturgefäße.

4.2.3 Zellfärbungen

4.2.3.1 Vitalitätsfärbung von Zellen

(Rotman und Papermaster, 1966)

Die durchgeführte Vitalitätsfärbung entspricht einer modifizierten Färbung von Zellen mittels Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid. Vitale Zellen können Fluoresceindiacetat aufnehmen und hydrolysieren es zu dem nicht-membrangängigen Fluorescein. Vitale Zellen fluoreszieren somit bei Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge (450 nm) im Gegensatz zu nicht-vitalen Zellen grün.

Der nicht-membrangängige rot-fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid wird hingegen von vitalen Zellen nicht aufgenommen. Tote Zellen, deren Membranen permeabler sind, nehmen den Farbstoff auf und fluoreszieren somit bei Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge (488 nm) rot.

| | | |
|-----------------------|--|------------------------------------|
| FDA-Stammlösung | 5 mg/ml | Fluoresceindiacetat in Aceton |
| FDA-Arbeitslösung | 1:500 Verdünnung der FDA-Stammlösung in PBS ⁻ | |
| Filter _{FDA} | 450 nm | Exzitation |
| | 515 nm | Emission |
| PI-Stammlösung | 5 mg/ml | Propidiumiodid in PBS ⁻ |
| PI-Arbeitslösung | 1:10 Verdünnung der PI-Stammlösung in PBS ⁻ | |
| Filter _{PI} | 488 nm | Exzitation |
| | 615 nm | Emission |
| Färbelösung | 15,4 % (v/v) | FDA-Arbeitslösung |
| | 7,7 % (v/v) | PI-Arbeitslösung |
| | 76,9 % (v/v) | PBS ²⁺ |

Die Durchführung der Vitalfärbungen erfolgte in Kulturplatten mit 12 Kavitäten, in denen die Zellen direkt oder auf Deckgläschen kultiviert wurden. Zuvor einer Markierung unterzogene Zellen wurden ohne weitere Waschschrte der Vitalfärbung unterzogen. Bei nicht-markierten Zellpopulationen wurde jede Kavität vor der Färbung zweimal mit je 500 µl PBS²⁺-Puffer gewaschen.

Die Vitalfärbung erfolgte durch Zugabe von 300 µl Färbelösung pro Kavität gefolgt von einer Inkubation bei 37°C für zehn Minuten. Anschließend wurde jede Kavität zweimal mit je 500 µl PBS²⁺-Puffer gewaschen. Es folgte die zügige Kontrolle der Zellfärbung mit der Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops. Hierbei wurden die Kulturplatten direkt betrachtet oder die Deckgläschen auf Objektträger gegeben.

Alternativ konnten auch Zellsuspensionen einer Vitalitätsfärbung unterzogen werden. Hierzu wurden 4 µl FDA-Arbeitslösung, 2 µl PI-Arbeitslösung und 20 µl Zellsuspension vereinigt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Tropfen des Ansatzes auf einen Objektträger überführt und die Zellfärbung wie oben beschrieben kontrolliert.

4.2.3.2 Fixieren von Zellen

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen, die einer Immun- oder Affinitätsfärbung unterzogen werden sollten, wurden einmal mit PBS⁻-Puffer und einmal mit PBS²⁺-Puffer gewaschen und anschließend 15 min in eiskaltem Methanol fixiert. Die Deckgläschen wurden getrocknet, mit 20 % (w/v) Saccharose überschichtet und mindestens 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen der Saccharose-Lösung konnten die Zellen bei -20°C gelagert werden.

4.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Zellen wurden Erstantikörper unterschiedlicher Spezifität aus verschiedenen Organismen eingesetzt. Bei den Zweitantikörper handelte es sich um Antikörper-Konjugate mit den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen Cy2 oder Cy3. Diese Fluorophore konnten mit der Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Axiovert 200) detektiert werden. Zusätzlich wurden die Nuclei der Zellen mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt.

| | |
|-----------------------|--|
| Blocklösung I | 0,1 % (v/v) Triton X-100 3 % (w/v) BSA in PBS ⁻ -Puffer |
| Ak-Lösung | 1:30 Verdünnung der Blocklösung I in PBS ⁻ -Puffer |
| DAPI-Stammlösung | 2 mg/ml DAPI in Methanol |
| Erstantikörperlösung | Verdünnung der Antikörper (s. Tab. 6) mit Ak-Lösung |
| Zweitantikörperlösung | Verdünnung der Antikörper (s. Tab. 7) mit Ak-Lösung |
| DAPI-Arbeitslösung | 1:2000 Verdünnung der Stammlösung mit PBS ⁻ -Puffer |

Tab. 6 Erstantikörper der Immunfluoreszenzfärbungen

| Antikörper | Wirt | Spezifität | Verdünnung |
|--------------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| anti- α -sm-Actin | Ms | Perizyten | 1:1000 |
| anti-Glut1 | Rb | BMEC | 1:1000 |
| anti-vWF | Rb | Endothel | 1:100 |
| anti-ZO-1 | Rt | BMEC | 1:1000 |
| anti-MMP10 | Ms | MMP10 (Hu) | 1:400 |
| anti-MRP2 | Gt | MRP2 (Hu) | 1:400 |

Tab. 7 Zweitantikörper der Immunfluoreszenzfärbungen

| Antikörper | Wirt | Spezifität | Verdünnung |
|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| anti-Rb / Cy3 | Gt | IgG (Rb) | 1:100 |
| anti-Ms / Cy2 | Gt | IgG (Ms) | 1:100 |
| anti-Ms / Cy3 | Gt | IgG (Ms) | 1:100 |
| anti-Rt / Cy3 | Gt | IgG (Rt) | 1:100 |
| anti-Gt / Cy3 | Do | IgG (Gt) | 1:100 |

Bei den Zielzellen handelte es sich um Methanol-fixierte Zellen auf Deckgläschen. Bei den Block-, Wasch und DAPI-Schritten wurden pro Kavität 300 μ l Lösung eingesetzt. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte jeweils in einem Volumen von 200 μ l.

| | | | |
|-----------------|------|-----|--------------------------|
| Blocken | 30 | min | Blocklösung I |
| Erstantikörper | 30 | min | Erstantikörperlösung |
| Waschen 1 | 3x 5 | min | PBS ⁻ -Puffer |
| Zweitantikörper | 30 | min | Zweitantikörperlösung |
| Waschen | 5 | min | PBS ⁻ -Puffer |
| DAPI | 2 | min | DAPI-Arbeitslösung |
| Waschen 3 | 5 | s | PBS ⁻ -Puffer |
| Waschen 4 | 5 | min | PBS ⁻ -Puffer |
| Waschen 5 | 5 | min | aqua bidest. |

Nach dem Trocknen der Deckgläschen mussten die Zellen mit Kaisers Glyceringelatine auf einem Objektträger versiegelt und dunkel gelagert werden.

4.2.3.4 Affinitätsfärbung von Zellen

Diese Methode wurde angewandt, um biotinylierte, iminobiotinylierte oder ImBAS-markierte Zellen mit der Hilfe des Alkalische-Phosphatase-Systems zu färben. Zum Einsatz kam hierbei ein Enzym-Streptavidin-Konjugat. Die Bedingungen sind wie in 4.1.6.3 auf die pH-abhängige Interaktion zwischen Streptavidin und Iminobiotinderivaten abgestimmt.

Um Hintergrundfärbung aufgrund zelleigener Alkalischer Phosphatasen zu verhindern, enthielt die Substratlösung Levamisol, einen spezifischen Inhibitor der Alkalischen Phosphatase. Das Enzym des Enzym-Streptavidin-Konjugates stammt aus bovinem Darm. Alkalische Phosphatase intestinaler Herkunft wird durch Levamisol, im Gegensatz zu denen anderer Herkunft, nur schwach inhibiert (van Belle, 1972). Das Enzym-Streptavidin-Konjugat konnte demzufolge zum Nachweis der Zellmarkierung eingesetzt werden, ohne starke Hintergrundfärbungen aufgrund zellimmanenter Enzyme zu erhalten.

| | | | |
|--------------------------------------|---|---------|---------------------------|
| Blocklösung A | 50 | mM | NH_4HCO_3 |
| pH 10,0 | 500 | mM | NaCl |
| | 0,1 | % (v/v) | Triton X-100 |
| | 3 | % (w/v) | BSA |
| Waschlösung | 1:30 Verdünnung der Blocklösung | | |
| pH 10,0 | mit 50 mM NH_4HCO_3 (pH10) | | |
| Konjugat-Lösung | Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (1 : 8000) in Waschlösung | | |
| Substratlösung | 33 μl Levamisol-Lösung (400 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | | |
| | 33 μl NBT-Lösung | | |
| | 16,5 μl BCIP-Lösung | | |
| | mit AP-Puffer ad 4 ml | | |
| Blocken | 60 | min | Blocklösung A |
| Waschen 1 | 2x 10 | s | Waschlösung |
| Binden | 60 | min | Konjugat-Lösung |
| Waschen 2 | 2x 5 | min | Waschlösung |
| Umpuffern | 10 | min | AP-Puffer |
| Substratreaktion bis Banden sichtbar | | | Substratlösung |
| Stoppen | > 10 | min | Stopp-Puffer |

Die Färbung wurde mit fixierten Zellen auf Deckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten durchgeführt. Das Volumen der eingesetzten Lösungen pro Kavität lag bei 500 µl. Die Substratreaktion wurde mit der Hilfe eines Mikroskops verfolgt und bei der gewünschten Signalintensität gestoppt. Nach dem Trocknen der Deckgläschen konnten die Zellen mit Kaisers Glyceringelatine auf einem Objektträger versiegelt werden.

4.3 Massenspektrometrische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Einsatz der Matrix-unterstützten-Laserdesorption-Ionisation-Massenspektrometrie. Mit dieser als MALDI-MS bezeichneten Analysetechnik können Molmassen von Peptiden mit hoher Auflösung bestimmt werden. Die Probe wird hierzu in eine Matrix aus niedermolekularen, organischen Molekülen eingebettet, die bei der Wellenlänge des verwendeten Lasers eine hohe Absorption aufweisen. Als Matrixsubstanzen finden in der Proteinanalytik häufig α -Cyano-4-hydroxizimtsäure (CCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder Sinapinsäure Verwendung. Matrix und Analyt können gemeinsam oder nacheinander auf den Probenhalter gegeben werden. Das Matrixmaterial liegt dabei in einem 10^3 - bis 10^5 -fachen Überschuss vor. MALDI-MS beruht auf der Übertragung der durch die Matrixmoleküle absorbierten Laserenergie auf den Analyten. Dieser Vorgang findet im Hochvakuum statt, bei kurzweiligen Laserimpulsen mit einer Dauer von wenigen Nanosekunden. Die übertragene Energie bewirkt die Ionisation und die Desorption, d. h. das Herauslösen, des Analyten aus der Matrix im explosionsartig verlaufenden MALDI-Prozess. Der in der Gasphase ionisiert vorliegende Analyt erfährt nun eine Beschleunigungsspannung von 20-30 kV. Da alle Ionen die gleiche Beschleunigungsenergie erfahren, werden sie abhängig von ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt. Peptide liegen bei dieser Methode in der Regel einfach protoniert, d. h. einfach positiv geladen mit einem Massenzuwachs von 1, vor. Die Bestimmung der Peptidmasse kann somit über die Messung der Zeit, die das Ion zur Passage einer definierten, feldfreien Driftstrecke benötigt, erfolgen. Die hierzu eingesetzten Flugzeitmassenspektrometer werden auch ToF-Analysatoren (*Time of Flight*) genannt. Zur Verbesserung der Auflösung wird die Beschleunigungsspannung erst einige Nanosekunden nach der Ionisierung angelegt. Dies führt dazu, dass Peptide, die schon während des MALDI-Prozesses in Richtung Driftstrecke beschleunigt wurden, nicht mehr die volle Beschleunigung im elektrischen Feld erfahren. Man spricht hierbei von einer verzögerten Extraktion (DE, *delayed extraction*).

Die Arbeiten wurden an einem Voyager-DETM PRO-Massenspektrometer (PE Biosystems) durchgeführt.

4.3.1 Probenvorbereitung

4.3.1.1 Hydrolyse von Proteinen

Zur partiellen Hydrolyse von Proteinen im Gel wurde die Proteinase Trypsin verwendet. Trypsin spaltet Polypeptide spezifisch carboxyterminal der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Abhängig von der jeweiligen Aminosäuresequenz entsteht somit für jedes Protein ein spezifisches Set an Peptiden. Bei dem verwendeten Trypsin aus Schweinepankreas handelte es sich um ein modifiziertes Enzym. Aufgrund reduktiver Methylierung seiner Lysinreste (Rice, et al., 1977), war die Fähigkeit des Enzyms zur Autolyse eingeschränkt. Somit waren in der späteren Analytik mittels Massenspektrometrie (MS) eine geringere Anzahl an Trypsinfragmenten zu erwarten.

| | | | |
|---------------------|----|----|----------------------------------|
| Hydrolyse-Puffer | 50 | mM | NH ₄ HCO ₃ |
| pH nicht einstellen | | | |

| | | | |
|---------------------|-----|-------|---|
| Trypsin-Stammlösung | 500 | ng/μl | Trypsin (<i>sequencing grade, modified</i>) |
| | 1 | mM | HCl |

Trypsin-Arbeitslösung 1 : 10 Verdünnung der Trypsin-Stammlösung mit 1 mM HCl

Im Gel vorhandene Puffersalze und Detergentien, die die Hydrolyse beeinträchtigen könnten, wurden vor der enzymatischen Reaktion durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die Gelstücke lagen dabei in silikonisierten 0,5 ml Minireaktionsgefäßen der Firma Biozyme vor.

| | | | |
|------------|-------|-----|-------------------------|
| Waschen 1 | 3x 20 | min | HPLC-H ₂ O |
| Waschen 2 | 20 | min | 50 % (v/v) Acetonitril |
| Entwässern | 20 | min | 100 % (v/v) Acetonitril |

Nach dem vollständigen Entfernen des Acetonitrils wurden die Gelstücke bei Raumtemperatur getrocknet. Den Gelstücken wurde 1 μl der Trypsin-Arbeitslösung und 20 μl des Hydrolyse-Puffers zugegeben. Der Ansatz wurde 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend bis zur MS-Analyse bei -20°C gelagert.

4.3.1.2 Anreicherung von Peptiden

Die Peptide der Hydrolyseüberstände aus 4.3.1 wurden mit Zip-Tip-Pipettenspitzen angereichert. Dabei handelt es sich um Pipettenspitzen, die immobilisiertes C₁₈-Material enthalten. Das Prinzip der Anreicherung entspricht dem einer Umkehrphasen-

Chromatographie. An das unpolare C₁₈-Material binden die Peptide zunächst aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Nach mehreren wässrigen Waschschrritten können die Peptide dann mit einem unpolaren Lösungsmittel eluiert werden. Die Elution der Peptide kann dabei mit Matrixlösung direkt auf den Maldiprobenteller erfolgen (4.3.2).

Der Hydrolyseansatz wurde nach Zugabe von 20 µl 0,2 % (v/v) TFA 20 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 4 µl 2 % (v/v) TFA zugesetzt, um dessen pH-Wert zu senken. Der so vorbereitete Hydrolyseüberstand wurde dann für die Anreicherung der Peptide eingesetzt. Die Zip-Tip-Pipettenspitzen wurden dabei mit der Hilfe einer 10 µl-Pipette wie folgt gehandhabt:

| | | | | |
|---------------|-----------|----|-------------------------------------|--------------------|
| Befeuchten | 3x 10 | µl | 50 % (v/v) | Acetonitril |
| Äquilibrieren | 3x 10 | µl | 0,1 % (v/v) | Trifluoressigsäure |
| Probenauftrag | 20x 10 | µl | Hydrolyseüberstand, nicht verwerfen | |
| Waschen | 5x 10 | µl | 0,1 % (v/v) | Trifluoressigsäure |
| Eluieren | 2 | µl | Matrixlösung, wiederholt aufziehen | |
| | oder 5 | µl | 50 % (v/v) | Acetonitril |
| | | | 0,1% (v/v) | Trifluoressigsäure |

4.3.2 MALDI-MS im Reflektor-Modus

Die Identifizierung von Proteinen anhand ihres Peptidgemisches nach enzymatischer Hydrolyse mittels Datenbankabfrage ist im starken Maße von der Genauigkeit der Massenbestimmung abhängig. Ein Problem der MALDI-MS ist die ungleichmäßige Energieverteilung bei Ionen gleicher Masse. Zu dieser kommt es z. B. aufgrund verzögerter Ionenbildung in der Gasphase oder durch Abschirmungseffekte während der Ionisierung.

Neben der bereits erwähnten verzögerten Extraktion stellt der Einsatz eines Ionenspiegels bzw. eines Reflektors eine Möglichkeit dar, die Auflösung der Spektren zu erhöhen. Das Funktionsprinzip eines solchen Reflektors beruht auf der Richtungsumkehr der Ionen in einem elektrischen Feld. Dieses ist dem ursprünglichen Beschleunigungsfeld entgegengesetzt und schließt sich der Driftstrecke des Flugrohrs unmittelbar an. Ionen identischer Masse mit jedoch abweichender Startenergie dringen unterschiedlich weit in das Gegenfeld ein, erfahren eine entgegengesetzte Beschleunigung und werden reflektiert. Ionen höherer Startenergie legen dabei im Reflektor einen weiteren Weg zurück und holen Ionen niedrigerer Energie an einem Fokussierungspunkt wieder ein. Ein an dieser Stelle positionierter Detektor kann so diese Ionen gleicher Masse mit hoher Auflösung erfassen.

Neben dieser gerätespezifischen Verbesserung kann die Massengenauigkeit durch Kalibrierungen während der Messung erhöht werden. Hierzu wurde in unmittelbarer

Nachbarschaft zur Probe ein Kalibriermix von fünf Peptidstandards auf dem Probeneller präpariert. Von diesem wurde ein Spektrum aufgenommen und das Gerät mit der Hilfe dieser Daten kalibriert. Zusätzlich erfolgte eine interne Kalibrierung der Spektren, sofern autolytische Peptide des Trypsins detektiert wurden.

Während der Auswertung der Spektren wurden kontaminierende Signale verworfen. Dabei handelte es sich z. B um Matrixmassen, Keratinpeptide oder autolytische Peptide des Trypsins. Eine empirische Liste dieser Signale ist im Anhang dargestellt.

Standard 1 und 2

| | | | |
|----------------------|--------------------|---------------|-------------|
| des-Arg1-Bradykinin | M+H ⁺ = | 904,4681 m/z | 1,0 pmol/μl |
| Angiotensin 1 | M+H ⁺ = | 1296,6853 m/z | 3,3 pmol/μl |
| Glu1-Fibrinopeptid B | M+H ⁺ = | 1570,6774 m/z | 1,3 pmol/μl |
| ACTH (1-17) | M+H ⁺ = | 2093,0867 m/z | 2,0 pmol/μl |
| ACTH (18-39) | M+H ⁺ = | 2465,1989 m/z | 1,5 pmol/μl |

Autolytische Peptide des Trypsins

| | | |
|-------------------|--------------------|---------------|
| Trypsin (108-115) | M+H ⁺ = | 842,5094 m/z |
| Trypsin (58-77) | M+H ⁺ = | 2211,1040 m/z |

Tab. 8 MALDI-Einstellungen im Reflektor-Modus

| Einstellungen | Peptidsets | Synthesen |
|-----------------------------|-------------|------------|
| Beschleunigungsspannung | 20 kV | 20 kV |
| <i>grid voltage</i> | 75 % | 75 % |
| <i>mirror voltage ratio</i> | 1,12 | 1,12 |
| <i>guide wire 0</i> | 0,02 % | 0 % |
| <i>extraction delay</i> | 220 ns | 100 ns |
| Massenbereich | 700-3500 Da | 100-600 Da |
| <i>low mass gate</i> | 630 Da | 75 Da |

CCA-Lösung

gesättigte Lösung von α-Cyano-4-hydroxymizsäure in:

0,1 % (v/v) TFA

50 % (v/v) Acetonitril

| | |
|--------------|--------------------------------------|
| Matrixlösung | 1:4 - Verdünnung der CCA-Lösung mit: |
| | 0,1 % (v/v) TFA |
| | 50 % (v/v) Acetonitril |

Auf die einzelnen Positionen des Proben-tellers konnten die Proben direkt mit Matrixlösung eluiert werden, sofern zuvor eine Anreicherung der Peptide durchgeführt wurde (4.3.1.2). Bei konventioneller Präparation der Probe wurde zunächst 400 µl Matrixlösung vorgelegt und dann 400 µl Probenlösung zugesetzt und gemischt. Die Probe sollte dabei 0,01-0,2 % (v/v) TFA enthalten.

4.4 Chemische Synthesen

4.4.1 Darstellung von ϵ -Aminocapronsäure

(Meyers und Miller, 1952)

In der Synthese von Iminobiotinylaminocapronsäure (ImBAS) (4.4.2) sollte neben der undeuterten ϵ -Aminocapronsäure eine D10- ϵ -Aminocapronsäure eingesetzt werden. Die deuterierte Variante der ϵ -Aminocapronsäure war allerdings nur in ihrer Lactamform kommerziell erhältlich. Das D10-Caprolactam musste somit mittels säurekatalysierter Hydrolyse zu ϵ -Aminocapronsäure-Hydrochlorid umgesetzt und durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt werden.

4.4.1.1 Hydrolyse von Caprolactam

Caprolactam (500 mg) wurde mit 15 ml aqua bidest. gelöst. Nach Zugabe von 4,5 ml 37 % (v/v) HCl erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für eine Stunde in einem Ölbad bei 125°C unter Rühren. Anschließend wurde der Ansatz i. Vak. bis zur Trockne eingengt.

4.4.1.2 Reinigung der ϵ -Aminocapronsäure

Das Produkt aus 4.4.1.1 besteht hauptsächlich aus ϵ -Aminocapronsäure-Hydrochlorid. Unter Verwendung eines starken Anionentauschers wurde das Produkt chromatographisch gereinigt, um für die weitere Synthese die freie Form der ϵ -Aminocapronsäure zu erhalten. Reste des Eduktes ϵ -Caprolactam konnten durch diesen Schritt nicht entfernt werden, waren allerdings im NMR-Spektrum des Produktes nicht nachweisbar.

Das Produkt aus 4.4.1.1 wurde in 5 ml aqua bidest. gelöst und die freie Form der ϵ -Aminocapronsäure wurde unter Verwendung von Macro-Pep Q-Säulenmaterial chromatographisch gereinigt.

Säule 5 ml Macro-Pep Q-Säulenmaterial in 20 ml Glassäule mit Fritte
 Silbernitratlösung 5 % (w/v) AgNO_3

| | | | | | |
|------------------------------------|------------|----|-----|---------|----------------------|
| Waschen | 3x 5 | ml | 1 | M | NaCl |
| Erschöpfen | bis pH 3-4 | | 0,5 | M | HCl |
| Vorbereiten | bis pH 8-9 | | 1 | % (w/v) | NaOH |
| Waschen 1 | bis pH 7 | | | | H_2O |
| Waschen 2 | 38 | ml | | | H_2O |
| bis AgNO_3 – Test negativ | | | | | |
| Probenauftrag | 5 | ml | | | Probe |
| Waschen 3 | 4x 5 | ml | | | H_2O |

Waschschritt 2 wurde durchgeführt, bis sich bei Zugabe eines Tropfens 5 % (w/v) AgNO_3 zum Eluat keine Trübung durch AgCl mehr zeigte. Nun erfolgte das vorsichtige Auftragen der Probe. Der Durchbruch und die nachfolgenden Waschlösungen (Waschen 3) wurden vereinigt und i. Vak. bis zur Trockne eingengt. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte mit 1 M NaCl, gelagert wurde die Säule in 20 % (v/v) Ethanol bei 4°C.

Der getrocknete Ansatz wurde mit 2 ml aqua bidest. gelöst und das Verhältnis Probe : Ethanol : Diethylether von 1 : 3 : 5 eingestellt. Der Ansatz wurde kräftig geschüttelt und aus dem Kolben in ein 50 ml Glaszentrifugenröhrchen überführt. Der Kolben wurde zweimal mit 5 ml Diethylether ausgespült und diese Waschlösungen mit dem Ansatz vereinigt. Die gefällte Aminocapronsäure wurde 10 min bei 260x g in einer Zentrifuge (1000 rpm, Variofuge) sedimentiert. Der Überstand wurde abgezogen, getrocknet, mit 2 ml aqua bidest. gelöst und erneut einer Fällung unterzogen. Der zweite Überstand wurde ebenfalls abgezogen, getrocknet, mit 0,5 ml aqua bidest. gelöst und erneut einer Fällung unterzogen. Die Sedimente wurden vereinigt, mit Ethanol gewaschen und i. Vak. zur Trockne eingengt. Die Identität des Produktes wurde mittels MALDI-MS (4.3.2) und NMR-Spektroskopie überprüft. Die Messung der NMR-Spektren erfolgte am Institut für organische Chemie der TU Darmstadt.

4.4.2 Synthese von Iminobiotinylaminocaprinsäure

Die starke Interaktion von Biotin und Avidin bzw. Streptavidin wird in vielen biochemischen Anwendungen genutzt. Aufgrund der hohen Affinität des Biotins zu (Strept-)Avidin, kann die Interaktion dieser Moleküle nur unter stringenten Bedingungen (z. B. pH 1,5 bei 6-8 M Guanidinhydrochlorid) gelöst werden. Sollen biotinylierte Proteine über Affinitätschromatographie gereinigt werden, führen die oben genannten Bedingungen während der Elution von der Säule zur Denaturierung der Zielproteine und zur Schädigung des Säulenmaterials. Ein alternatives „Biotinylierungs“-Reagenz stellt Iminobiotin, das Guanidino-Analogon des Biotins, dar. Dieses zeigt mit Streptavidin ein pH-abhängiges Bindeverhalten (Abb. 14).

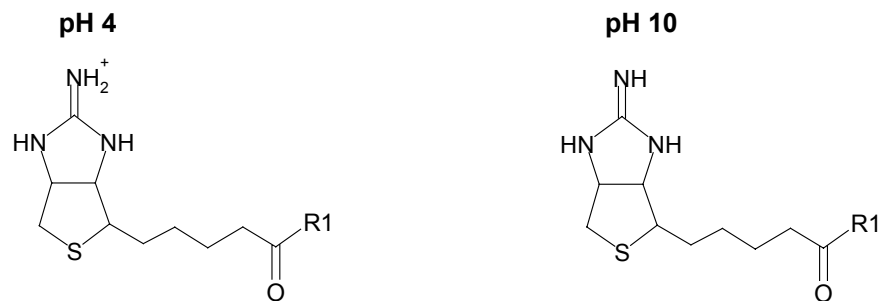


Abb. 14 pH-Abhängigkeit des Iminobiotins

Während Iminobiotin bei pH-Werten >9.5 Streptavidin mit K_d -Werten von $3,5 \times 10^{-11}$ bindet, kann die Elution bei pH 4 ($K_d < 10^{-3}$) unter milden Bedingungen erfolgen (Fudem-Goldin und Orr, 1990). Als kommerziell erhältliches Reagenz zur Iminobiotinylierung steht bisher nur *EZ-Link-NHS-Iminobiotin* (Pierce) zur Verfügung.

Durch die Kopplung von NHS-Iminobiotin mit ϵ -Aminocaprinsäure wurde die Iminobiotin-Aminocaprinsäure (ImBAS, Abb. 15) hergestellt und mittels Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt. Dieses Reagenz war, in den weiteren Versuchen, die Ausgangssubstanz der Etablierung alternativer Iminobiotinylierungsreaktionen.

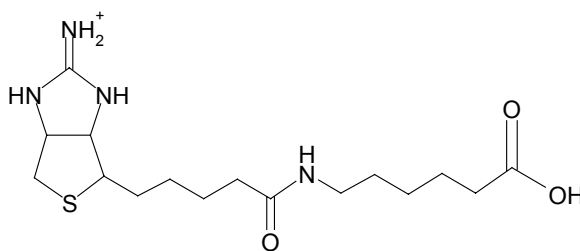


Abb. 15 Iminobiotinylaminocapronsäure (ImBAS)

4.4.2.1 Kopplung von ϵ -Aminocapronsäure an Iminobiotin

| | | | |
|----------------|-----|-------|---|
| Phosphatpuffer | 8 | mM | Na_2HPO_4 |
| pH 7,4 | 1,5 | mM | KH_2PO_4 |
| ACS-Lösung | 4 | mg/ml | ϵ -Aminocapronsäure in Phosphatpuffer |

In einem 50 ml Glasrundkolben wurde 100 ml ACS-Lösung vorgelegt und 100 mg NHS-Iminobiotin (gelöst in 800 μl DMF) langsam zugesetzt. Nun erfolgte unter Rühren die Zugabe von DMF (ca. 9 ml), bis der Ansatz klar war. Eine Inkubation bei 4°C über Nacht wurde angeschlossen. Der Ansatz wurde dann i. Vak. bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Ansatz wurde mit 40 ml Ethanol aus dem Kolben aufgenommen. Die überschüssige, Ethanol-unlösliche ϵ -Aminocapronsäure wurde mit der Hilfe eines Büchner-Trichters (doppeltes Filterpapier) abfiltriert. Der Filter wurde dreimal mit je 20 ml Ethanol gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und i. Vak. bis zur Trockne eingengt. Die Ausbeute an der als $\text{ImBAS}_{\text{roh}}$ bezeichneten Ethanol-löslichen Fraktion wurde bestimmt. Anschließend wurde der Ansatz erneut mit Ethanol gelöst, à 5 mg $\text{ImBAS}_{\text{roh}}$ aliquotiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

4.4.2.2 Reinigung der Iminobiotinylaminocapronsäure

Die Reinigung von ImBAS erfolgte mittels Umkehrphasen-Chromatographie an n-Octadecyl-Material. Bei dieser Methode bindet der Analyt aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zunächst an das unpolare Säulenmaterial. Durch steigende Konzentrationen eines unpolaren, organischen Lösungsmittels erfolgt dann die Elution des Analyten bei einer spezifischen Konzentration. Dies ermöglicht die hoch auflösende Trennung komplexer

Gemische. Die Arbeiten fanden mit Lösungsmitteln von HPLC-Qualität statt. Wässrige Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. Die Trennungen wurden mit der Hilfe eines Äkta-Chromatographiesystems (APB) durchgeführt.

| | | |
|--------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Material | Nucleosil C ₁₈ 120-5µm | |
| Säulenvolumen (SV) | 2 ml | |
| Fluss | 1 ml/min | |
| Probe | 5-6 mg ImBAS in 1 ml Puffer A | |
| Puffer A | 0,065 % (v/v) | Trifluoressigsäure |
| Puffer B | 100 % (v/v) | Acetonitril |

Ein Aliquot ImBAS_{roh} (5 mg, vgl. 4.4.2.1) wurde in 1 ml Puffer A gelöst und nach Zentrifugation (10 min, 20.000x g) in zwei Hüben à 500 µl auf die Säule appliziert. Der darauf folgende Chromatographie-Ablauf ist in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9 Chromatographie von ImBAS an C₁₈-Material

| Funktion | Volumen [SV] | Konzentration B [%] |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------|
| Vorbereiten | 2 | 0 |
| Äquilibrieren | 5 | 0 |
| Probenauftrag | 2x 0,25 | 0 |
| Waschen | 2 | 0 |
| Gradient 1 | 2 | 0 – 25 |
| Gradient 2 | 6 | 25 – 30 |
| Gradient 3 | 1 | 30 – 100 |
| Reinigen | 4 | 100 |
| Gradient 4 | 2 | 100 – 0 |

SV : Säulenvolumen

Während der Chromatographie wurden die Leitfähigkeit und die Absorption bei 215 nm detektiert und die einzelnen Fraktionen manuell gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels MALDI-MS (4.3.2) identifiziert. Die ImBAS-haltigen Fraktionen mehrerer Chromatographien wurden vereinigt, i. Vak. bis zur Trockne eingengt und zusätzlich 3 Stunden bei 100°C im Vakuum getrocknet.

4.4.3 Synthese von Sulfo-NHS-Iminobiotinylaminocaprinsäure

Die Darstellung des Sulfo-NHS-ImBAS, des aktivierten Esters der ImBAS, erfolgte über Festphasensynthese an einem Polystyrol-gebundenem Carbodiimid. Es handelt sich hierbei um Polymer-gebundenes N-Benzyl-N'-cyclohexylcarbodiimid (Abb. 16), das die einfache Entfernung des Harnstoff-Nebenproduktes durch Filtration ermöglicht (Weinshenker, et al., 1988).

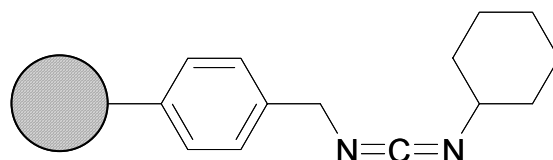


Abb. 16 Polymer-gebundenes N-Benzyl-N'-cyclohexylcarbodiimid

| | | |
|----------------|--|------------------|
| Säulenmaterial | N-Benzyl-N'-cyclohexylcarbodiimid, Polystyrol-gebunden 2 % (w/v) DVB, 1,3- 1,7 mmol/g | |
| DCM/DMF | 60 % (v/v) | Dichlormethan |
| | 40 % (v/v) | Dimethylformamid |
| DCM:DMF (1:1) | 50 % (v/v) | Dichlormethan |
| | 50 % (v/v) | Dimethylformamid |

Tab. 10 Bei SImBAS-Synthese eingesetzte Verhältnisse

| Substanz | Äquivalent | Menge [mmol] |
|-----------|------------|--------------|
| ImBAS | 1 | 0,1 |
| Sulfo-NHS | 1,6 | 0,16 |
| BCC | 2 | 0,2 |

Das Produkt (34 mg) der ImBAS-Reinigung (4.4.2.2) wurde mit 750 µl DCM/DMF aus dem Glaskolben in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Kolben wurde zweimal mit 500 µl DCM/DMF gespült und die Waschlösungen mit der ImBAS-Lösung vereinigt. Nach der Zugabe des BCC zur ImBAS-Lösung erfolgte eine Inkubation für 5 min auf einem Vortexer bei RT. Das Sulfo-NHS wurde in 300 µl Dimethylformamid aufgenommen, löste sich aber nicht vollständig. Die Sulfo-NHS-Suspension wurde mit dem ImBAS-BCC-Gemisch in einer

5 ml Einwegspritze vereinigt. Eine Inkubation für 20 h bei RT wurde angeschlossen, während derer der Ansatz konstant langsam gedreht wurde.

Der Reaktionsansatz wurde durch eine 15 ml Einwegsäule mit Fritte und zusätzlich eingelegtem Filterpapier filtriert. Dieser Schritt diente dazu, das BCC, das daran gebundene Isoharnstoffderivat und das überschüssige ungelöste Sulfo-NHS zu entfernen. Die Säule wurde mit 7 ml DCM:DMF (1:1) gewaschen und die Waschlösung mit dem Filtrat vereinigt. Das Filtrat wurde anschließend i. Vak. bis zur Trockne eingengt. Um trotz des verwendeten DMF ein rieselfähiges Produkt zu erhalten, wurde der getrocknete Ansatz einmal mit Diethylether und fünfmal mit Dichlormethan (à 2 ml) gewaschen und erneut getrocknet. Die Lagerung des Produktes *SNHS-ImBAS_{roh}* erfolgte bei – 20°C.

4.5 Markierung und Anreicherung von Proteinen

Zur Markierung von Proteinen wurden ausgehend von ImBAS eine in-situ Aktivierung der freien Säure des Reagenz in Gegenwart von EDC und Sulfo-NHS durchgeführt. Alternativ fanden aktivierte Ester des ImBAS (SNHS-ImBAS), sowie kommerziell erhältliche aminoreaktive Ester des Biotins und Iminobiotins (Pierce) Anwendung.

Zur Oberflächenmarkierung lebender Zellen wurden die Markierungslösungen direkt in die Kulturgefäße gegeben. Bei der Markierung von Proteinen oder Peptiden erfolgte die Zugabe der Markierungslösungen zu einer Lösung des jeweiligen Zielmoleküls.

4.5.1 Markierung löslicher Polypeptide

4.5.1.1 In-situ Aktivierung

Das wasserlösliche Carbodiimid 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) wurde verwendet, um in Gegenwart von Sulfo-NHS aktivierte Ester des ImBAS zu erzeugen.

EDC stellt einen sog. *zero length cross linker* dar, d. h. ein Reagenz, das die Konjugation zweier Moleküle bewirkt, ohne Bestandteil des Produktes zu werden (Grabarek und Gergely, 1990). EDC vermittelt in einer zweistufigen Reaktion die Bildung einer Amidbindung durch die Kondensation eines primärenamins mit einer freien Carboxylsäure. Dabei entsteht zunächst ein aktiviertes, labiles o-Acylisoharnstoff-Intermediat. Diese aktive Verbindung kann dann mit Nukleophilen reagieren und z. B. mit primären Aminen Amidbindungen eingehen. In wässrigen Lösungen ist die Hydrolyse des Intermediates als wichtige Konkurrenzreaktion zu beachten. Wird die Reaktion in Gegenwart von Sulfo-NHS durchgeführt, entsteht ein SNHS-Ester-Intermediat, das eine höhere Stabilität gegenüber Hydrolyse aufweist. Diese SNHS-Ester sind hydrophile aktive Gruppen, die mit primären Aminen von Zielproteinen schnell reagieren und zudem nicht Membran-permeabel sind

(Staros, 1982). Aufgrund ihrer Anfälligkeit gegenüber Hydrolyse können derart aktivierte Ester nicht aus wässrigen Lösungen isoliert werden.

Ausgehend von der freien Säuregruppe des ImBAS wurden dessen SNHS-Ester mit der Hilfe der EDC-Reaktion in Gegenwart von SNHS gebildet. Diese Reaktion erfolgte unmittelbar bevor die Zielproteine der Markierungslösung zugegeben wurden und wurde deshalb als in-situ Aktivierung des ImBAS bezeichnet.

| | | | | |
|--------------|-----|---------|-------------------|-------------------------------|
| ImBAS-Lösung | 4 | mM | ImBAS | } in PBS ⁻ -Puffer |
| EDC-Lösung | 100 | mM | EDC | |
| SNHS-Lösung | 300 | mM | Sulfo-NHS | |
| βME-Lösung | 1 | % (v/v) | β-Mercaptoethanol | |

Die obigen Stammlösungen wurden erst unmittelbar vor ihrem Einsatz in PBS⁻-Puffer angesetzt. Das ImBAS aus 4.4.2.2 wurde mit der Hilfe einer Ultraschallbehandlung in PBS⁻-Puffer gelöst. Im ersten Schritt der Markierung erfolgte die Aktivierung des ImBAS durch eine 15-minütige Inkubation des folgenden Ansatzes:

| | | | |
|-------------------|-----|----|--------------------------|
| Markierungslösung | 750 | μl | ImBAS-Lösung |
| | 80 | μl | EDC-Lösung |
| | 67 | μl | SNHS-Lösung |
| | 3 | μl | PBS ⁻ -Puffer |

Anschließend wurde die Markierungslösung durch Zugabe von 12,6 μl βME-Lösung auf 1 mM β-Mercaptoethanol eingestellt und weitere 5 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt erfolgte, um einen Teil des überschüssigen EDC zu neutralisieren. Höhere Konzentrationen mussten jedoch aufgrund der Zytotoxizität des β-Mercaptoethanols vermieden werden.

Im zweiten Schritt der Markierungsreaktion wurde der Ansatz mit dem Zielmolekül supplementiert. Nach Zugabe von 100 μl Peptidlösung (1 mg/ml) folgte eine Inkubation von 2 Stunden auf einem Schüttler. Die endgültigen Markierungsbedingungen waren somit:

| | | | | |
|------------------------|-----|-------|--------------|-------------------------------|
| Markierungsbedingungen | 3 | mM | ImBAS | } in PBS ⁻ -Puffer |
| | 8 | mM | EDC | |
| | 20 | mM | SNHS | |
| | 0,1 | mg/ml | Modellpeptid | |

Die Ansätze wurden nach der Markierung mittels Umkehrphasen-Chromatographie getrennt (4.5.1.3) oder bei -80°C gelagert.

| | | |
|----------|--|-------------|
| Probe | 250 µl Markierungsansatz + 250 µl Puffer A | |
| Puffer A | 0,065 % (v/v) | TFA |
| Puffer B | 100 % (v/v) | Acetonitril |

Tab. 12 Chromatographie markierten Modellpeptides an C₂/C₁₈-Material

| Funktion | Volumen [SV] | Konzentration B [%] |
|---------------|-----------------|------------------------|
| Äquilibrieren | 5 | 0 |
| Probenauftrag | (0,5 ml) | 0 |
| Waschen | 2 | 0 |
| Gradient 1 | 1 | 0 – 10 |
| Gradient 2 | 15 | 10 – 80 |
| Gradient 3 | 1 | 80 – 100 |
| Reinigen | 5 | 100 |
| Gradient 4 | 2 | 100 – 0 |

SV : Säulenvolumen

4.5.2 Markierung von Zelloberflächenproteinen

Die Markierung von Zelloberflächenproteinen wurde in PBS²⁺-Puffer durchgeführt, da die verwendete Lösung keine freien Aminofunktionen, wie z. B. Aminosäuren, enthalten durfte. Die im PBS²⁺-Puffer enthaltenen bivalenten Ionen begünstigen dabei die Adhäsion der Zellen.

Tab. 13 Markierungsvolumina

| Kulturgefäß | Markierungslösung [ml] | Waschlösung [ml] |
|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| Kavität (12-Loch-Platte) | 0,3 | 0,5 |
| T75-Flasche | 2 | 5 |
| T175-Flasche | 5 | 10 |

Die Zielzellen wurden zuvor 24 Stunden in serumfreiem Medium *DMEM/Ham's F12 (1:1)* kultiviert. Die eingesetzten Volumina der Markierungs- und Waschlösungen orientierten sich an der Größe der verwendeten Kulturgefäße (s. Tab. 13). Pro präparativem Markierungsexperiment wurden BMEC in vier T175-Flasche eingesetzt. Alle Schritte der

Markierung fanden bei RT auf einem Immunschüttler statt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Markierungslösungen ist 4.5.1.1 bzw. 4.5.1.2 zu entnehmen. Die Durchführung der Markierung von Zelloberflächenproteinen umfasste folgende Schritte:

| | | | |
|-----------|----|-----|---|
| Waschen 1 | 10 | s | PBS ⁻ -Puffer |
| Waschen 2 | 10 | s | PBS ²⁺ -Puffer |
| Markieren | 30 | min | Markierungslösung |
| Waschen 3 | 10 | s | 50 mM Glycin in PBS ²⁺ -Puffer |
| Waschen 4 | 10 | s | PBS ²⁺ -Puffer |

Erfolgte die Markierung von Zellen in Kulturplatten, so wurde eine Vitalitätsfärbung oder das Fixieren der Zellen unmittelbar angeschlossen. Handelte es sich um eine präparative Markierung und somit um in Flaschen kultivierte Zellen, wurden diese direkt nach der Markierung mit einem Zellschaber aus den Flaschen geschabt. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml PBS²⁺-Puffer pro Flasche aus den Kulturgefäßen genommen. Die Zellsuspensionen aller vier Flaschen wurden in einem 50 ml Röhrchen vereinigt und die Zellen 10 min bei 110x g (740 rpm, Centrifuge 5810) sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit 1,5 ml PBS²⁺-Puffer in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut sedimentiert (2 min bei 100x g) und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen bis zum Zellaufschluss erfolgte bei -80°C.

4.5.2.1 Permeabilisierung von Zellen

Eine milde Permeabilisierung von Zellmembranen kann mit dem Detergenz Digitonin durchgeführt werden (Lin, et al., 2000; Plutner, et al., 1992). Die Zellmembranen werden so für hydrophile Substanzen durchlässig, ohne dass die komplette Lyse der Zellen erfolgt. Diese Behandlung konnte einer Markierung von Zellen vorangestellt werden, wenn die Markierung nicht auf die Zelloberfläche beschränkt bleiben sollte.

| | | |
|-----------------|---------------|------------------------------|
| Digitoninlösung | 0,002 % (w/v) | Digitonin |
| | | in PBS ²⁺ -Puffer |

Zur Permeabilisierung der Zellmembran der Zielzellen wurden die Zellpopulationen 2 min in Digitoninlösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen direkt in Markierungsversuchen oder Vitalitätsfärbungen eingesetzt.

| | | | |
|----------------|------|---------|--|
| Bindepuffer | 50 | mM | NH ₄ HCO ₃ |
| pH 10,0 | 500 | mM | NaCl |
| | 0,05 | % (v/v) | Triton X-100 |
| Elutionspuffer | 50 | mM | NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂ |
| pH 4,0 | 500 | mM | NaCl |
| | 0,05 | % (v/v) | Triton X-100 |

In einem 20 ml Einwegsulchen wurden 1 ml Streptavidin-Sepharose-Säulenmaterial vorgelegt und zunächst mit 10 ml Bindepuffer, dann mit 10 ml Umpuffer äquilibriert. Nach Zugabe von 1 ml Proteinlösung aus 4.5.3.1 wurde der Ansatz mit Umpuffer auf 20 ml aufgefüllt. Die Detergenzkonzentration im Ansatz entsprach somit den während der Chromatographie aufrechterhaltenen Bedingungen von 0,05 % (v/v) Triton X-100. Das Säulchen wurde verschlossen und 3 Stunden bei 4°C unter konstantem Drehen inkubiert. Der Durchbruch wurde abgelassen und das Säulenmaterial in eine leere MonoQ-Säule (APB) mit dem Säulenvolumen 1 ml überführt. Das Säulenmaterial wurde mit 2 ml Bindepuffer gewaschen und die Waschlösung mit dem gesammelten Durchbruch vereinigt. Nach dem Einbau der Säule in ein Äkta-Chromatographiesystem (APB), erfolgte das Auswaschen ungebundener Proteine mit 5 ml Bindepuffer bei einem Fluss von 0,5 ml/min. Zur Elution der Proteine wurde das Chromatographiesystem auf Elutionspuffer umgestellt und obiger Fluss beibehalten. Das Chromatogramm der Affinitätsreinigung wurde über die Detektion der Absorption bei 280 nm aufgenommen und das Eluat manuell gesammelt. Das Signal der eluierten Proteine im Chromatogramm wurde integriert. Durch den Vergleich der Signalfäche mit denen von Proteinstandards konnte die eluierte Proteinmenge bestimmt werden.

Das Säulenmaterial wurde mit 10 ml PBS⁻-Puffer gewaschen und dann in 20 % (v/v) Ethanol bei 4°C gelagert.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung von PCR-Produkten im elektrischem Feld erfolgte mittels Gelelektrophorese in 1,5 % (w/v) oder 2 % (w/v) Agarosegelen. Die Länge der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem DNA-Standard abgeschätzt.

| | | | |
|------------|----|----|-------------|
| TAE-Puffer | 40 | mM | Tris |
| pH 8,0 | 20 | mM | Essigsäure |
| | 2 | mM | EDTA |

| | | |
|---------------------------------------|---|---|
| Ethidiumbromidlösung dunkel lagern | 1 mg/ml | Ethidiumbromid |
| DNA-Auftragspuffer 6fach | 50 % (v/v) 0,2 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,05 % (w/v) | Glycerin SDS Bromphenolblau Xylencyanol in TAE-Puffer |

Zur Herstellung der Gele wurde eine Suspension der erforderlichen Menge Agarose in TAE-Puffer angesetzt. Nach Aufkochen der Suspension in einem Mikrowellengerät wurde der Ansatz auf eine Ethidiumbromidkonzentration von 0,1 ng/ml eingestellt und in eine Horizontal-Gelelektrophorese-Apparatur mit Taschenformer gegossen. Die Abmessungen der Gele betrug 70 mm x 80 mm (Minigele, ca. 50 ml) bzw. 10 mm x 145 mm (Midigele, ca. 120 ml), bei einer Geldicke von ca. 10 mm.

Nach Erstarren des Gels wurde dieses mit TAE-Puffer überschichtet und der Taschenformer entfernt. Die Proben wurden mit 1/5 ihres Volumens an DNA-Auftragspuffers versetzt und in die Auftragstaschen pipettiert. Eine Spur des Gels wurde mit 3,5 µl eines DNA-Standards (100 ng/µl) belegt, um die Länge der getrennten PCR-Produkte abschätzen zu können.

Die Elektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 110 V für Mini- bzw. 120 V für Midigele statt, bis die Bromphenolblaufront ca. 2/3 der maximalen Laufstrecke erreicht hatte. Mittels UV-Licht wurde die getrennte DNA sichtbar gemacht und konnte so photographisch dokumentiert werden.

4.6.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung nukleinsäurehaltiger Lösungen erfolgte mittels Absorptionsmessung bei 260 nm in einem GeneQuant pro RNA/DNA- Spektralphotometer. Die Messungen wurden in Quarzküvetten der Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Dabei war die vorliegende Nukleinsäurekonzentration der gemessenen Absorption proportional:

$$1,0 A_{260\text{nm}}\text{-Einheit} = 50 \mu\text{g/ml dsDNA oder } 40 \mu\text{g/ml ssDNA bzw. } 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

Mit der Hilfe des Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ließ sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Bei Vorliegen einer sauberen DNA/RNA-Lösung sollte der Quotient zwischen 1,7 und 2 liegen. Niedrigere oder höhere Werte lassen auf Verunreinigungen mit Proteinen bzw. niedermolekularen Substanzen schließen.

4.6.3 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde eingesetzt, um definierte DNA-Bereiche ausgehend von geringsten Mengen Vorläufer-DNA zu vervielfältigen. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der enzymatischen Duplikation der Vorläufer-DNA (= Matrize) durch eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Saiki, 1985). Voraussetzung für die Initiation der Reaktion ist das Vorliegen kurzer, zur Ziel-DNA komplementärer, einzelsträngiger Oligonukleotide, sog. Primer. Pro PCR-Ansatz wird ein Primer-Paar benötigt, das aus der Sequenz der Ziel-DNA abgeleitet wurde. Die Oligonukleotide sind jeweils komplementär homolog zu dem (+)-Strang des einen Endes bzw. zu dem (-)-Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region. Bei der Methode werden mehrere Zyklen durchlaufen. Jeder Zyklus umfasst jeweils die Denaturierung der zu vervielfältigen DNA, die Anlagerung der Primer (*Annealing*) sowie die Synthese der neuen DNA-Stränge durch die Taq-DNA-Polymerase bei 72°C.

Die verwendeten Primer wurden aus DNA-Information humanen oder porcinen Ursprungs *in silico* abgeleitet. Ihre Sequenzen und spezifischen Annealingtemperaturen sind im Materialteil aufgelistet. Die Annealingtemperaturen und Ansatz-spezifischen Details sind außerdem im Ergebnisteil angegeben.

Die verwendeten Taq-Polymerasen fügten Matrizen-unabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende der amplifizierten DNA-Fragmente. Dieser einbasige Überhang konnte bei der späteren Klonierung des PCR-Produktes ausgenutzt werden.

Um auch bei geringen Volumina unter reproduzierbaren Bedingungen arbeiten zu können, wurden jeweils für mehrere Ansätze gemeinsam ein Premix angesetzt. Bei allen molekularbiologischen Arbeiten wurde H₂O von HPLC-Qualität verwendet und mit Filterpipettenspitzen gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden. Alle Lösungen und Puffer wurden dabei auf Eis gehandhabt.

| | | | |
|--------------|----|---------|----------------|
| dNTP-Lösung | 10 | mM | dATP |
| | 10 | mM | dCTP |
| | 10 | mM | dGTP |
| | 10 | mM | dTTP |
| Primerlösung | 10 | pmol/µl | Oligonukleotid |

4.6.3.1 Standard-PCR

Bei dieser Standardvariante der PCR wurde mit einer Hot-Start-Taq-Polymerase gearbeitet. Hierbei handelt es sich um ein durch einen Antikörper blockiertes Enzym, das zu Beginn der PCR-Reaktion durch 15-minütige Inkubation bei 95°C aktiviert werden muss.

| | | | |
|----------------------|-------|---------|-------------------------------|
| Hot-Start-PCR-Puffer | 20 | mM | Tris |
| pH 9,0 , 10fach | 100 | mM | KCl |
| | 1 | mM | DTT |
| | 0,1 | mM | EDTA |
| | 0,5 | % (v/v) | Nonidet P-40 |
| | 0,5 | % (v/v) | Tween-20 |
| | 50 | % (v/v) | Glycerin |
| | | enthält | Stabilisator |
| | | | |
| Premix pro Ansatz | 2,5 | µl | 10fach Hot-Start-PCR-Puffer |
| | 0,5 | µl | dNTP-Lösung |
| | 1 | µl | Primer 1 |
| | 1 | µl | Primer 2 |
| | 0,125 | µl | Hot-Start-Taq-Polymerase |
| | x | µl | Matrizen-Lösung |
| | | | mit H ₂ O ad 25 µl |

Das Volumen der eingesetzten Matrizen-Lösung lag je nach Aufgabenstellung und Primerpaar zwischen 2 und 5 µl. Zur Herstellung der Matrizen-Lösungen wurden cDNA-Lösungen 1:10 verdünnt. Diese cDNA-Lösungen wurden durch reverse Transkription von RNA verschiedener Gewebe gewonnen. Ihre Konzentration entsprach 50 µg/µl RNA-Äquivalent. Die cDNA-Lösungen wurden von der Firma Esplora zur Verfügung gestellt.

Tab. 14 Programm für Hot-Start-Polymerase

| Funktion | Temperatur [°C] | Dauer [s] |
|----------------|--------------------|--------------|
| Denaturieren 1 | 95 | 900 |
| Denaturieren 2 | 94 | 30 |
| Annealing | Primer-spezifisch | 30 |
| Extension 1 | 72 | 60 |
| Extension 2 | 72 | 600 |
| Lagerung | 8 | ∞ |

} 30-40 Zyklen

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt (4.6.1). Waren die PCR-Ansätze für eine Sequenzierungsreaktion oder Ligation vorgesehen wurden sie wie unter 4.6.4.1 beschrieben gereinigt.

4.6.3.2 Bakterien-PCR

Diese Variante der PCR dient der Durchmusterung von Bakterienkolonien nach Ligation auf rekombinante Klone mit funktionellem Insert. Als Matrizen dienten hierbei Bakterienklone, die von einer Kulturplatte entnommen und direkt in der PCR eingesetzt wurden.

| | | | |
|-------------------|-----|----|---------------------------------------|
| Premix pro Ansatz | 2 | µl | 10fach PCR-Puffer |
| | 1 | µl | 50 mM MgCl ₂ |
| | 0,4 | µl | dNTP-Lösung |
| | 0,5 | µl | Primermix pGEM Teasy (je 10 pmol/µl) |
| | 0,2 | µl | Taq-Polymerase |
| | 2,9 | µl | H ₂ O |

Pro Klon wurde in einem Mini-Reaktionsgefäß 15 µl H₂O vorgelegt und mit einem sterilen Zahnstocher die Bakterienkolonie von der Kulturplatte in das Gefäß eingebracht. Der Ansatz wurde fünf Minuten auf 95°C erhitzt, um die Zellen aufzuschließen und um bakterieneigene Enzyme (z. B DNasen) zu inaktivieren. Nach diesem ersten Denaturierungsschritt wurde jedem Ansatz 7 µl Premix zugegeben und die PCR fortgesetzt.

Tab. 15 Programm für Bakterien-PCR

| Funktion | Temperatur [°C] | Dauer [s] |
|-------------------|--------------------|--------------|
| Denaturieren 1 | 95 | 300 |
| Zugabe des Premix | | |
| Denaturieren 2 | 94 | 90 |
| Denaturieren 3 | 94 | 30 |
| Annealing | 58 | 30 |
| Extension 1 | 72 | 60 |
| Extension 2 | 72 | 600 |
| Lagerung | 8 | ∞ |

} 30 Zyklen

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die Ansätze, nach Zugabe von 4 µl DNA-Auftragspuffer, mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt (4.6.1).

4.6.4 Reinigung von Nukleinsäuren

4.6.4.1 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der mittels PCR amplifizierten DNA-Abschnitte erfolgte unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Systems nach den Vorgaben des Herstellers.

Der jeweilige PCR-Ansatz wurde mit dem fünffachen Volumen an Puffer PB gemischt und auf ein QIAquick-Säulchen gegeben. Puffer PB enthält ein chaotrophes Salz, wodurch die Bindung der DNA-Fragmente an die Säulenmatrix unter Hochsalz-Bedingungen ermöglicht wird. Anschließend wurde die Säule 1 min bei 10.000x g zentrifugiert (5417R Eppendorf), um niedermolekulare Bestandteile des Ansatzes und Proteine, die nicht an das Säulenmaterial binden, zu entfernen. Es folgte ein Waschschrift mit salz- und ethanolhaltigem PE-Puffer. Die Waschlösung wurde durch zweimaliges Zentrifugieren unter obigen Bedingungen vollständig entfernt. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte nach Zugabe von 20 µl H₂O erneut durch Zentrifugation, wobei das Säulchen zuvor auf ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt wurde.

Die Nukleinsäure-Konzentration des Eluats wurde photometrisch bestimmt (4.6.2) oder mit der Hilfe eines Agarosegels abgeschätzt (4.6.1).

4.6.4.2 Elution von DNA aus Agarose

Die Elution der DNA-Abschnitte aus Agarosegel erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Systems nach den Vorgaben des Herstellers (Qiagen). Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht-Kontrolle zügig aus dem Agarosegel geschnitten, in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Nach Zugabe des dreifachen Gelvolumens an Puffer QG wurde das Gelstück 10 Minuten bei 50°C geschmolzen, wobei es mehrfach kräftig geschüttelt wurde. Nach dem vollständigen Auflösen des Gels wurde ein Gelvolumen an 2-Propanol zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Der Ansatz wurde auf ein QIAquick-Säulchen gegeben und 1 min bei 10.000x g zentrifugiert (5417R Eppendorf). Der Durchbruch wurde verworfen und ein Waschschrift mit 750 µl salz- und ethanolhaltigem PE-Puffer angeschlossen. Die Waschlösung wurde durch zweimaliges Zentrifugieren unter obigen Bedingungen vollständig entfernt. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte nach Zugabe von 20 µl H₂O erneut durch Zentrifugation, wobei das Säulchen zuvor auf ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt wurde. Die Nukleinsäure-Konzentration des Eluats wurde photometrisch bestimmt (4.6.2) oder mit der Hilfe eines Agarosegels abgeschätzt (4.6.1).

4.6.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

(Birnboim und Doly, 1979)

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des QIAprep Miniprep Systems nach den Vorgaben des Herstellers (Qiagen). Die Methode entspricht einer modifizierten alkalischen Lyse der plasmidtragenden Bakterien und anschließender Reinigung der Plasmid-DNA über QIAquick-Säulchen.

| | | | |
|-----------|---------|---------|----------------------|
| P1 Puffer | 50 | mM | Tris-HCl |
| pH 9,0 | 10 | mM | EDTA |
| | 100 | µg/ml | RNase |
| P2 Puffer | 200 | mM | NaOH |
| | 50 | % (w/v) | SDS |
| N3 Puffer | 3 | M | Kaliumacetat |
| pH 5,5 | | | |
| PB Puffer | enthält | | Guanidinhydrochlorid |
| | enthält | | 2-Propanol |

Die Bakterien von 2 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden 3 min mittels einer Tischzentrifuge in einem sterilen Reaktionsgefäß bei 5973x g sedimentiert (7.500 rpm, 5417R Eppendorf) und das Medium verworfen. Die Zellen wurden mit 250 µl kaltem P1 Puffer resuspendiert. Durch die im Puffer enthaltene RNase sollte die Hydrolyse der bakterieneigenen RNA bewirkt werden. Nach Zugabe von 250 µl P2 Puffer folgte eine vierminütige Inkubation. Während dieser wurde der Ansatz fünfmal vorsichtig invertiert, um den Ansatz zu durchmischen und gleichzeitig Scherkräfte zu vermeiden. Nun wurden 350 µl N3 Puffer zugegeben, um den Ansatz zu neutralisieren, das überschüssige SDS auszufällen und den Ansatz auf Hochsalzbedingungen einzustellen. Anschließend wurde die chromosomale DNA, sowie Zelltrümmer durch eine Zentrifugation (10 min bei 10.000x g) sedimentiert. Der Überstand wurde auf ein QIAquick-Säulchen gegeben und 1 min bei 10.000x g zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen und ein Waschschrift mit 500 µl PB-Puffer angeschlossen. Die Waschlösung wurde durch Zentrifugation entfernt und ein weiterer Waschschrift mit 750 µl salz- und ethanolhaltigem PE-Puffer angeschlossen. Die Waschlösung wurde durch zweimaliges Zentrifugieren unter obigen Bedingungen vollständig entfernt. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte nach Zugabe von 30 µl H₂O und einminütiger Inkubation erneut durch Zentrifugation, wobei das Säulchen zuvor auf ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt wurde.

Die Nukleinsäure-Konzentration des Eluats wurde photometrisch bestimmt (4.6.2).

4.6.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren

4.6.5.1 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung der unter 4.6.3.1 amplifizierten DNA-Abschnitte erfolgte mithilfe von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger, et al., 1977). Nach der Amplifizierung und nachfolgender Reinigung des PCR-Produktes wurde jeweils einer der beiden DNA-Stränge amplifiziert und zugleich unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide markiert. Durch den Abbruch der Amplifizierung bedingt durch den Einbau eines Didesoxynukleotides, entstanden DNA-Stränge verschiedener Länge, die entsprechend jedem der vier Nukleotide vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe trugen. Nach der Reinigung des Sequenzierungsansatzes (4.6.5.2) erfolgte die Trennung der DNA-Fragmente mittels Kapillargelelektrophorese in einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer bei gleichzeitiger Detektion der Fluorophore. Pro Sequenzierungsansatz waren 350 bis 450 Nukleotide auswertbar.

| | | | |
|-------------------|--|----|-------------------------|
| Sequenziermix | A-Dye Terminator, gekoppelt mit Dichloro[R6G] C-Dye Terminator, gekoppelt mit Dichloro[ROX] G-Dye Terminator, gekoppelt mit Dichloro[R110] T-Dye Terminator, gekoppelt mit Dichloro[TMRA] Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) AmpliTaq DNA-Polymerase Tris, pH 9,0 Mg ₂ Cl | | |
| Premix pro Ansatz | 4 | µl | Sequenziermix |
| | 2 | µl | 5fach Sequenzier-Puffer |
| | 3 | µl | Primer (1 pmol/µl) |
| | x | µl | DNA-Lösung |
| | mit H ₂ O ad 20 µl | | |

Tab. 16 Programm für Sequenzierung

| Funktion | Temperatur [°C] | Dauer [s] |
|--------------|--------------------|--------------|
| Denaturieren | 96 | 10 |
| Annealing | Primer-spezifisch | 5 |
| Extension | 60 | 120 |
| Lagerung | 8 | ∞ |

} 25 Zyklen

Nach Abschluss der Sequenzierungsreaktion wurden die Ansätze wie unter 4.6.5.2 beschrieben gereinigt.

4.6.5.2 Reinigung der Sequenzierungsansätze

Die Reinigung der Sequenzierungsansätze erfolgte unter Verwendung von Qiagen DyeEx-Säulchen. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Ausschlusschromatographie. Hierbei erhält man die bei der Sequenzierreaktion entstanden DNA-Stränge im Ausschlussvolumens des Säulchens. Niedermolekulare Substanzen und überschüssige fluorophorgekoppelten Didesoxynukleotide hingegen können in die Poren des Trenngels eindringen und weisen somit ein höheres Elutionsvolumen auf.

Das DyeEx-Säulchen wurde an der Unterseite geöffnet, in ein 2 ml Sammelgefäß gestellt und aufgeschraubt. Anschließend wurde es 3 min bei 774x g (2700 rpm, 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Der Sequenzierungsansatz wurde auf das Säulchenbett aufgetragen, das Säulchen in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die Zentrifugation wiederholt. In einem Sequenziergefäß wurden 4 µl des Durchbruchs mit 16 µl Hi-Di™-Formamid gemischt und dann für die eigentliche Sequenzierung eingesetzt.

4.6.6 Klonierung von DNA

Bei dem zur Klonierung von DNA verwendeten System handelte es sich um einen mit dem Restriktionsenzym EcoR V linearisierten pGEM®-T Easy Vektor. Um die Rezirkularisierung des Vektors durch Selbstligation zu unterbinden, sind den 3'-Enden des Vektors jeweils ein überhängendes Thymidin angefügt. Der Vektor eignet sich somit zur Klonierung von PCR-Produkten, die Template-unabhängig mit einzelnen Desoxyadenosinen an ihren 3'-Enden amplifiziert wurden.

Dieser Vektor ist der Kategorie der *high copy* Plasmide zugehörig und kodiert eine Ampicillinresistenz. Zusätzlich weist er eine *multiple cloning region* auf, die sich in einer für das α -Peptid des Enzyms β -Galaktosidase kodierenden Region befindet. Bei erfolgreicher Insertion eines DNA-Abschnittes in den Vektor, kommt es zu einer Inaktivierung des α -Peptides. Nach einer Transformation, können rekombinante Klone somit aufgrund der fehlenden β -Galaktosidase-Aktivität mittels des Blau-Weiß-Testes auf Indikatorplatten identifiziert werden.

4.6.6.1 Ligation von DNA-Fragmenten

| | | | |
|-----------------|----|---------|-----------------------------|
| Ligationspuffer | 60 | mM | Tris |
| pH 7.8 , 2fach | 20 | mM | MgCl ₂ |
| | 20 | mM | DTT |
| | 2 | mM | ATP |
| | 10 | % (w/v) | Polyethylenglykol (MW 8000) |
| Ligationsansatz | 10 | µl | Ligationspuffer |
| | 1 | µl | Ligase (3U/µl) |
| | 1 | µl | Vektor (50 ng/µl) |
| | 8 | µl | DNA-Lösung |

Laut Angaben des Herstellers (Promega) ist das Ligationssystem optimiert auf den Einsatz von Insert-DNA und Vektor im molaren Verhältnis von 1:1. Da das System Verhältnisse von 1:8 bis 8:1 toleriert, wurden die maximalen Volumina an DNA-Lösung (8 µl) eingesetzt. Bei der DNA-Lösung handelte es sich um Eluate der Reinigung von PCR-Produkten (4.6.4.1). Der Ligationsansatz wurde auf Eis angesetzt und die Ligase als letzte Komponente zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer dreistündigen Inkubation bei RT wurde der Ansatz bis zum Einsatz in einer Transformation elektrokompeter Zellen (4.6.6.2) bei -80°C gelagert.

4.6.6.2 Transformation elektrokompeter Zellen

Die Transformation elektrokompeter Zellen erfolgte nach dem Prinzip der Elektroporation. Hierbei werden die Bakterien durch einen kurzen elektrischen Impuls permeabilisiert, wodurch freie DNA in die Zellen diffundieren kann. Rekombinante Klone wurden mittels eines Ampicillin-haltigen Selektionsmediums selektiert. Die Klone mit funktionellem Insert konnten mittels des Blau-Weiß-Testes auf Indikatorplatten identifiziert werden.

| | | | |
|--------------|-----|---------------------|-------|
| IPTG-Lösung | 1 | M | IPTG |
| X-Gal-Lösung | 100 | mM | X-Gal |
| | | in Dimethylformamid | |

Elektrokompente *E.coli*-Zellen des Stammes DH5α wurden direkt vor der Elektroporation auf Eis aufgetaut. In einem sterilen Minireaktionsgefäß wurden 2 µl eines Ligationsansatzes vorgelegt (4.6.6.1), die Zellen zugegeben und eine einminütige Inkubation auf Eis angeschlossen. Die Zellen wurden in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt und mithilfe eines Elektroporators (Micropulser) einem kurzen elektrischen Impuls bei 2,5 kV ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium aus der Küvette genommen und in einem Kulturröhrchen 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Während dieser „Erholungs“-Kultivierung wurden LB-Agarplatten (inkl. Ampicillin) kurz getrocknet. Jede Platte wurde mit steriler Impföse mit 40 µl X-Gal-Lösung und 4 µl IPTG-Lösung versetzt und erneut getrocknet, um das cytotoxische Dimethylformamid zu entfernen. Mittels steriler Impföse wurden nun Zellsuspensionen (50 und 100 µl) sowie das Sediment des restlichen Ansatzes nach Zentrifugation (2 min, 1000x g) ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C, wurden die rekombinanten Klone mittels Blau-Weiß-Test identifiziert.

5 Ergebnisse

5.1 Chemische Synthesen

5.1.1 Hydrolyse von Caprolactam

In der Synthese von Iminobiotinylaminocaprinsäure (ImBAS) sollte neben der undeuterten ϵ -Aminocaprinsäure eine D10- ϵ -Aminocaprinsäure eingesetzt werden. Die deuterierte Variante der ϵ -Aminocaprinsäure war allerdings nur in ihrer Lactamform kommerziell erhältlich. Das D10-Caprolactam musste somit mittels säurekatalysierter Hydrolyse (4.4.1.1) zu ϵ -Aminocaprinsäure-Hydrochlorid umgesetzt und durch Ionenaustausch-Chromatographie (4.4.1.2) gereinigt werden. Diese Methode wurde unter Verwendung von undeutertem Caprolactam etabliert. Die Identität des Produktes wurde mittels MALDI-MS und NMR-Spektroskopie überprüft.

5.1.1.1 Hydrolyse von D0-Caprolactam

504 mg (4,45 mmol) ϵ -Caprolactam wurden wie in 4.4.1.1 beschrieben hydrolysiert. Nach Reinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie und Abziehen des Lösungsmittels wurden 447 mg (3,41 mmol) ϵ -Aminocaprinsäure [131,18 g/mol] erhalten. Dies entsprach einer Ausbeute von 76,6%. Die MALDI-MS-Analyse ergab ein monoisotopisches Signal für das Produkt von 132,0539 m/z (Theort. 131,0946 m/z). Die Analyse mittels NMR-Spektroskopie wurde von F. Runge durchgeführt und ergab keine kontaminierenden Signale.

5.1.1.2 Hydrolyse von D10-Caprolactam

504 mg (4,10 mmol) D10- ϵ -Caprolactam wurden wie in 4.4.1.1 beschrieben hydrolysiert. Nach Reinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie und Abziehen des Lösungsmittels wurden 454 mg (3,22 mmol) D10- ϵ -Aminocaprinsäure erhalten. Dies entsprach einer Ausbeute von 78,6%. Die MALDI-MS-Analyse ergab ein monoisotopisches Signal für das Produkt von 142,1767 m/z (Theort. 141,1729 m/z).

5.1.2 Synthese von ImBAS

Die Synthese der beiden Varianten der Iminobiotinylaminocaprinsäure erfolgte wie in 4.4.2 beschrieben. Die Identität der Produkte wurde mittels MALDI-MS (4.3.2) und NMR-Spektroskopie überprüft. Die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie sind im Anhang aufgeführt.

5.1.2.1 Synthese von D0-ImBAS

100 mg (0,30 mmol) NHS-Iminobiotin-Trifluoroacetamid (FW 436,41 g/mol) wurden in 800 μ l DMF gelöst und einer Lösung von ϵ -Aminocaprinsäure zugegeben. Dabei wurde ϵ -Aminocaprinsäure mit 400 mg (3,05 mmol) in 100 ml Phosphatpuffer im Überschuss (1:13) eingesetzt. Das nach der Reaktion und den Ethanol-Waschschritten getrocknete Produkt wurde mit ImBAS_{roh} bezeichnet.

5.1.2.2 Synthese von D10-ImBAS

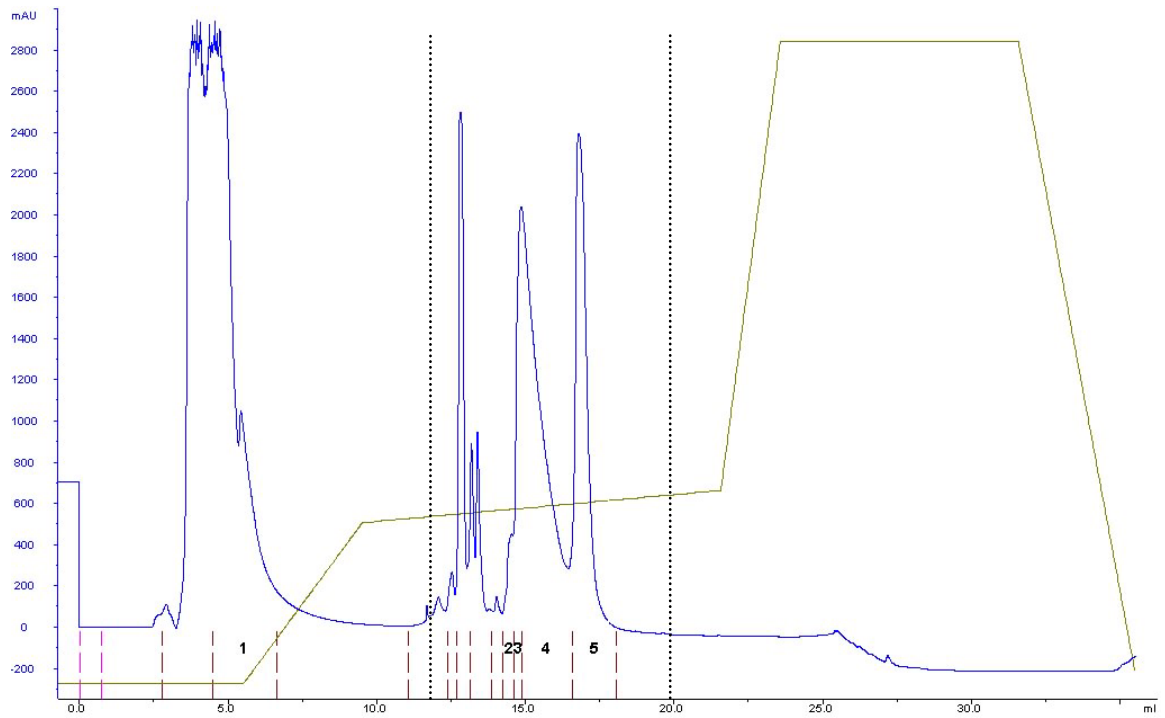
100 mg (0,30 mmol) NHS-Iminobiotin-Trifluoroacetamid (FW 436,41 g/mol) wurden in 800 μ l DMF gelöst und einer Lösung von ϵ -Aminocaprinsäure zugegeben. Dabei wurde ϵ -Aminocaprinsäure mit 400 mg (2,83 mmol) in 100 ml Phosphatpuffer im Überschuss (1:12) eingesetzt. Die weiteren Arbeiten erfolgten wie unter 4.4.2 beschrieben.

5.1.2.3 Reinigung von ImBAS-Varianten

Die Produkte D0- bzw. D10-ImBAS_{roh} aus 5.1.2 wurden wie in 4.4.2.2 beschrieben mittels Umkehrphasen-Chromatographie an C₁₈-Material gereinigt. Hierbei wurden 5-6 mg der Substanz in 1 ml Puffer A gelöst und in zwei Hüben auf die Säule appliziert. Während der Chromatographie wurde die Absorption bei 215 nm (Absorptionsmaximum von Carbonylgruppen) verfolgt und Fraktionen manuell gesammelt.

Die Identität der gesammelten Fraktionen wurde mittels MALDI-MS (4.3.2) bestimmt und die ImBAS-haltigen Fraktionen wurden vereinigt.

a)



b)

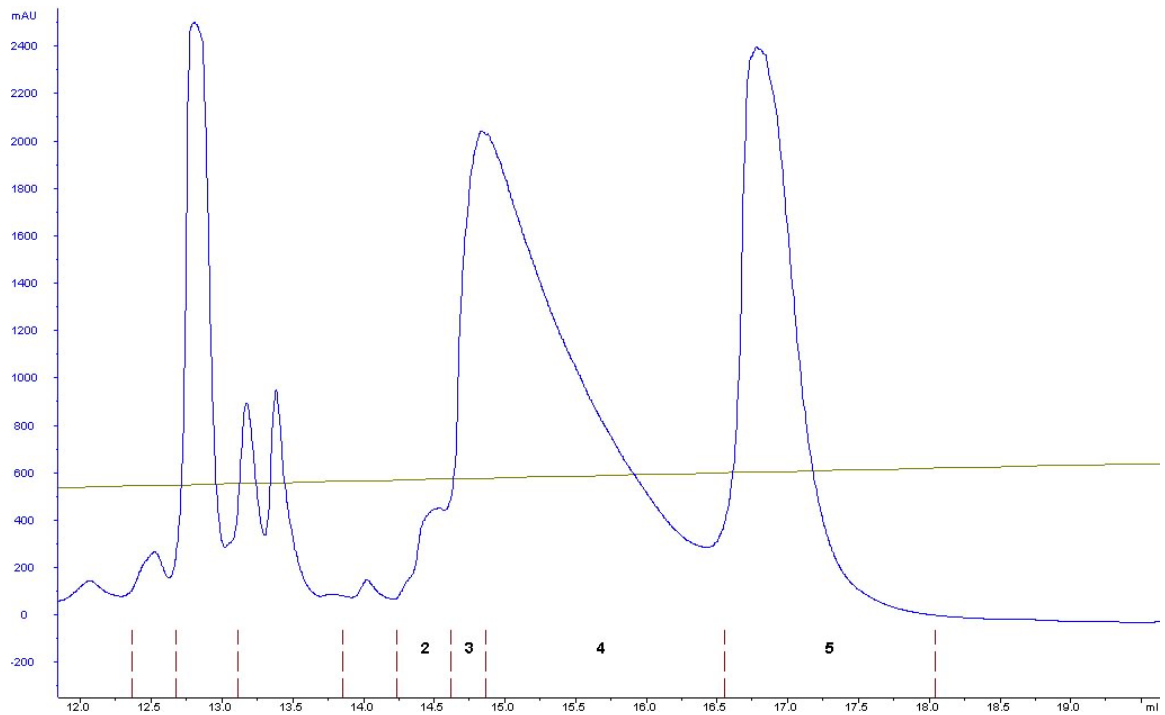


Abb. 17 Chromatogramm der Reinigung von ImBAS durch Umkehrphasen-Chromatographie an C_{18} -Material. Puffer A: 0,065% TFA, Puffer B: Acetonitril; gesammelte Fraktionen sind nummeriert; Konzentration von Puffer B: grün; Absorption bei 215 nm: blau
a) Chromatogramm, b) Vergrößerung des mit Punktlinien markierten Ausschnitts

Wie anhand Tab. 17 ersichtlich ist, war die bei der Synthese im Überschuss eingesetzte ϵ -Aminocapronsäure in Fraktion 1 und somit im Durchbruch zu finden. Das durch Hydrolyse des NHS-Iminobiotins entstandene Nebenprodukt Iminobiotin eluierte als Fraktion 2 mit geringfügig kürzeren Retentionszeiten als die beiden Hauptsignale des ImBAS (Fraktionen 4 und 5). Bei der chromatographischen Reinigung des ImBAS wurden die Fraktionen 4 und 5 mehrerer Chromatographien vereinigt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels ergaben sich die in Tab. 18 aufgeführten Ausbeuten der ImBAS-Synthesen.

Tab. 17 MALDI-MS-Daten der Fraktionen einer D0-ImBAS-Reinigung

| Fraktion | 1. Signal [m/z] | 2. Signal [m/z] | Substanz |
|----------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| 1 | 132,05 | - | ϵ -Aminocapronsäure |
| 2 | 357,21 | 244,22 (70%) | ImBAS, Iminobiotin |
| 3 | 357,19 | 244,22 (<10%) | ImBAS, Iminobiotin |
| 4 | 357,22 | - | ImBAS |
| 5 | 357,21 | 379,09 | ImBAS, Matrix |

Tab. 18 Ausbeuten der ImBAS-Synthesen

| Charge | ImBAS _{roh} [mg] | ImBAS _{roh} - Ausbeute [%] | ImBAS [mg] | ImBAS- Ausbeute [%] |
|---------------|------------------------------|--|---------------|------------------------|
| *D0_240701 | *61 | *150 | - | - |
| D0_241001 | 143 | 175 | - | - |
| D0_220402 | 142 | 174 | 44,9 | 55 |
| D0_060103 | 193 | 237 | 34,0 | 42 |
| *D10_010202_1 | *133 | *317 | 33,8 | 80,6 |
| *D10_010202_2 | *133 | *317 | 33,2 | 79,2 |

* halber Ansatz

Die exemplarische Analyse des ImBAS der Charge D0_220402 mittels NMR-Spektroskopie, die von F. Runge durchgeführt wurde, ergab keine Signale kontaminierender Substanzen. Die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie sind im Anhang angegeben.

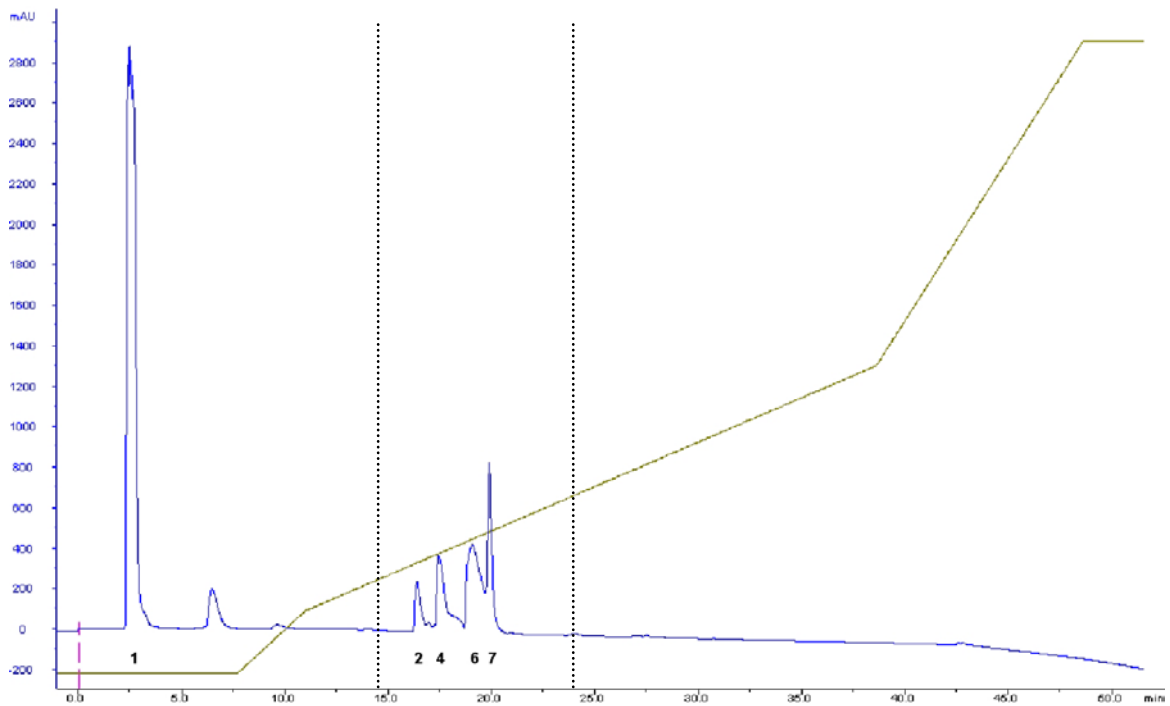
5.1.3 Synthese von Sulfo-NHS-ImBAS

Die Darstellung des Sulfo-NHS-ImBAS (SNHS-ImBAS), des aktivierten Esters der ImBAS, erfolgte über Festphasensynthese an einem Polystyrol-gebundenem Carbodiimid (4.4.3). Das nach der Reaktion und den Waschschrinen getrocknete Produkt wurde als SNHS-ImBAS_{roh} bezeichnet und umfasste 37,7 mg. Bei einem Molekulargewicht von 533,6 g/mol entspricht dies bei einer angenommenen Reinheit von 100% einer Ausbeute von 70,6%. Die Analyse des SNHS-ImBAS_{roh} mittels MALDI-MS (4.3.2) ergab neben den produkt-typischen Signalen bei 533,98 m/z und 555,94 m/z für das SNHS-ImBAS bzw. den SNHS-ImBAS/Na-Komplex auch ein Edukt-spezifisches Signal bei 357,2 m/z (= ImBAS).

Eine weitere Untersuchung des SNHS-ImBAS_{roh} erfolgte mittels Umkehrphasen-Chromatographie an C_{2/18}-Material unter den Bedingungen von 4.5.2.3 (Abb. 18). Aufgrund vorhergehender chromatographischer Trennung des Eduktes Sulfo-NHS wurde ermittelt, dass das bei der Synthese im Überschuss eingesetzte Edukt nicht an die Säule bindet und somit im Durchbruch zu finden ist. Die einzelnen Fraktionen der chromatographischen Trennung des SNHS-ImBAS wurden manuell gesammelt und mittels MALDI-MS untersucht. Dabei zeigten die Fraktionen 6 und 7 ImBAS-typische Signale um 357,2 m/z. Fraktion 7 zeigte zusätzlich produkt-typische Signale bei 533,98 m/z und 555,94 m/z für das SNHS-ImBAS bzw. den SNHS-ImBAS/Na-Komplex.

Da die Umkehrphasen-Chromatographie unter wässrigen Bedingungen bei niedrigem pH-Wert durchgeführt wurde, eignet sich diese Methode nicht, um den Hydrolyse-labilen aktivierten Ester SNHS-ImBAS zu reinigen. Da schon während der chromatographischen Trennung die Hydrolyse des SNHS-ImBAS stattfindet, sind auch die mittels analytischer Umkehrphasen-Chromatographie ermittelten Daten in ihrer Aussagekraft begrenzt.

a)



b)

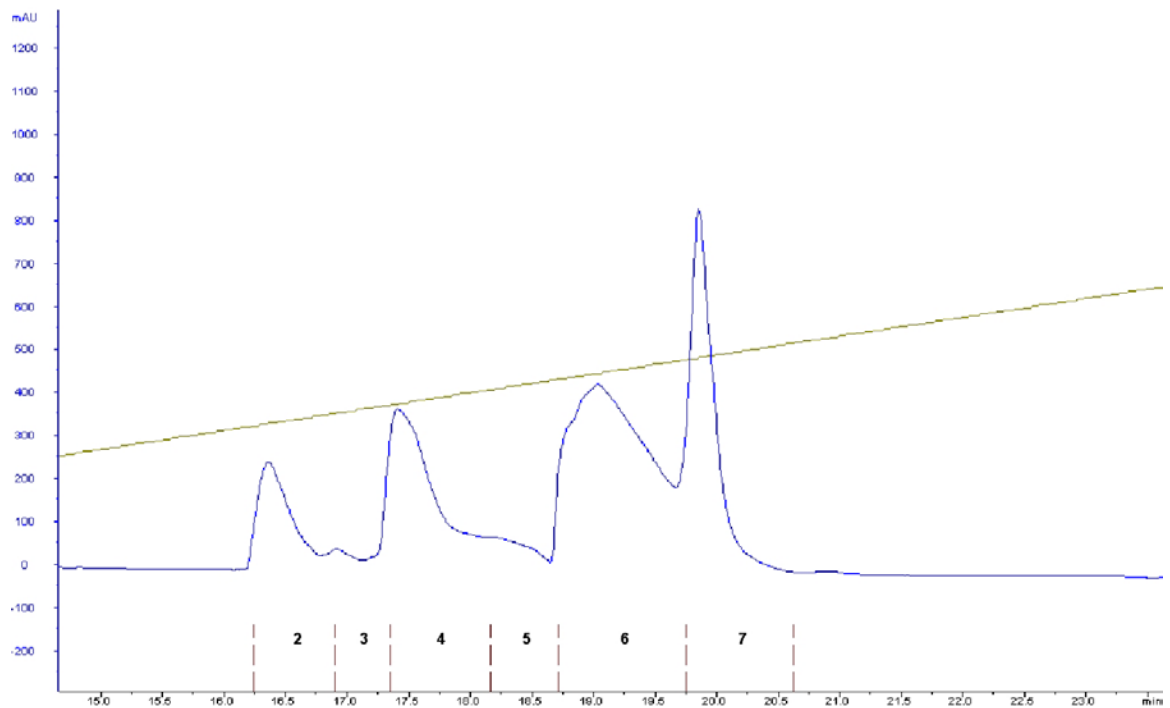


Abb. 18 Chromatogramm der Umkehrphasen-Chromatographie von SNHS-ImBAS an C₁₈-Material. Puffer A: 0,065% TFA, Puffer B: Acetonitril; gesammelte Fraktionen sind nummeriert; Konzentration von Puffer B: grün, Absorption bei 215 nm: blau
a) Chromatogramm, b) Vergrößerung des mit Punktlinien markierten Ausschnitts

5.2 Quantifizierung der Markierung

Die Markierungseffizienz der verschiedenen Markierungsstrategien, d. h. in-situ Aktivierung des ImBAS oder Einsatz des aktivierten Esters SNHS-ImBAS, wurde mittels Markierung des Modellpeptides Pep1 (4.5.2) und anschließender Umkehrphasen-Chromatographie (4.5.2.3) ermittelt. Als Vergleichsreagenz fand dabei der kommerziell erhältliche aminoreaktive Ester eines Biotinderivates (SNHS-LC-Biotin) Anwendung.

Das verwendete Modellpeptid Pep1 wies einen durch Acetylierung blockierten N-Terminus auf. Die potentielle Markierung war somit auf den singulären Lysin-Rest beschränkt. Das Peptid verfügte ferner über zwei Trypsin-spezifische Hydrolysestellen und konnte aufgrund der Absorption seines Tyrosinrestes bei 274 nm photometrisch detektiert werden.

Pep1 Acetyl-NH-ATSYLTAKASRAR $M+H^+$ = 1437,7809 m/z

Die Markierung des Modellpeptides mit den verschiedenen Markierungsreagenzien erfolgte unter standardisierten Bedingungen (4.5.2). Anschließend wurde ein Teil des Markierungsansatzes mittels Umkehrphasen-Chromatographie an $C_{2/18}$ -Material getrennt (4.5.2.3). Die Fraktionen wurden gesammelt und mittels MALDI-MS (4.3.2) analysiert. Die Flächenintegrale der Signale des unmarkierten und des markierten Peptides wurden gebildet und die jeweilige Markierungsausbeute bestimmt (Abb. 20, Tab. 19).

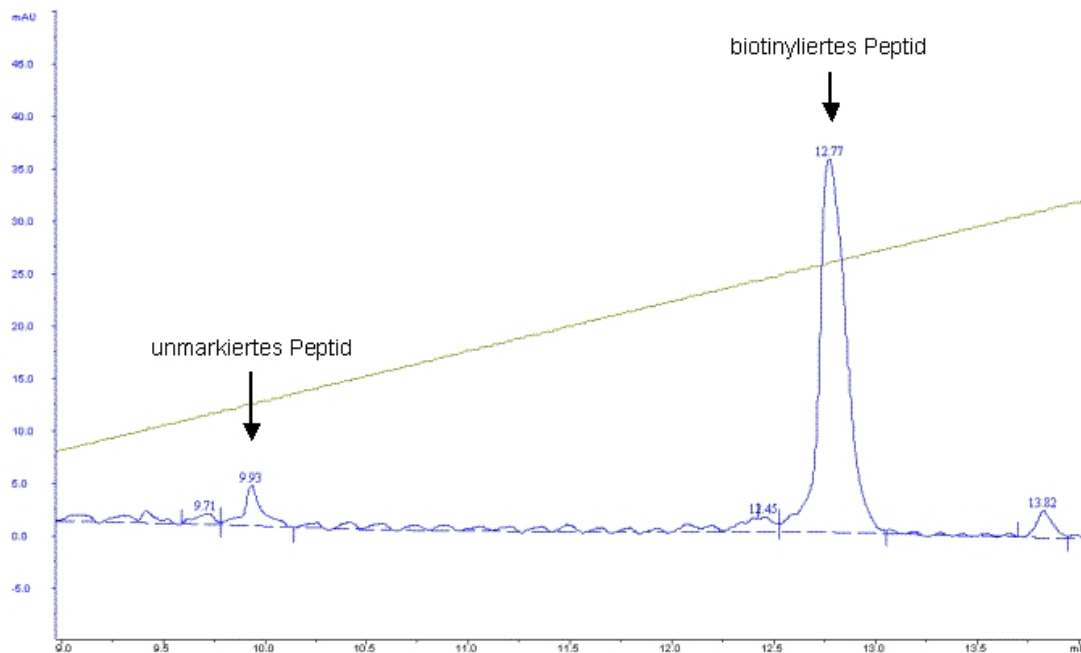


Abb. 19 Umkehrphasen-Chromatographie eines Markierungsansatzes an $C_{2/18}$ -Material; Probe: Modellpeptid markiert mit SNHS-LC-Biotin (0,25 mg/ml), Puffer A: 0,065 % (v/v) TFA, Puffer B: Acetonitril; Konzentration von Puffer B : grün, Absorption bei 274 nm : blau
Ausschnittsvergrößerung mit gestrichelter Basislinie und Retentionsvolumina

Tab. 19 Quantifizierung der Markierungsausbeute verschiedener Reagenzien

| Markierungsreagenz | unmarkiertes Peptid [mAU*ml] | markiertes Peptid [mAU*ml] | Markierung [%] | Nebenreaktion [mAU*ml] / [%] |
|---------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|------------------------------|
| SNHS-LC-Biotin | 0,4 | 5,46 | 93 | - |
| In-situ ImBAS (D0) | 8,87 | 0,25 | 3 | - |
| In-situ ImBAS (D10) | 8,26 | 0,46 | 5 | - |
| SNHS-ImBAS | 3,48 | 2,07 | 29 | 1,67 / 23 |

Der Markierungsansatz mit SNHS-ImBAS wies ein Nebenprodukt auf. Wie im Massenspektrum (Abb. 20) zu erkennen, zeichnet sich dieses Nebenprodukt von 1646,8656 m/z durch eine Massenzunahme des Peptides von 209,0847 Da aus. Dieses Nebenprodukt war im Gegensatz zu dem ImBAS-markierten Peptid nicht über Affinitäts-Chromatographie an Streptavidin-beschichteten Partikeln anzureichern.

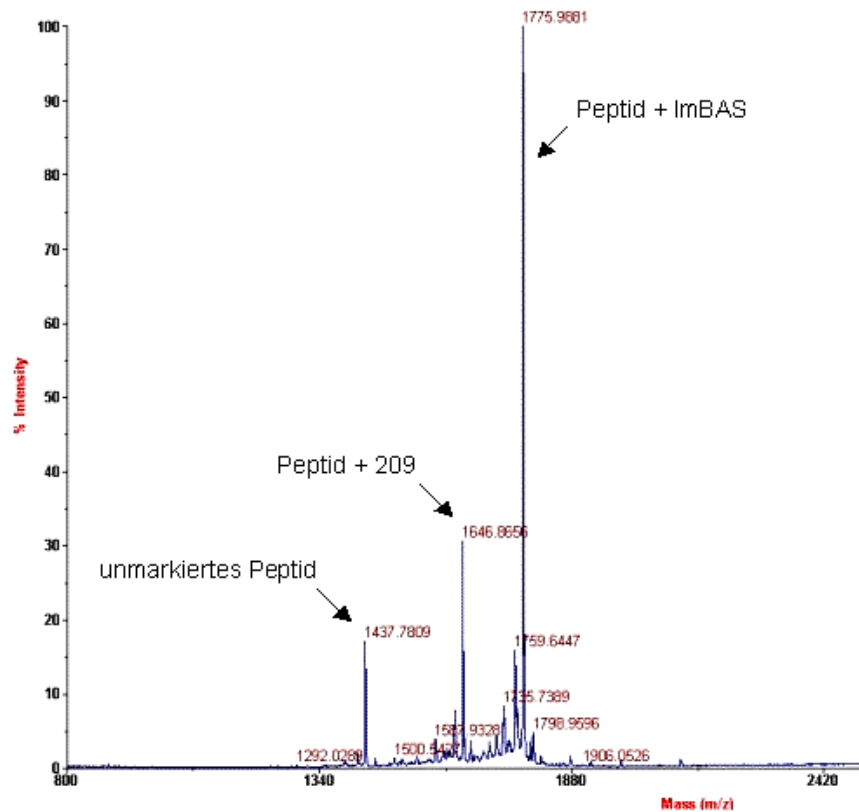


Abb. 20 MALDI-MS-Spektrum des Modellpeptides markiert mit SNHS-ImBAS

5.3 Hydrolyse markierter Peptide

Die mit ImBAS bzw. mit SNHS-LC-Biotin markierten Modellpeptide und eine unmarkierte Kontrolle wurden mit Trypsin hydrolysiert (4.3.1.1) und die resultierenden Peptidgemische mittels MALDI-MS (4.3.2) analysiert. Hierzu wurden 200 µl des jeweiligen Markierungsansatzes aus 4.5.2 mit 0,8 µl Trypsinlösung (500 ng/µl) versetzt und zwölf Stunden bei 37°C inkubiert. Die mit MALDI-MS detektierten Peptide sind in Tab. 20 und in Abb. 21 dargestellt. In der Tabelle kursiv gedruckte Peptide (< 600 Da) waren nicht zu erfassen. Durch eine ImBAS-Markierung erfährt das Zielpeptid eine Massenänderung des monoisotopischen Signals von 338,1776 Da. Die durch das Markierungsreagenz SNHS-LC-Biotin eingeführte Massenänderung beträgt 339,1617 Da, da hier statt der Guanidinogruppe des ImBAS eine Ketogruppe vorliegt. Das ImBAS-markierte Restpeptid mit C-terminalem Lysin-Rest war im Gegensatz zur biotinylierten Variante im Spektrum sichtbar.

Das D10-ImBAS-markierte Modellpeptid zeigte ein zum D0-ImBAS-markierten Peptid identisches Verhalten (Daten nicht gezeigt). Durch eine D10-ImBAS-Markierung erfährt das Zielpeptid dabei eine Massenänderung des monoisotopischen Signals von 348,2404 Da.

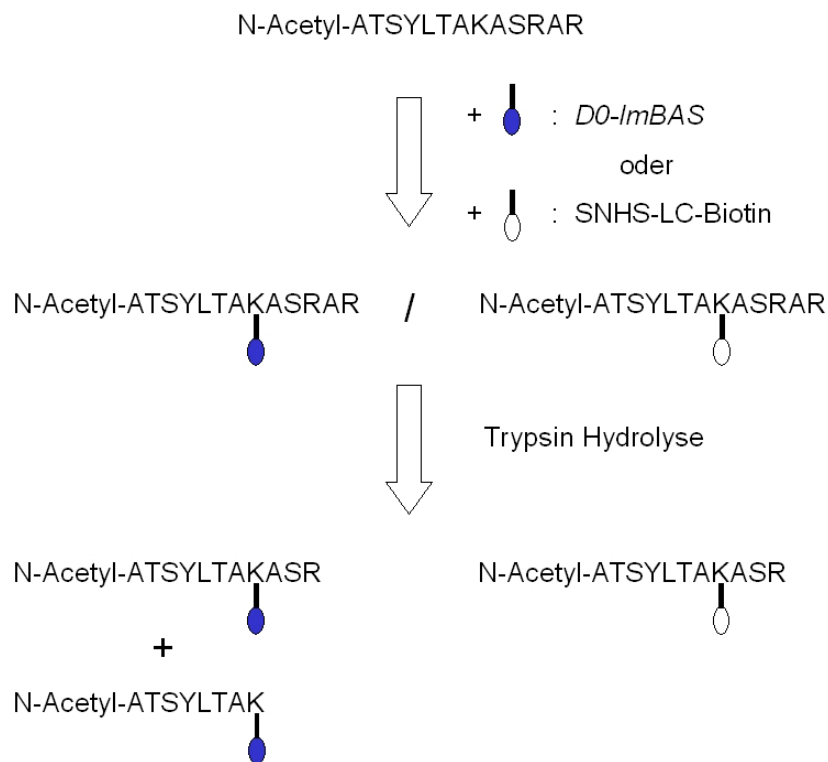


Abb. 21 Schema der mit MALDI-MS detektierten Hydrolyseprodukte des markierten Modellpeptides Pep1

Tab. 20 MALDI-MS-Daten der hydrolysierten Peptide

| Peptid | unmarkiert [m/z] | ImBAS-Peptid [m/z] | LC-Biotin-Peptid [m/z] |
|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|
| Acetyl-ATSYLTAKASRAR | 1437,78 | 1775,96 | 1776,96 |
| Acetyl-ATSYLTAKASR | 1210,64 | 1548,82 | 1549,82 |
| Acetyl-ATSYLTAK | 896,47 | 1234,65 | - |
| ASRAR | - | - | - |
| AR | - | - | - |

5.4 Differentielle Markierung von Peptiden

Die unter 5.2 angegebenen, gesammelten Fraktionen der D0- bzw. D10-ImBAS-markierten Modellpeptide wurden bis zur Trockne eingengt. Die getrockneten Proben wurden mit 0,1 % (v/v) TFA gelöst, so dass sich, bezogen auf die Signal-Integrale der markierten Peptide (vgl. Tab. 19), eine Konzentration von 10 (mAU*ml_R) / ml ergab. Die Signal-Integrale wurden anhand der jeweiligen Chromatogramme ermittelt und in der Einheit mAU*ml_R angegeben.

Diese Peptidlösungen identischer Konzentration wurden in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 gemischt. Mittels MALDI-MS (4.3.2) wurde überprüft, ob sich diese bekannten Mischverhältnisse auf der Ebene der MALDI-MS-Spektren wiederfinden lassen. Ausschnitte der Spektren der Mixturen 1:1, 1:5, 1:10 und 1:20 sind in Abb. 22 dargestellt.

Die Signalintensitäten der Signale 1775,9585 m/z (D0-ImBAS-Peptid) und 1786,0213 m/z (D10-ImBAS-Peptid) spiegelten das jeweilige Mischungsverhältnis wider. Die differentiell markierten Peptidpaare wiesen die für den Austausch von zehn Wasserstoff- durch Deuteriumatome spezifische Massendifferenz von 10,06 Da auf.

Bei den Signalen der D10-ImBAS-markierten Peptide ist ein dem Hauptsignal vorausgehendes Signal zu beobachten, das um 1 Da kleiner zu sein scheint. Hierbei handelt es sich um das D9-ImBAS-markierte Peptid (D9-Peptid, vgl. Abb. 22d).

Die Verunreinigung der Markierungsansätze mit D9-ImBAS rührt von dem unvollständigen Deuterierungsgrad (D10, 98%) der Ausgangssubstanz D10-Caprolactam her. Das Signalverhältnis der D9- zur D10-Markierung ist jedoch gering. Das Auswerteprogramm erkennt das D9-Signal als eigenständiges Signal und wertet es nicht als dem D10-Signal und dessen Isotopenmuster zugehörig.

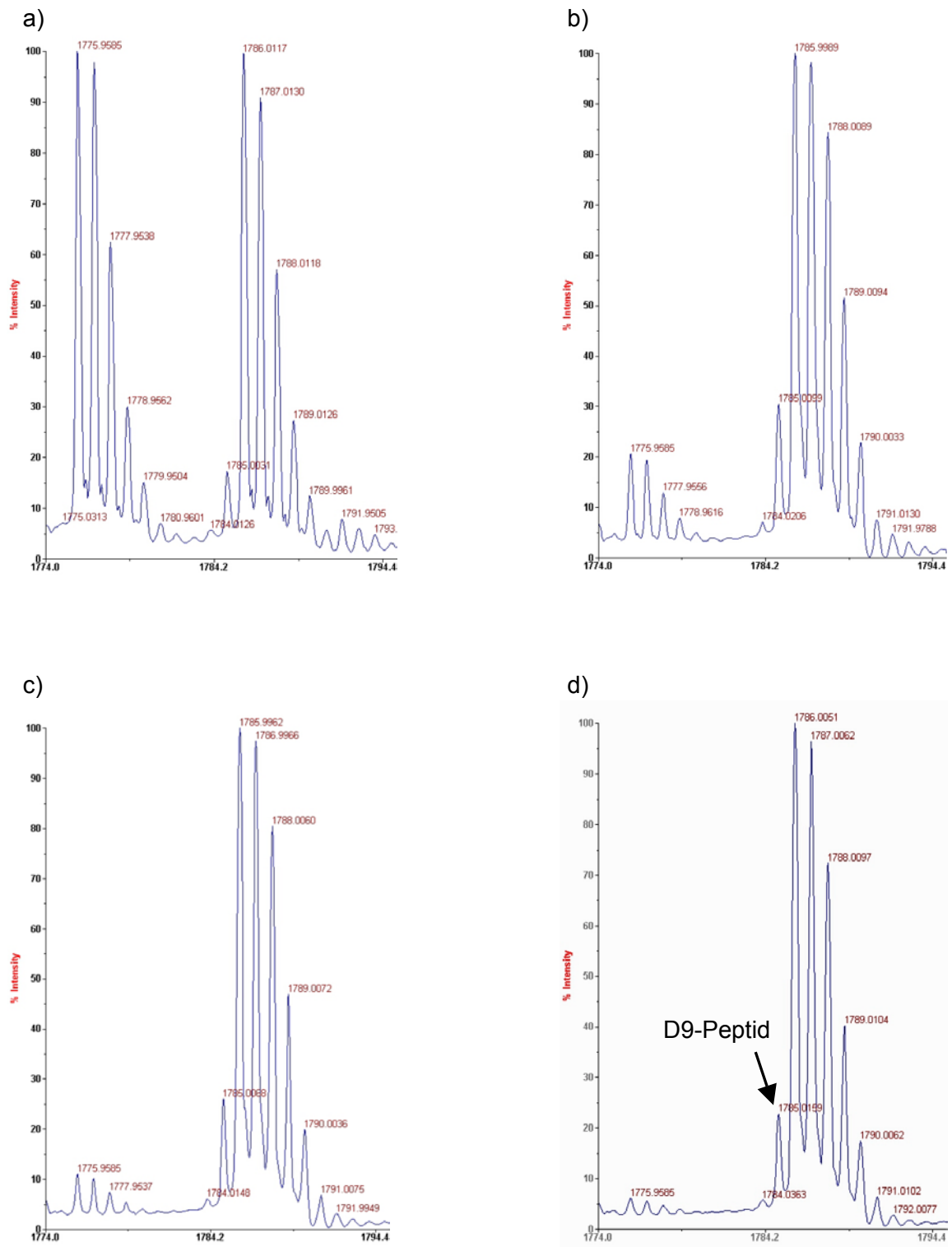


Abb. 22 MALDI-MS-Spektren der differentiellen Markierung des Modellpeptides N-Acetyl-ATSYLTAKASRAR mit der leichten bzw. schweren ImBAS-Variante. Mischverhältnisse leicht zu schwer: a) 1 : 1, b) 1 : 5, c) 1 : 10 und d) 1 : 20, mit Angabe des D9-ImBAS-markierten Peptides

5.5 Präparation und Kultur der BMEC

Die Präparation ausgehend von 37 Hirnhälften laut 4.2.1 ergab eine Ausbeute von durchschnittlich $2 \cdot 10^8$ Zellen. Da die BMEC in traubenartigen Zellhaufen vorlagen, war eine genaue Zellzählung nicht möglich. Die Vitalität der BMEC, ermittelt wie unter 4.2.3.1 beschrieben, lag bei über 90%, die Kontamination mit Erythrocyten bei unter 5%.

Die Zellen wurden in kollagenierte Kulturgefäße ausgesät und zunächst in serumhaltigem Medium in Gegenwart von Antibiotika kultiviert (4.2.2). Die Identität der kultivierten Zellen wurde in den einzelnen Passagen anhand des Nachweises von Marker-Proteinen bestätigt. Diese Marker-Proteine wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (4.2.3.3). Das *tight-junction*-spezifische Protein *Zonula occludens Protein 1* (ZO-1) und der *Glucose Transporter 1* (Glut1) wurden zur Identifizierung von BMEC genutzt. Mit dem *van Willebrand Faktor* (vWF) wurde auch ein allgemeiner Endothel-Marker immunchemisch detektiert. Um Aussagen über Kontaminationen der Präparation mit anderen Zelltypen des Gehirns treffen zu können, wurden die Kulturen auch auf *smooth muscle Actin* (smActin) untersucht. Diese Aktinart ist in BMEC nicht nachzuweisen, wird jedoch z. B. von Perizyten exprimiert. Diese immunchemischen Färbungen dienten somit dazu, die Zellkultur auf Kontaminationen mit diesem schnell wachsenden Zelltyp zu untersuchen. Zur besseren Orientierung wurden alle immunchemischen Färbungen mit einer Färbung des Zellkerns (Dapi-Färbung) kombiniert.

Wie in den BMEC-spezifischen Färbungen in Abb. 23 und Abb. 24 zu erkennen ist, nimmt mit steigender Passagenzahl die Expression der BHS-Marker ZO-1 und Glut1 kontinuierlich ab. Damit scheint eine Vergrößerung der Zell- und Zellkerndimensionen einherzugehen. Die Endothel-spezifische Färbungen mit anti-vWF-Antikörper (Abb. 25) zeigte nur eine geringfügige Abnahme der Färbungsintensitäten, wenngleich auch hier starke Veränderungen der Zellmorphologie mit ansteigender Passagenzahl festzustellen waren. Die immunchemischen Färbungen mit anti-smActin-Antikörper in Abb. 26 zeigten eine über alle Passagen konstante geringfügige Kontamination der BMEC-Kultur mit Perizyten. Auch in diesen mit geringerer Vergrößerung aufgenommenen Bildern ist eine Änderung der Zellkernmorphologie zu erkennen.

Aufgrund der beschriebenen Veränderungen, die mit zunehmender Passagenzahl auftraten, wurden zur Anreicherung und Identifizierung BHS-spezifischer Oberflächenproteine nur BMEC der Passage 0 eingesetzt. Diese Zellen waren drei Tage nach der Zellpräparation bis zur Konfluenz gewachsen und wurden vor ihrer Oberflächenmarkierung 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert.

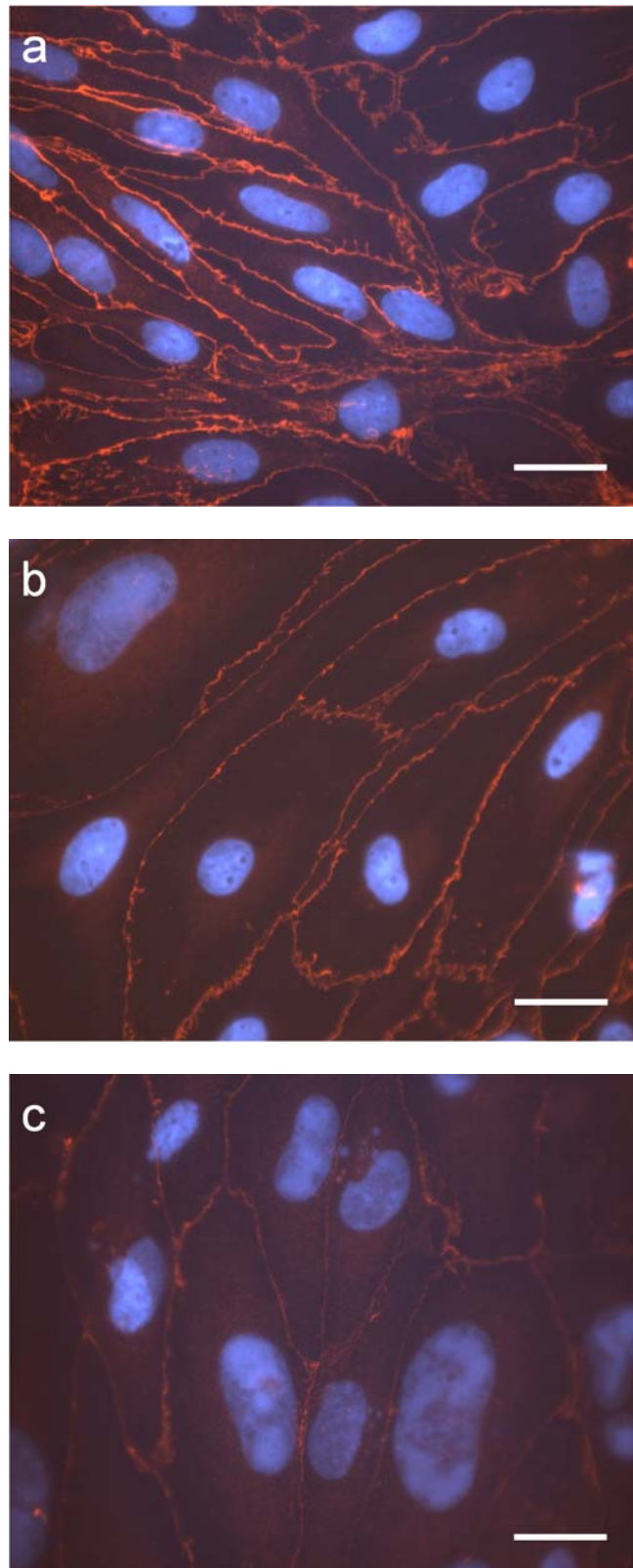


Abb. 23 Immunfluoreszenzfärbungen der BMEC verschiedener Passagen,
Erstantikörper : anti-ZO-1 (Rt)-Ak , Zweitantikörper anti-Rt-Ak/Cy3;
Belichtungszeiten Cy3 / Dapi in Klammern; — : 20 μ m
a) Passage 0, (700 ms / 50 ms)
b) Passage 1, (900 ms / 50 ms)
c) Passage 2, (1500 ms / 50 ms)

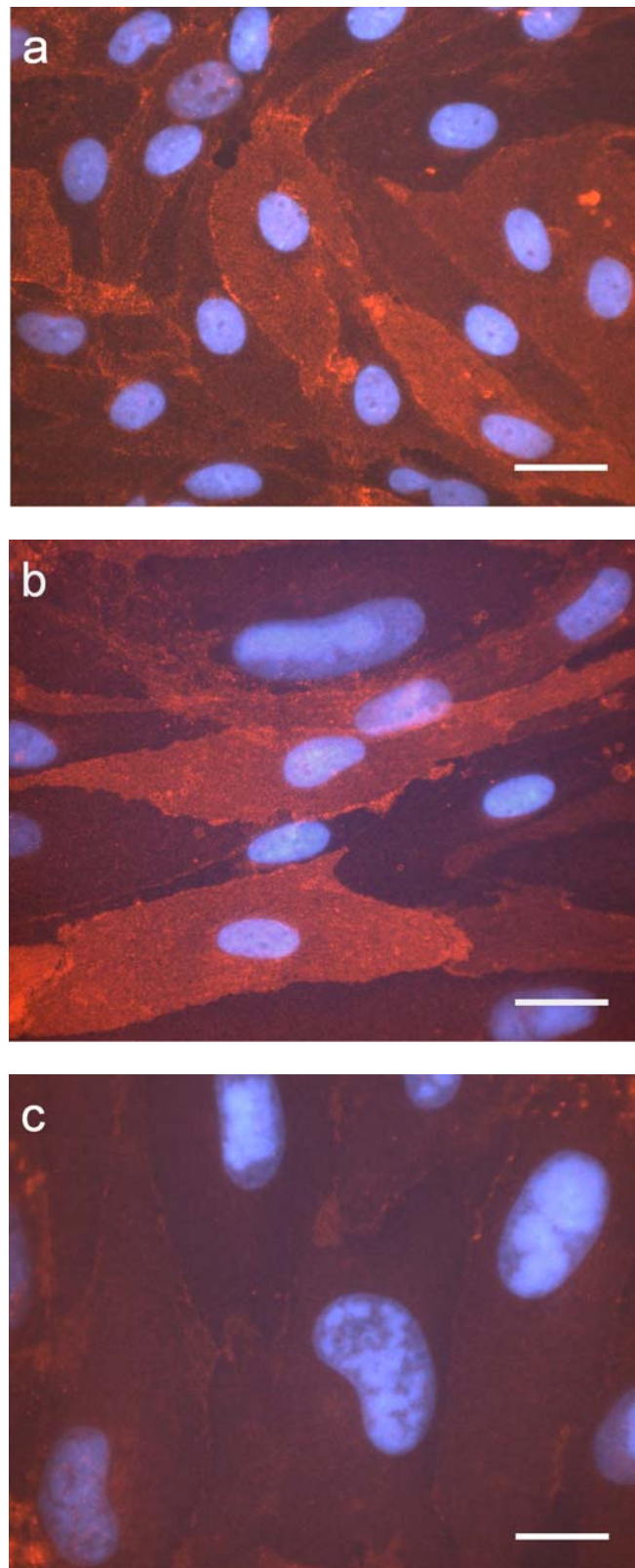


Abb. 24 Immunfluoreszenzfärbungen der BMEC verschiedener Passagen, Erstantikörper : anti-Glut1 (Rb)-Ak , Zweitantikörper anti-Rb-Ak/Cy3; Belichtungszeiten Cy3 / Dapi in Klammern; — : 20 μ m
a) Passage 0, (780 ms / 40 ms)
b) Passage 1, (780 ms / 40 ms)
c) Passage 2, (1000 ms / 40 ms)

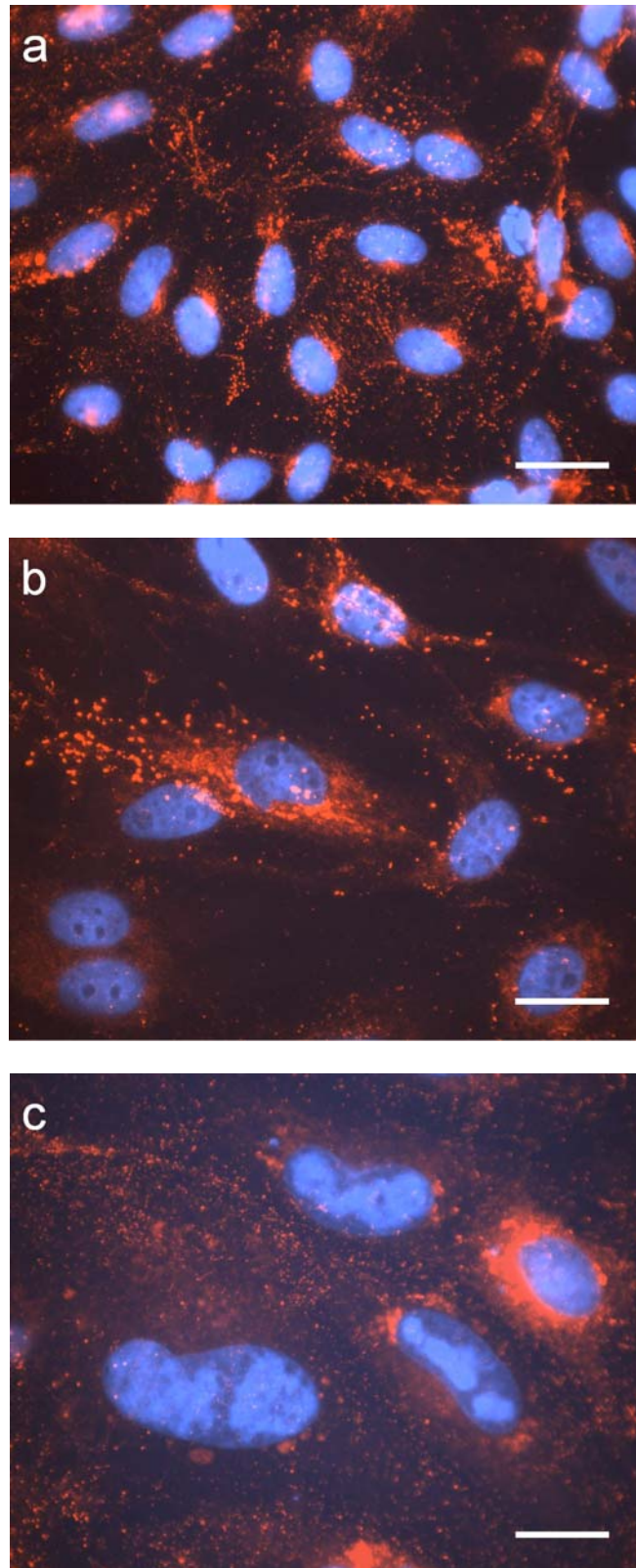


Abb. 25 Immunfluoreszenzfärbungen der BMEC verschiedener Passagen,
Erstantikörper : anti-vWF (Rb)-Ak , Zweitantikörper anti-Rb-Ak/Cy3;
Belichtungszeiten Cy3 / Dapi in Klammern; — : 20 μ m
a) Passage 0, (450 ms / 40 ms)
b) Passage 1, (450 ms / 40 ms)
c) Passage 2, (450 ms / 40 ms)

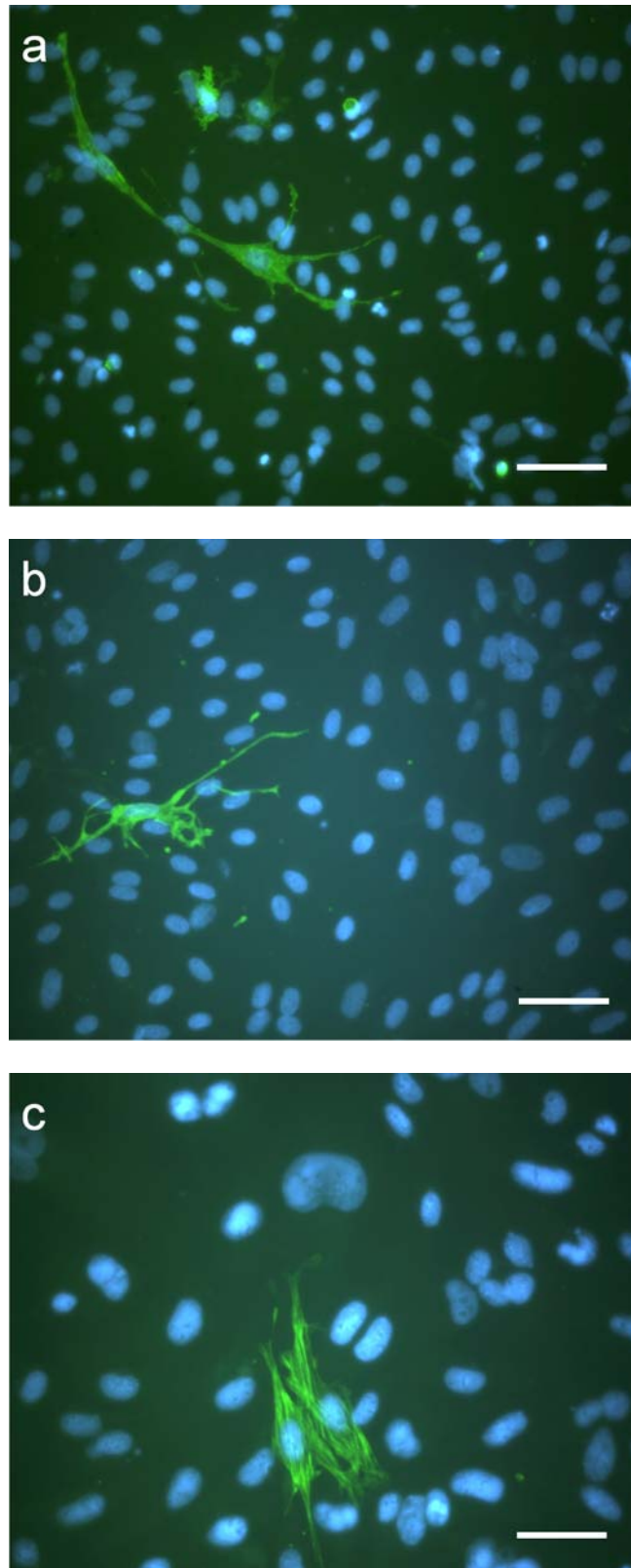


Abb. 26 Immunfluoreszenzfärbungen der BMEC-Kultur verschiedener Passagen, Erstantikörper : anti- α -sm-Actin (Ms)-Ak , Zweitantikörper anti-Ms-Ak/FITC; Belichtungszeiten FITC / Dapi in Klammern; — : 50 μ m
a) Passage 0, (2500 ms / 100 ms)
b) Passage 1, (2500 ms / 100 ms)
c) Passage 2, (2500 ms / 100 ms)

5.6 Oberflächenmarkierung von vitalen Zellen

Zur Oberflächenmarkierung vitaler Zellen (4.5.3) wurden BMEC der Passage 0 eingesetzt. Diese Zellen wurden vor der Markierung 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Wurde dieser vorbereitende Schritt vermieden, zeigten die unter 4.5.4 angereicherten markierten Proteine Kontaminationen mit markiertem Rinderserumalbumin (BSA). Dies konnte auch nicht durch mehrmaliges Waschen der Zellkultur vor der Markierung mit PBS⁻-Puffer verhindert werden (Daten nicht gezeigt). Eine der Markierung vorangestellte serumfreie Kultivierung war somit nötig. Die für eine präparative Oberflächenmarkierung vorgesehenen Zellen wurden in T175-Flaschen, die für spätere Färbungen vorgesehenen Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturplatten kultiviert. Die Markierungen wurden mit in-situ aktiviertem ImBAS oder mit dem aktivierten Ester SNHS-ImBAS durchgeführt (4.5.3). Wie aus Abb. 27 ersichtlich, war bei den markierten Populationen nach der Markierung im Vitalitätstest (4.2.3.1) keine Verringerung der Vitalität festzustellen.

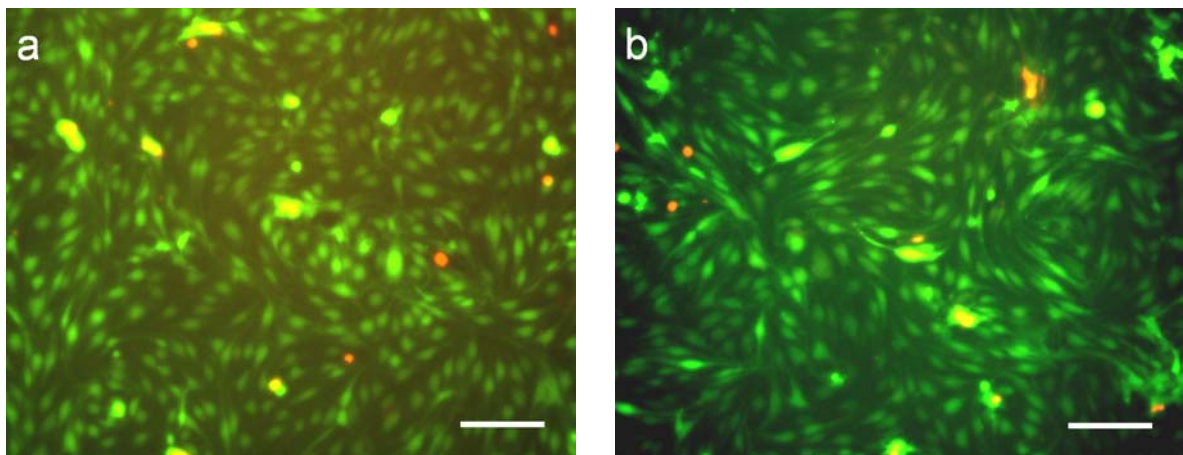


Abb. 27 Vitalitätsfärbung ImBAS-markierter BMEC der Passage 0 in Kultur, — : 100 μ m
a) Markierung mit 1 mg/ml SNHS-ImBAS
b) unmarkierte Kontrollpopulation

Zum Nachweis der Oberflächenmarkierung auf den Zellen wurden diese nach der Markierung mit Methanol fixiert (4.2.3.2) und mit Hilfe eines Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugates gefärbt (4.2.3.4). Zusätzlich wurde eine Zellpopulation vor der Markierung mit Digitonin permeabilisiert (4.5.3.1). Der enzymatische Nachweis der Markierung ist in Abb. 28 durch den Vergleich der unmarkierten Kontrollpopulation mit den markierten Populationen dargestellt. Im Falle der permeabilisierten Population fällt dabei eine stärkere Färbung auf, die zum Teil die Zellkerne mit einschließt.

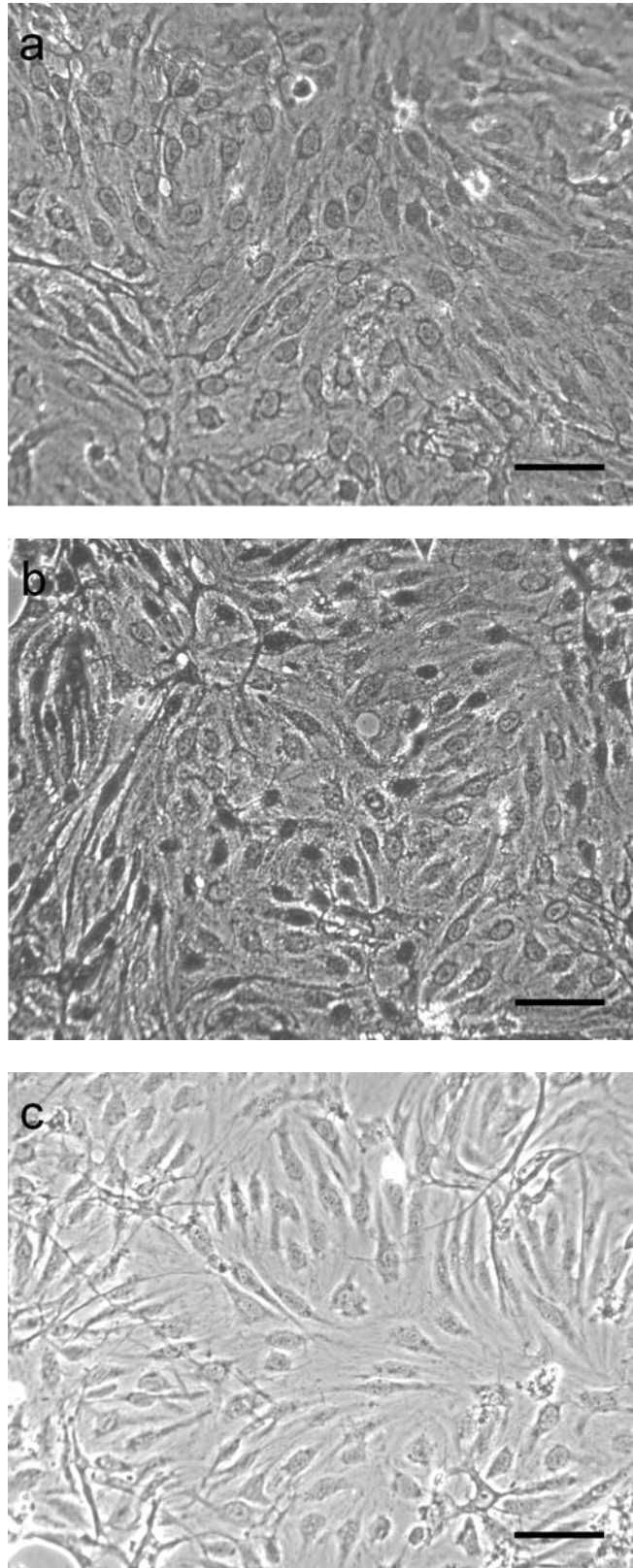


Abb. 28 Affinitätsfärbung ImBAS-markierter BMEC der Passage 0 mit dem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-System, Entwicklungs- und Belichtungszeiten identisch, — : 50 μ m
a) Markierung mit 1 mg/ml SNHS-ImBAS
b) Markierung mit 1 mg/ml SNHS-ImBAS nach Permeabilisierung mit Digitonin
c) unmarkierte Kontrollpopulation

5.7 Anreicherung ImBAS-markierter Proteine

Zur Anreicherung ImBAS-markierter Oberflächenproteine von BMEC wurden vier T175-Flaschen mit BMEC der Passage 0 eingesetzt. Die Zellen wurden, wie unter 4.5.3 beschrieben, mit 1 mg/ml SNHS-ImBAS markiert und dann in Gegenwart von Proteaseinhibitoren und Triton X-100 aufgeschlossen (4.5.4.1). Nach dem Entfernen der unlöslichen Bestandteile, wurde die Probe einer Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose-Material unterzogen (4.5.4.2). Das Chromatogramm der Reinigung (Abb. 29) zeigt die Elution der ImBAS-markierten Proteine von der Säule nach pH-Wert-Änderung. Der Durchbruch mit den nicht markierten Proteinen ist im Chromatogramm nicht zu sehen, da die Säule erst nach dem Auswaschen der ungebundenen Proteine an das Chromatographie-System angeschlossen wurde. Die Chromatographie wurde unter den Bedingungen 0,5 M NaCl und 0,05 % (v/v) Triton X-100 durchgeführt, um unspezifische Bindungen der Proteine an die Säule zu unterdrücken bzw. um die Löslichkeit der Proteine zu begünstigen. Das Eluat von 1,7 ml wurde manuell gesammelt und über einer Membran mit der Ausschlussgrenze 3 kDa auf ein Volumen von 150 µl eingengt. Das Säulenmaterial (1 ml) wurde mit PBS⁻-Puffer gewaschen, in 20 % (v/v) Ethanol gelagert und konnte mehrfach verwendet werden.

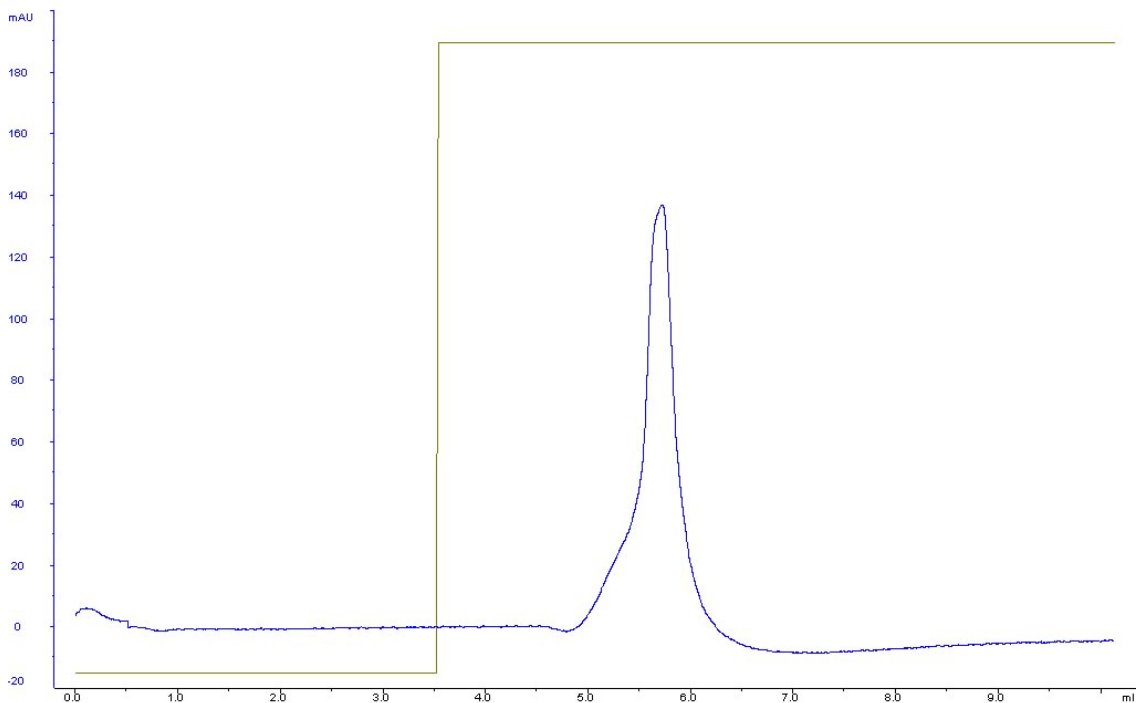


Abb. 29 Affinitätschromatographie von ImBAS-markierten BMEC-Proteinen an Streptavidin-Sepharose. Puffer A: Bindepuffer (pH10), Puffer B: Elutionspuffer (pH4), Konzentration von Puffer B: grün, Absorption bei 280 nm: blau

5.7.1 Konzentrationsbestimmung der eluierten Proteine

Das eingesetzte Detergenz Triton X-100 ist nicht dialysierbar und reichert sich somit beim Einengen der Triton-haltigen Probe über der Membran an. Da hohe Triton X-100-Konzentrationen die Ergebnisse herkömmlicher Protein-Bestimmungs-Methoden verfälschen, musste eine alternative Methode zur Abschätzung der Proteinkonzentration der Probe angewandt werden. Hierzu wurden Lösungen eines Standardproteins (BSA) in Elutionspuffer verwendet, deren Absorptionssignale mit Hilfe des Chromatographie-Systems aufgezeichnet wurden. Um hierbei eine zu starke Ausweitung des Signals zu vermeiden, fand dies ohne Säule statt. Die Signalintegrale waren in ihrer Größe reproduzierbar und dabei proportional zu den applizierten Proteinmengen (Abb. 30).

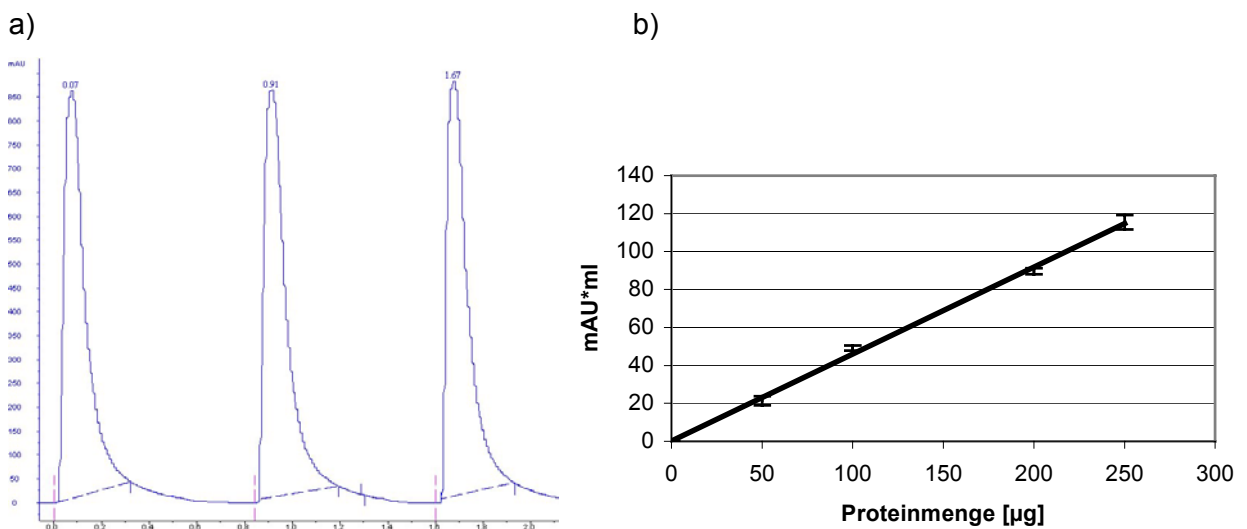


Abb. 30 Standardreihe zur Proteinbestimmung der angereicherten Proteine
 a) Chromatogramm der dreifachen Applikation von je 200 µg BSA in Elutionspuffer, Absorption bei 280 nm blau dargestellt mit gestrichelter Basislinie
 b) Graph des Verhältnisses der Signalintegrale zur Proteinmenge, ($R = 0,998$)
 Geradengleichung: $y = 4,48 \text{ mAU*ml*}\mu\text{g}^{-1} + 0,05 \text{ mAU*ml}$

Das Signalintegral der in der Affinitätschromatographie ImBAS-markierter Proteine (Abb. 29) betrug 61 mAU*ml. Entsprechend des in Abb. 30 dargestellten Zusammenhangs zwischen Proteinmenge und Signalfäche kann die Gesamtmenge der angereicherten ImBAS-markierten Oberflächenproteine aus BMEC mit 132 µg angenommen werden.

5.7.2 SDS-PAGE angereicherter Proteine

Mit den Fraktionen der Affinitätschromatographie ImBAS-markierter BMEC-Proteine aus 5.7 und einer Kontrollprobe wurde ein analytisches Gel (4.1.3) und ein identisch belegter Blot auf einer PVDF-Membran (4.1.5) hergestellt (Abb. 31). Das Gel wurde einer Sypro-Ruby-

Färbung (4.1.4.1), der Blot wurde einer Affinitätsfärbung (4.1.6.3) unter Verwendung eines Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugates unterzogen.

Aufgetragen sind hier 10% des konzentrierten Eluates (kE_i) der markierten, angereicherten Proteine aus 5.7. Die Spuren K, I und DB_i sind mit jeweils 0,4% eines Aufschlusses bzw. des Durchbruchs der Affinitätsreinigung belegt.

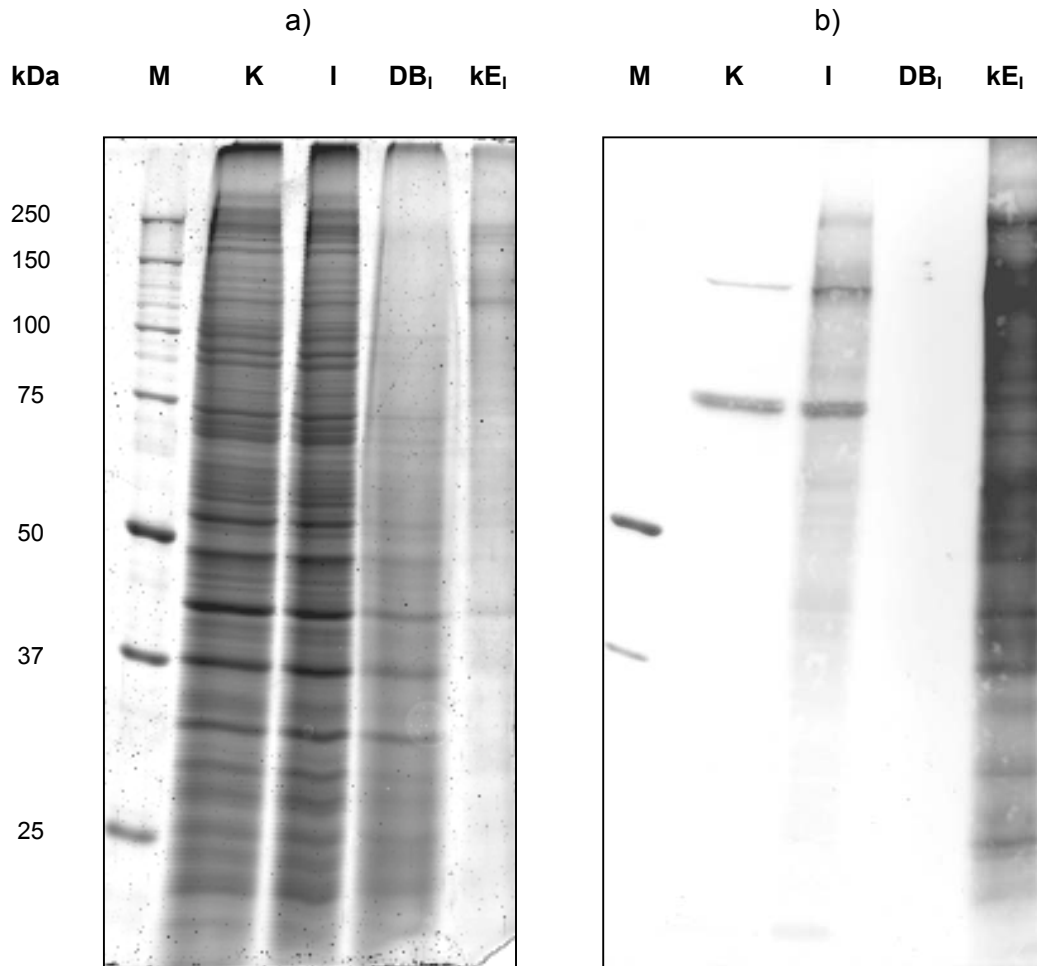


Abb. 31 SDS-Gel und Blot der Fraktionen der Affinitäts-Chromatographie ImBAS-markierter Proteine aus BMEC; M: Marker, K: Kontrolle, I: markiertes Protein vor Säule, DB_i : Durchbruch, kE_i : konzentriertes Eluat
 a) SDS-Gel mit Fraktionen der ImBAS-Anreicherung, nach Sypro-Ruby-Färbung
 b) Blot nach Affinitätsfärbung, Probenauftrag identisch zu a)

Die Affinitätsfärbung des Blotes in Abb. 31b zeigt eine deutliche Anreicherung markierter Proteine im konzentrierten Eluat (kE_i) der Chromatographie, wohingegen im Durchbruch (DB_i) keine Färbung zu erkennen ist. Sowohl die Kontrollprobe der unmarkierten Zellen (K), als auch der Aufschluss der ImBAS-markierten Zellen (I) zeigt distinkte Banden bei 75 und 120 kDa. Probe I zeigt darüber hinaus Signale im gesamten Massenbereich von 250 bis 25 kDa.

5.7.3 Präparative SDS-PAGE

Um eine Identifizierung der unter 5.7 angereicherten Proteine mittels MALDI-MS zu ermöglichen, wurde ein präparatives SDS-Gel (4.1.3) des konzentrierten Eluates angefertigt.

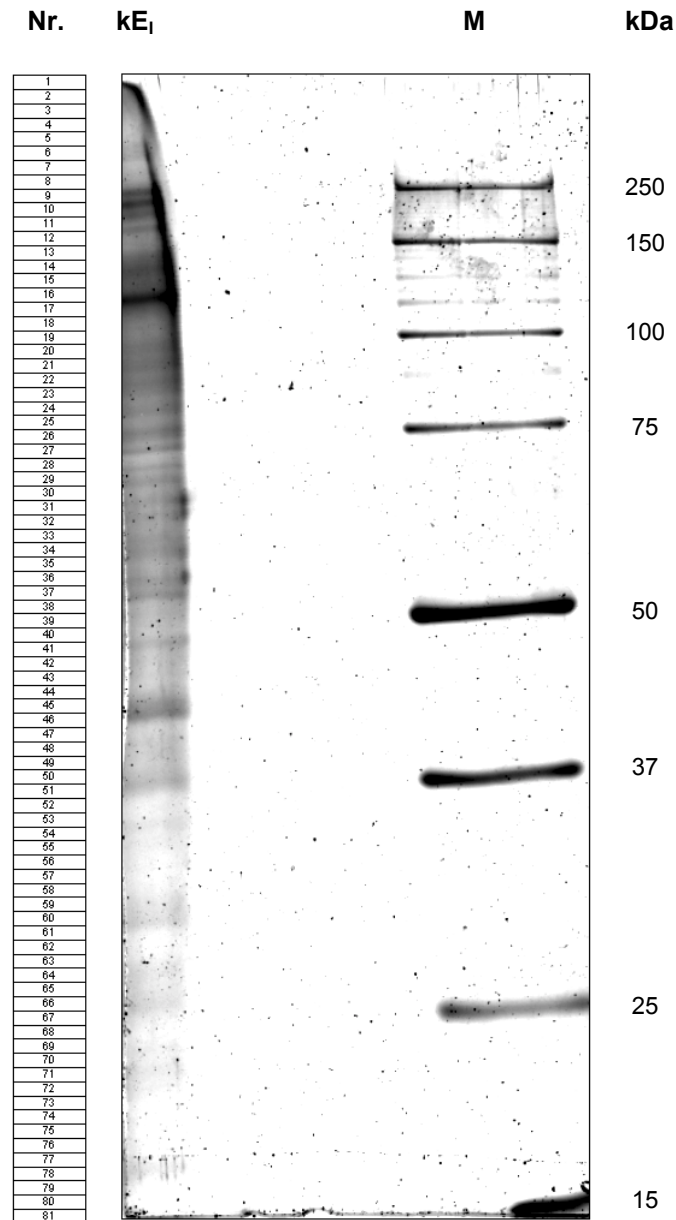


Abb. 32 Präparatives SDS-Gel der angereicherten ImBAS-markierten BMEC-Proteine, nach Elektrophorese Probenspur in 81 Stücke geschnitten, Restgel mit Sypro-Ruby-Lösung gefärbt. Nr. : Bandennummer, kE₁: konzentriertes Eluat der angereicherten ImBAS-markierten Proteine, M : Marker

Auf dieses Gel wurden 45 µl der Probe kE₁, d. h. 30% des konzentrierten Eluates (kE₁) der markierten, angereicherten Proteine aus 5.7 aufgetragen. Das Gel wurde zunächst nicht gefärbt, um die bei der späteren Hydrolyse entstehenden Peptide mit größerer Ausbeute aus dem Gel extrahieren zu können. Unmittelbar nach der Elektrophorese wurde die Probenspur

in 81 Stücke geschnitten (je ca. 10 mm x 1 mm). Das restliche Gel wurde mit Sypro-Ruby-Lösung gefärbt (4.1.4.1) und ist in Abb. 32 dargestellt. Am rechten Rand der Probenspur ist dabei das Bandenmuster der Probe kE_I zu erkennen.

An der linken Seite des restlichen Geles ist in Abb. 32 die Nummerierung der Gelbanden angegeben. Diese Nummerierung wird als Probenbezeichnung während der weiteren Analytik beibehalten. Die Gelbanden wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.8 Identifizierung der angereicherten Proteine

5.8.1 MALDI-MS-Analyse der Proteine

Die in den Gelbanden enthaltenen Proteine wurden einer sechsstündigen Hydrolyse mit Trypsin bei 37°C unterzogen (4.3.1.1). Nach der Anreicherung der Peptide aus den Hydrolyseüberständen mittels ZiP-Tip-Säulchen (4.3.1.2), fand die MALDI-MS-Analytik wie unter 4.3.2 angegeben statt. Die Analyse mittels MALDI-MS ergab dabei pro Probe ein Set von Peptidmassen, einen sog. *peptide mass fingerprint* (PMF). Anhand dieser PMFs sollten die vorliegenden Proteine mit Hilfe von Datenbankrecherchen identifiziert werden. Die Erfolgsaussichten ein Protein anhand seines PMF seiner Datenbankannotation zuzuordnen zu können, sind von der Qualität des Spektrums maßgeblich abhängig. Neben der Massengenauigkeit der Messung ist die Kontamination mit Protein-unspezifischen Massenwerten als ein wesentliches Kriterium der Qualität des Spektrums anzusehen. Um die Massengenauigkeit zu erhöhen, wurden bei der Auswertung der Spektren diese unter Bezugnahme auf die bekannten Massen der Trypsinfragmente kalibriert. Diese interne Kalibrierung wurde zusätzlich zu der externen Kalibrierung, d. h. die Kalibrierung auf einen der Probe unmittelbar benachbarten Peptidstandard, durchgeführt. Um die Kontamination mit Protein-unspezifischen Massenwerten zu verringern, wurden die bekannten kontaminierenden Massen von den Massenlisten abgezogen. Hierbei handelte sich um Massen, die z. B. von der Matrix oder den verwendeten Chemikalien herrührten und die zuvor auch in Kontrollexperimenten ohne Protein auftraten. Eine Liste der ausgeschlossenen, kontaminierenden Massenwerte ist im Anhang angegeben.

Die Spektren wurden wie beschrieben intern kalibriert, und, nach Abzug der Basislinie, mit einem speziellen Algorithmus graphisch geglättet (*noise removal factor*: 2). Dann wurden die Spektren auf ihre monoisotopischen Signale reduziert (vgl. Abb. 33) und die jeweilige Massenliste erstellt. Nach Abzug der kontaminierenden Massenwerte wurden diese Massensets für die weiteren Datenbankrecherchen, wie unter 5.8.2 beschrieben, verwendet.

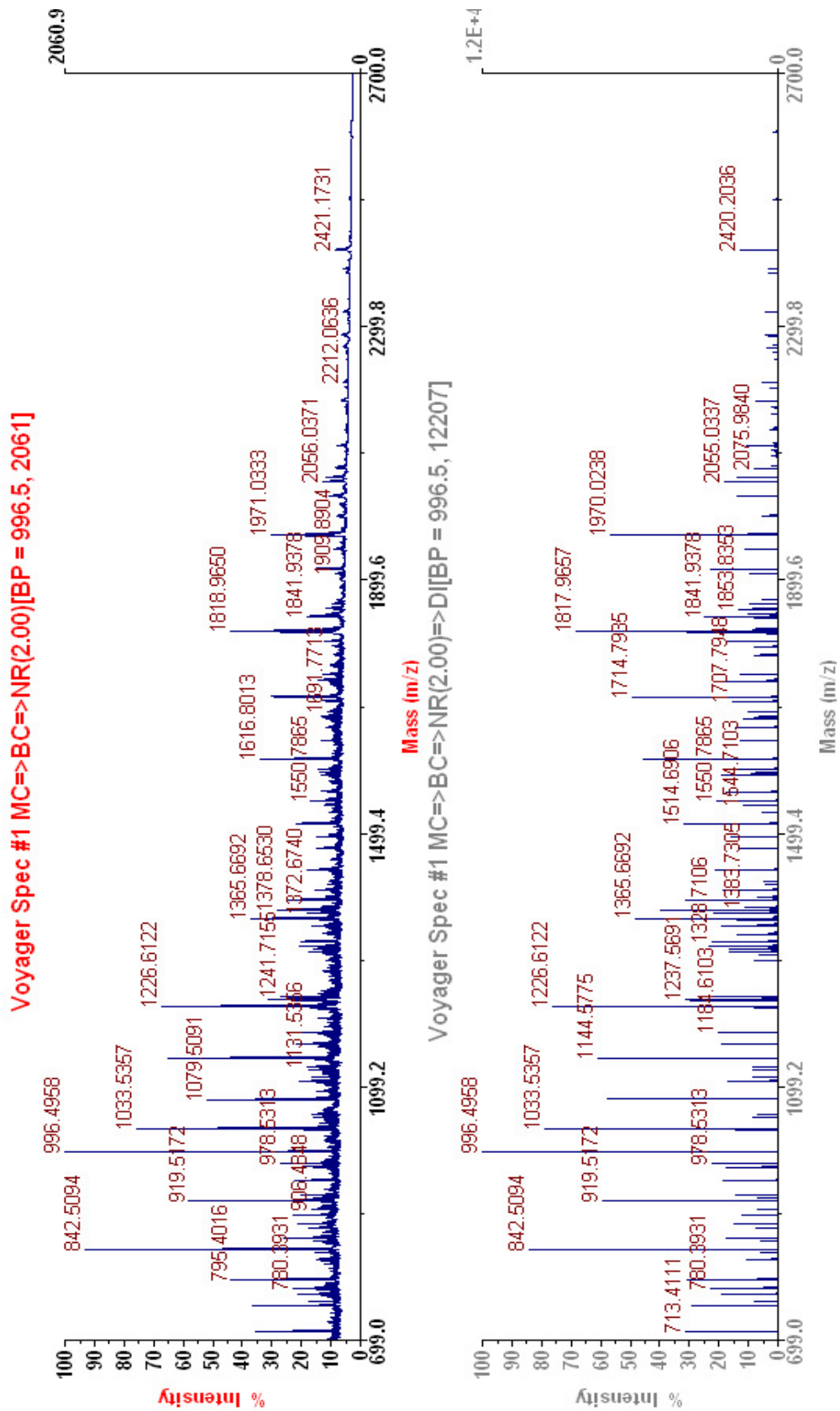


Abb. 33 Maldi-MS-Spektrum der Probe 26, nach Abzug der Basislinie und Glättung, vor (oben) und nach (unten) Reduzierung auf die monoisotopischen Signale; kalibriert auf die autolytischen Signale des Trypsins (z. B. 842,5094 m/z).

5.8.2 Identifizierung der Proteine mittels Datenbankrecherche

Die Datenbankrecherche wurde mit Hilfe der Suchmaske Mascot (*Matrixscience*) durchgeführt. Um die Massenänderung, die mit der ImBAS-Markierung eines Proteines einhergehend berücksichtigen zu können, wurden die nötigen Daten in der *UNIMOD*-Datenbank annotiert. Die *UNIMOD* – Datenbank beinhaltet die Massenänderungen einer Vielzahl von Proteinmodifikationen natürlicher und artifizierlicher Art. Die Suchmaske Mascot berücksichtigt die bei *UNIMOD* annotierten Modifikationen und kann somit zur Identifizierung ImBAS-markierter Proteine verwendet werden.

Tab. 21 Annotation der ImBAS-Markierung bei *UNIMOD*:

| ImBAS-Varianten | D0-ImBAS | D10-ImBAS |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Bezeichnung | ESP-Tag light d0 | ESP-Tag light d10 |
| Kurzbezeichnung | ESP-Tag_light | ESP-Tag_heavy |
| Zusammensetzung | H(26) C(16) N(4) O(2) S | H(26) H2(10) C(16) N(4) O(2) S |
| Δ Masse (monoisotopisch) | 338,177647 Da | 348,240414 Da |
| Δ Masse (durchschnittlich) | 338,4682 Da | 348,5299 Da |
| Position | Lysin / N-Terminus | Lysin / N-Terminus |

Die Mascot-Recherchen wurden in den Datenbanken SwissProt und NCBI durchgeführt. Die Massenänderungen bedingt durch die Oxidation von Methioninresten wurden dabei toleriert. Die Suche wurde mit einer maximalen Anzahl von zwei *missed cleavages*, d. h. zwei ausgelassenen trypsinspezifischer Hydrolysestellen und bei einer Massengenauigkeit von 20 –100 ppm durchgeführt. Hydrolysestellen, denen unmittelbar ein Prolinrest folgte, wurden dabei nicht akzeptiert. Konnten einem identifizierten Protein nicht alle im Spektrum gefundenen Signale zugeordnet werden, wurde mit den verbliebenen Signalen eine erneute Suche unter weniger stringenten Parametern durchgeführt.

Die Ergebnisse der Recherchen sind in Tab. 22 zusammengefasst. Nicht aufgeführt sind hier die Proben, die zwar gute Spektren aufwiesen, mit deren Massenliste jedoch kein Protein identifiziert werden konnte (19 Proben). Ebenfalls nicht ausgewiesen sind die Proben, die eine Häufung Triton X-100-typischer Signale aufwiesen (fünf Proben). Diese zeigten, aufgrund der Polyoxyethylenkette des Triton X-100, Signalgruppen mit spezifischen Massendifferenzen von jeweils 44,03 Da.

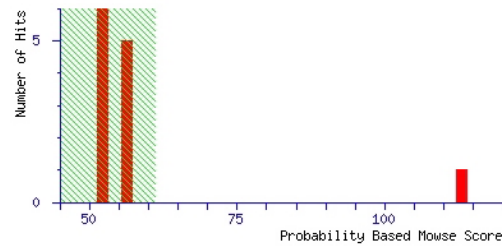
a)

{MATRIX}
{SCIENCE} **Mascot Search Results**

Search title : b26
 Database : SwissProt 41.1 (183303 sequences; 91969008 residues)
 Taxonomy : Mammalia (mammals) (68054 sequences)
 Timestamp : 11 Apr 2003 at 17:37:28 GMT
 Top Score : 113 for **002840**, Vascular endothelial-cadherin precursor (VE-cadherin)

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 61 are significant ($p < 0.05$).



Re-Search All

Search Unmatched

1. [002840](#) **Mass:** 87492 **Total score:** 113 **Peptides matched:** 22
 Vascular endothelial-cadherin precursor (VE-cadherin) (Cadherin-5)

b)

Protein View

Match to: **002840**; Score: 113
Vascular endothelial-cadherin precursor (VE-cadherin) (Cadherin-5)

Nominal mass (M_r): **87492**; Calculated pI value: 5.31

NCBI BLAST search of [002840](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Sus scrofa](#)

Variable modifications: Oxidation (M), ESP-Tag_light (K)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 61

Number of mass values matched: 22

Sequence Coverage: 23%

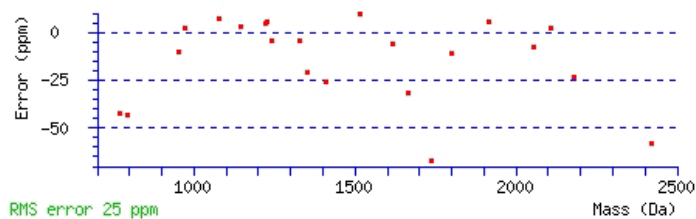
Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MQVLVMLLAA AGTYLGLLTA PTAASNPGRQ DTPSTLPLHR RQKRDWIWNQ
51  MHIDEEEKNGS LPHYVVGKIKS SVNHKNTKYQ LRGESAGKVF RVDENTIGDVI
101 AFERLDREKI PEYQLVALV DKNTEKNLES PSSFTIKVHD INDNWPVFTQ
151 LVFNASVPDM SVIGTSVIQL TAVDADDPTV ADHASVIYRL KEGEEHFRIR
201 GPGLIETASK NLDRETVPY KIVVETQDAQ GLRGDSGTAT VFITLQDVND
251 NFPVFTQTRY TFSVPEDIRV GSPLGSLFVK DPDEPNRKT KYSIVQGEYR
301 DTFTIEPDPT RMEGIKPMK PLDYERIQY SFTIEADPT IDLRYLSGTS
351 TKNIARVIIN VTDVDEPPNF KQPFYHFQLR ENEKPKWIGS VLAVDPDAAQ
401 RSIGYSIRRT SDKGQFFGIN KHGNIYNVKE LDREVYPWYN LTVEAKELDS
451 RGTPTGKESI VQVHIEVLDE NDNAPFAKP YEAKVCEDAP QGKLVVQISA
501 IDKDVTPRDV KFKFSLSTED SNFTLTDNHD NTANITVKHG YFDREARAVH
551 HLPILISDNG RPSLTGTSTL HVTVCKCNER GEFTLCEEMG AQVGVSIQAL
601 VAIFLCILTI AVISLLVYLR RRLRKQARAH GRSVPEIHEQ LVTYDEEGGG
651 EMDTTSYDVS VLNSVRHGGA KPPRPALDAR PSLYAQVQKP PRHAPGAHAP
701 GEMAAMIEVK KDEADHDGGG PPYDTLHIFG YEGAESIAES LSSLGTDSSD
751 SDIDYDFLND WGRPRFKMLAE LYGSDPREEL LY

```

c)



d)

| Start - End | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Sequence |
|-------------|----------|----------|----------|-------|------|-------------------------------------|
| 58 - 67 | 1409.70 | 1408.69 | 1408.73 | -0.04 | 0 | NGSLPHYVVK ESP-Tag_light (K) |
| 70 - 78 | 1352.68 | 1351.67 | 1351.70 | -0.03 | 1 | SSVNHKNTK ESP-Tag_light (K) |
| 89 - 104 | 1916.92 | 1915.92 | 1915.91 | 0.01 | 1 | VFRVDENTGDVYAFER |
| 92 - 104 | 1514.69 | 1513.68 | 1513.67 | 0.01 | 0 | VDEITGDVYAFER |
| 108 - 122 | 2420.20 | 2419.20 | 2419.34 | -0.14 | 1 | EKIPEYQLVALVVDK 2 ESP-Tag_light (K) |
| 127 - 137 | 1222.64 | 1221.63 | 1221.62 | 0.01 | 0 | NLESPSSFTIK |
| 190 - 198 | 1144.58 | 1143.57 | 1143.57 | 0.00 | 1 | LKEGEEHFR |
| 199 - 210 | 1241.72 | 1240.71 | 1240.71 | -0.01 | 1 | IRGGLIETASK |
| 199 - 214 | 1739.86 | 1738.85 | 1738.97 | -0.12 | 2 | IRGGLIETASKNLDR |
| 201 - 210 | 972.54 | 971.53 | 971.53 | 0.00 | 0 | GPGLIETASK |
| 222 - 233 | 1328.71 | 1327.70 | 1327.71 | -0.01 | 0 | IVVETQDAQGLR |
| 260 - 269 | 1226.61 | 1225.60 | 1225.60 | 0.01 | 0 | YFVSPEDIR |
| 270 - 288 | 2055.03 | 2054.03 | 2054.04 | -0.02 | 1 | VGSPLGSLFVKDPDEPQNR |
| 270 - 289 | 2183.09 | 2182.09 | 2182.14 | -0.05 | 2 | VGSPLGSLFVKDPDEPQNRK |
| 281 - 291 | 1665.78 | 1664.78 | 1664.83 | -0.05 | 2 | DPDEPQNRKTK ESP-Tag_light (K) |
| 312 - 326 | 1802.93 | 1801.92 | 1801.94 | -0.02 | 0 | NEGIKPMKPLDYER |
| 327 - 344 | 2111.07 | 2110.06 | 2110.06 | 0.00 | 0 | IQQYSFTIEATDPTIDLR |
| 402 - 408 | 795.40 | 794.39 | 794.43 | -0.03 | 0 | SIGYSIR |
| 402 - 409 | 951.53 | 950.52 | 950.53 | -0.01 | 1 | SIGYSIRR |
| 539 - 546 | 1079.51 | 1078.50 | 1078.49 | 0.01 | 1 | HGYFDRER |
| 539 - 548 | 1616.80 | 1615.79 | 1615.80 | -0.01 | 2 | HGYFDRERAK ESP-Tag_light (K) |
| 623 - 628 | 771.46 | 770.45 | 770.49 | -0.03 | 2 | LRRQAR |

Abb. 34 Mascot-Ergebnis der Datenbankrecherche für Probe 26

- Darstellung des Mowse-Scores des zugeordneten Proteins
- Sequenzabdeckung der Peptide im zugeordneten Protein
- Abweichungen der Signale von den zugeordneten theoretischen Peptidmassen.
- Liste der Peptidsignale mit den zugeordneten theoretischen Peptiden, inklusive der berücksichtigten Modifikationen

Das Ergebnis einer Mascot-Recherche ist am Beispiel der Probe 26 in Abb. 34 dargestellt. Es beinhaltet die graphische Darstellung des Mowse-Scores, eines Wertes, der die Qualität des erhaltenen Treffers beschreibt. Die Grenze ab derer ein Mowse-Score von dem Rechercheprogramm als signifikant eingestuft wird, ist abhängig von der durchsuchten Datenbank und den eingestellten Parametern, sie liegt in der Regel bei Werten zwischen 60 und 70. Des Weiteren wird die Sequenzabdeckung, d. h. die durch die Peptide abgedeckte Sequenz des vorgeschlagenen Proteins angegeben (Abb. 34b). Die graphische Darstellung der Massenabweichungen der Signale von den zugeordneten theoretischen Peptidmassen erlaubt die Beurteilung der Qualität des Treffers (Abb. 34c). So wurde bei Probe 26 mit einer Massengenauigkeit von 70 ppm gesucht, die zugeordneten Massen weichen allerdings nur im Durchschnitt 25 ppm von den theoretischen Werten ab. In der abschließenden Liste der Peptidsignale und der ihnen zugeordneten theoretischen Peptide, werden zusätzlich die berücksichtigten Modifikationen angegeben (Abb. 34d).

Tab. 22 Liste der identifizierten Proteine.

Acc.Nr. : Nummer des Datenbankeintrages, DB : Datenbank, Org. : Organismus, Seq. : Sequenzabdeckung, ppm/MC, Rechercheeinstellungen für Massengenauigkeit (ppm) und erlaubte Anzahl der *missed cleavages*, MW : theoretisches Molekulargewicht, Mark. : Anzahl der Markierungen, Lokal. : Lokalisation des Proteins in der Zelle, C : Cytosol, CS : Cytoskelett, M ass. : Membran assoziiert, N : Nucleus, PM : Plasmamembran (inkl. Membran-verankerte Proteine), S : sekretierte Proteine, u : unbekannte Lokalisation, ? : vorhergesagte Lokalisation, mit * gekennzeichnete Proteine lagen in Mixturen vor.

Tab. „Liste der identifizierten Proteine“, Teil 1

| Probe | Protein | Acc.Nr. | DB | Org. | Seq. [%] | Peptide | Score | ppm/MC | MW [kD] | Mark. | Lokal. |
|-------|---|-----------------|-------|--------|----------|---------|-------|--------|---------|-------|---------|
| 8 | Canalicular multispec. org. anion transp. 1 (MRP2) | Q63120 | SProt | Rt | 10 | 19/38 | 72 | 80/2 | 170 | 7 | PM |
| 11 | sim. to HP1-BP38 protein | gij27691722 | NCBI | Rt, Ms | 17 | 8/14 | 76 | 65/2 | 39 | 6 | N? |
| 13 | unnamed protein product | gij12834852 | NCBI | Ms | 40 | 8/39 | 75 | 55/1 | 19 | 3 | C? |
| 14 | RIKEN cDNA 1200012P04 | gij20891869 | NCBI | Ms | 23 | 17/60 | 74 | 80/1 | 88 | 5 | M ass.? |
| 15 | hypothetical protein FLJ20420 | gij8923390 | NCBI | Hs | 21 | 5/6 | 75 | 50/2 | 26 | 2 | u |
| 16 | homeotic protein R4 - rat (fragment) | gij111789 | NCBI | Rt | 47 | 8/28 | 77 | 50/2 | 13 | 6 | N |
| 17 | Adapter-related protein complex 2 α -1 subunit | P17426 | SProt | Ms | 13 | 15/40 | 64 | 80/2 | 107 | 7 | M ass. |
| 18 | hypothetical protein XP_164238 | gij20864484 | NCBI | Ms | 22 | 8/22 | 74 | 60/2 | 33 | 6 | PM? |
| 19 | plexin-B1/SEP receptor | gij5918167 | NCBI | Hs | 7 | 15/51 | 74 | 60/2 | 214 | 3 | PM |
| 20 | RIKEN cDNA 2610012O22 | gij27716295 | NCBI | Ms | 36 | 6/20 | 67 | 50/1 | 20 | 5 | u |
| 21 | glycogen phosphorylase | gij87575 | NCBI | Hs | 21 | 20/54 | 72 | 55/2 | 97 | 13 | C |
| 22 | Integrin alpha-1 (Laminin and collagen rec.) | gij2829468 | NCBI | Hs | 10 | 12/27 | 73 | 45/2 | 127 | 7 | PM |
| 23 | TNF receptor superfam mem 11B prec | O08727 | SProt | Rt | 20 | 4/15 | 84 | 75/1 | 46 | 5 | S |
| 23_a | Brain acid soluble protein 1 | P80724 | SProt | Bv | 23 | 4/15 | *40 | 75/1 | 23 | 3 | PM |
| 24 | sim. to prot. tyrosine phosphatase, rec. type, B | gij27718409 | NCBI | Ms, Rt | 7 | 16/22 | 82 | 100/2 | 236 | 9 | PM? |
| 25 | Vascular endothelial-cadherin precursor | O02840 | SProt | Pc | 16 | 15/51 | 68 | 80/2 | 87 | 3 | PM |
| 25_a | unnamed protein product | gij26330534 | NCBI | Ms | 48 | 9/36 | 70 | 60/2 | 13 | 11 | u |
| 26 | Vascular endothelial-cadherin precursor | O02840 | SProt | Pc | 23 | 22/61 | 113 | 70/2 | 87 | 6 | PM |
| 26_a | hypothetical protein XP_288900 | gij28551453 | NCBI | Ms | 39 | 9/45 | 83 | 50/1 | 16 | 2 | u |
| 27 | Insulin receptor precursor | P06213-00-28-03 | SProt | Hs | 8 | 13/47 | 70 | 65/2 | 156 | 2 | PM |
| 27_a | Inositol 1,4,5-trisphosphate rec. type 1 | Q9TU34 | SProt | Bv | 2 | 11/34 | *65 | 60/1 | 308 | 10 | PM |
| 27_b | Copper-transporting ATPase 2 | P35670-00-68-01 | SProt | Hs | 6 | 9/34 | *64 | 60/1 | 157 | 3 | PM |
| 28 | RIKEN cDNA 1700049E17 | gij21735459 | NCBI | Ms | 35 | 9/27 | 77 | 55/2 | 20 | 5 | PM? |

Tab. „Liste der identifizierten Proteine“, Teil 2

| Probe | Protein | Acc.Nr. | DB | Org. | Seq. [%] | Peptide | Score | ppm/MC | MW [kD] | Mark. | Lokal. |
|-------|---|-----------------|-------|--------|----------|---------|-------|--------|---------|-------|---------|
| 29 | Vascular endothelial-cadherin precursor | O02840 | NCBI | Pc | 11 | 11/16 | 101 | 20/1 | 87 | 1 | PM |
| 29_a | sim. to ribosomal protein L35 | gij15012043 | NCBI | Hs | 26 | 5/7 | 84 | 90/2 | 15 | 7 | C? |
| 30 | sim. to breast cancer antigen NY-BR-1 | gij27480984 | NCBI | Hs | 27 | 7/27 | 68 | 75/2 | 18 | 3 | u |
| 31 | sim. to cell division cycle 20 homolog | gij20896939 | NCBI | Ms | 24 | 10/57 | 72 | 50/2 | 37 | 2 | u |
| 31_a | sim. to CD151 antigen | gij15126600 | NCBI | Ms | 23 | 9/34 | 72 | 45/2 | 28 | 5 | PM |
| 31_b | sim. to ribosomal protein L27 | gij20903071 | NCBI | Ms, Rt | 37 | 8/25 | 81 | 45/2 | 16 | 10 | u |
| 32 | heat shock protein | gij194029 | NCBI | Ms | 45 | 5/16 | 74 | 60/1 | 9 | 5 | C |
| 34 | Heat shock cognate 71 kDa protein | P11142 | SProt | Hs | 18 | 9/18 | 70 | 30/1 | 71 | 1 | C |
| 35 | PRO0890 | gij7959716 | NCBI | Hs | 24 | 6/16 | 72 | 40/2 | 9 | 3 | u |
| 35_a | sim. to RIKEN cDNA 4933434106 | gij27689329 | NCBI | Ms | 12 | 6/10 | 70 | 55/2 | 41 | 3 | u |
| 40 | KIAA0820 protein | gij24308091 | NCBI | Hs | 11 | 9/18 | 78 | 65/2 | 97 | 5 | CS |
| 41 | matrix metalloproteinase 10 | gij19424154 | NCBI | Rt | 12 | 10/32 | 71 | 70/2 | 54 | 7 | S |
| 41_a | G protein receptor kinase 2 | gij4206092 | NCBI | Opos | 13 | 9/22 | 69 | 70/2 | 80 | 3 | M ass. |
| 41_b | sim. to protease | gij20888703 | NCBI | Ms | 8 | 8/13 | 80 | 60/2 | 104 | 6 | u |
| 42 | Myosin heavy chain | P02562 | SProt | Rb | 4 | 8/13 | 90 | 50/1 | 125 | 4 | C |
| 42_a | KIAA1230 protein | gij20521806 | NCBI | Hs | 4 | 5/5 | 72 | 50/2 | 105 | 4 | M ass.? |
| 44 | ELKS delta | gij27530920 | NCBI | Hs | 4 | 7/10 | 84 | 50/2 | 125 | 5 | u |
| 45 | serine/threonine kinase 10 | gij6678163 | NCBI | Ms | 11 | 14/45 | 94 | 55/2 | 112 | 6 | N? |
| 45_a | sim. to RIKEN cDNA 4933424A10 | gij29745459 | NCBI | Hs | 8 | 11/31 | 73 | 55/2 | 98 | 7 | PM? |
| 47 | sol. vascular endothel. cell growth fac. receptor | gij2136181 | NCBI | Hs | 8 | 6/9 | 69 | 55/2 | 77 | 3 | S |
| 49 | Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin) | P02571-00-00-01 | SProt | Hs | 38 | 13/26 | 100 | 50/2 | 42 | 0 | CS |
| 49_a | unnamed protein product | gij10433974 | NCBI | Hs | 4 | 7/13 | 76 | 45/2 | 114 | 3 | u |

Die Resultate der Recherchen zu den Proben aus 5.7.3 sind in Tab. 22 zusammengefasst. Unter den angegebenen Parametern konnten in 31 Gelbanden insgesamt 45 Proteine identifiziert werden, wobei in elf Banden mehrere Proteine gefunden wurden. In der Tabelle sind die genauen jeweiligen Suchparameter (Datenbank, ppm/MC) und Beschreibungen der Proteinzusammenfassungen, anhand von Score, Peptidzahlen, Markierungen, MW und Lokalisation, angegeben.

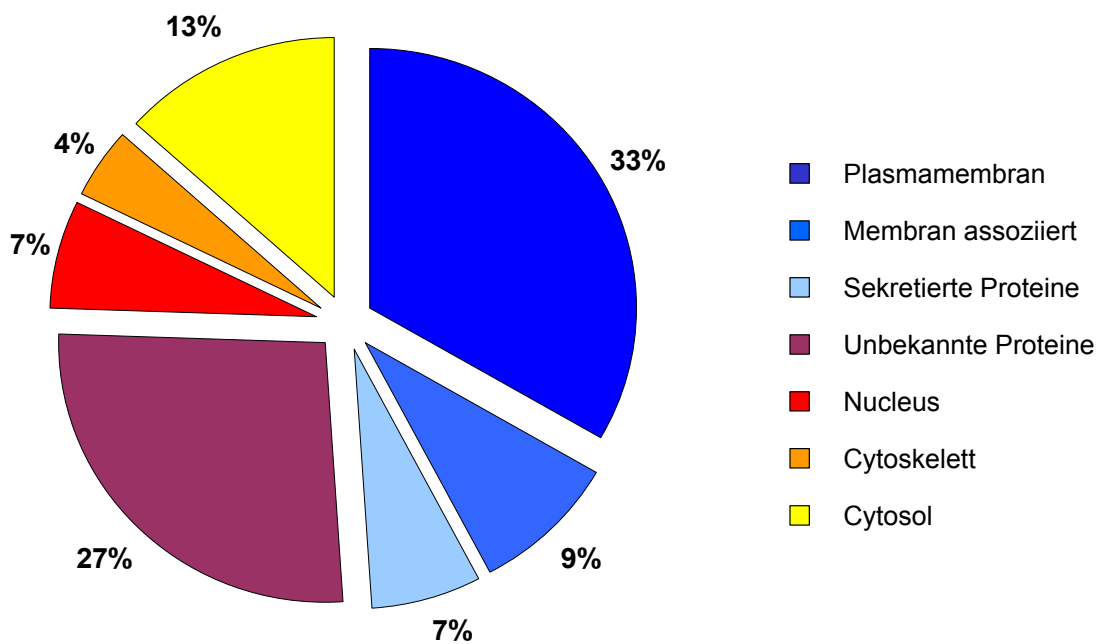


Abb. 35 Zelluläre Verteilung der identifizierten Proteine

Die in Tab. 22 aufgeführten 45 identifizierten Proteine sind in Abb. 35 nach ihrer zellulären Lokalisation zusammengefasst. Die Rubrik *Plasmamembran*-Proteine schließt hierbei Membran-verankerte Proteine mit ein. Unter der Rubrik *unbekannte Proteine* sind die Proteine zusammengefasst, die aufgrund von DNA-Daten einer Peptid-Massenliste zugeordnet wurden, deren Funktion und Lokalisation jedoch noch unbekannt sind. Die Proben, die anhand ihrer Peptid-Massenlisten nicht identifiziert werden konnten, sind in dieser Zusammenfassung nicht enthalten.

5.9 Validierung der Identifizierungen

Die Expression einiger der unter 5.8 identifizierten Proteine wurden mittels immunchemischer und molekularbiologischer Methoden in BMEC bestätigt.

5.9.1 Plexin B1

Das in Gelbande 19 identifizierte Protein Plexin B1 ist ein Semaphorin-Rezeptor mit einer theoretischen Größe von 214 kDa. Anhand der Trennung im SDS-Gel wurde der Bande allerdings eine Proteingröße von ca. 100 kDa zugeordnet.

Die Expression des Plexin B1 in BMEC sollte unter Einsatz molekularbiologischer Methoden bestätigt werden. Hierzu wurde dessen Transkript mittels PCR (4.6.3.1) in verschiedenen Geweben nachgewiesen (Abb. 36). Das eingesetzte Primerpaar *PlexnB1* wurde aus einer porcinen Sequenz von 421 bp (Klon: BG383536Pig) abgeleitet, die zu 87% mit der humanen Sequenz des PlexinB1 übereinstimmte. In Abb. 37 sind zwei Ausschnitte aus der humanen DNA-Sequenz des Plexin B1 gezeigt, die insgesamt 5859 bp umfasst. Die dunkel hinterlegten Bereiche kodieren für die zugeordneten Peptide. Das Primerset *PlexnB1* ist mit unterstrichenen Sequenzabschnitten angegeben. Das mit diesem Primerset zu erhaltende PCR-Produkt deckte einen Nucleotidbereich ab, der u. a. für vier der zugeordneten Peptide kodierend war. Im Rahmen der PCR wurde ein Produkt erhalten, das die erwartete theoretische Größe von 250 bp zeigte.

Das aus dem Agarosegel ausgeschnittene PCR-Produkt wurde gereinigt (4.6.4.2) und sequenziert (4.6.5). Die erhaltene Sequenz stimmte zu 97% mit der der porcinen Sequenz überein. Die Durchführung der PCR mit dem Primerpaar *PlexnB1* mit cDNA aus verschiedenen Geweben zeigte das Vorliegen von Transkripten des PlexinB1 in unterschiedlicher Ausprägung, in BMEC und den anderen untersuchten Geweben.

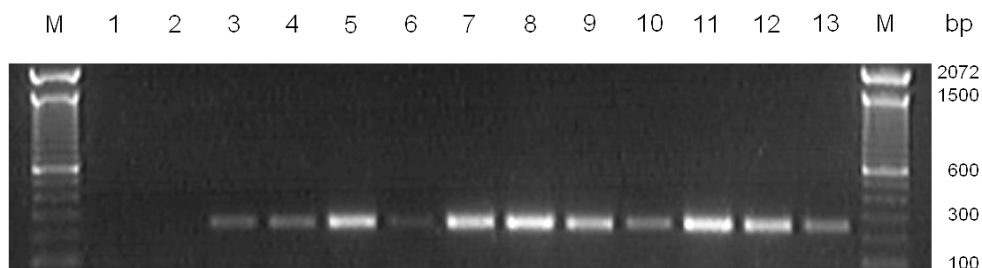


Abb. 36 Expression des PlexinB1 in verschiedenen Geweben, Trennung der PCR-Produkte im 1,5 % (w/v) Agarosegel, PCR bei 71°C Annealing-Temperatur, 31 Zyklen, eingesetzte cDNA aus verschiedenen Geweben;
M: Marker, 1: H₂O, 2: RT_{BMEC}, 3: AOEC, 4: BMEC, 5: Cortex, 6: Kolon, 7: Herz, 8: Niere, 9: Leber, 10: Lunge, 11: Plexus choroideus, 12: Milz, 13: Testis

a)

2881 gaggtgccgg gaagaggacg tgggtgtctca gaacacgact ttgcctacca ggatccgaag
 2941 gtccattcca tcttcccggc cgcggccccc agagctgggg gcaccctctc caccctgaat
 3001 ggctccaagc tcctgactgg gcggctggag gacatccgag tgggtggtgg agaccagcct
 3061 tgtcacttgc tgccggagca gcagtcagaa caactgcggt gtgagaccag cccacgcccc

b)

3541 tttgcaacac tgaacccac acctttctcc tatgaggccg accccacctc gcagccactc
 3601 **aaccctgagg accccaccat gcc**attcccg cacaagcctg ggagtgtgtt ctccgtggag
 3661 ggggagaacc tggaccttgc aatgtccaag **gaggaggtgg** tggctatgat aggggatggc
 3721 **ccctgtgtgg** tgaagacgct gacgcggcac cacctgtact gcgagcccc cgtggagcag
 3781 **cccctgccac** ggcaccatgc cctccgagag **gcacctgact** ctttgc**ctga gttcacggtg**
 3841 **cagatgggga** acttgcgctt ctccctgggt cacgtgcagt atgacggcga gagccctggg
 3901 gcttttctctg tggcagccca ggtgggcttg ggggtgggca cctctcttct ggctctgggt
 3961 gtcatcatca ttgtcctcat gtacaggagg aagagcaagc aggcctgag ggactataag
 4021 aaggttcaga tccagctgga gaatctggag agcagtgctc gggaccctg caagaaggaa
 4081 ttcacagacc tcatgactga gatgaccgat ctcaccagtg acctcctggg cagcggcatc
 4141 cccttctctg actacaaggt gtatgcggag aggatcttct **tccttgggca cgcgagctc**
 4201 **cccttgacc** gggacctggg tgtgcctgag agcagacggc ccaactgtga gcaaggctg
 4261 gggcagctct ctaacctgct caacagcaag ctcttctca ccaagtcat ccacacgctg
 4321 gagagccagc gcacctttc agctcgggac cgtgcctacg tggcatctct gctcacctg
 4381 gcaactgcatg ggaagcttga gtatttact gacatcctcc gcactctgct cagtgaactg
 4441 gttgcccagt atgtggcca **gaaccccaag** ctgatgctgc **gcaggacaga gactgtggg**
 4501 **gagaag**ctgc tcaccaactg gatgtccatc tgtctgtata ccttctgtgag ggactccgta
 4561 ggggagcctc tgtacatgct ctttgcaggg **attaagacc aagtggataa ggggccagt**
 4621 **gacagtgtga caggcaaggc** caaatacacc ttgaacgaca accgcctgct cagagaggat
 4681 gtggagtacc gtcccctgac cttgaatgca ctattggctg tggggcctgg ggcaggagag
 4741 gccagggcg tgcccgtgaa ggtcctagac tgtgacacca tctcccaggc aaaggagaag
 4801 atgctggacc agctttataa aggagtgcct ctcaccagc ggccagacc tcgaccctt
 4861 gatgttgagt ggcggtctgg ggtggccggg cacctcattc tttctgacga ggatgtact
 4921 tctgaggtcc agggctctg gaggcgcctg aacacactgc agcattaca ggtcccagat
 4981 ggagcaactg tggccctcgt ccctgcctc accaagcatg tgctccggga aaaccaggat
 5041 tatgtccctg gagagcggac cccaatgctg gaggatgtag atgaggggg catccggccc
 5101 tggcacctgg tgaagccaag tgatgagccg gagccgcca ggcctcgag gggcagcctt
 5161 cggggcgggg agcgtgagcg **cgccaaggcc atccctgaga tctacctgac cgcctgctg**
 5221 **tccatgaagg gcaccctgca gaag**ttcgtg gatgacctgt tccaggtgat tctcagcacc
 5281 agccgccccg tgccgctcgc tgtgaagtac ttctttgacc tgctggatga gcaggcccag
 5341 cagcatggca tctccgacca ggacaccatc cacatctgga agaccaacag cttgcctctg
 5401 aggttctgga tcaatataat aaaaaaccg cagtttgtgt tcgacgtgca aacatctgat
 5461 aacatggatg cgggtgctcct tgtcattgca cagaccttca tggacgcctg caccctggcc
 5521 gaccacaagc tgggcccggg **ctccccgatc aacaaacttc tgtatgcacg** ggacattccc
 5581 cggtaacaagc ggatggtgga aaggctactat gcagacatca gacagactgt cccagccagc

Abb. 37 DNA-Sequenz von humanen PlexinB1, **auf Peptidebene gefundene Bereiche**;
 Primerset PlxnB1, Gesamtsequenz mit 5859 bp
 a) Sequenzabschnitt 2881-3120
 b) Sequenzabschnitt 3541-5640

5.9.2 MRP2 (*Canalicular multispecific organic anion transporter*)

Das in Gelbande 8 gefundene Protein MRP2 wurde in den weiteren Arbeiten, entsprechend seiner humanen Form, als ABCC2 bezeichnet. Dies steht für *ATP-binding cassette sub-family C member 2*. Die theoretische Größe des Proteins beträgt 173 kDa. Die betreffende Bande war im SDS-Gel jedoch mit einer Größe von ca. 250 kDa korreliert.

ABCC2 wurde mittels PCR (4.6.3.1) in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Das eingesetzte Primerpaar ABCC2 wurde aus drei porcinen Sequenzen abgeleitet. Hierzu wurden diese Sequenzen zunächst in-silico zu einem Contig von 565 bp vereinigt. Aus dieser Sequenz wurde dann ein Primerpaar abgeleitet.

Die DNA-Sequenz des Proteins ABCC2 aus Ratte ist in Abb. 39 in zwei Abschnitten dargestellt. Die dunkel hinterlegten Bereiche repräsentieren dabei die auf Peptidebene zugeordneten Bereiche. Die Sequenzen des Primerpaars ABCC2 sind unterstrichen abgebildet. Das mit Hilfe des Primerpaars amplifizierte Produkt beinhaltet einen Bereich, der für zwei der zugeordneten Peptide kodierte. Die theoretische Größe des Produktes war 187 bp. Das aus dem Agarosegel, auf der Höhe von 200 bp, ausgeschnittene PCR-Produkt wurde gereinigt (4.6.4.2) und sequenziert (4.6.5). Die erhaltene Sequenz stimmte zu 88% mit der humanen Sequenz des ABCC2 überein. Die Durchführung der PCR mit dem Primerpaar ABCC2 mit cDNA aus verschiedenen Geweben, zeigte das Vorliegen nachweisbarer Transkripte des ABCC2 nur in Niere und Leber (Abb. 38).

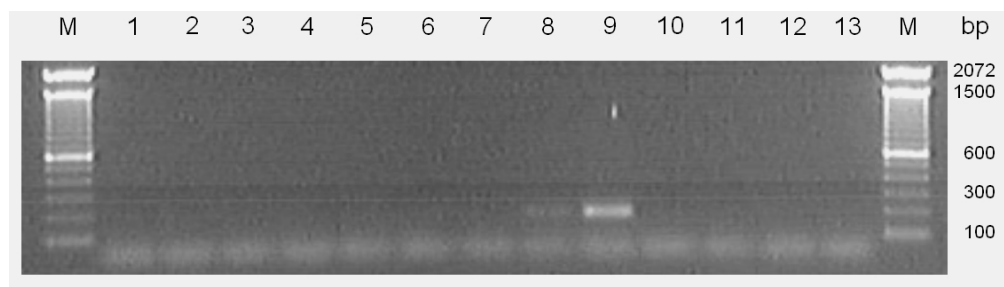


Abb. 38 Expression des ABCC2 in verschiedenen Geweben, Trennung der PCR-Produkte im 1,5 % (w/v) Agarosegel, PCR bei 61°C Annealing-Temperatur, 40 Zyklen, eingesetzte cDNA aus verschiedenen Geweben;
 M: Marker, 1: H₂O, 2: RT_{BMEC}, 3: AOEC, 4: BMEC, 5: Cortex, 6: Kolon, 7: Herz, 8: Niere, 9: Leber, 10: Lunge, 11: Plexus choroideus, 12: Milz, 13: Testis

a)

```

661 aactagaag atgtctgga tctgatgaa gggtttaaaa caaggctcagt caccagcaag
721 tttagggcgg ccatgacaaa ggacctgcag aaagccaggc aggcttttca gaggcggctg
781 cagaagtccc agcggaaacc tgaggccaca ctacacggac tgaacaagaa gcagagtcag
841 agccaagacg ttctcgtcct ggaagaagcg aaaaagaagt ctgagaagac caccaaaagc
901 tatcccaaat cgtggttgat caagtctctc ttcaaaacct tccacgtagt gatcctgaaa
961 tcattttatac tgaatattaat acatgacctt ttggtgtttc tgaatcctca gctgctgaa
1021 ttgctgatcg gtttctgtaa gagctctaac tcatactgtg ggtttggcta tatctgtgca
1081 atcctaagt ttgctgtgac tctcatccaa tctttctgcc ttcagtctta ctttcaacat
1141 tgttttgtgt tgggaatgtg cgtacggaca accgtcatgt cttcgatata taagaagca
1201 ttgacctat ctaacttggc taggaagcag tacaccattg gagagacggg gaacttgatg
1261 tctgtagatt cccagaagct aatggatgcg accaactaca tgcagtgggt gtggcaagt
1321 gttatacaga ttactttgtc catcttcttc ctgtggagag agttgggacc gtccatctta
1381 gcagggtgtg gggttatggt tctcctaata ccagttaatg gagttctggc taccaagatc
1441 agaaatattc aggtccaaaa tatgaagaat aaagacaaac gtttaaaaat catgaatgag
1501 attctcagtg gaatcaagat cctgaaatac tttgcctggg aaccttcatt tcaagagcaa
1561 gtccagggca ttcggaagaa agaactcaag aacttgctgc ggttcggcca gctgcagagt
1621 ctgctgatct tcattttaca gataactcca atcctggtgt ctgtggtcac attttctgtc
1681 tatgtcctgg tggatagcgc caatgttttg aatgocggaga aggcatttac ctccatcacc
1741 ctcttcaata tctacgctt cctctgtcc atgcttcca tggtgacctc atcgatcctc
1801 caggccagtg tttctgtgga cggctggag aggtatttgg gaggagacga ttagacaca
1861 tctgccattc gcgcgctcag caattttgat aaagctgtga agttttcaga ggcctctttt
1921 acttgggacc cggacttga agccacaatc caagatgtga acctggacat aaagccaggc
1981 caactggtgg ctgtggtggg cactgtaggc tctgggaaat cctcttgggt atcagccatg
2041 ctgggagaaa tggaaaactg tcacgggac atcaccatcc agggatccac agcctatgtc
2101 cctcagcagt cctggattca gaatggaacc atcaaagaca acatctgtt tgggtccgaa
2161 tacaatgaaa agaagtacca gcaagtctc aaagcatgcg ctctctccc agacttgaa
2221 atattgctg gaggagacat ggctgagatc ggagagaagg ggataaatct cagtgtgtgt
2281 cagaagcagc gagtcagcct ggccagagct gcctatcaag atgtgacat ctatattctg
2341 gacgatcccc tgtcggctgt ggatgctcat gtgggaaaac acattttcaa caaggtgtg
2401 ggccccaacg gcctgttggc tggcaagacg agaatctttg ttactcatgg tattcacttc
2461 cttcccaag tggatgagat tgtagtctg gggaaaggca ccatcttaga gaaaggatcc
2521 tctcgtgacc tgttggacaa gaaggagtg tttgctagga actggaagac cttcatgaag
2581 cattcagggc ctgaaggaga ggccacagtc aataatgaca gtgaggcggg agacgacgat
2641 gatgggctga ttcccaccat ggaggaatc cctgaggatg cagcttctt ggccatgaga
2701 agagaaaata gtcttcgcgc taccactgagc cgcagctcta ggtccagcag ccgacgtggg
2761 aagtcctca aaaactcctt gaagattaaa aatgtgaatg tcttgaagga gaagggaaaa
2821 gaagtggaag gacaaaaact aattaagaaa gaatttgtgg aaaccgggaa ggtcaagttc
2881 tccatctacc tgaagtatct acaggcagta ggggtgtggt ccatacttt catcatcctt
2941 ttctacggat tgaataatgt tgctttatc ggctctaacc tctggtgag tgcttgacc
3001 agtgactctg acaacttga tggaccaac aattcgtct ctcataggga catgagaatt
3061 ggggtcttg gagctctggg attagcaca ggtatgtt tgcttattc aactctgtg
3121 agcatatag cttgcagaaa tgcataaaa gctttgacg ggcagctgtt aaccaacatc
3181 ctccgggac ccatgaggtt ttttgacaca actcccacag gccggattgt gaacagattt
3241 tctggtgata tttctactgt ggacgacttg ctccccaga cacttcaag ctggatgatg
3301 tgtttcttg gcactcgtg cactctgtc atgatctgca tggccacccc agtctctgct
3361 atcatcatca ttctctcag cattctttat atttcgtgc aggtttttta tgtggctact
3421 tcccgccagc tgagacggtt ggattctgtc accaaatctc cgatctattc tcaactcagt
3481 gagactgca caggtttgc cattatcgt gcctttgagc accagcagc atttctagct
3541 tggaaatgaga agcagattga catcaaccag aatgtgtct tttcctggat tacctcaac
3601 aggtggttg caattcggct ggagctggtt ggaaacttg tctctctg ttcgccttg
3661 ctgctgtta tttatagaaa aaccttaacc ggggacgtt tgggcttgt tctgtcaac
3721 gccctcaata tcacacaaac cttgaactgg ctagttagga tgacgtcaga agcagagacc
3781 aacattgtg cagttgagc aataagtga tacataaatg tagagaatga ggcgcctgg

```

Abb. 39a Erster Abschnitt der DNA-Sequenz des MRP2 der Ratte

```

3841 gtgactgaca agaggcctcc ggcagactgg cccagacatg gtgagatcca gtttaacaac
3901 tatcaagtgc ggtatcggcc ggagctggat ctggactga aagggatcac ttgtaacatc
3961 aagagcggag agaaggtcgg cgtagtgggc aggactggg ctgggaaatc atccctcaca
4021 aactgcctct tcagaatcct agagtctcgc gggggccaga tcatcattga tgggatagat
4081 gttgcctcca ttggactgca cgaccctcga gagaggctga ccatcattcc ccaggacccc
4141 attttgttct cggggagtct gaggatgaat ctcgaccctt tcaacaata ttcagatgag
4201 gaggtttga gggccctga gttggctcac ctcagatcct ttgtgtctgg cctacagctt
4261 gggttgttat ccgaagtgc agagggtgt gacaacctga gcatagggca gaggcagctc
4321 ctatgcctgg gcagggctgt gcttcgaaa tccaaaatcc tggtcctgga tgaagccacg
4381 gctgcagtgg atctcgagac ggatagctc attcagacga ccatccgaa ggagttctcc
4441 cagtgcacgg tcatcaccat cgctcacagg ctgcacacca tcatggacag tgacaagata
4501 atggctctag acaacgggaa gattgtcgag tatggcagtc ctgaagaact gctgtccaac
4561 agaggttcct tctatctgat ggccaaggaa gccggcattg aaaatgtgaa tcacacagag
4621 ctctag

```

Abb. 39 DNA-Sequenz des MRP2 der Ratte, Sequenzabschnitt 661-4626 auf Peptidebene gefundene Bereiche; Primerset ABCC2, Gesamtsequenz mit 4626 bp

Das Protein ABCC2 wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung in BMEC der Passage 0 nachgewiesen. Zum Einsatz kam hierbei ein polyklonaler Antikörper aus Ziege, der gegen ein Peptid des *N-terminalen* Bereichs des humanen MRP2 gerichtet ist. Die Selektivität des Erstantikörpers wurde im Western-Blot bestätigt. Hierbei wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Die Detektion des Erstantikörpers erfolgte mit einem Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugat. Der verwendete Zweitantikörper anti-Gt-Ak/AP wurde in einer Verdünnung von 1: 5000 verwendet.

BMEC der Primärkultur wurde in Gegenwart von Triton X-100 aufgeschlossen und die Proteine im SDS-Gel getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und einer immunchemischen Färbung unterzogen (Abb. 40).

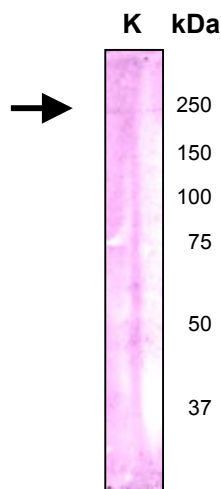


Abb. 40 Western-Blot eines Gesamtaufschlusses von BMEC, Erstantikörper : anti-MRP2 (Gt)-Ak, Zweitantikörper anti-Gt-Ak/AP, mit markierter Bande bei 250 kDa

Der Anti-MRP2-Antikörper zeigte zwar eine diffuse unspezifische Färbung der Membran, detektierte allerdings nur eine Proteinbande.

Für Immunfluoreszenz-Färbungen von BMEC wurde dieser Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt und mit einem Cy3-gekoppelten anti-Gt-IgG-Antikörper (1:200) detektiert. Abb. 41 zeigt den Vergleich der immunchemisch gefärbten BMEC mit einer Negativ-Kontrolle (ohne Erstantikörper), bei identischen Belichtungszeiten.

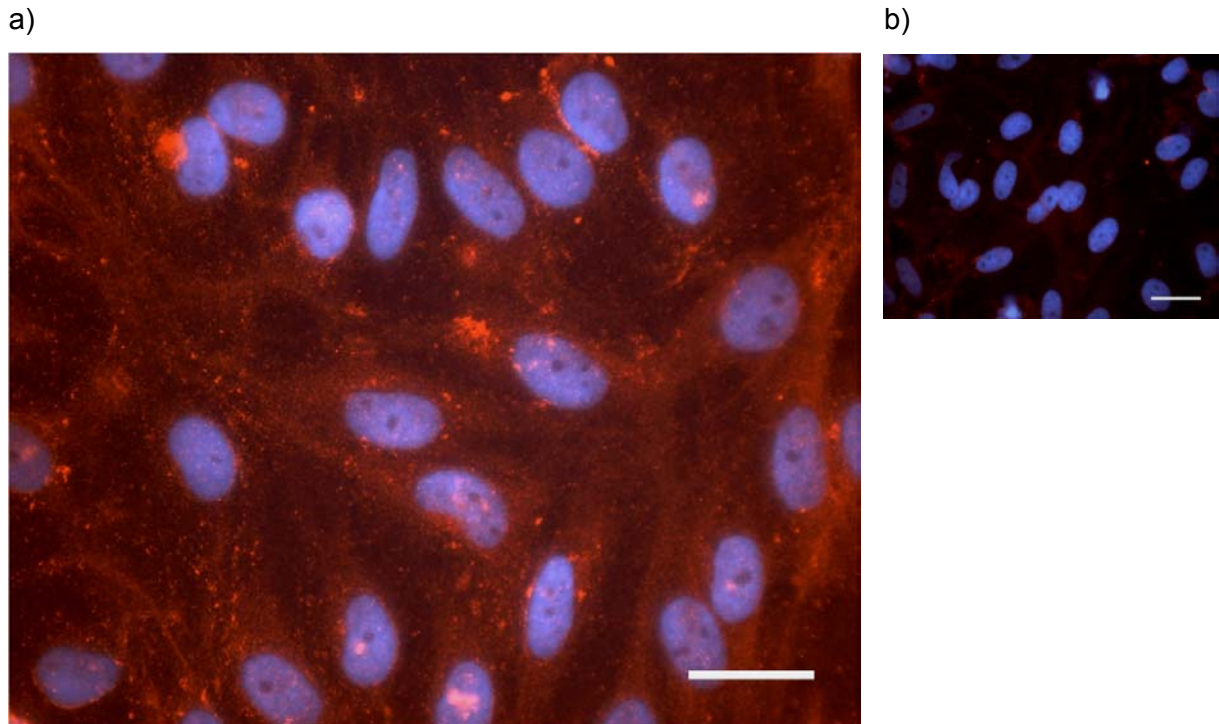


Abb. 41 Immunfluoreszenzfärbungen der BMEC-Kultur Passage 0,
Erstantikörper : anti-MRP2 (Gt)-Ak , Zweitantikörper anti-Gt-Ak/Cy3;
Belichtungszeiten Cy3 / Dapi in Klammern; — : 20 μ m
a) anti-MRP2 (Gt)-Ak und anti-Gt-Ak/Cy3, (1300 ms / 30 ms)
b) nur anti-Gt-Ak/Cy3, (1300 ms / 30 ms)

5.9.3 MMP10 (*matrix metalloproteinase 10*)

Das in Gelbande 41 detektierte Protein MMP10 gehört zur Familie der Matrix Metalloproteinasen. MMP10 weist ein theoretisches Molekulargewicht von 54 kDa auf. Es wurde in Bande 41 identifiziert, die mit einer Proteingröße von ca. 50 kDa korreliert war.

Die Sequenzabdeckung des MMP10 durch die zugeordneten Peptide ist in Abb. 42a dargestellt. Die Peptide sind über das ganze Protein verteilt und decken 12% der Proteinsequenz ab. In Abb. 42b ist eine Liste der Peptide und deren Modifikationen angegeben.

a)

```

1  MEPLAILVLL  CFPICSAAYPL  HGAVRQDHST  MDLAQQYLEK  YYNFRKNEKQ
51 FFKRKDSSPV VKKIEEMQKF  LGLEMTGKLD  SNTVEMMHKP  RCGVPDVGGF
101 STFGSPKWR KNHISYRIVN  YTLDLPRESV  DSAIERALKV  WEEVTPLTFS
151 RISEGEADIM  ISFAVGEHGD  FYPFDGVGQS  LAHAYPPGPG  FYGDAHFDDE
201 EKWSLGPSGT  NLFLVAAHEL  GHSLGLFHSN  NKESLMYPVY RFSTSQANIR
251 LSQDDIEGIQ  SLYGARPSDD  ATVVVPVPSVS  PKPETPVKCD  PALSFDAVDM
301 LRGEFLFFKD  RHFWRRTQWN  PEPEFHLISA  FWPSLPSGLD  AAYEAMNKDR
351 VLIFKGSQFW  AVRGNEVQAG  YPKRIHTLGF  PPTVKKIDAA  VFEKEKKKTY
401 FFVGDKYWRF DETRQLMDKG  FPRLLITDDFP  GIEPQVDAVL  HAFGFFYFFC
451 GSSQFEFDPN  ARTVTHTLKS  NSWLLC

```

b)

| Start - End | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Sequence |
|-------------|----------|----------|----------|-------|------|--------------------------------------|
| 47 - 49 | 728.36 | 727.36 | 727.37 | -0.01 | 0 | NEK ESP-Tag_light (K) |
| 47 - 53 | 1616.84 | 1615.83 | 1615.84 | -0.01 | 1 | NEKQFFK 2 ESP-Tag_light (K) |
| 50 - 55 | 1191.61 | 1190.60 | 1190.67 | -0.08 | 2 | QFFKRK ESP-Tag_light (K) |
| 56 - 63 | 1197.59 | 1196.58 | 1196.66 | -0.08 | 1 | DSSPVVKK ESP-Tag_light (K) |
| 109 - 111 | 827.42 | 826.42 | 826.46 | -0.05 | 1 | WRK ESP-Tag_light (K) |
| 111 - 117 | 1255.63 | 1254.63 | 1254.67 | -0.04 | 1 | KNHISYR ESP-Tag_light (K) |
| 233 - 241 | 1157.60 | 1156.59 | 1156.56 | 0.04 | 0 | ESLMYPVYR |
| 398 - 406 | 1780.88 | 1779.87 | 1779.92 | -0.05 | 1 | KTYFFVGDK 2 ESP-Tag_light (K) |
| 407 - 414 | 1172.57 | 1171.56 | 1171.54 | 0.02 | 1 | YWRFDETR |
| 470 - 476 | 822.41 | 821.40 | 821.37 | 0.03 | 0 | SNSWLLC |

Abb. 42 Mascot-Ergebnis des in Probe 41 identifizierten MMP10,

a) Sequenzabdeckung des MMP10 durch die Peptide;

b) Liste der Peptidsignale mit den zugeordneten theoretischen Peptiden, inklusive der berücksichtigten Modifikationen

Die Matrix-Metalloproteasen bilden eine Familie hauptsächlich sekretierter Enzyme und weisen sehr hohe Sequenzidentitäten auf. Die porcine DNA-Sequenz des MMP10 war nicht verfügbar. Die Verwendung der humanen Sequenz zum Ableiten von Primerpaaren wurde aufgrund der extrem hohen Sequenzübereinstimmungen von MMP10 mit z. B. MMP3 verworfen. Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, ein Primerpaar abzuleiten, das den spezifischen Nachweis des MMP10 mittels PCR in BMEC ermöglichte. Die Bestätigung der Expression des MMP10 in BMEC erfolgte über immunchemische Färbung von Zellen der Primärkultur.

Zum Einsatz kam hierbei ein monoklonaler Antikörper aus Maus, der gegen ein rekombinant hergestelltes, humanes MMP10 gerichtet war. Dieser Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt und mit einem Cy3-gekoppelten anti-Ms-IgG-Antikörper (1:200) detektiert. Abb. 43 zeigt den Vergleich der immunchemisch gefärbten BMEC mit einer Negativ-Kontrolle (ohne Erstantikörper), bei identischen Belichtungszeiten.

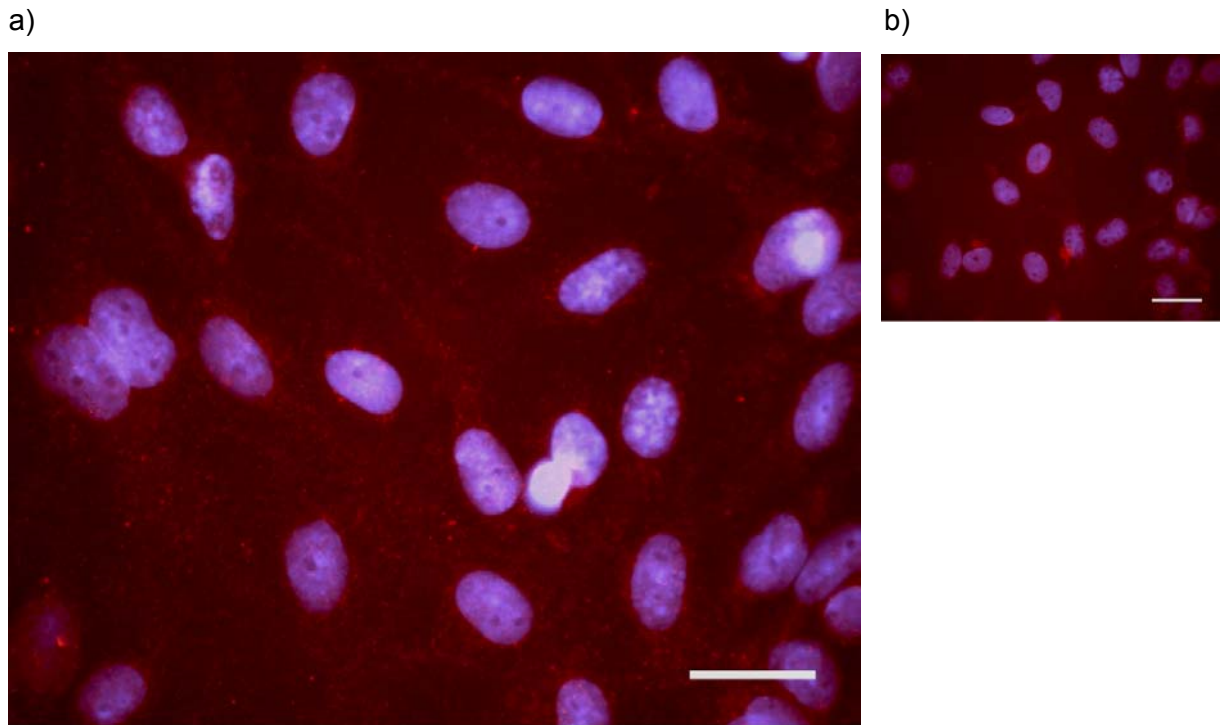


Abb. 43 Immunfluoreszenzfärbungen der BMEC-Kultur Passage 0,
Erstantikörper : anti-MMP10 (Ms)-Ak , Zweitantikörper anti-Ms-Ak/Cy3;
Belichtungszeiten Cy3 / Dapi in Klammern; — : 20 μ m
a) anti-MMP10 (Ms)-Ak und anti-Ms-Ak/Cy3, (6800 ms / 35 ms)
b) nur anti-Ms-Ak/Cy3, (6800 ms / 35 ms)

5.9.4 ATP7b (*copper-transporting ATPase 2*)

Probe 27 enthält laut Maldi-MS-Analyse und Datenbankrecherche das Protein *Copper-transporting ATPase 2*, im weiteren entsprechend des *genecard codes* ATP7b genannt. Die dem Protein zugeordneten Peptide deckten 6% des Proteins ab. Der Sequenzausschnitt, der die Peptid-kodierenden DNA-Bereiche (dunkelgrau unterlegt) enthält, ist in Abb. 44 dargestellt. Abgebildet ist hier der Sequenzbereich der humanen Isoform A des ATP7b. Die ebenfalls beschriebene humane Isoform B zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass die in der Abbildung hellgrau unterlegten Bereiche fehlen. Ausgehend von der humanen Sequenz der Isoform A wurden zwei Primerpaare abgeleitet, die ebenfalls in Abb. 44 angegeben sind.

Die Amplifikation mit Hilfe des Primerpaars *ATP7b-1870* sollte ein Produkt ergeben, das spezifisch für die Isoform A ist und das einen Peptid-kodierenden Bereich beinhaltet.

Die Verwendung des Primerpaars *ATP7b-2350* sollte beim Vorliegen der Isoform A ein Produkt der Größe 376 bp amplifizieren. Beim Vorliegen der Isoform B sollte allerdings ein Produkt der Größe 241 bp entstehen.

```

1321 gctgggaatt ccatggtgca aactacagat ggtacaccta catctgtgca ggaagtggct
1381 cccacactg ggaggctccc tgcaaaccat gccccggaca tcttgcaaa gtccccaaa
1441 tcaaccagag cagtggcacc gcagaagtgc ttcttacaga tcaaaaggcat gacctgtgca
1501 tcctgtgtgt ctaacataga aaggaatctg cagaaaagaag ctgggtgtct ctccgtgttg
1561 gttgccttga tggcaggaaa ggcagagatc aagtatgacc cagaggatcat ccagcccctc
1621 gagatagctc agttcatcca ggacctgggt tttagggcag cagtcatgga ggactacgca
1681 ggctccgatg gcaacattga gctgacaatc acagggatga cctgcgcgtc ctgtgtccac
1741 aacatagagt ccaaactcac gaggacaaat ggcatcactt atgcctccgt tgcccttgc
1801 accagcaaa g cccttggtta gtttgaccg gaaattatcg gtccacggga tattatcaa
1861 attattgagg aaattggctt tcatgcttcc ctggcccaga gaaacccca cgctcatcac
1921 ttggaccaca agatggaaat aaagcagtgg aagaagtctt tctgtgcaag cctgggtgtt
1981 ggcatccctg tcatggcctt aatgatctat atgctgatac ccagcaacga gccccaccag
2041 tccatggtcc tggaccacaa catcattcca ggactgtcca ttctaaatct catcttcttt
2101 atcttgtgta cctttgtcca gctcctcggg ggggtggtact tctacgttca ggctacaaa
2161 tctctgagac acaggtcagc caacatggac gtgctcatcg tctggccac aagcattgct
2221 tatgtttatt ctctggcat cctgggtggt gctgtggctg agaaggcga gaggagcct
2281 gtgacattct tgcacacgcc ccccatgctc tttgtgttca ttgccctggg ccggtggctg
2341 gaacacttgg caaagagcaa aacctcaga gcccgtgcta aactcatgtc tctccaagcc
2401 acagaagcca ccgttgtgac ccttgggtgag gacaatttaa tcatcaggga ggagcaagtc
2461 cccatggagc tgggtgcagcg gggcgatc gtcaagtgtg tccctggggg aaagttcca
2521 gtggatggga aagtcttga aggcaatacc atggctgatg agtccctcat cacaggagaa
2581 gccatgccag tactaagaa acccggaagc actgtaattg cgaggtctat aaatgcacat
2641 ggctctgtgc tcattaaagc taccacgtg ggcaatgaca ccactttggc tcagattgtg
2701 aaactgtgtg aagaggctca gatgtcaag gcacccattc agcagctggc tgaccggtt
2761 agtggatatt ttgtcccatt tatcatcatc atgtcaactt tgacgttggg ggtatggatt
2821 gtaatcggtt ttatcgattt tgggtgtgtt cagaaatact ttctaacc caacaagcac
2881 atctcccaga cagaggatgat catccggtt gctttccaga cgtccatcac ggtgctgtgc
2941 attgctgcc cctgctcct ggggctggcc acgcccacgg ctgtcatggt gggcaccggg
3001 gtggccgcg agaacggcat cctcatcaag ggaggcaagc ccctggagat ggcgcaaac
3061 ataagactg tgatgttga caagactggc accattacc atggcgtccc cagggtcatg

```

Abb. 44 DNA-Sequenz von humanen ATP7b (Isoform A), Sequenzausschnitt 1321-3120 auf Peptidebene gefundene Bereiche; bei Isoform B fehlende Bereiche; Primer ATP7b-1870; Primer ATP7b-2350, Gesamtsequenz mit 4398 bp

Das mit Hilfe des Primerpaars *ATP7b-1870* amplifizierte PCR-Produkt wurde auf der Höhe von ca. 400 bp aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt (4.6.4.2) und sequenziert (4.6.5). Die erhaltene Sequenz war zu 84% mit der humanen Sequenz des ATP7b identisch. Die PCR mit dem Primerpaar *ATP7b-1870* mit cDNA verschiedenen Ursprungs, zeigte das Vorliegen von Transkripten der Isoform A des ATP7b in BMEC und anderen Geweben (Abb. 45). Die Signalintensität zeigte dabei unterschiedliche Ausprägung. Sehr schwache Signale waren in den Geweben AOEC, Cortex, Milz und Testis bzw. kein Signal war in Lunge zu erkennen. In Testis war zusätzlich ein Signal auf der Höhe von ca. 800 bp zu detektieren.

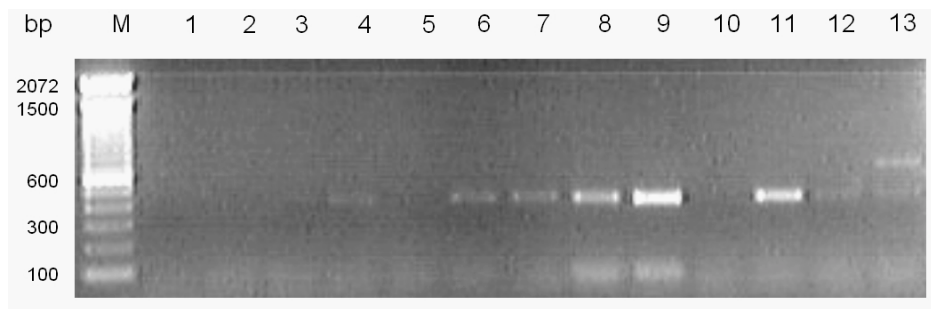


Abb. 45 PCR mit Primerset *ATP7b-1870* in verschiedenen Geweben, Trennung der PCR-Produkte im 1,5 % (w/v) Agarosegel, PCR bei 58°C Annealing-Temperatur, 39 Zyklen, eingesetzte cDNA aus verschiedenen Geweben; M: Marker, 1: H₂O, 2: RT_{BMEC}, 3: AOEC, 4: BMEC, 5: Cortex, 6: Kolon, 7: Herz, 8: Niere, 9: Leber, 10: Lunge, 11: Plexus choroideus, 12: Milz, 13: Testis

Die PCR unter Einsatz des Primerpaars *ATP7b-2350* unter Verwendung von cDNA aus verschiedenen Geweben ergab mehrere Produkte (Abb. 46). Im Agarosegel waren zwei Produkte im Größenbereich 300 bis 400 bp unterscheidbar. Diese Signale waren in AOEC, Cortex und Lunge nur sehr schwach ausgeprägt.

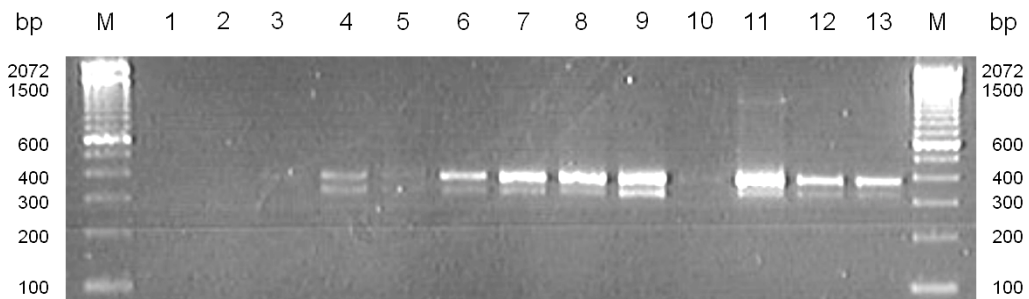


Abb. 46 PCR mit Primerset *ATP7b-2350* in verschiedenen Geweben, Trennung der PCR-Produkte im 1,5 % (w/v) Agarosegel, PCR bei 55°C Annealing-Temperatur, 40 Zyklen, eingesetzte cDNA aus verschiedenen Geweben; M: Marker, 1: H₂O, 2: RT_{BMEC}, 3: AOEC, 4: BMEC, 5: Cortex, 6: Kolon, 7: Herz, 8: Niere, 9: Leber, 10: Lunge, 11: Plexus choroideus, 12: Milz, 13: Testis

In Abb. 47 sind die PCR-Produkte der beiden Primerpaare für *ATP7b* für die Gewebe BMEC, Cortex und Leber einander gegenübergestellt. Die PCR mit *ATP7b-1870* ist dabei im Vergleich zum Gel der Abb. 45 mit höherer Zyklenzahl durchgeführt worden. Die stärksten Signale für beide Ansätze sind in Leber festzustellen. Dabei weicht das Verhältnis der beiden Produkte für *ATP7b-2350* von denen in BMEC und Cortex ab.

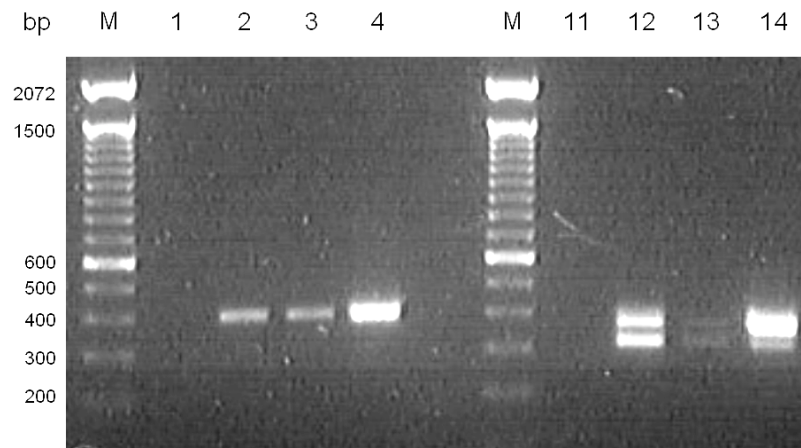


Abb. 47 PCR mit Primersets *ATP7b-1870* und *ATP7b-2350* in BMEC, Cortex und Leber, Trennung der PCR-Produkte im 1,5 % (w/v) Agarosegel, Annealing bei 58°C bzw. 55°C, 40 Zyklen, eingesetzte cDNA aus verschiedenen Geweben; Spur 1-4 mit Primerset für *ATP7b-1870*, Spur 11-14 mit Primerset *ATP7b-2350*
M: Marker, 1+11: H₂O, 2+12: BMEC, 3+13: Cortex, 4+14: Leber

Ein PCR-Ansatz des Primersets *ATP7b-2350* in Cortex wurde gereinigt (4.6.4.1) und in den pGEM-Teasy-Vektor ligiert (4.6.6.1). Nach Transfektion in *E.coli* (4.6.6.2) konnten rekombinante Klone mit funktionellem Insert erhalten werden. Diese wurden nach der Isolierung der Plasmid-DNA (4.6.4.3) sequenziert (4.6.5), um die Sequenz der ligierten PCR-Produkte zu ermitteln.

Drei der erhaltenen Klone, die im Agarosegel voneinander abweichende Größen aufwiesen, wurden in der Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Die erhaltenen Sequenzen waren im hohen Maße mit der humanen Sequenz des ATP7b identisch (Klon 6: 92%, Klon 8: 92%, Klon 10: 94%). Der Vergleich dieser Sequenzen mit denen der humanen Isoformen A und B des ATP7b ist in Abb. 48 dargestellt. Der hier skizzierte Sequenzausschnitt umfasst die Positionen 2689 bis 2904 der DNA-Sequenz des humanen ATP7b. Die Nummerierung bezieht sich demzufolge auf die humane Sequenz.

Klon 8 war strukturell der humanen Isoform A identisch. Klon 10 entsprach ebenfalls der humanen Isoform A, wies allerdings zusätzlich einen Einschub von 21 bp auf, der bei keiner der anderen Sequenzen zu finden ist.

Klon 6 ist größtenteils mit dem Isotyp B des ATP7b identisch, besitzt aber, im Unterschied zu diesem, einen additiven, der Isoform A und den anderen Klonen entsprechenden Sequenzabschnitt von 81 bp.

6 Diskussion

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist vor allem aus pharmakologischer und medizinischer Sicht von Bedeutung. Spezielles Interesse gilt dabei der luminalen Plasmamembran der mikrovaskulären Hirnkapillaren. Diese Membran stellt für im Blut gelöste Substanzen die erste Barriere an der BHS dar. Die Proteine dieser Zellmembran sind maßgeblich beteiligt an zellulärer Kommunikation, an Transportprozessen und an der Ausbildung der *tight junctions*. Die Charakterisierung des Oberflächenproteoms der Hirnkapillarendothelzellen (BMEC) verspricht ein besseres Verständnis ihrer Schrankenfunktion und könnte Wege zu deren pharmakologischen Modulation aufzeigen.

Die Identifizierung und Charakterisierung von Membranproteinen mit den gängigen Methoden der Proteomforschung ist jedoch beschränkt. So ist die 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) in ihrer Auflösung von hydrophoben Proteinen stark limitiert. In dieser Arbeit wurde ein alternativer Ansatz gewählt, um Membranproteine anzureichern und zu identifizieren. Hierbei sollte die Verwendung von 2D-Gelen vermieden werden. Durch die Kombination von Oberflächenmarkierung lebender Zellen, Affinitätschromatographie und MALDI-Massenspektrometrie wurde spezifisch das Oberflächenproteom von BMEC untersucht.

Die Interaktion von Biotin und Avidin bzw. Streptavidin wird in vielen biochemischen Anwendungen genutzt. So können biotinylierte Zielmoleküle z. B. detektiert, aus Lösungen präzipitiert oder mittels Affinitätschromatographie angereichert werden. Es sind verschiedene Biotinderivate erhältlich, die aufgrund spezieller Aktivierungsgruppen die gezielte Kopplung des Reagenzes an Proteine ermöglichen. Zum Beispiel können aminreaktive N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS) des Biotins eingesetzt werden, welche zur kovalenten Bindung des Biotins an die *C-Termini* und ϵ -Aminofunktionen des Zielproteins führen. Diese NHS-Ester des Biotins sind allerdings nicht wasserlöslich und benötigen daher, bei einer Reaktionsführung im wässrigen Milieu, die Gegenwart organischer Lösungsmittel. Sind die Zielmoleküle jedoch gegenüber organischen Lösungsmitteln empfindlich oder sollen die Oberflächen lebender Zellen biotinyliert werden, sind diese NHS-Biotinderivate nicht einsetzbar. Für solche Reaktionen können Biotinderivate mit der wasserlöslichen, aminreaktiven Sulfo-NHS-Gruppe verwendet werden (Staros, 1982). So wurde z. B. die Biotinylierung von Oberflächenproteinen lebender Zellen mit Sulfo-NHS-Biotin beschrieben (Cole, et al., 1987).

In alternativen Strategien können Cystein-Reste oder Kohlenhydrate glykosylierter Proteine das Ziel der Markierung darstellen. In diesen Fällen ist vor der Markierung jedoch eine zusätzliche Behandlung der Zielproteine nötig.

Da Cysteine Disulfidbrücken bilden, in denen sie in oxidierter Form vorliegen, werden die zu markierenden Proteine in der Regel vor der Markierung reduziert. Dies findet unter denaturierenden Bedingungen statt, um die Zugänglichkeit aller Cystein-Reste zu gewährleisten. In einer Anwendung dieser Strategie auf lebende Zellen sind denaturierende Bedingungen strikt zu vermeiden, um cytotoxische Effekte zu verhindern. Somit ist anzunehmen, dass in einem solchen Ansatz nicht alle Cysteine der Oberflächenproteine lebender Zellen einer Markierung zugänglich wären. Zudem könnten die reduzierenden Bedingungen zu Zellschädigungen führen.

Im Falle der Markierung der Kohlenhydrate glykosylierter Proteine z. B. mit Biotin-Hydrazid-Derivaten, muss zuvor eine chemische oder enzymatische Oxidation der Kohlenhydrate durchgeführt werden. Diese Vorbehandlungen können die Zielzellen beeinflussen oder sogar schädigen. Bei der selektiven Markierung der glykosylierten Membranproteine werden zusätzlich die Möglichkeiten einer Isotopen-kodierten differentiellen Markierung zweier Zellpopulationen verringert. Aufgrund der Mikroheterogenität der Glykosylierung einer Proteinspezies, wären auf der Ebene der Massenspektrometrie keine Signalpaare, sondern komplexe Signalmuster zu erwarten.

Zur Markierung des Oberflächenproteoms lebender Zellen bieten sich besonders aminreaktive Reagenzien an. Die primären Amingruppen der Lysin-Reste und die *N-Termini* sind Ziel dieser Markierungsstrategie. Während die *N-Termini* der Membranproteine durch Acetylierung blockiert und/oder auf der cytosolischen Membranseite lokalisiert vorliegen können, sind Lysin-Reste in nativen Proteinen häufig Markierungsreaktionen gut zugänglich. Die Reaktion mit Sulfo-NHS-Estern des Biotins kann dabei ohne zusätzliche vorbereitende Behandlung der Zellen in physiologischen Puffersystemen durchgeführt werden.

Aufgrund der hohen Affinität des Biotins zu Streptavidin oder Avidin, kann die Interaktion dieser Moleküle nur unter extremen Bedingungen (6-8 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 1,5) gelöst werden. Sollen biotinylierte Proteine über Affinitätschromatographie gereinigt werden, führen die oben genannten Bedingungen während der Elution zur Denaturierung der Zielproteine.

Als ein alternatives Biotinderivat steht Iminobiotin, das Guanidino-Analogon des Biotins, zur Verfügung. Dieses zeigt ein pH-abhängiges Bindeverhalten (Abb. 14) und ermöglicht die Elution iminobiotinylierter Proteine von Streptavidin-Säulenmaterialien unter milden Bedingungen mittels einer pH-Wert-Änderung.

Als Reagenz zur Iminobiotinylierung ist bisher nur der NHS-Ester des Iminobiotins kommerziell erhältlich. Dieses membrangängige Reagenz ist allerdings nicht geeignet, selektiv die Oberflächenproteine lebender Zellen zu markieren. Seine Verwendung bei der Anreicherung von Membranproteinen nach der Markierung isolierter Membranfraktionen ist hingegen beschrieben (Zeheb, et al., 1983). Die Effektivität eines solchen Ansatzes ist

jedoch von der Qualität der durchgeführten subzellulären Fraktionierung abhängig. Da die resultierenden Fraktionen häufig gegenseitige Kontaminationen aufweisen (Huber, et al., 2003), ist mit diesem Ansatz eine auf Proteine der Zelloberfläche beschränkte Analytik kaum möglich.

Zur selektiven Iminobiotinylierung des Oberflächenproteoms lebender Zellen und nachfolgender Affinitätsreinigung der Membranproteine unter milden Bedingungen bestehen mehrere Anforderungen an das Markierungsreagenz. Es sollte aufweisen:

- eine pH-abhängige Iminobiotin-Gruppe als Affinitätsanker,
- eine aminreaktive Aktivierungs-Gruppe, die Membranimpermeabilität vermittelt und
- ein *spacer*-Arm zur Verringerung sterischer Hinderung, der zudem das Einbringen einer Isotopen-Markierung ermöglicht.

Da ein solches Reagenz nicht kommerziell erhältlich war, wurde es synthetisiert und mit ihm Iminobiotinylierungsreaktionen etabliert. Durch die Kopplung von ϵ -Aminocapronsäure mit NHS-Iminobiotin wurde das Molekül Iminobiotinylaminocapronsäure (ImBAS) hergestellt. Die Sulfo-NHS-Iminobiotinylaminocapronsäure (SNHS-ImBAS), d. h. der aminreaktive Sulfo-NHS-Ester des ImBAS, wurde durch zwei alternative Aktivierungsreaktionen erzeugt. In Abb. 50 ist die Struktur des neuen Markierungsreagenz SNHS-ImBAS mit einer Beschreibung seiner funktionellen Gruppen angegeben.

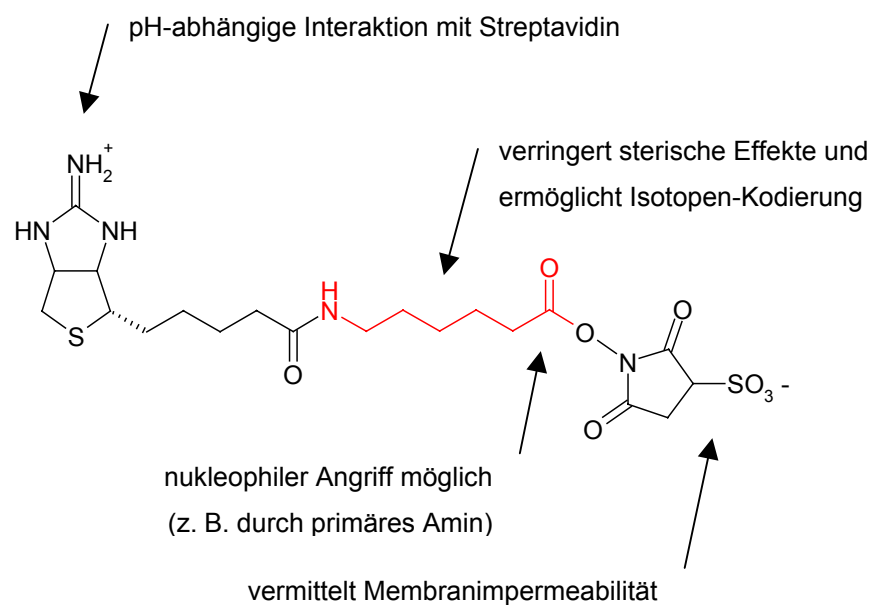


Abb. 50 Sulfo-NHS-Iminobiotinylaminocapronsäure (SNHS-ImBAS) mit Beschreibung der funktionellen Gruppen, rot markierter Anteil der Aminocapronsäure ist Träger der Isotopen-Kodierung in den Varianten D0- und D10-SNHS-ImBAS

Die Synthese der freien Säure des ImBAS ergab durchweg errechnete Ausbeuten von über 100% (Tab. 18). Demzufolge war von Verunreinigungen des Produktes auszugehen und dessen Reinigung nötig. Als Kontaminationen kamen hauptsächlich die in der Synthese im Überschuss eingesetzte ϵ -Aminocaprinsäure und Iminobiotin als Hydrolyseprodukt des NHS-Iminobiotins in Frage. Da beide Substanzen über Carbonsäure-Gruppen verfügen, hätte eine Aktivierung des ungereinigten Produktes neben SNHS-ImBAS auch aminreaktive Ester der Aminosäure und des Iminobiotins generiert. Der Einsatz dieses Reagenzgemisches in der Analyse des Oberflächenproteoms würde zu verstärkter Artefaktbildung und zu einer Erhöhung der Probenkomplexität führen. Zudem hätte das an die Zielproteine kovalent gebundene Iminobiotin eine Anreicherung des Nebenproduktes während der Affinitätschromatographie bewirkt.

Das ImBAS-Rohprodukt wurde einer Umkehrphasen-Chromatographie an C_{18} -Material unterzogen, um die Kontaminanten zu entfernen. Die Fraktionen der Chromatographie wurden mittels MALDI-MS analysiert. Da die ϵ -Aminocaprinsäure nur geringfügig verzögert mit dem Durchbruch eluierte, konnte sie gut von den ImBAS-Signalen getrennt werden. Das durch die Hydrolyse des NHS-Iminobiotins entstandene freie Iminobiotin eluierte mit geringfügig kürzerer Retentionszeit als die Hauptsignale des ImBAS (Abb. 17). Das Produkt ImBAS zeigte zwei Signale, deren MALDI-MS-Analyse diese jedoch eindeutig als ImBAS-haltig auswies. Die Elution des ImBAS in einem doppelten Signal könnte in dem Vorliegen eines homogenen Salzkomplexes begründet sein. Hierbei würden jeweils mehrere ImBAS-Moleküle aneinander gelagert vorliegen. Die ImBAS-haltigen Fraktionen wurden, unter Vermeidung des Iminobiotins, gesammelt und vereinigt. Dieses Vorgehen ergab eine durchschnittliche ImBAS-Ausbeute nach Synthese und Reinigung von 59%.

Um zwei unterschiedlich deuterierte ImBAS-Varianten herzustellen, wurde in der ImBAS-Synthese, alternativ zur undeuterten ϵ -Aminocaprinsäure, das D10-Isotop der Aminosäure eingesetzt. Da dieses nicht kommerziell erhältlich war, wurde es durch säurekatalysierte Hydrolyse aus D10-Caprolactam gewonnen. Die Hydrolyse des D10-Caprolactams und die Isolierung der D10-Aminosäure konnte mit einer Ausbeute an D10- ϵ -Aminocaprinsäure von 79% durchgeführt werden. Für diese Reaktion sind Ausbeuten von 90% beschrieben (Meyers und Miller, 1952), wobei jedoch mit 100fach größeren Ansätzen gearbeitet wurde.

Zur ImBAS-Markierung von Proteinen wurden zwei verschiedene Protokolle etabliert. Bei der in-situ Aktivierung wurde direkt vor der Markierungsreaktion die freie Säure des ImBAS mit Hilfe des wasserlöslichen Carbodiimids EDC in Gegenwart von Sulfo-NHS aktiviert. Das überschüssige EDC wurde neutralisiert, und der Lösung wurden dann die zu markierenden Proteine bzw. Zellen zugegeben. Dieses Verfahren ist zur Kopplung zweier Proteine beschrieben, bei der das zweite Protein nicht dem EDC ausgesetzt werden soll (Grabarek

und Gergely, 1990). In der Anwendung auf lebende Zellen bedeutet dies, dass die Quervernetzung von auf der Zelloberfläche präsentierten Carboxyl- und Amino-Gruppen unterbunden wird. Diese Vernetzung von Zelloberflächenproteinen würde zu einer Erhöhung der Probenkomplexität führen und die Solubilisierung der Membranproteine erschweren.

Das zweite Protokoll zur ImBAS-Markierung von Proteinen umfasste den direkten Einsatz des SNHS-ImBAS als aktivierten Ester. Die Darstellung des Esters erfolgte über Festphasensynthese an einem Polystyrol-gebundenen Carbodiimid. Hierbei wurde ein rieselfähiges Produkt erhalten, welches für die weiteren Arbeiten gut zu handhaben war.

Im Gegensatz dazu ist die Synthese des NHS-Esters der ImBAS beschrieben (Hofmann, et al., 1982). Die Arbeit umfasste die Synthese des membrangängigen NHS-Esters unter Verwendung des Carbodiimides DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid). Das so erzeugte Produkt zeigte allerdings harzartige Eigenschaften und konnte nicht in kristalliner Form isoliert werden. Die NHS-ImBAS und andere Biotinderivate wurden zur Markierung von Insulin eingesetzt, um die Isolierung von Rezeptoren zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Produkt SNHS-ImBAS_{roh} mittels MALDI-MS und Umkehrphasen-Chromatographie an C₁₈-Material untersucht. Die produkt-typischen Signale von 533,98 m/z und 555,94 m/z für das SNHS-ImBAS bzw. dessen Na-Komplex zeigten dabei geringe Intensitäten in den MALDI-MS-Spektren. Dies kann in der negativen Ladung der Sulfo-NHS-Gruppe des Moleküls begründet liegen. Da die MS-Messung im Positiv-Modus durchgeführt wird, werden positiv ionisierte Moleküle im elektrischen Feld beschleunigt. Analyten mit negativen Ladungen können somit nicht oder nur mit geringen Signalintensitäten detektiert werden. Die Trennung des SNHS-ImBAS_{roh} mittels Umkehrphasen-Chromatographie führte zur Detektion mehrerer Signale. Das im Überschuss eingesetzte Edukt Sufo-NHS eluierte dabei bereits im Durchbruch. Es konnten zwei ImBAS-haltige Signale detektiert werden, von denen das mit höherer Retentionszeit zusätzlich produkt-typische Signale für SNHS-ImBAS bzw. dessen Na-Komplex aufwies. Da die chromatographische Trennung unter wässrigen Bedingungen bei niedrigen pH-Werten durchgeführt werden musste, eignete sie sich nicht, den Hydrolyse-labilen Ester SNHS-ImBAS mit hohen Wiederfindungsraten zu reinigen. Da die Hydrolyse des Esters zudem schon während der Trennung stattfand, war die Aussagekraft der chromatographischen Methode bezüglich der Reinheit des Produktes stark limitiert. Aus diesem Grund wurde ein indirekter Nachweis des Produktes etabliert. Dieser beruhte auf der Markierung eines Modellpeptides und einer nachfolgenden chromatographischen Trennung der Produkte. Hierdurch konnten zudem die Markierungseffizienz der verschiedenen Markierungsstrategien, d. h. in-situ Aktivierung der ImBAS-Varianten und Einsatz des aktivierten Esters verglichen werden. Ein kommerziell erhältliches, aminreaktives Biotinderivat (SNHS-LC-Biotin) fand dabei als Vergleichsreagenz Anwendung. Die

Konzentrationen der Reagenzien waren dabei so gewählt, wie sie für die Zellmarkierung eingesetzt werden sollten. Der Vergleich der Markierungsausbeuten ergab, dass der direkte Einsatz des aktivierten Esters dem der in-situ Aktivierung überlegen war. Da die Markierungsausbeute des SNHS-ImBAS nur etwa ein Drittel des Wertes des SNHS-LC-Biotins erreichte war davon auszugehen, dass das Produkt SNHS-ImBAS nicht in reiner Form vorlag. Zudem erzeugte das SNHS-ImBAS im Markierungsexperiment ein Nebenprodukt mit einer Markierungseffizienz von 23%. Dieses Nebenprodukt äußerte sich in der Massenzunahme des Modellpeptides um 209,08 m/z (Abb. 20). Es war allerdings im Gegensatz zum ImBAS-markierten Peptid nicht über Affinitätschromatographie anzureichern. Somit konnte es sich weder um eine ImBAS-Markierung eines Peptidfragmentes, noch um eine Iminobiotinylierung des Modellpeptides handeln. Die Natur der Nebenreaktion wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht geklärt. Die Reinigung des Produktes mittels Umkehrphasen-Chromatographie musste aus oben erwähnten Gründen unterbleiben.

Aufgrund der überlegenen Markierungseffizienz des SNHS-ImBAS im Vergleich zur in-situ-Aktivierung des ImBAS, wurde das Rohprodukt des aktivierten Esters für die Analyse des Oberflächenproteoms von BMEC genutzt. Dabei führte das Auftreten der Nebenreaktion zwar zu einer Erhöhung der Komplexität der Probe, welche jedoch aufgrund der hohen Markierungseffizienz toleriert wurde. Der Einfluss der Nebenprodukte auf die Analytik wurde auch dadurch begrenzt, dass die Affinitätschromatographie nicht direkt zu deren Anreicherung führte. Ferner war anhand der Signalintensitäten im MS-Spektrum des Markierungsansatzes (Abb. 20) ersichtlich, dass die ImBAS-Markierung die Detektion des Peptides mittels MALDI-MS stärker begünstigt, als dies beim Nebenprodukt der Fall war. Dies könnte als Einfluss der Guanidino-Gruppe gewertet werden, welche die positive Ladung des Analyten während des MALDI-Prozesses stabilisiert. Somit war eine bevorzugte Detektion ImBAS-markierter Peptide auch in unbekanntem Proben zu erwarten.

Zusätzliche Hinweise auf eine ImBAS-bedingte Verbesserung der Ionisierbarkeit von Peptiden ergab der Vergleich mit dem biotinylierten Modellpeptid. Hierzu wurde ein ImBAS-markiertes bzw. biotinyliertes Modellpeptid enzymatisch mit Trypsin hydrolysiert und mittels MALDI-MS analysiert. Dabei konnten wie im Schema der Abb. 21 dargestellt kein biotinyliertes Peptidfragment mit *C-terminalem* Lysin-Rest detektiert werden. Es konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob das biotinylierte Fragment während der Hydrolyse nicht entstand, oder ob es im MALDI-Prozess nicht zu ionisieren war. Allerdings war die ϵ -Aminofunktion dieses Peptides aufgrund der Biotinylierung blockiert, wodurch eine Beeinflussung des Ionisierungsverhalten wahrscheinlich war. Peptide mit *C-terminalem* Lysin-Rest zeigen in der MALDI-Analytik häufig schlechtere Ionisierbarkeiten und geringere Signalintensitäten als Peptide mit *C-terminalem* Arginin-Rest. Durch die ImBAS-Markierung des Lysin-Restes trug das Peptid eine Guanidino-Gruppe. Somit kam es zu keiner

Maskierung der Ladung. Vielmehr ähnelte das Ionisierungsverhalten dem eines Peptides mit *C-terminalen* Arginin-Rest.

Der differentielle Einsatz der Isotopen-kodierten ImBAS-Varianten D0-ImBAS und D10-ImBAS wurde anhand der Markierung des Modellpeptides exemplarisch durchgeführt. Hierbei wurden Proben der markierten Peptide in bekannten Verhältnissen gemischt und einer MALDI-MS-Analyse unterzogen. In den resultierenden Spektren war das jeweilige Signalpaar mit der spezifischen Massendifferenz von 10,06 Da bis zu einem Verhältnis von eins zu zwanzig detektierbar. Das ImBAS-Reagenz stellt somit einen Ansatz dar, in dem Proben mittels MALDI-MS einer relativen Quantifizierung unterzogen werden können.

Hierin ähnelt es dem in der Einleitung beschriebenen ICAT-Ansatz. Bei diesem werden zwei Proben mit jeweils einer isotopischen Variante eines thiolreaktiven Biotinderivates markiert. Die Proben werden anschließend vereinigt, hydrolysiert und die markierten Peptide aufgrund der Affinitätsankers angereichert. Anschließend erfolgt die Analyse des Peptidgemisches mittels Massenspektrometrie (Gygi, et al., 1999). Proteine, die in beiden Proben gleich stark vertreten sind, ergeben nach der Hydrolyse Peptidpaare mit identischer Häufigkeit. Die korrespondierenden Peptide sind dabei an der spezifischen Massendifferenz von acht Dalton zu erkennen. Proteine differierender Häufigkeit ergeben im Spektrum Peptidpaare unterschiedlicher Intensitäten, anhand derer eine relative Quantifizierung erfolgen kann (Abb. 11). Durch die Einschränkung der Analyse auf die Cystein-haltigen Peptide, erlaubt der ICAT-Ansatz eine Verringerung der Probenkomplexität um eine bis zwei Größenordnungen. Die aufwendige Probenvorbereitung stellt jedoch einen Nachteil dieses Ansatzes dar. Die eigentliche Markierung der Proben erfolgt erst zu einem späten Zeitpunkt im analytischen Prozess. Die Probenvorbereitung umfasst neben dem getrennten Zellaufschluss und der Proteinextraktion auch eine obligatorische Reduktion unter denaturierenden Bedingungen. Die uneinheitliche Behandlung der beiden Proben während dieser Schritte ist möglich und würde die quantitative Analytik verfälschen.

Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Diskriminierung wäre in einem ImBAS-basierten Experiment geringer. Denn hier könnte die Markierung dank der aminreaktiven Komponente des Reagenzes direkt, d. h. ohne vorbereitende Schritte, erfolgen. Da die Markierung zu einem frühen Zeitpunkt des Prozesses erfolgen kann, würden die beiden Proben früh vereinigt und Diskriminierungen so verhindert. Im Falle einer Markierung des Oberflächenproteoms vitaler Zellen, könnten sogar die heiklen Schritte des Zellaufschlusses und der Proteinextraktion mit einer vereinigten Probe durchgeführt werden.

Allen Markierungsmethoden, die das Einbringen nicht-radioaktiver, stabiler Isotopen beinhalten, sind einige Limitationen gemeinsam. So sind die dynamischen Bereiche der Analytik eingeschränkt. Im vorliegenden Beispiel der differentiellen ImBAS-Markierung konnten mittels MALDI-MS nur Signalverhältnisse der Peptidpaare von eins zu zwanzig

detektiert werden. Sind die Unterschiede in der Signalintensitäten höher, erscheint das dominante Peptid als singuläres Signal. Gel-basierte Methoden der Proteomanalyse weisen hingegen, dank Fluoreszenz-Färbemethoden, dynamische Bereiche von bis zu vier Größenordnungen auf. Da Proteine in Konzentrationen von 10 bis 10^6 Kopien pro Zelle vorliegen können, stellen die begrenzten dynamischen Bereiche der Analytik gravierende Limitationen der Methode dar. In zukünftigen Arbeiten wird zu klären sein, ob die Möglichkeit der Probenanreicherung mittels Affinitätsanker geeignet ist, diese Nachteile auszugleichen.

Bei der Verwendung Isotopen-kodierter Reagenzien kann deren unvollständige Deuterierung zudem zu Problemen führen. So enthält z. B. das D8-ICAT-Reagenz immer geringe Mengen seines D7-Isotops. Ähnliches wurde bei D10-ImBAS beobachtet. Dabei war in den MALDI-MS-Spektren der D10-ImBAS-markierten Peptide ein dem Hauptsignal vorausgehendes Signal zu sehen (Abb. 22). Es handelte sich dabei um das Signal des D9-ImBAS-markierten Peptides. Die Kontamination des Markierungsansatzes mit D9-ImBAS trat aufgrund des unvollständigen Deuterierungsgrades (D10, 98%) des Eduktes Caprolactam auf. Das Signalverhältnis der D9- zur D10-Markierung war allerdings so gering, dass das Auswertungsprogramm das D9-Signal als eigenständiges Signal erfasste. Es wurde somit nicht der natürlichen Isotopenverteilung des D10-Signals zugeordnet.

Die Eignung des SNHS-ImBAS bzw. der in-situ aktivierten ImBAS, selektiv Oberflächenproteine lebender Zellen zu markieren, wurde an C6-Zellen und BMEC bestätigt. In Markierungsexperimenten mit anschließenden Vitalitätsfärbungen waren keine Unterschiede bezüglich der Vitalität zwischen markierten Zellen und Kontrollpopulationen erkennbar. Dies ließ darauf schließen, dass die Bedingungen der Markierung, wie z. B. Puffersystem, Inkubationsdauer oder Volumen, zellschonend gewählt waren. Ferner wurde so gezeigt, dass eventuelle Nebenprodukte der Reagenzien keine cytotoxischen Eigenschaften aufwiesen.

Zur Kontrolle der Selektivität der Oberflächenmarkierung wurde eine Affinitätsfärbung der ImBAS-markierten Zellen etabliert. Diese Färbung trug der pH-abhängigen Interaktion des Iminobiotinderivates mit Streptavidin Rechnung. Hierbei zeigten ImBAS-markierte Zellen im Vergleich zu unmarkierten Kontrollpopulationen deutliche Färbungen. Diese waren zudem auf die Zelloberfläche begrenzt. In einer vor der Markierung permeabilisierten Zellpopulation hingegen konnten intrazelluläre Färbungen und speziell die Färbung der Nuclei beobachtet werden. Dies entsprach somit dem Resultat, das nach einer Markierung mit membrangängigen Reagenzien zu erwarten gewesen wäre. Die bevorzugte Färbung der Nuclei permeabilisierter Zellen ist vor dem Hintergrund des hohen Lysin-Gehaltes kernlokalisierter Histone verständlich.

Das Reagenz SNHS-ImBAS war demzufolge weder membrangängig noch cytotoxisch und konnte somit in den folgenden Arbeiten zur Markierung von BMEC im präparativen Maßstab

eingesetzt werden. Hierzu war es nötig, gezielt diesen Zelltyp aus dem hoch komplexen Gewebe des Gehirns zu isolieren und zu kultivieren.

Die Physiologie des Gehirns repräsentiert das Zusammenspiel von schätzungsweise 100 verschiedenen Zelltypen. Die selektive Isolierung der Hirnkapillarendothelzellen des mikrovaskulären Systems kann jedoch unter Berücksichtigung zelltypischer Morphologie und physikalischer Eigenschaften erfolgen. Hierzu wurde eine Kombination mechanischer und enzymatischer Prozesse sowie verschiedener Zentrifugationstechniken durchgeführt. Erhalten wurden dabei BMEC-Populationen, die hohe Vitalitäten aufwiesen. Dabei waren sie nur zu ca. 5% mit Erythrozyten kontaminiert. Diese Blutzellen zeigten allerdings kein adhärentes Verhalten und waren zudem nicht mehr zur Zellvermehrung befähigt. Somit stellte diese Kontamination kein Problem für die weiteren Arbeiten dar.

Die BMEC wurden in kollagenierten Kulturgefäßen mit serumhaltigem Medium kultiviert. Die Identität der kultivierten Zellen wurde anhand des Nachweises von Marker-Proteinen mittels Immunfluoreszenzfärbung bestätigt. Die Expression dieser Marker-Proteine wurde über mehrere Zellpassagen verfolgt. Dabei wurden Veränderungen bezüglich der Proteinexpression und der Zellmorphologie beobachtet. Das *tight junctions*-spezifische Protein ZO-1 zeigte sich in allen drei Passagen in seiner zellulären Lokalisation auf die Kontaktstellen benachbarter Zellen beschränkt. Die Expression dieses cytosolischen Proteins nahm allerdings schon ab Passage 1 drastisch ab. Der Nachweis mittels Immunfluoreszenz in allen Passagen gelang somit nur durch die Verlängerung der Belichtungszeiten (Abb. 23). Ohne diese konnte die Lokalisation des ZO-1 in Passage 1 kaum und in Passage 2 nicht mehr bestätigt werden. Die beobachtete Abnahme der Expression des ZO-1 ließ auf eine Dedifferenzierung der BMEC mit fortdauernder Kultivierung und Passagenzahl schließen. Ähnliches wurde bei der Expression des Glucose-Transporters Glut1 festgestellt (E-Abb.10). Der auf der Zelloberfläche präsentierte Transporter war in Passage 1 in geringerem Maße detektierbar als in der Primärkultur (Passage 0). Es zeigten nur ca. 50% der Zellen ähnlich starke Signale wie sie in Passage 0 erhalten wurden. In der zweiten Passage war das Protein bei gleicher Belichtungszeit nicht mehr detektierbar. Erst um ca. 30% verlängerte Belichtungszeiten ermöglichten hier den Nachweis der sehr stark verringerten Glut1-Expression. Die Endothel-spezifische Färbung gegen van Willebrand-Faktor zeigte nur eine geringfügige Abnahme der Färbungsintensitäten mit steigender Passagenzahl. In allen immunchemischen Nachweisen war über die drei Passagen zusätzlich eine Veränderung der Zellmorphologie zu beobachten. Diese ging mit einer Vergrößerung der Zell- und Zellkerndimensionen um das Zwei- bis Vierfache einher. Auf den Ebenen der Morphologie und der Proteinexpression zeigten die Zellen demzufolge mit steigender Passagenzahl Anzeichen von Dedifferenzierungen. Aus diesem Grund wurden die folgenden Markierungen der

Oberflächenproteine lebender BMEC mit Zellen der Primärkultur (Passage 0) durchgeführt. Vor dem Hintergrund des komplexen Aufbaus der Hirnkapillare und der Interaktionen der beteiligten Zelltypen, konnte die BMEC-Primärkultur nur als ein einfaches Modell der BHS dienen. Sie stellte allerdings eine verfügbare Zellpopulation dar, die in ihren Eigenschaften den in-vivo agierenden Hirnkapillarendothelzellen stark ähneln sollte. Die BMEC-Kulturen wurden zusätzlich immunchemisch auf die Expression von *smooth muscle Actin* (smActin) untersucht. Diese Actinart wird in BMEC nicht exprimiert und konnte somit als Indikatorprotein für Kontaminationen der BMEC-Zellkultur mit anderen Zelltypen verwendet werden. Die schnell wachsenden Pericyten exprimieren smActin und wurden als geringfügige Kontamination aller Passagen nachgewiesen (Abb. 26). Sie bedeckten dabei ca. 3% der Oberfläche der Kulturen. Da demzufolge 97% der Zelloberflächen von BMEC gestellt wurde, war die Primärkultur der BMEC für eine Analyse des Oberflächenproteoms der BHS gut geeignet. Die Zellen wurden hierzu zwei Tage in serumhaltigem Medium bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte eine der Markierung vorangehende eintägige serumfreie Kultivierung der BMEC. Ohne diese Vorbereitung zeigte die Analytik der angereicherten Proteine Kontaminationen mit ImBAS-markiertem Rinderserumalbumin (BSA). Serumalbumin stellt mit 50-60% des Gesamtproteins das häufigste Protein des Serums dar. Wurden die Zielzellen bis unmittelbar vor der Markierung in serumhaltigem Medium kultiviert, konnte auch mehrmaliges Waschen der Zellen mit PBS⁻-Puffer spätere BSA-Kontaminationen nicht verhindern. Eine der Markierung vorangestellte serumfreie Kultivierung war somit nötig.

Zur Analyse des Oberflächenproteoms von BMEC wurden lebende Zellen mit einer apikalen Gesamtoberfläche von ca. 700 cm² einer ImBAS-Markierung mit SNHS-ImBAS unterzogen. Nach dem Aufschluss der Zellen und der Solubilisierung der Proteine mit dem Detergenz Triton X-100, erfolgte eine Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose-Material. Die durch Änderung des pH-Wertes von der Säule eluierten Proteine ergaben im Chromatogramm ein deutlich aufgelöstes Signal. Über das Integral des Signales konnte die Gesamtmenge an isoliertem Protein bestimmt werden.

Ein analytisches SDS-Gel und die Affinitätsfärbung eines identischen Blotes belegten die mit der Chromatographie erreichte Anreicherung der ImBAS-markierten Proteine. Hierbei waren in der Spur der Kontrollpopulation und in der Spur der nicht-angereicherten Probe markierter Zellen identische Signale auf der Höhe von 75 und ca. 120 Da zu finden. Hierbei handelte es sich um unspezifische Signale, die nicht von ImBAS-markierten Proteinen herrührten.

Levamisol ist ein Inhibitor alkalischer Phosphatasen. Die Alkalische Phosphatasen intestinaler Herkunft werden dabei jedoch nur schwach inhibiert (van Belle, 1972). Das Enzym des verwendeten Enzym-Streptavidin-Konjugates stammte aus bovinem Darm und konnte somit auch in Gegenwart des Inhibitors zum Nachweis von ImBAS-Markierungen

eingesetzt werden. Die unspezifischen Signale der Kontrollprobe traten auch beim Einsatz des Inhibitors in der Affinitätsfärbung auf. Somit war ausgeschlossen, dass noch intakte zelleigene Phosphatasen für diese Signale verantwortlich waren. Ihre Ursache war eher in biotinhaltigen Carboxylasen der BMEC zu suchen. Die Expression biotinabhängiger Carboxylasen ist beschrieben für Niere, Leber, Pankreas und Gehirn. Diese Gewebe enthalten diese Enzyme vorzugsweise in Mitochondrien (Duhamel und Whitehead, 1990). Speziell BMEC sind reich an Mitochondrien. Die Expression biotinhaltiger Carboxylasen in diesem Zelltyp ist somit wahrscheinlich.

Das Fehlen der Signale in der Spur des Durchbruchs der Chromatographie sprach für diese These. Da biotinhaltige Proteine nicht durch eine Änderung des pH-Wertes vom Material der Affinitätssäule zu eluieren sind, unterblieb ihre Anreicherung. Die spätere Analyse der ImBAS-markierten Proteine wurde demzufolge nicht durch die biotinhaltigen Enzyme beeinflusst.

Anhand der Affinitätsfärbung konnte eine deutliche Anreicherung ImBAS-markierter Proteine im konzentrierten Eluat (Probe kE_1) belegt werden. Diese Probe wurde in einem präparativen SDS-Gel getrennt, um Proben für die MALDI-MS-Analyse zu generieren. Bei dem resultierenden Gel wurde zunächst auf eine Färbung verzichtet. Aufgrund des analytischen Gels wurde für das präparative Gel eine Vielzahl an Banden erwartet, deren gezieltes Ausschneiden nicht praktikabel gewesen wäre. Eine für Färbungen typische Fixierung des Gels sollte zudem vermieden werden, da dies zu einer verringerten Extraktion der Proteine bzw. deren Peptide aus dem Gel führen könnte. Die Spur der Probe kE_1 im präparativen SDS-Gel wurde deshalb direkt in 81 ca. 15 mm x 1 mm große Stücke geschnitten. Das restliche Gel wurde dann einer Fluoreszenzfärbung unterzogen. Der gefärbte Randbereich der Spur kE_1 ermöglichte das Abschätzen der Banden und ihrer Molekulargewichte. Hierbei waren deutliche Proteinbanden bis herunter zu 37 kDa zu erkennen. Die Nummerierung der Banden ist in Abb. 32 dargestellt und diente der ungefähren Orientierung bezüglich der Proteingrößen. Die Proteinbanden wurden einer enzymatischen Hydrolyse mit Trypsin unterzogen, die Peptide angereichert und mittels MALDI-MS analysiert.

Die ImBAS-Markierung ging mit einer spezifischen Massenzunahme der Peptide von 338,18 Da pro Markierung einher. Die Berücksichtigung dieser Änderung im Rahmen der Datenbankrecherchen war nötig, um die angereicherten Proteine identifizieren zu können. Hierzu wurde die ImBAS-Markierung als chemische Modifikation in der UNIMOD-Datenbank annotiert. Diese Datenbank beinhaltet die spezifischen Massenänderungen vieler natürlicher und artifizierlicher Proteinmodifikationen. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Suchmaske Mascot berücksichtigte diese annotierten Modifikationen während der durchgeführten Recherchen. Die Einstellungen der Recherchekriterien sind detailliert im Ergebnisteil angegeben. Anhand der jeweiligen Massenlisten konnten in 31 Banden insgesamt 45

Proteine identifiziert werden. Für 19 Banden konnten trotz guter Spektren jeweils keine Identifizierung erfolgen. Dies könnte darin begründet sein, dass es sich um unbekannte Proteine handelt, deren Sequenzen noch nicht in den durchsuchten Datenbanken annotiert waren. Allerdings könnten die betreffenden Banden auch eine Vielzahl verschiedener Proteine in geringen Mengen enthalten. Somit könnten in der MALDI-MS-Analyse nur die stärksten Peptidsignale vieler verschiedener Proteine erfasst worden sein. Eine Proteinidentifizierung anhand solcher extrem heterogener Massenlisten war mit den verwendeten Suchmasken nicht möglich. In zukünftigen Experimenten wären ergänzende MS-Analysen sinnvoll, die zusätzlich die Aminosäuresequenz der detektierten Peptide ermitteln können. Bei einer sog. MS-MS-Messung werden einzelne Peptidspezies im Massenspektrometer isoliert, fragmentiert und die Massen ihrer Fragmente bestimmt. Über diese Fragmentmassen ist dann die Sequenz des jeweiligen Peptides ableitbar. So können Proteine auch anhand weniger Peptide identifiziert werden.

Viele Membranproteine liegen glykosyliert vor. Die aus ihnen resultierenden Peptide weichen in ihrer tatsächlichen Masse aufgrund der Glykosylierung drastisch von ihrer theoretischen Masse ab. Die Zuordnung dieser Peptidmassen zu annotierten Proteinen ist somit nicht möglich. Eine enzymatische Deglykosylierung der Peptidgemische vor der MALDI-MS-Analyse könnte in zukünftigen Arbeiten zur Identifizierung solcher glykosylierten Proteine beitragen.

Bei fünf Banden zeigte sich eine Häufung Triton X-100-typischer Signale, wodurch die Identifizierung der vorliegenden Proteine unmöglich wurde. Dies stellte eine Limitation des Einsatzes dieses Detergenzes dar. Alternative Detergenzien wie z. B. Octylglykosid könnten in zukünftigen Experimenten verwendet werden, sofern sie mit der Affinitätschromatographie kombinierbar wären.

Die MALDI-MS-Analyse der 81 Gelbanden ergab 55 Spektren guter Qualität. Diese lieferten Massenlisten, die für Datenbankrecherchen eingesetzt wurden. Durch diese Recherchen konnten in 31 Banden insgesamt 45 Proteine identifiziert werden. Die ausführliche Auflistung der identifizierten Proteine mit detaillierter Angabe der Suchparameter ist im Ergebnisteil tabellarisch zusammengefasst. Die Rechercheergebnisse sind gemeinsam mit den MALDI-MS-Resultaten in Abb. 51 dargestellt. Ferner ist hier erneut die zelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine angegeben.

Anhand der statistischen Darstellung wird deutlich, dass es sich bei etwa der Hälfte der identifizierten Proteine um Oberflächenproteine, d. h. um Membranproteine im weiteren Sinne handelt. Diese Rubrik schließt sowohl Plasmamembranproteine, als auch sekretierte und Membran-assoziierte Proteine ein. Diese Einteilung ist vertretbar, da die durchgeführte Proteinanreicherung auf der Basis der Präsentation der Proteine auf der Zelloberfläche erfolgte. Die Liste der Proteine umfasste dabei z. B. Cadherin, Integrin α -1, Insulin-Rezeptor,

oder auch CD151. Die Präsentation dieser Proteine auf der Zelloberfläche von BMEC ist zum Teil beschrieben und / oder als sehr wahrscheinlich anzusehen.

Weitere 27% der identifizierten Proteine repräsentierten sog. unbekannte Proteine. Hierbei handelte es sich um Proteine bekannter DNA-Sequenz, jedoch unbekannter Funktion und Lokalisation. Die Präsenz dieser Proteine auf der Zelloberfläche von BMEC ist somit möglich. Zukünftige Arbeiten an dieser Proteingruppe stellen aufgrund der wenigen verfügbaren Daten eine große Herausforderung dar.

Der Nachweis der zellulären Lokalisation dieser unbekannt Proteine könnte z. B. über Peptidantikörper erfolgen. Hierzu müssten Peptide aus den DNA-Sequenzen abgeleitet und zur Generierung von Antikörpern eingesetzt werden.

Etwa ein Viertel aller gefundenen Proteine war für den Nucleus, das Cytosol oder das Cytoskelett beschrieben. Diese Proteine waren nicht auf der Membranoberfläche vitaler Zellen zu erwarten und stellten Kontaminationen dar. Diese könnten im Vorliegen geschädigter Zellen schon vor der Zellmarkierung begründet sein. Für Zellen in konfluenter Kultur wird generell eine Apoptoserate von ca. 5% angenommen. Ein zellschädigender Einfluss der Markierung selbst kann aufgrund der Vitalfärbungen ausgeschlossen werden. Allerdings zeigten diese Färbungen auch in den Kontrollpopulationen geringe Anzahlen toter Zellen. Sollte es sich dabei um nekrotische Zellen handeln, wäre bei diesen die Markierung nicht auf die Zelloberfläche beschränkt. Frisch präparierte BMEC bilden traubenförmige Zellhaufen, die auch Zelltrümmer enthalten können. Dieser sog. Zelldebris könnte zum Teil auch noch nach drei Tagen in der Primärkultur enthalten sein und markiert werden. Somit käme es zu einer, wenn auch begrenzten, Anreicherung von Proteinen, die nicht auf der Zelloberfläche vitaler Zellen präsentiert werden.

Im Falle des in Bande 49 identifizierten Actins ist eine andere Ursache der Kontamination wahrscheinlich. Actin ist über die submembranösen Plaques der *tight junctions* mit Membranproteinen verbunden. Werden diese markiert und in Gegenwart von Triton X-100 solubilisiert könnte Actin in Protein-Detergenz-Komplexen mitgerissen werden. Die Anreicherung des Actins während der Affinitätschromatographie würde quasi indirekt erfolgen. Die Protein-Detergenz-Komplexe würden erst unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE aufgelöst werden. Die Trennung des eingeschleppten Actins würde dann entsprechend seines Molekulargewichtes im Gel erfolgen. Tatsächlich entspricht die Höhe der Bande 49 bei ca. 40 kDa der theoretischen Größe des Actins. Die Recherche ordnete der betreffenden Massenliste 13 Peptide des Actins zu. Von diesen trug jedoch keines eine ImBAS-Markierung. Dies sprach gegen eine Markierung des cytosolischen Proteins in vitalen Zellen und gegen dessen direkte Anreicherung. Die Identifizierung des Actins stellte somit nicht die Selektivität der ImBAS-Markierung in Frage.

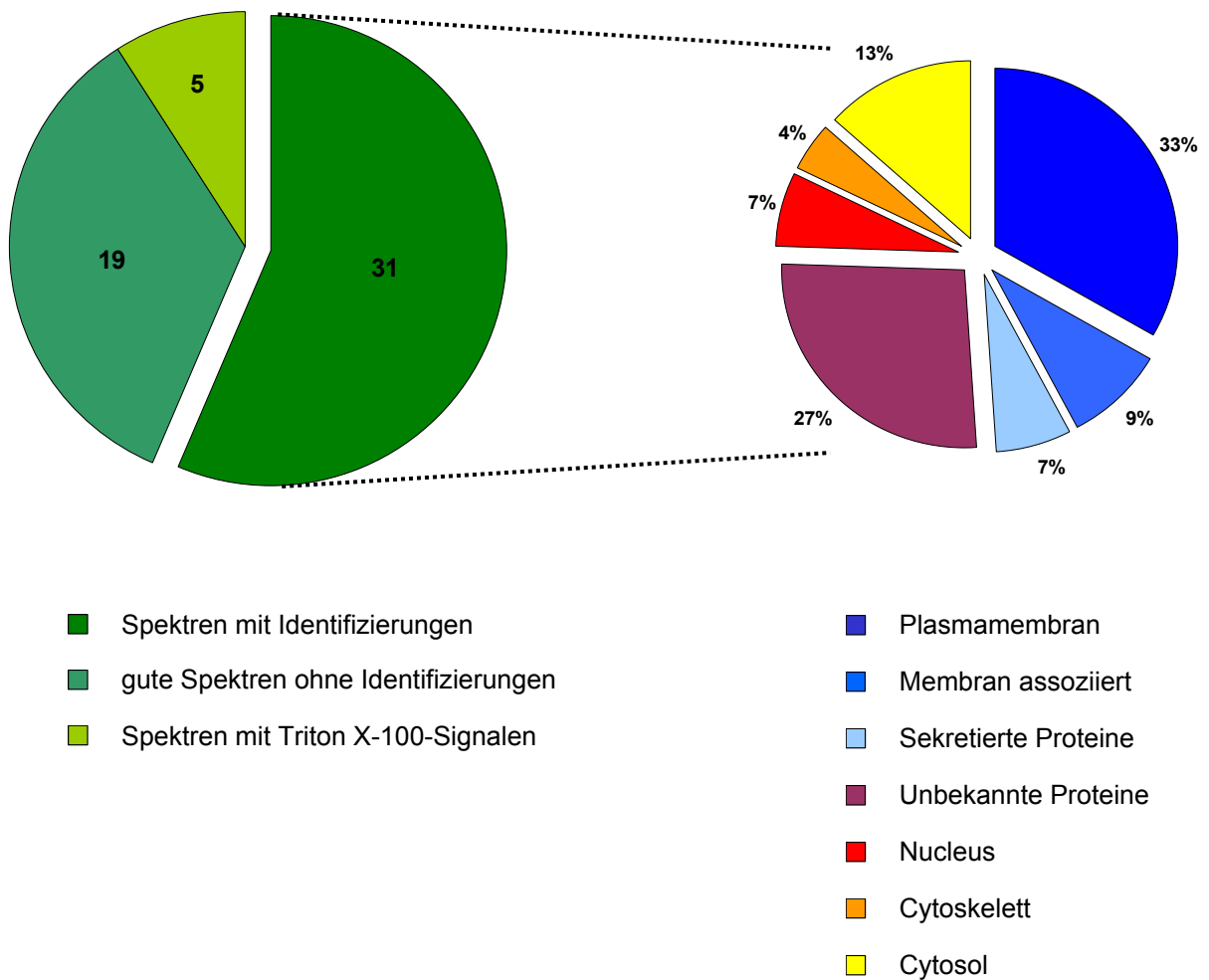


Abb. 51 Schema der Spektrenqualität unter Angabe der aus ihnen resultierenden Proteinidentifizierungen

Anhand des in Bande 26 identifizierten Cadherins kann die Selektivität der Markierung zusätzlich belegt werden. Die Höhe der Bande 26 im SDS-Gel entsprach einer Proteingröße von ca. 75 kDa. Das zugeordnete Protein *Vascular endothelial-cadherin (Precursor)* aus Schwein weist in seiner prozessierten Form, d. h. ohne Signal- oder Propeptid, eine Größe von ca. 83 kDa auf. Es handelt sich dabei um ein Typ I-Transmembranprotein mit einer transmembranen Domäne. Der betreffenden Massenliste wurden 22 Peptide zugeordnet, von denen fünf Peptide eine ImBAS-Markierung trugen. Alle markierten Bereiche des Proteins befanden sich dabei in der potentiell extrazellulären Domäne des Proteins (Rest 45-593). Weder den Signal- oder Propeptidbereichen noch der potentiell cytosolischen Domäne (Rest 620-782) wurden dabei markierte Peptide zugeordnet. Allerdings konnte ein Peptid der

cytosolischen Region detektiert werden, das zwar über zwei Lysin-Reste verfügte, das jedoch keine ImBAS-Markierung trug.

Die ImBAS-markierten Peptide des Cadherins besaßen *C-terminale* Lysin-Reste und wiesen bis auf eine Ausnahme mindestens eine *missed cleavage* auf. Die unmarkierten Peptide hingegen zeigten nur in vier Fällen *C-terminale* Lysin-Reste. Die restlichen 14 Peptide trugen hingegen *C-terminale* Arginin-Reste. Dies deckte sich mit der Beobachtung, dass in der MALDI-MS die Detektion von Peptiden mit *C-terminalem* Arginin begünstigt sei. Eine ImBAS-Markierung hingegen scheint das Ionisierungsverhalten der Peptide mit *C-terminale* Lysin zu verbessern. Ein solcher Effekt konnte auch während der Experimente mit dem Modellpeptid beobachtet werden (s. o.). Dies wurde so interpretiert, dass die positive Ladung eines markierten Peptides während der MS-Analyse durch die Guanidinogruppe des ImBAS stabilisiert wird. Bei der Verwendung konventioneller aminreaktiver Biotin-Reagenzien wäre solch ein Effekt ausgeschlossen. Denn diese Biotinylierung könnte keine positive Ladung stabilisieren, sondern würde im Gegenteil sogar zur Maskierung des positiv geladenen Lysin-Restes führen.

Die Markierung nicht-adhärenter Zellen mit Sulfo-NHS-LC-Biotin und nachfolgender 2D-PAGE wurde kürzlich beschrieben (Jang und Hanash, 2003). Die Zellen wurden mit dem Biotin-Reagenz markiert und die Membranproteine mittels Affinitätschromatographie an Avidin angereichert. Während des Zellaufschlusses und der Chromatographie wurde das Detergenz NP-40 verwendet. In 2D-Gelen erfolgte die Trennung der Proteine, die dann mittels MALDI-MS und nLC-ESI-MS/MS identifiziert wurden. Für eine B-Lymphoblasten-Kultur wurde eine Liste von 17 Proteinen veröffentlicht. Dabei wurden bekannte Membranproteine wie Integrin β -2 oder der Transferrin-Rezeptor gefunden. Allerdings wurden in diesem Ansatz auch viele *heat-shock*-Proteine und Chaperone identifiziert, deren intrazelluläre Lokalisation beschrieben ist. Es handelt sich dabei um lösliche Proteine oder um Membranproteine des endoplasmatischen Retikulums (ER). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits während der Humanproteom-Tagung in Versailles (2002) diskutiert (mündliche Mitteilung Patterson).

Die Präsenz solcher Proteine an der Plasmamembran vitaler BMEC konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden. So wurden in den Banden 32 und 34 zwei *heat-shock*-Proteine identifiziert, die ImBAS-markierte Peptide enthielten. Diese Proteine wurden in der Statistik allerdings als cytosolische Proteine geführt.

Wie diese Proteine auf die Zelloberfläche gelangen ist derzeit unklar. Da die meisten *heat-shock*-Proteine weder über Transmembranbereiche noch über Signalpeptide verfügen, ist der klassische sekretorische Pfad über das ER und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran unwahrscheinlich.

Einige der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten BMEC-Proteine wurden mittels immunchemischer und molekularbiologischer Methoden bestätigt. Dies erfolgte, um die Resultate des ImBAS-basierten Ansatzes zu validieren. Hierzu wurden vier Kandidaten ausgewählt:

- Plexin B1, ein Semaphorin-Rezeptor
- MRP2 (ABCC2), ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie
- MMP10, ein Mitglied aus der Familie der Matrix-Metalloproteinasen
- ATP7b, eine Kupfer-transportierende ATPase

Plexin B1 ist ein Semaphorin-Rezeptor mit einer transmembranen Domäne und einer Größe von 214 kDa. Im SDS-Gel wurde es in Bande 19 identifiziert, die mit einer Proteingröße von ca. 100 kDa korreliert war. Dieser vermeintliche Widerspruch konnte bei Betrachtung der Sequenzabdeckung durch die zugeordneten Peptide aufgelöst werden. Die Peptide wurden dem Protein erst ab Aminosäure-Rest 1001 von insgesamt 1951 Aminosäuren zugeordnet. Es handelte sich also um ein Fragment des Proteins, das im SDS-Gel getrennt wurde. Unklar ist allerdings, ob es sich hierbei um ein Artefakt handelte, das im Laufe der Probenvorbereitung entstand, oder ob das Protein in dieser Form von vitalen BMEC auf deren Oberfläche präsentiert wurde. Drei der 15 zugeordneten Peptide trugen eine ImBAS-Markierung.

Die Expression des Plexin B1 war bisher beschrieben für Neuronen, hämatopoetische Zellen und embryonalen Endothelzellen. Um die Expression in BMEC zu testen, wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, das einen Nukleotidbereich abdeckte, der für vier der zugeordneten Peptide kodierend war. Hierdurch konnte der Nachweis des Plexin B1 auf Transkriptebene erfolgen. Alle elf untersuchten Gewebe zeigten die Expression des Plexin B1. Dabei waren in BMEC und AOEC nur schwache Signale und in Cortex starke Signale detektierbar. Die Expression einer alternativen Plexin B1-Variante könnte in zukünftigen Arbeiten ebenfalls mittels molekularbiologischer Methoden erfolgen. Hierzu müssten PCR-Reaktionen durchgeführt werden, deren Produkte im Bereich der ersten Sequenzhälfte des Plexin B1 kodieren. Wären diese nicht detektierbar, spräche dies für das Vorliegen einer Variante des Plexin B1 bereits auf Transkriptebene. Alternativ könnte die Variante des Rezeptors aber auch durch die Prozessierung des Proteins entstehen. Durch eine posttranslationale Modifikation entstünde die Plexin B1-Variante somit erst auf Proteinebene. Eine Untersuchung dieser Fragestellung wäre in weiterführenden Arbeiten z. B. mit immunchemischen Methoden durchführbar.

Das *multidrug-resistance-associated-Protein 2* (MRP2) ist ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie, das 17 potentielle Transmembrandomänen aufweist. ABC-Transporter (ATP-binding-cassette-Transporter) sind „Efflux-Pumpen“, die potentiell toxische Substanzen

unter ATP-Hydrolyse über biologische Membranen transportieren. Der Nomenklatur dieser Proteinfamilie zufolge wurde MRP2 im Rahmen dieser Arbeit als ABCC2 bezeichnet. Im präparativen SDS-Gel wurde es in Bande 8 identifiziert, die mit einer Proteingröße von ca. 250 kDa korreliert war. Laut der Swiss-Prot-Annotation des ABCC2 aus Ratte (Q63120) zeigte das Protein ein theoretisches Molekulargewicht von 173 kDa. Aufgrund von vier potentiellen N-Glykosylierungs-Stellen des Transporters konnte dessen Molekulargewicht *in vivo* jedoch als höher angenommen werden. Zudem waren die Schätzungen des Molekulargewichtes anhand der Bandennummer im Bereich hoher Molekulargewichte (bis Bande 13, d. h. >150 kDa) nur als sehr grobe Näherungen zu sehen.

Dem Protein waren im Rahmen der Recherche 19 Peptide zugeordnet worden, die über dessen komplette Sequenz verteilt waren. Nach *Contig*-Bildung aus drei porcinen DNA-Sequenzen wurde ein Primerpaar abgeleitet. Mit diesem wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, das einen Nukleotidbereich abdeckte, der für eines der zugeordneten Peptide kodierend war. Der Nachweis des ABCC2 auf Transkriptebene war nur in Niere und Leber erfolgreich. Dies sind die Gewebe für welche die stärkste Expression des ABCC2 beschrieben ist (Kusuhara und Sugiyama, 2002). Die Präsenz des ABCC2 an der Blut-Hirn-Schranke gilt gegenwärtig, trotz zum Teil kontroverser Ergebnisse, als akzeptiert.

So konnten in bovinen BMEC mittels PCR- und Westernblot-Analysen die MRP-Varianten MRP1 und MRP4-6, aber nicht MRP2 nachgewiesen werden (Zhang, et al., 2000). Dagegen ist der Nachweis des MRP2 in Hirnkapillaren aus Ratte mittels *real-time*-PCR beschrieben (Miller, et al., 2000). In dieser Veröffentlichung erfolgte auch zusätzlich ein indirekter Nachweis des Transporters durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren und fluoreszenzmarkierter Substrate. Dem Protein wurde so eine luminalen Lokalisation in den Kapillaren zugewiesen. Der Einsatz isolierter Kapillaren barg jedoch die Gefahr, dass Perizyten-spezifische Proteine bzw. deren Aktivitäten den Endothelzellen zugeordnet werden konnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden BMEC-Primärkulturen als ein Modell der Blut-Hirn-Schranke verwendet. Die der ImBAS-Markierung unterzogenen apikalen Membranen der BMEC entsprachen dabei der luminalen Oberfläche der Kapillare. Die erfolgte Identifizierung des ABCC2 im Oberflächenproteom der BMEC deckte sich somit mit den obigen Beobachtungen in Rattenkapillaren. Um ausschließen zu können, dass die Identifizierung des ABCC2 auf geringe Kontaminationen der Kultur durch Perizyten zurückzuführen war, wurde ABCC2 in der BMEC-Kultur immunchemisch nachgewiesen. Der Einsatz des anti-MRP2-Antikörpers aus Ziege in Westernblot-Analysen ergab ein Signal unterhalb von 250 kDa. Der Antikörper zeigte zwar eine Hintergrundfärbung der Membran, detektierte jedoch keine anderen Proteinbanden. Bei der immunchemischen Färbung der

BMEC-Primärkultur mit diesem Antikörper wurden nur in Endothelzellen Signale detektiert. Die Identifizierung des ABCC2 konnte somit nicht von Perizyten herrühren.

Die zelluläre Lokalisation des ABCC2 in BMEC schien nicht nur auf die Oberfläche beschränkt zu sein. In Abb. 52 sind körnige Bereiche der Fluoreszenzfärbung durch Pfeilköpfe gekennzeichnet. Ob es sich hierbei um angefärbte intrazelluläre Vesikel handelt, könnte in zukünftigen Arbeiten u. U. mittels konfokaler Mikroskopie untersucht werden. Die in Abb. 52 mit Pfeilen gekennzeichneten Bereiche erschienen im mikroskopischen Bild als Oberflächenfärbung.

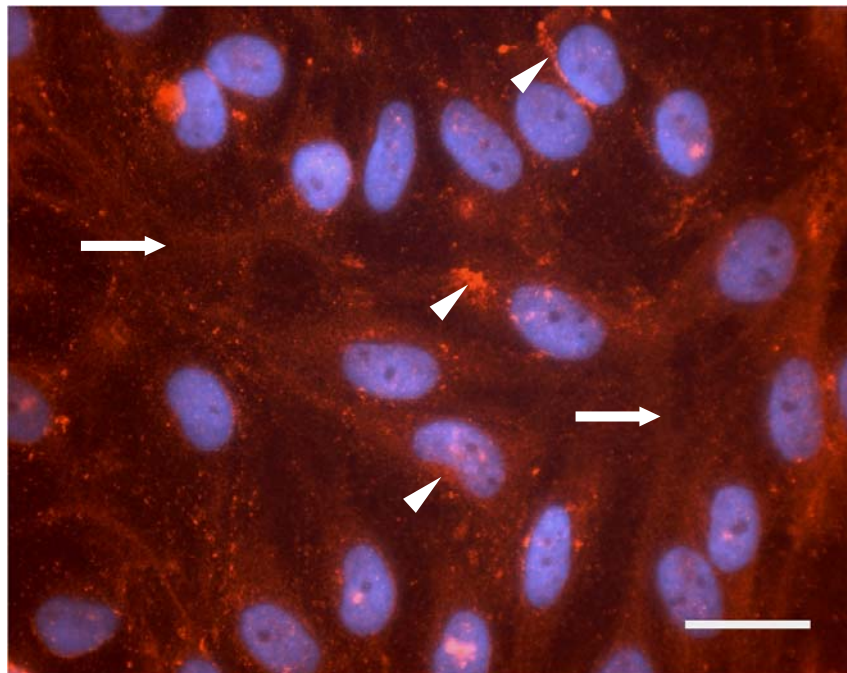


Abb. 52 Immunfluoreszenzfärbungen der BMEC-Kultur Passage 0,
Erstantikörper : anti-MRP2 (Gt)-Ak , Zweitantikörper anti-Gt-Ak/Cy3;
— : 20 µm

Die Matrix-Metalloproteinasen stellen eine Familie Zink-abhängiger Enzyme dar, die über 20 Vertreter aufweist. Der durch sie katalysierte enzymatische Abbau der extrazellulären Matrix ist für viele physiologische und pathophysiologische Prozesse bedeutend. Sie werden dabei zumeist als inaktive Zymogene von den Zellen sekretiert.

MMP10 stellt ein Mitglied dieser Proteinfamilie dar, dessen Expression bisher nur für Lungen- und Knochengewebe beschrieben ist (GeneCards-Annotation: GC11M103998). Das Protein weist ein theoretisches Molekulargewicht von 54 kDa auf. Im SDS-Gel wurde es in Bande 41 identifiziert, die mit einer Proteingröße von ca. 50 kDa korreliert war.

Dem Protein waren im Rahmen der Recherche 10 Peptide zugeordnet worden, die über dessen komplette Sequenz verteilt waren. Dabei trugen sieben Peptide insgesamt neun ImBAS-Markierungen. Zwei der markierten Peptide wurden mit geringen m/z-Werten von deutlich unter 1000 m/z detektiert. Eine ImBAS-Markierung bewirkt einen Massenzuwachs von ca. 338 Da. Dies bedeutet, dass diese Peptidespezies in ihrer unmarkierten Form, mit Molekulargewichten unter 700 Da, im MALDI-MS nicht zu detektieren gewesen wären. Erst die ImBAS-Markierung ermöglichte ihre Detektion und somit einen Informationsgewinn, der zur Identifizierung des Proteins beitrug.

Zwei sich überlagernde Peptide befanden sich zudem innerhalb der ersten 80 Aminosäuren des Proteins. Dieser Bereich bildet bei den Matrix-Metalloproteinasen ein Propeptid. Die Aktivierung der Proteinase erfolgt meist extrazellulär durch enzymatische Hydrolyse dieses Propeptides. Die MMP-Familie zeigt sehr große Sequenzübereinstimmungen innerhalb ihrer Mitglieder. MMP10 und MMP3 z. B. weisen auf DNA-Ebene eine sehr hohe Sequenzidentität auf, die sogar bei speziesübergreifenden Vergleichen kaum abnimmt. Die porcine DNA-Sequenz des MMP10 war nicht verfügbar. Der spezifische Nachweis der MMP10-Expression mittels PCR war somit massiv erschwert. Es wurde alternativ ein immunchemischer Nachweis des Proteins in BMEC durchgeführt.

Der Einsatz des anti-MMP10-Antikörpers aus Maus in Westernblot-Analysen ergab mehrere sehr schwache Signale. Hierbei wurde ein Bandenpaar zwischen 50 und 60 kDa detektiert. Dies entsprach in etwa den für das Proenzym und dessen aktivierter Variante erwarteten Größen. Allerdings zeigte die Färbung noch mindestens acht weitere Signale höherer Masse, so dass die Selektivität des Antikörpers in zukünftigen Experimenten überprüft werden sollte.

Bei der immunchemischen Färbung der BMEC-Primärkultur mit diesem Antikörper wurden nur in Endothelzellen schwache Signale detektiert. Hierbei war aber ein deutlicher Unterschied zur Negativkontrolle erkennbar. Die Lokalisation des MMP10 in BMEC erschien im mikroskopischen Bild auf das Zellinnere beschränkt zu sein.

Mittels konfokaler Mikroskopie könnte in zukünftigen Arbeiten überprüft werden, ob es sich tatsächlich um gefärbte Vesikel der Zelle handelt. Eine derartige Lokalisation wäre für MMP10 anzunehmen, da es sich um ein sekretiertes Protein handelt. Aus diesem Grund sollten weiterführende Experimente auch verstärkt die Analytik des Zellüberstandes beinhalten.

Das integrale Membranprotein ATP7b stellt eine Kupfer-transportierende ATPase dar. Es gilt als assoziiert mit der sog. Wilson-Krankheit (WD). Diese auch hepatolenticuläre Degeneration genannte Erkrankung ist durch eine schwere Störung des Kupferstoffwechsels gekennzeichnet. Im Laufe dieser autosomal-rezessiv vererbten Krankheit kommt es zur Anreicherung von Kupfer im Gewebe von Leber und Gehirn. Die daraus resultierenden

cytotoxischen Effekte führen zur Schädigung der Leber und zu neurologischen Schäden. In Patienten mit Symptomen der Wilson-Krankheit wurden bisher über 100 verschiedenen Mutationen des ATP7b gefunden (Forbes und Cox, 1998). Dabei handelte es sich hauptsächlich um punktuell auftretende *missense*-Mutationen.

ATP7b weist eine theoretische Größe von 157 kDa auf. Im SDS-Gel wurde es allerdings in Bande 27 identifiziert, die mit einer Proteingröße von ca. 75 kDa korrelierte. Die Sequenzabdeckung der zugeordneten Peptide war dabei auf das mittlere Drittel der Sequenz beschränkt. Demzufolge wäre es möglich, dass im SDS-Gel nur ein Fragment des Proteins getrennt wurde. Eine alternative Ursache wäre die Präsenz einer Variante des ATP7b auf der Zelloberfläche der BMEC. Dem Protein wurden sechs Peptide zugeordnet, von denen drei ImBAS-Markierungen trugen. Zwei der markierten Peptide wurden mit *m/z*-Werten von unter 1000 *m/z* detektiert. Wie am Beispiel des MMP10 schon besprochen, wäre die Detektion dieser Peptidspezies ohne Markierung nicht möglich gewesen.

Die Expression des ATP7b wurde bisher für Leber, Niere, Plazenta und Gehirn gezeigt (GeneCards-Annotation: GC13M046494). Dabei wurde für die Gehirn-spezifische Isoform B des ATP7b eine cytosolische Lokalisation beschrieben. Diese Isoform entsteht durch alternatives Splicen, es fehlen ihr zwei Sequenzbereiche von 486 bzw. 135 bp. Der letztere Abschnitt kodiert auf Proteinebene den Bereich der Reste 911 bis 955. Diese Aminosäuresequenz beinhaltet eine potentielle Transmembrandomäne. Das vollständige Protein ATP7b wird hingegen Isoform A genannt.

Eines der dem Protein zugeordneten Peptide lag in einem Bereich, welcher der cytosolischen Isoform B fehlt. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass im Rahmen dieser Arbeit die membranständige Isoform A identifiziert wurde. Anhand der humanen DNA-Sequenz wurden zwei Primersets abgeleitet. Das Primerset *ATP7b-1870* war spezifisch für Isoform A. Der Einsatz des Primersets *ATP7b-2350* in der PCR sollte hingegen für die beiden Isoformen unterschiedliche Produkte liefern, da es einen Bereich einschloss der in Isoform B fehlte. Produkte, die für Isotyp A spezifisch waren, wurden in BMEC und in allen anderen untersuchten Geweben, außer Lunge, gefunden. Hierbei zeigten sich in Übereinstimmung zu den veröffentlichten Daten die stärksten Signale in Lebergewebe.

Die Verwendung des Primersets *ATP7b-2350* ergab in allen Geweben, außer Lunge, mehrere Produkte im Größenbereich von 300 bis 400 bp. Das Verhältnis der Signalintensitäten variierte dabei allerdings mit den Geweben. Die PCR-Produkte aus dem Gewebe Cortex wurden kloniert und sequenziert. Hierbei wurden drei verschiedenen Klone charakterisiert, die sich von den bisher beschriebenen humanen Sequenzen unterschieden. Klon 8 entsprach dabei der Isoform A des ATP7b. Eine kürzere Variante des ATP7b, die der humanen Isoform B ähnelte, war in Klon 6 zu finden. Hier fehlte allerdings nicht der komplette Bereich von 135 bp, sondern nur ein Sequenzabschnitt von 54 bp. Klon 6 kodierte

somit eine um 27 Aminosäuren längere Variante der Isoform B des ATP7b. Eine dritte Sequenz, Klon 10, wies zusätzlich einen Einschub von 21 bp auf. Dieser schloss sich unmittelbar an den bei Isoform B fehlenden Sequenzabschnitt an. Durch diesen Einschub ergab sich eine Sequenzänderung auf Proteinebene auf einer Länge von zehn Aminosäureresten. Zusammengefasst deutete dies darauf hin, dass das porcine Protein ATP7b mehrere Splice-Varianten aufweist. Da für die Isoformen des humanen Proteins verschiedene zelluläre Lokalisationen beschrieben sind, waren die porcinen Varianten von großem Interesse. Die Expression und das Verhältnis der Varianten zueinander, schien zudem gewebespezifisch zu sein. Nur in BMEC und in Cortex wurde ein Verhältnis der kurzen Variante (Klon 6) zu den langen Varianten (Klone 8 und 10) von eins zu eins festgestellt. Aufgrund des geringen Größenunterschieds zwischen Klon 8 und Klon 10 konnte dabei zwischen diesen nicht unterschieden werden. In allen anderen Geweben hingegen wurden für die langen Varianten des ATP7b wesentlich mehr Transkript nachgewiesen. Die Signale für *ATP7b-2350* waren für BMEC deutlich stärker als für Cortex. In zukünftigen Arbeiten sollte deshalb untersucht werden, ob das Signal für Cortex ausschließlich auf die darin enthaltenen BMEC zurückzuführen ist.

Die BMEC gelten als zelluläre Komponente der Blut-Hirn-Schranke. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Schutz des Gehirns vor potentiell toxischen Substanzen. Durch die Expression verschiedener Transport- oder Entgiftungssysteme werden sie dieser Schutzfunktion gerecht. So exprimieren BMEC z. B. P-Glykoprotein oder das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte ABCC2. Der Zusammenhang zwischen der Expression von ATP7b und dem Auftreten von Cisplatin-Toleranzen maligner Gewebe wurde in jüngster Zeit diskutiert (Higashimoto, et al., 2003). Cisplatin ist ein Schwermetallkomplex mit zytostatischer Wirkung, der in der Chemotherapie von Bronchialkarzinomen und Tumoren des Urogenitaltraktes eingesetzt wird. In weiterführenden Arbeiten wird zu klären sein, ob dem Kupfer-Transporter ATP7b an der Blut-Hirn-Schranke eine ähnliche Schutzfunktion zukommt.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Oberflächenproteom von BMEC analysiert werden. Es wurde ein neuartiges Reagenz entwickelt, das die selektive Markierung der Oberflächenproteine lebender Zellen und die schonende Anreicherung ihrer Membranproteine ermöglichte. Das hierzu synthetisierte SNHS-ImBAS zeigte deutliche Vorteile gegenüber konventionellen Biotinylierungsreagenzien, sowohl auf der Ebene der Probenvorbereitung als auch auf der Ebene der MALDI-MS-Analytik. Dieses zum Patent angemeldete Reagenz erwies sich in den durchgeführten Arbeiten als nicht cytotoxisch und nicht-membrangängig. Um es zur Analyse des Oberflächenproteoms vitaler BMEC einsetzen zu können, wurde dieser Zelltyp aus dem hochkomplexen Organ Gehirn isoliert und kultiviert.

Die Kontrolle der Zellmaterials erfolgte mittels immunchemischer Nachweise von Markerproteinen. Nach einer präparativen Markierung von BMEC wurden die Membranproteine angereichert und im SDS-Gel getrennt. Mittels eigens etablierter Affinitätsfärbungen konnten die selektiven Eigenschaften des Reagenzes und die erfolgreiche Anreicherung markierter Proteine belegt werden. Die Identifizierung der angereicherten Proteine erfolgte mittels MALDI-MS und anschließender Datenbank-Recherche. Hierbei wurden insgesamt 45 Proteine identifiziert. Für die Hälfte dieser Proteine war eine Lokalisation an der Zelloberfläche beschrieben. Die Funktion und Lokalisation bei einem weiteren Viertel der Proteine waren unbekannt. Für die restlichen Proteine war eine intrazelluläre Lokalisation beschrieben.

Die Expression von vier der identifizierten Proteine mit bekannter Funktion wurde mit ergänzenden Methoden in BMEC bestätigt. Hierbei handelte es sich um den Rezeptor Plexin B1, die sekretierte Protease MMP10 und die Transportproteine MRP2 (ABCC2) und ATP7b. Der zuletzt aufgeführte Kupfer-Transporter ATP7b konnte in verschiedenen Isoformen nachgewiesen werden, die sich von den humanen Sequenzen zum Teil deutlich unterschieden.

Die Primärkultur der BMEC stellte ein einfaches Modell der Blut-Hirn-Schranke dar. Mit steigender Passagenzahl zeigten sich jedoch während der Zellkultivierung verstärkt Effekte der Dedifferenzierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb nur BMEC-Primärkulturen verwendet. Für zukünftige Arbeiten stünden somit jedoch verschiedene Zellpopulationen zur Verfügung. Durch den Vergleich dieser Populationen könnten weiterreichende Erkenntnisse über die Blut-Hirn-Schranke gewonnen werden. Solch ein differentieller Ansatz könnte ebenfalls mit einer ImBAS-basierten Methodik erfolgen. Anhand der differentiellen Markierung eines Modellpeptides wurde bereits exemplarisch gezeigt, dass Isotopen-kodierte ImBAS-Varianten den Vergleich zweier Proben ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

Aebersold, R. und Goodlett, D. R. (2001)
"Mass Spectrometry in Proteomics"
Chem. Rev. **101**: 269-95.

Anderson, L. und Seilhamer, J. (1997)
"A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver"
Electrophoresis **18**: 533-37.

Aurrand-Lions, M., Duncan, L., Ballestrem, C. und Imhof, B. A. (2001)
"JAM-2, a Novel Immunoglobulin Superfamily Molecule, Expressed by Endothelial and Lymphatic Cells"
J Biol Chem. **276**: 2733-41.

Balda, M. S., Whitney, J. A., Flores, C., Gonzalez, S., Cereijido, M. und Matter, K. (1996)
"Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein"
J Cell Biol. **134**: 1031-49.

Balda, M. S. und Matter, K. (2000)
"Transmembrane proteins of tight junctions"
Cell & Developmental Biology **11**: 281-89.

Bauer, H., Stelzhammer, W., Fuchs, R., Weiger, T. M., Danninger, C., Probst, G. und Krizbai, I. A. (1999)
"Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro"
Exp. Cell Res. **250**: 434-38.

Betz, A. L. und Goldstein, G. W. (1978)
"Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries"
Science **202**: 225-27.

Betz, A. L., Firth, J. A. und Goldstein, G. W. (1980)
"Polarity of the Blood-Brain Barrier: Distribution of Enzymes between the Luminal and Antiluminal Membranes of Brain Capillary Endothelial Cells"
Brain Res. **192**: 17-28.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979)
"A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid dna"
Nucleic Acids Research **7**: 1513-22.

Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R. und Postel, W. (1982)
"Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications"
J Biochem Biophys Methods **6**: 317-39.

- Blum, M., Beier, H. und Gross, H. J. (1987)
"Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels"
Electrophoresis **8**: 93-99.
- Bradford, M. M. (1976)
"A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye protein binding"
Anal. Biochem. **71**: 248-54.
- Cole, S. R., Ashman, L. K. und Ey, P. L. (1987)
"Biotinylation: An Alternative to Radioiodination for the Identification of Cell Surface Antigens in Immunoprecipitates"
Molecular Immunology **24**: 699-705.
- Colegio, O. R., van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C. und Anderson, J. M. (2002)
"Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells"
Am.J.Physiol Cell Physiol. **283**: C142-C47.
- Cordenonsi, M., D'Atri, F., Hammar, E., Parry, D. A., Kendrick-Jones, J., Shore, D. und Citi, S. (1999)
"Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin"
J Cell Biol. **147**: 1569-82.
- Dragsten, P. R., Blumenthal, R. und Handler, J. S. (1981)
"Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane?"
Nature **294**: 718-22.
- Duhamel, R. C. und Whitehead, J. S. (1990)
"Prevention of Nonspecific Binding of Avidin"
Methods Enzymol. **184**: 201-07.
- Farquhar, M. G. und Palade, G. E. (1963)
"Junctional complexes in various epithelia"
J Cell Biol. **17**: 375-412.
- Forbes, J. R. und Cox, D. W. (1998)
"Functional Characterization of Missense Mutations in ATP7B: Wilson Disease Mutation or Normal Variant?"
Am. J. Hum. Gent. **63**: 1663-74.
- Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., McAndrew, R. S., Osteryoung, K. W., Gage, D. A. und Phinney, B. S. (2003)
"Proteomic study of the Arabidopsis thaliana chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis"
Proteome Res. **2**: 413-25.
- Fudem-Goldin, B. und Orr, G. A. (1990)
"2-Iminobiotin-containing reagent and affinity columns"
Methods Enzymol. **184**: 167-73.

- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. und Tsukita, S. (1993)
"Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions"
J Cell Biol. **123**: 1777-88.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. und Tsukita, S. (1994)
"Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions"
J Cell Biol. **127**: 1627-26.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998)
"Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin"
J Cell Biol. **141**: 1539-50.
- Gloor, S. M., Wachtel, M., Bollinger, M. F., Ishihara, H., Landmann, R. und Frei, K. (2001)
"Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier"
Brain Res. Rev **36**: 258-64.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. und Weiss, W. (2000)
"The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients"
Electrophoresis **21**: 1037-53.
- Görg, A., Boguth, G., Kopf, A., Reil, G., Parlar, H. und Weiss, W. (2002)
"Sample prefractionation with Sephadex isoelectrical focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels"
Proteomics **2**: 1652-7.
- Goshe, M. B., Conrads, T. P., Panisko, E. A., Angell, N. H., Veenstra, T. D. und Smith, R. D. (2001)
"Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses"
Anal. Chem. **1**: 2578-86.
- Goshe, M. B. und Smith, R. D. (2003)
"Stable isotope-coded proteomic mass spectrometry"
Curr Opin Biotechnol. **14**: 101-09.
- Grabarek, Z. und Gergely, J. (1990)
"Zero-length crosslinking procedure with the use of aktive esters"
Anal Biochem. **185**: 131-35.
- Gygi, S. P., Han, D. K. M., Gingras, A.-C., Sonenberg, N. und Aebersold, R. (1999)
"Protein analysis by mass spectrometry and sequence database searching: Tools for cancer research in the post-genomic era"
Electrophoresis **20**: 310 -19.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. und Aebersold, R. (1999)
"Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags"
Nature Biotechnology **17**: 994 - 99.

- Han, D. K., Eng, J., Zhou, H. und Aebersold, R. (2001)
"Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry"
Nature Biotechnology **19**: 946-51.
- Harlowe und Lane, M. A. (1988)
"Antibodies. A laboratory manual"
Cold Spring Harbour, New York.
- Higashimoto, M., Kanzaki, A., Shimiakawa, T., Konno, S., Naritaka, Y., Nitta, Y., Mori, S., Shirata, S., Yoshida, A., Terada, K., Sugiyama, T., Ogawa, K. und Takebayashi, Y. (2003)
"Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase in human esophageal carcinoma"
Journal of Molecular Medicine **11**: 337-41.
- Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S. und Rubin, L. L. (1997)
"Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells"
J Cell Sci **110**: 1603-13.
- Hofmann, K., Titus, G., Montibeller, J. A. und Finn, F. M. (1982)
"Avidin Binding of Carboxyl-Substituted Biotin and Analogues"
Biochemistry **21**: 978-84.
- Huber, J. D., Egleton, R. D. und Davis, T. P. (2001)
"Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier"
Trends in Neurosciences **24**: 719-25.
- Huber, L. A., Pfaller, K. und Vietor, I. (2003)
"Organelle Proteomics: Implication for Subcellular Fractionation in Proteomics"
Circ Res. **92**: 962-68.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. und Tsukita, S. (1999)
"Direct Binding of Three Tight Junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH Termini of Claudins"
J Cell Biol. **147**: 1351-63.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kemphues, K. J. und Ohno, S. (1998)
"An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3"
J Cell Biol. **143**: 95-106.
- Jang, J. H. und Hanash, S. (2003)
"Profiling of the cell surface proteome"
Proteomics **3**: 1947-54.
- Juliano, R. L. und Ling, V. (1976)
"A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants"
Biochim.Biophys.Acta **455**: 152-62.

- Khyse-Anderson, J. (1984)
"Electroblotting of multiples gels: A simple apparatus without buffertanks for rapid transfer of proteins from polacryamide to nitrocellulose"
J. Biochem.Biophys.Methods **10**: 203-09.
- Klose, J. (1975)
"Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals"
Humangenetik **26**: 231-43.
- Kusuhara, H. und Sugiyama, Y. (2002)
"Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney"
Journal of Controlled Release **78**: 43-54.
- Laemmli, U. K. (1970)
"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4"
Nature **227**: 680-85.
- Lin, P., Fischer, T., Weiss, T. und Farquhar, M. G. (2000)
"Calnuc, an EF-Hand Ca²⁺ binding protein, specifically interacts with the C-terminal α 5-helix of G α i3"
PNAS **97**: 674-79.
- Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M. und Yates III, J. R. (1999)
"Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry"
Nature Biotechnology **17**: 676-82.
- Mantych, G. L., James, D. E. und Devaskar, S. U. (1993)
"Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier"
Endocrinology **132**: 35-40.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. und Dejana, E. (1998)
"Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration"
J Cell Biol. **142**: 117-27.
- Meyers, C. Y. und Miller, L. E. (1952)
"ε-Aminocaproic acid"
Org. Synth. **32**: 39-41.
- Miller, D. S., Nobmann, S. N., Gutmann, H., Toeroek, M., Drewe, J. und Fricker, G. (2000)
"Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy"
Molecular Pharmacology **58**: 1357 - 67.
- Miller, G. (2002)
"Breaking Down Barriers"
Science **297**: 1116-18.

- Mischek, U., Meyer, J. und Galla, H. J. (1989)
"Characterization of γ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries"
Cell. Tiss. Res. **256**: 221-26.
- Mitic, L. L. und Anderson, J. M. (1998)
"Molecular architecture of tight junctions"
Annu Rev Physiol. **60**: 121-42.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1999)
"Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 511-16.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M. und Tsukita, S. (1999)
"Endothelial Claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes Tight Junction Strands in Endothelial Cells"
J Cell Biol. **147**: 185-94.
- Morrison, R. S., Kinoshita, Y., Johnson, M. D., Uo, T., Ho, J. T., McBee, J. K., Conrads, T. P. und Veenstra, T. D. (2002)
"Proteomic Analysis in the Neurosciences"
Molecular & Cellular Proteomics **1**: 553-60.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988)
"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.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. und Tsukita, S. (2003)
"Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice"
J Cell Biol. **161**: 653-60.
- O'Farrel, P. H. (1975)
"High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins"
J Biol Chem. **250**: 4007-21.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. und Mann, M. (2002)
"Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics"
Molecular & Cellular Proteomics **1**: 376 - 86.
- Orr, G. A. (1981)
"The Use of the 2-Iminobiotin-Avidin Interaction for the Selective Retrieval of Labeled Plasma Membrane Components"
J Biol Chem. **256**: 761-66.
- Pasquali, C., Fialka, I. und Huber, L. A. (1997)
"Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins"
Electrophoresis **18**: 2573-81.

- Petty, M. A. und Lo, E. H. (2002)
"Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation"
Progress in Neurobiology **68**: 311-23.
- Plutner, H., Davidson, H. W., Saraste, J. und Balch, W. E. (1992)
"Morphological analysis of protein transport from the ER to the Golgi membranes in digitonin-permeabilized cells: role of the P58 containing compartment"
J Cell Biol. **119**: 1097-116.
- Rabilloud, T. (2003)
"Membrane proteins ride shotgun"
Nature Biotechnology **21**: 508-10.
- Rice, R. H., Means, G. E. und Brown, W. D. (1977)
"Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation"
Biochem.Biophys.Acta **492**: 316-21.
- Romijn, E. D., Krijgsveld, J. und Heck, A. J. R. (2003)
"Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics"
J. Chromatogr. A **1000**: 589-608.
- Rotman, B. und Papermaster, B. W. (1966)
"Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters."
Proc Natl Acad Sci U S A **1**: 134-41.
- Rubin, L. L. und Staddon, J. M. (1999)
"The cell biology of the blood-brain barrier"
Annu Rev Neurosci **22**: 11-28.
- Saiki, R. K. (1985)
"Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia"
Science **230**: 1350-54.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. und Tsukita, S. (1998)
"Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions"
J Cell Biol. **141**: 397-408.
- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y. und Tsukita, S. (1997)
"Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation"
J Cell Biol. **137**: 1393-401.
- Sanchez del Pino, M. M., Hawkins, R. A. und Peterson, D. R. (1995)
"Neutral Amino Acid Transport by the Blood-brain barrier - Membrane vesicle studies"
J Biol Chem. **267**: 25951-57.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977)
"DNA sequencing with chain-terminating inhibitors"
Proc Natl Acad Sci USA **74**: 5463-67.

- Santoni, V., Rabilloud, T., Doumas, P., Rouquie, D., Mansion, M., Kieffer, S., Garin, J. und Rossignol, M. (1999)
"Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels"
Electrophoresis **20**: 705-11.
- Schnölzer, M., Jedrzejewski, P. und Lehmann, W. D. (1996)
"Protease-catalyzed incorporation of ^{18}O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
Electrophoresis **17**: 945-53.
- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S. und Lifton, R. P. (1999)
"Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg^{2+} Resorption"
Science **285**: 103-06.
- Sims, D. E. (1986)
"The Pericyte--A Review"
Tissue Cell **18**: 153-74.
- Smith, Q. R., Momma, S., Aoyagi, M. und Rapoport, S. I. (1987)
"Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier"
J. Neurochem. **49**: 1651-58.
- Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M. E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K. und Kato, T. (1999)
"Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors"
Neuroscience Research **35**: 155-64.
- Staros, J. V. (1982)
"N-Hydroxysulfosuccinimide Active Esters: Bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers"
Biochemistry **21**: 3950-55.
- Steinberg, T. H., Agnew, B. J., Gee, K. R., Leung, W.-T., Goodman, T., Schulenberg, B., Hendrickson, J., Beechem, J. M., Haugland, R. P. und Patton, W. F. (2003)
"Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology"
Proteomics **3**: 1128-44.
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S. und Goodenough, D. A. (1986)
"Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia"
J Cell Biol. **103**: 755-66.
- Stevenson, B. R., Anderson, J. M., Goodenough, D. A. und Mooseker, M. S. (1988)
"Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance"
J Cell Biol. **107**: 2404-8.

- Stevenson, B. R. und Begg, D. A. (1994)
"Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells"
J Cell Sci **107**: 367-75.
- Tatsuta, T., Naito, M., Oh-hara, T., Sugawara, I. und Tsuruo, T. (1992)
"Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier"
J Biol Chem. **267**: 20383-91.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. und Davison, M. (2001)
"Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology"
Proteomics **1**: 377-96.
- Tsukamoto, T. und Nigam, S. K. (1999)
"Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins"
Am J Physiol. **276**: F737-50.
- Tsukita, S., Furuse, M. und Itoh, M. (2001)
"Multifunctional strands in tight junctions"
Nature Reviews: Molecular Cell Biology **2**: 285-93.
- van Belle, H. (1972)
"Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues"
Biochem.Biophys.Acta **289**: 158-68.
- van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (1997)
"Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts"
J Cell Sci **110**: 1113-21.
- van Meer, G. und Simons, K. (1986)
"The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domain of MDCK cells"
EMBO Journal **5**: 1455-64.
- Wachtel, M., Frei, K., Ehler, E., Fontana, A., Winterhalter, K. und Gloor, S. M. (1999)
"Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition"
J Cell Sci **112**: 4347-56.
- Washburn, M. P., Wolters, D. und Yates, J. R. (2001)
"Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology"
Nature Biotechnology **19**: 242 - 47.
- Weiler-Güttler, H., Zinke, H., Möckel, B., Frey, A. und Gassen, H. G. (1989)
"cDNA Cloning and Sequence Analysis of the Glucose Transporter from Porcine Blood-Brain Barrier"
Biol. Chem. Hoppe-Seyler **370**: 467-73.
- Weinshenker, N. M., Shen, C. M. und Wong, J. Y. (1988)
"Polymeric carbodiimide preparation"
Org. Synth.Coll. **VI**: 951-54.

- Wildgruber, R., Harder, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W., Fey, S. J., Larsen, P. M. und Görg, A. (2000)
"Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients"
Electrophoresis **21**: 2610-16.
- Wong, V. und Gumbiner, B. M. (1997)
"A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier"
J Cell Biol. **136**: 399-409.
- Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E. und Yates III, J. R. (2003)
"A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins"
Nature Biotechnology **21**: 532-37.
- Zeheb, R., Chang, V. und Orr, G. A. (1983)
"An Analytical Method for the Selective Retrieval of Iminobiotin-Derivatized Plasma Membrane Proteins"
Anal Biochem. **129**: 156-61.
- Zhang, R., Sioma, C. S., Thompson, R. A., Xiong, L. und Regnier, F. E. (2002)
"Controlling Deuterium Isotope Effects in Comparative Proteomics"
Anal. Chem. **74**: 3662 - 69.
- Zhang, Y., Han, H., Elmquist, W. F. und Miller, D. W. (2000)
"Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel cells"
Brain Res. **876**: 148-53.

Ergebnisse der NMR-Spektroskopie

NMR-Daten der ϵ -Aminocapronsäure (D0):

^1H NMR (300 MHz, D_2O)

$\delta = 3.0$ (t, $J_{\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2} = 7,5$), 2.2 (t, $J_{\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2} = 7,3$), $1.55-1.75$ (m, 4H) [$-\text{C}_\gamma\text{H}_2-$ / $-\text{C}_\beta\text{H}_2-$],
 $1.35-1.45$ (m, 2H) [$-\text{C}_\gamma\text{H}_2-$]

NMR-Daten des D0-ImBAS:

^1H -NMR ($[\text{D}_4]$ Methanol $\delta = 4.72$ (dd, $^3J = 7.9$, $^3J = 4.5$, 1H, $-\text{CH}-$); 4.54 (dd, $^3J = 7.9$, $^3J = 4.5$, 1H, $-\text{CH}-$); $3.25-3.3$ (m, 1H, $-\text{SCH}-$); 3.18 (t, 2H, $^3J = 6.8$, $-\text{OCNCH}_2-$); $2.8-3.05$ (m, 2H, $-\text{SCH}_2\text{CH}-$); 2.27 (t, 2H, $^3J = 7.3$, $-\text{OCCH}_2\text{CH}_2-$); 2.21 (t, $^3J = 7.3$, 2H, $-\text{OCCH}_2\text{CH}_2-$); $1.3-1.8$ (m, $-\text{CH}_2-$, 12H)

Liste kontaminierender Signale,

Angaben in m/z, Trypsinfragmente unterstrichen

| | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|------------------|-----------|
| 512,3 | 1107,544 | 1381,64 | 1768,799 | 2286,1254 |
| 748,4519 | 1109,4904 | 1383,6909 | 1784,74 | 2361,95 |
| 768,600 | 1118,5091 | 1393,75 | 1791,74 | 2367,26 |
| 825,100 | 1164,566 | 1407,712 | 1794,78 | 2384,153 |
| <u>842,5094</u> | 1165,5853 | 1434,7705 | 1838,91 | 2501,2524 |
| 855,100 | 1179,59 | 1438,748 | 1851,929 | 2510,12 |
| 861,090 | 1193,61 | 1455,6868 | 1941,94 | 2584,1276 |
| 877,050 | 1232,62 | 1469,73 | 1993,9772 | 2701,515 |
| 897,410 | 1234,6796 | 1475 | 1981,89 | 2705,16 |
| 906,504 | 1235,55 | 1476,839 | 2025,94 | 2717,442 |
| 917 | 1262,5977 | 1487,6783 | 2095,037 | 2831,19 |
| 1006,487 | 1300,58 | 1493,74 | 2141,76 | 3013,324 |
| 1016,541 | 1307,72 | 1584,74 | 2150,0783 | 3223,2821 |
| 1037,520 | 1316,5905 | 1638,86 | 2158,031 | 3223,2821 |
| 1045,564 | 1320,60 | 1657,7934 | 2164,054 | 3312,27 |
| 1060,560 | 1350,687 | 1707,7805 | <u>2211,1040</u> | 3313,31 |
| 1065,490 | 1357,71 | 1716,8517 | 2217,17 | 4489,116 |
| 1066,490 | 1365,6399 | 1736,842 | 2239,17 | |
| 1081,572 | 1366,66 | 1759,8601 | 2283,180 | |
| 1090,532 | 1372 | 1759,9594 | 2285,97 | |

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thomas H. Oppolzer
Geboren: 25.05.1972 in Langen/Hessen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

78 - 84 Grund- und Hauptschule in Urberach/Rödermark
84 - 91 Ricarda-Huch-Schule in Sprendlingen/Dreieich
06/91 Abitur an der Ricarda-Huch-Schule in Sprendlingen/Dreieich

Zivildienst:

09/91 - 10/92 Deutsches Rotes Kreuz, Kreisverband Offenbach

Studium:

10/92 Beginn des Biologiestudiums an der Technischen Universität Darmstadt
09/94 Abschluss des Vordiploms
07/95 - 08/96 Biologiestudium an der Université de Bordeaux I (Frankreich)
09/99 Mündliche Diplom-Hauptprüfungen
03/99-10/99 Diplomarbeit am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt, unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Gassen und Dr. S. Wolf, mit dem Thema: „Proteomanalyse zur Identifizierung Blut-Hirn-Schranke-spezifischer Proteine“
seit 02/00 Promotion am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Gassen und Dr. S. Wolf, mit dem Thema: „Analyse des Oberflächenproteoms von Hirnkapillarendothelzellen“

Veröffentlichungen

Patente:

Wolf, S., Bangsow, T., Jäger, M., Oppolzer, T.H. (2001)

„Iminobiotinderivat“

DE 101 51 158.2, angemeldet

Posterpräsentationen:

Oppolzer, T., Jäger, M. und Wolf, S. (2002)

“Analysis of cell surface proteins using *ESP-Tag*TM, an isotope tagging approach for quantitative mass spectrometry”

HUPO-Congress, Versailles

Oppolzer, T., Bangsow, T., Pelzer, P., Märten, S., Wolf, S. und Jäger, M. (2003)

“Characterization of Plasma Membrane Proteins of Brain Mikrovaskular Endothelial Cells“

Proteomic-Forum, München

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Thomas H. Oppolzer

Darmstadt, den 16. Dezember 2003