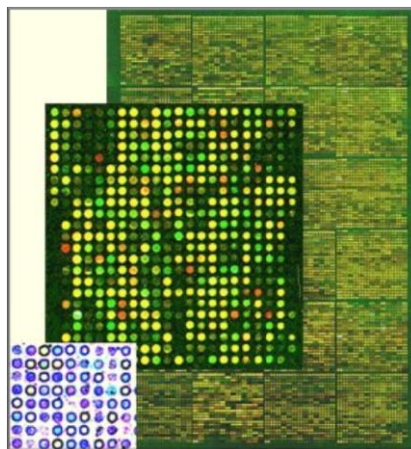


Protein Microarray Technologie



**Arbeitsgruppenpraktikum am
NMI Reutlingen**

Betreuung:

Dr. Thomas Joos

Dr. Oliver Pötz

Protokoll:

Stefan Mogk

Inhaltsverzeichnis

1	Theorie	3
1.1	<i>Festphasenpeptidsynthese</i>	3
1.2	<i>High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)</i>	5
1.3	<i>Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI)</i>	6
1.4	<i>Microarrays</i>	8
2	Projekte	9
2.1	<i>pepART</i>	9
2.2	<i>beta-Catenin</i>	10
3	Experimenteller Teil	13
3.1	<i>Allgemeine Arbeitsvorschriften</i>	13
3.1.1	<i>Kopplung von Peptiden an BSA Beads</i>	13
3.1.2	<i>Antikörper Assay</i>	14
3.2	<i>Ab-Spezifität unter Verwendung kleiner Epitope</i>	14
3.3	<i>Gerontologische Mutationen im beta-Catenin Stoffwechsel</i>	22
4	Literaturverzeichnis	27

1 Theorie

1.1 Festphasenpeptidsynthese

In der Festphasenpeptidchemie ist die wachsende Peptidkette über einen Anker an einer festen, Lösungsmittel-inerten Polystyrol-Matrix kovalent gebunden. Die Kopplung der Aminosäuren erfolgt vom C- zum N-Terminus und damit entgegen der biologischen Syntheserichtung. Zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, sowie zur Erhöhung der Kopplungseffizienz werden in der Peptidchemie vier bis achtfache Überschüsse eingesetzt. Nicht umgesetzte Reagenzien werden aus der Reaktionskammer durch Filtration (Batch-Verfahren) oder durch kontinuierliches Waschen (Durchflussverfahren) entfernt. Nach Abschluss der Synthese wird das Peptid vom Träger abgespalten und gereinigt.

Im Vergleich zur Synthese in flüssiger Phase ergeben sich bei der Festphasensynthese kürzere Syntheszeiten, die Möglichkeit der Automatisierung und der Wegfall aufwendiger Reinigungsschritte. Allerdings können in der mehrstufigen Festphasensynthese vermehrt Nebenreaktionen auftreten. Beim Batch-Verfahren wird die Matrix, an der das Peptid aufgebaut wird, in einem Gefäß mit Lösungsmittel und Reagenzien geschüttelt, um Diffusionskräfte zu überwinden und den Reaktionsablauf zu beschleunigen. Alternativ hierzu ist es möglich, Reagenzien und Lösungsmittel ständig durch eine Säule zu pumpen, die den polymeren Träger enthält. Der polymere Träger selbst muss folgende Voraussetzungen erfüllen: Möglichst chemische Inertheit sowie gute Permeabilität für Lösungsmittel und Reagenzien. Es kommen meist Polystyrol oder Polyacrylamid zum Einsatz. Gängig ist zum Beispiel das Pfropfpolymer TentaGel (PS-PEG), das durch Aufpfropfen von Polyethylenglykol (PEG) als Spacer auf eine Matrix aus Polystyrolkugeln (PS) gewonnen wird. Diese Pfropfpolymeren sind druckstabil und können sowohl im Batch- als auch unter Durchflussverfahren eingesetzt werden. Bezüglich Reaktionsgeschwindigkeit und Mobilität sollte eine PEG-Kette 2000-3000 Dalton wiegen. Dominiert werden die Eigenschaften der Polymere von den Eigenschaften des PEGs und nicht von der PS-Matrix selbst. Hervorzuheben sind die ausgesprochen guten Quelleigenschaften der Pfropfpolymeren wie beinahe Lösungsmittelunabhängigkeit, was die Verwendung von TentaGel-Harzen in fast allen Lösungsmitteln ermöglicht.

Ein bifunktionelles Molekül bildet den Linker zwischen Matrix und Peptid. Er besitzt eine funktionelle Gruppe zur Anknüpfung der Carboxylfunktion der C-terminalen Aminosäure (z.B. Benzylester bei Merrifield) und sollte einer permanenten Schutzgruppe im jeweiligen Syntheschema entsprechen. Der Linker soll nach dem Aufbau der Peptidkette mit einem passenden Reagenz abspaltbar sein; somit hängt die Wahl des Linkers von der Schutzgruppenkombination ab.

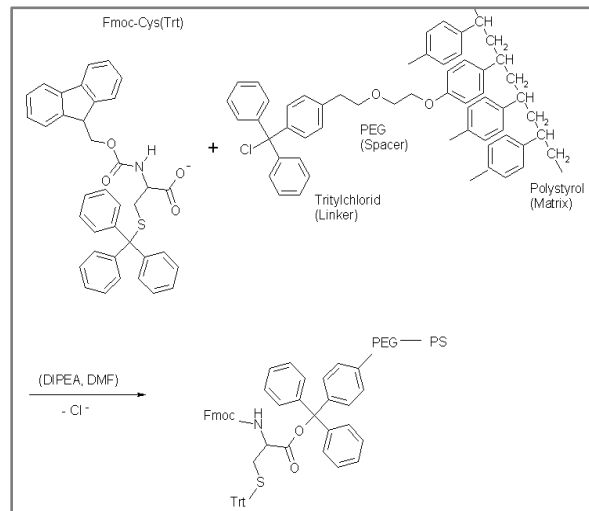


Abbildung 1: Immobilisierung einer AS am Träger

Die Beladung des Trägers, bzw. die Kopplung der Aminosäuren erfolgt in der Regel mit Kopplungsreagenzien wie HBTU, TBTU. BOP wird auf Grund seiner cancerogenen Eigenschaften nicht länger verwendet. Um unerwünschte Nebenreaktionen bei der Kopplung zu vermeiden, werden sowohl die α -Aminofunktion, als auch die Seitenketten geschützt. Als N_α -Schutzgruppen haben sich Derivate der Carbamidsäure vom Urethan-Typ bewährt. Sie sind als temporäre Schutzgruppen unter vergleichsweise milden Bedingungen abspaltbar, und verringern zusätzlich die Polarität der Aminosäuren, wodurch ihre Löslichkeit in organischen Lösemitteln erhöht wird.

Gängige Synthesenstrategien erfolgen mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc), tert.-Butyloxycarbonyl- (Boc) und Benzyl-oxycarbonyl- (Z) Schutzgruppen. Das jeweilige Reaktionsschema bestimmt neben unterschiedlichen Abspaltungsbedingungen auch die Auswahl der permanenten Seitenkettenschutzgruppen. Je nach Strategie erfolgt die Entschützung nach dem Prinzip der Orthogonalität oder der graduierten Labilität. Unter Zusatz von TFA kommt es zu einer Simultanabspaltung aller Seitenkettenschutzgruppen sowie des Peptids vom Träger. Bei Säurespaltung ist darauf zu achten, dass reaktive Carbokationen als Alkylierungsmittel entstehen, weshalb folgende Scavenger zum Einsatz kommen:

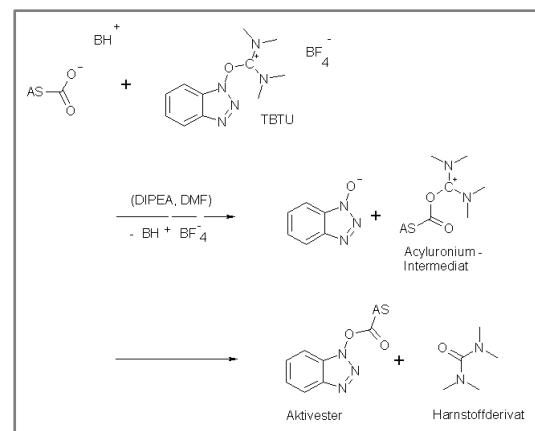


Abbildung 2: Aktivierung einer AS als Aktivester

unterschiedlichen Abspaltungsbedingungen auch die Auswahl der permanenten Seitenkettenschutzgruppen. Je nach Strategie erfolgt die Entschützung nach dem Prinzip der Orthogonalität oder der graduierten Labilität. Unter Zusatz von TFA kommt es zu einer Simultanabspaltung aller Seitenkettenschutzgruppen sowie des Peptids vom Träger. Bei Säurespaltung ist darauf zu achten, dass reaktive Carbokationen als Alkylierungsmittel entstehen, weshalb folgende Scavenger zum Einsatz kommen:

Ethandithiol für Cystein, Thioanisol für Phenylalanin, Phenol für Tyrosin, und Wasser zum Quenchen von Tritylkationen („Reagenz K“).

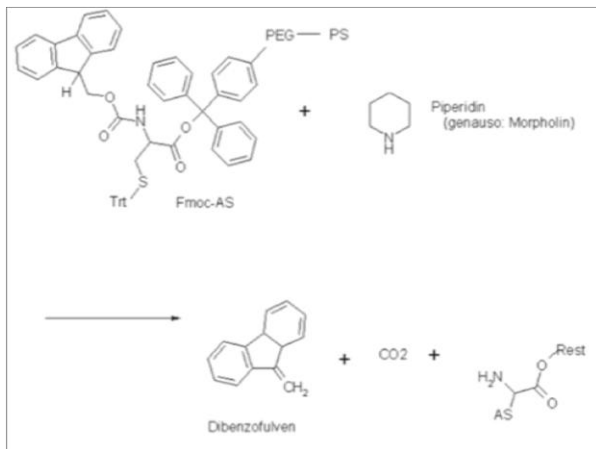


Abbildung 3: Abspaltung der Schutzgruppen

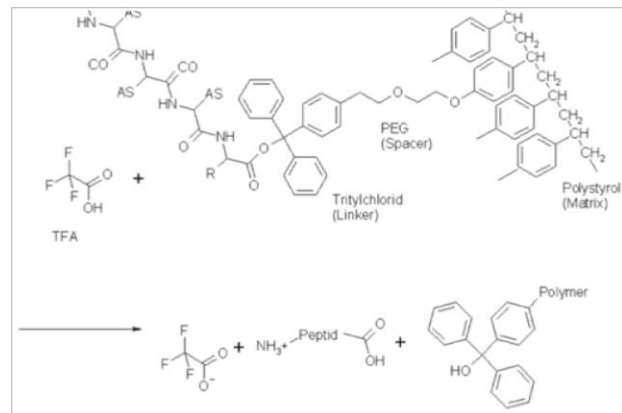


Abbildung 4: Abspaltung vom Harz

1.2 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Die Begriffe FPLC (fast performant) und HPLC benennen in ihrer allgemeinsten Form eine pumpengestützte Chromatographie. Die erhebliche Packungsdichte erlaubt hochaufgelöste Trennungen und bedingen die Durchführung bei hohem Druck. In der Praxis beschreibt FPLC meist eine Molekularsiebchromatographie, während es sich bei HPLC um verteilungschromatographische Verfahren handelt. Bei der HPLC wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem flüssigen Laufmittel, der mobilen Phase (Eluent) durch eine so genannte Trennsäule mit der stationären Phase gepumpt. Üblicherweise geht der Trennsäule eine Vorsäule vorher, die wesentlich billiger als die Trennsäule ist und zur Abhaltung von Verunreinigungen dient. Wechselwirkt ein Bestandteil der zu untersuchenden Substanz stark mit der stationären Phase, so verbleibt er relativ lange in der Säule, andernfalls verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke der Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Retentionszeiten am Ende der Trennsäule, wo sie dann (meist photometrisch) nachgewiesen werden können.

Es werden zwei Methoden unterschieden: Normal Phase (NP) und Reverse Phase (RP). Bei der NP-HPLC wird eine polare stationäre Phase (z.B. Silikagele/Kieselgel) genutzt. Die Stärke der Elutionskraft der mobilen Phase ist im Allgemeinen abhängig von der Polarität. Die verschiedenen Lösungsmittel sind nach steigender Polarität in der eluotropen Reihe angeordnet. Je polarer eine mobile Phase ist, desto schneller wird eine Substanz eluiert. Polare

Moleküle werden auf der Säule länger retardiert als unpolare Moleküle und verlassen deshalb später die Säule.

Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. 70% aller analytischen HPLC-Trennungen sind RP-Trennungen. Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet und die Elutionskraft sinkt mit steigender Polarität. Die stationäre Phase wird hergestellt, indem man die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus langkettigen Kohlenwasserstoffen (oft C-18 Alkane) überzieht und ihre Polarität damit umkehrt. Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser und Acetonitril verwendet. Bei isokratischen Trennungen bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während der gesamten Zeit gleich. Bei Gradiententrennungen wird die Polarität des Fließmittelgemisches während der Analyse verändert.

1.3 Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI)

Der Begriff der Elektrospray Ionisation geht auf Arbeiten von Dole (1968) zurück und wurde durch John B. Fenn ⁽¹⁾ etabliert.

Elektrospray Ionisation ist eine Technik zur Erzeugung von Ionen. Sie gehört zu den Ionisationsverfahren, bei denen die Erzeugung der Ionen unter Atmosphärendruck stattfindet. Sie ist das bevorzugte Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen, da sie schonend für das Analytmolekül ist und kaum zu Fragmentationen führt. Außerdem ist sie auch für die Ionisierung sehr großer Moleküle wie beispielsweise Proteine sehr gut geeignet. Anwendungsgebiete für ESI sind die Bestimmung der Molekülmasse, die Analyse und Sequenzierung von Proteinen und Oligonukleotiden und die quantitative Bestimmung von Arzneimitteln oder Pestiziden.

Bei der Elektrospray Ionisation wird eine Analytlösung durch eine Metallkapillare geleitet an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Durch die Spannung kommt es zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode. Das elektrische Feld durchdringt die Analytlösung und in ihr befindliche Ionen bewegen sich elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu. Dabei bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und über die Bildung eines Taylor-Cone als feines Aerosol (ca. 10 µm Tropfengröße) aus der Kapillare austreten. Ein neutrales Trägergas wie Stickstoff wird häufig benutzt um die Vernebelung der Lösung und die Verdampfung des Lösungsmittels zu unterstützen. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Tropfengröße, während die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfen-Oberfläche zunimmt. Wenn der Radius der Tropfen kleiner als das sog.

Rayleigh-Limit wird, zerfallen die Tropfen wegen der Abstoßung von gleichartigen Ladungen („Coulomb-Explosionen“) in kleinere Tröpfchen.

Für die Bildung freier Ionen in der Gasphase existieren mehrere Modellvorstellungen. Beim Charge Residue Model (CRM, Modell des geladenen Rückstands) geht man davon aus, dass letztlich winzige Tropfen von ca. 1nm Durchmesser übrigbleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten. Nach dem Ion Evaporation Model (IEM, Ionenemissionsmodell) werden bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert.

Die erzeugten Ionen werden durch die Potentialdifferenz zwischen Sprayerkapillare und Orifice in das Massenspektrometer gelenkt. Die Art der Spannung, die an der Kapillare angelegt wird, bestimmt die Ladung der Ionen, die erzeugt werden. Durch eine positive Spannung werden Kationen erzeugt und durch eine negative Spannung Anionen. Bei der Elektrospray-Ionisierung handelt es sich um eine sanfte Methode der Ionenerzeugung, bei der auch empfindliche Moleküle und nicht kovalente Aggregate ionisiert werden können. Typischer Weise werden Quasimolekül-Ionen detektiert ($[M+H]^+$ bei positiver Spannung; $[M-H]^-$ bei negativer Spannung). Ein charakteristisches Phänomen bei der ESI ist die Bildung von Addukt-Ionen mit Bestandteilen des Eluenten oder Puffers ($[M+Na]^+$; $[M+NH_4]^+$). Diese Adduktbildung ist ebenfalls mit Bestandteilen der Probenmatrix möglich. In einer Ionenfalle werden die erzeugten Ionen festgehalten. Die Speicherung der Ionen erfolgt ohne Kontakt zu einer Oberfläche. Es gibt verschiedene Ausführungen der Ionenfalle:

In der Paul-Falle wird ein zeitlich veränderliches elektromagnetisches Feld verwendet um Ionen festzuhalten. Hat dieses Feld die Form eines Quadrupols, wird die Falle auch als Quadrupol-Falle bezeichnet. Das Feld wird in diesem Fall durch drei rotationssymmetrische Elektroden erzeugt: zwei Endkappenelektroden und eine

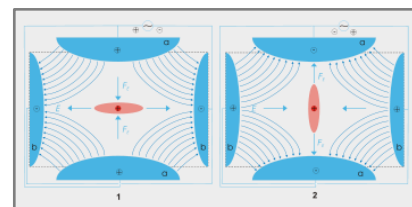


Abbildung 5: Paul-Falle

mittlere Ringelektrode. Zwischen der Ringelektrode und den Endkappenelektroden liegt eine Wechselspannung mit einer Hochfrequenz von meist einem Megahertz an. Während einer Analyse wird die Amplitude der Wechselspannung erhöht. Je nach Ionen-Masse werden die Ionen bei Erreichen unterschiedlicher Amplituden aus der Ionenfalle geschleudert und gelangen zum Detektor.

Daneben existieren auch Flugzeit-Massenspektrometer (TOF, time of flight), die ausnutzen, dass die Ionen beim Eintritt in den Analysator alle die gleiche Energie haben und leichte Ionen deshalb schneller sind als schwere. Als Detektoren eignen sich Photomultiplier (Sekundärelektronenvervielfacher) oder Faraday-Detektoren, bei denen der Ionenstrom auf

einen auf konstantem Potential gehaltenen Metallbecher trifft, was sich als Spannungsabfall an einem hochohmigen Zufluss-Widerstand bemerkbar macht.

1.4 Microarrays

Die Untersuchung von Genexpression oder Protein-Protein-Interaktion erfordert häufig die gleichzeitige Analyse einer Vielzahl von Proben. Erschwerend kommt hinzu, dass oft nur eine sehr geringe Menge des Probenmaterials zur Verfügung steht. Mit der Entwicklung von parallelisierten und miniaturisierten Nachweisverfahren auf der Basis von sogenannten Microarrays oder Biochips wird diesen Anforderungen Rechnung getragen.

Seit Ende der 90er Jahre finden DNA Microarrays breite Anwendung in der Genomanalyse und bei der Untersuchung differentieller Genexpression. Sie ermöglichen den Nachweis von RNA Transkripten über ihre spezifische Bindung an komplementäre Nukleinsäuren. Aus dem zu untersuchenden Objekt extrahierte RNA wird hierzu mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die cDNA Fragmente können an ssDNA-Sonden hybridisieren, die an definierten Rasterpositionen eines Glaträgers aufgebracht wurden. Nach dem Abwaschen von nicht gebundenen Nukleinsäuren wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des Microarrays mittels eines Laser ausgelesen.

DNA Microarrays werden heute routinemäßig zur Erforschung der transkriptionellen Expression eingesetzt. Tatsächlich werden zelluläre Funktionen aber von den Translationsprodukten, namentlich den Proteinen, ausgeübt. Es existiert keine direkte Korrelation zwischen mRNA-Expression und Proteinaktivität: Posttranslationale Modifikation, Interkonversion, spezifische Proteininteraktion, sowie unterschiedliche Lokalisation von Proteinen in bestimmten Zellkompartimenten beeinflussen den Proteinstatus weit über das auf RNA Ebene detektierbare Maß hinaus. Aus diesem Grund muss der Erforschung des Genoms nun die Untersuchung des Proteoms folgen.

Neben etablierten Methoden wie ELISA werden Biochips zur qualitativen und quantitativen Erfassung vieler Proteine in geringen Probenvolumina eingesetzt. Hierzu enthalten Protein Microarrays ebenso wie ihre DNA Pendant eine Vielzahl von Testfeldern auf kleinstem Raum. Mit Hilfe eines Spotters werden geringe Proteinmengen auf dem Trägermaterial immobilisiert.

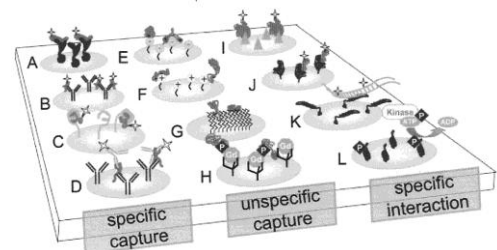


Abbildung 6: Capture-Wechselwirkungen ⁽³⁾
(aus Templin et al, Proteomics 2003)

Auf den Array kann nun entweder gereinigtes Protein oder ein Proteinmix (Zelllysat) aufgebracht werden. Jene Spots, in denen keine Interaktion stattfindet, bleiben nach einem angeschlossenen Waschschrift unbeladen. Die Detektion (z.B. mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern) erlaubt eine Unterscheidung zwischen Spots mit und ohne Proteininteraktion.

Im Gegensatz zu planaren Microarrays kommen Bead-gekoppelte Methoden ohne technisch aufwendiges Spotten unter Reinraumbedingungen aus. Hierzu stehen bei gängigen Systemen (Luminex) bis zu hundert, durch zweidimensionale Fluoreszenzmarkierungen unterscheidbare Bead-Typen zur Verfügung, an die Peptide oder Proteine gekoppelt werden können. Die Inkubation der beladenen Beads mit den zu untersuchenden Proben erfolgt im Batch-Verfahren. Nach einem Reinigungsschritt werden Bead-Typ und Proteininteraktion automatisiert ausgelesen. Je nach Fragestellung lassen sich Antigene oder Antikörper an die Beads koppeln, um auf diese Weise Sandwich-Anordnungen oder Co-Immünpräzipitationen zu realisieren. Die Detektion selbst erfolgt photometrisch mit sekundären Phytoerythrin (PE)-gekoppelten spezifischen Antikörpern. Analog hierzu können Immunoglobulin-Protein A oder Avidin-Biotin Systeme eingesetzt werden.

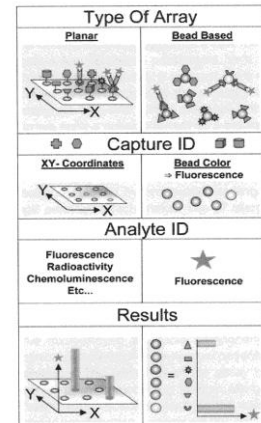


Abbildung 7: Bead-gekoppelte Assays⁽³⁾

2 Projekte

2.1 pepART

Sowohl in wissenschaftlichen, als auch im klinischen Screeningverfahren, werden immer höhere Anforderungen an die Protein Microarray Technologie gestellt. Mit geringen Probenvolumina soll eine Vielzahl von Zielmolekülen zuverlässig detektiert werden. Da für jedes nachzuweisende Zielmolekül aber ein spezifisch bindendes Capture-Molekül benötigt wird, besteht ein ständig wachsender Bedarf an Antikörpern. Eine wesentliche Vereinfachung stellt die Entwicklung des pepART Projektes dar, der peptidbasierenden Proteomanalyse mittels Array-Technologie: Durch den enzymatischen Abbau aller Proteine einer Probenlösung bildet das entstehende Gemisch aus Peptidfragmenten einen charakteristischen

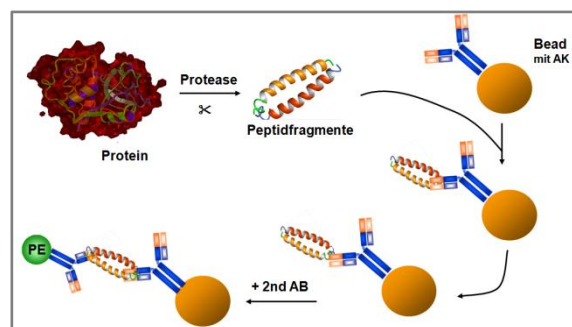


Abbildung 8: pepART

Fingerabdruck der ursprünglich enthaltenen Proteine.

Das Verfahren erlaubt eine drastische Reduktion der Detektionsantikörper, die gegen vergleichsweise wenige Peptidfragmente gerichtet sein müssen. Welche Peptidfragmente für den Nachweis eines Fingerabdrucks erkannt werden müssen, lässt sich vorab durch einen proteolytischen Verdau *in silico* ermitteln. Zur Generierung von Antikörpern können dann synthetisch hergestellte Peptidfragmente aus einigen wenigen Aminosäurebausteinen benutzt werden.

Zur Weiterentwicklung von pepART werden nun Versuche unternommen, die Zahl der benötigten Antikörper weiter einzugrenzen. Dies wird naturgemäß nur über die Verkleinerung der Epitope möglich sein, da die Anzahl der Aminosäurebausteine eines Epitops die benötigten Antikörper exponentiell erhöht. Andererseits dürfen Genauigkeit und Robustheit der Messergebnisse nicht beeinträchtigt werden. Dieses Problem könnte über die Detektion zweier Epitope pro Peptidfragment gelöst werden. Während ein Antikörper die Peptide N-terminal an ein Bead bindet, kann ein zweiter Antikörper C-terminal angreifen und damit selbst als Antigen für den fluoreszenzmarkierten Antikörper dienen. Die Epitope beider Termini können theoretisch auf drei oder vier Aminosäurebausteine begrenzt werden. Der Nachweis wird dabei erst durch die Kombination der eigentlich zu kleinen Epitope ausreichend sicher. Auch hier lassen sich die benötigten Antikörper durch Proteolyse *in silico* voraussagen. Fraglich erscheint momentan, ob ein vier Aminosäuren großes Epitop ausreichend spezifische Antikörper generiert, wie affin diese Antikörper an „falsche“ Epitope mit einer randomisierten Aminosäure binden, und welchen Beitrag einzelne Aminosäure-Reste zur Affinität leisten.

2.2 beta-Catenin

Abhängig von seiner Lokalisation erfüllt Beta-Catenin unterschiedliche Funktionen innerhalb einer Zelle.

Einerseits ist es an der Ausbildung von Zell-Zellverbindungen, wie den Zonula adhaerentes und Puncta adhaerentes, beteiligt. Hier wirkt es als Verbindung zwischen den Zelladhäsionsproteinen (Cadherinen) und dem Zytoskelett: Epitheliale (E) oder neuronale (N)-Cadherine in der Plasmamembran werden über ihre cytoplasmatische Catenin-

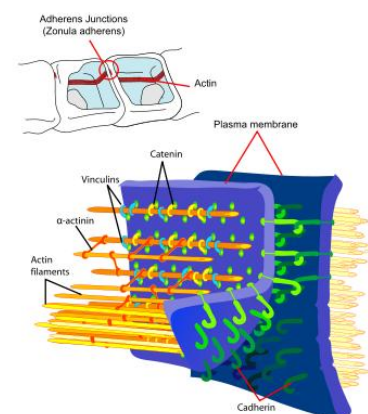


Abbildung 9: Zell-Zell-Verbindung

bindende Domäne an beta-Catenin gebunden. Beta-Catenin wiederum liegt als Heterodimer mit alpha-Catenin vor, welches mit dem Aktinnetzwerk verknüpft ist.

Andererseits kann eine hohe cytoplasmatische beta-Catenin Konzentration auch zu seiner Translokation in den Zellkern führen. Dort bewirkt es als Teil eines Transkriptionsfaktors die Expression einer Reihe von Zielgenen, die für die Zellteilung verantwortlich sind. Hierzu gehören beispielsweise c-myc, cyclin D1, sowie einige Metalloproteasen. Dieser Vorgang ist essentiell für die normale Embryonalentwicklung und wird bei bestimmten Krebsformen beobachtet.

Im gesunden, adulten Organismus wird daher die zelluläre beta-Catenin Konzentration durch kontinuierlichen proteolytischen Abbau begrenzt. Ein Multiprotein-Komplex aus Adenomatous polyposis of the Colon (APC), Axin, Caseinkinase und Glycogensynthase-Kinase sorgt dabei für die mehrfache Phosphorylierung des beta-Catenins, welches hierdurch für die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation freigegeben wird.

Mutationen in APC oder im Phosphorylierungsbereich von beta-Catenin können nun dazu führen, dass dessen Abbau nicht mehr möglich ist. Das hat eine pathologische Expression der genannten Zielgene zur Folge. Dies initiiert wahrscheinlich die Zelltransformation und führt zur Bildung von Melanomen, hepatozellulären Karzinomen, Medulloblastomen, Prostata- und Ovarialkarzinomen, sowie Nephroblastomen bzw. Wilms-Tumoren. Fraglich ist, ob solche Mutationen während des Alterungsprozesses gehäuft auftreten, und die resultierende erhöhte beta-Catenin Konzentration damit die Grundlage für die Entstehung maligner Krebserkrankungen bildet.

Physiologisch wird der Abbau des beta-Catenins im Rahmen der Embryonalentwicklung inhibiert. Dieser Stoffwechselweg wird durch lokale Mediatoren (Wnt-Liganden) vermittelt: Wnt setzt sich zusammen aus „wingless“ und „Int-1“. Beobachtungen mit *Drosophila melanogaster* zeigten, dass Mutationen im wingless-Gen zu einer flügellosen Variante der Fliegen führen. Das Int-1 Gen fördert bei Mäusen unter bestimmten Umständen die Entwicklung von Mamma-Karzinomen.

Es gibt ca. 20 humane Wnt-Gene, die für sekretorische Glykoproteine codieren. Ihre Aufgabe ist die Regulation des Zellwachstums, der Motilität und Differenzierung während der

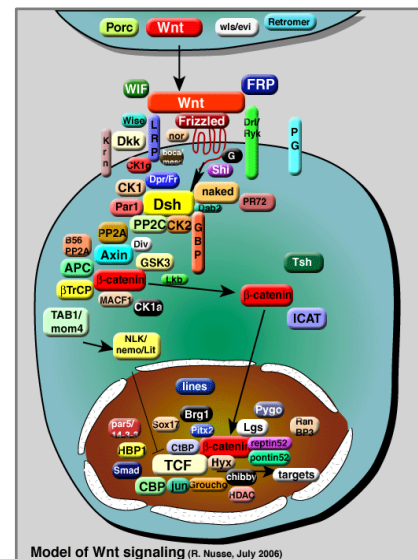


Abbildung 10: Wnt-Signalweg

Embryogenese. Wnt Faktoren binden hierzu an den G-Protein-gekoppelten Sieben-Transmembran-Rezeptor frizzled, der im Zusammenspiel mit LDL-related Protein und einer Reihe von Cofaktoren aktiviert wird. Das Signal wird intrazellulär von einem Protein namens disheveled transduziert und führt zur Inhibition des Proteinkomplexes, der für die Phosphorylierung von beta-Catenin zuständig ist. Folglich kommt es zu einer cytosolischen Akkumulation von beta-Catenin, welches in den Zellkern translokalisiert wird und dort an einen Transkriptionsfaktor der t-cell factor/lymphocyte enhancer factor Familie bindet.

3 Experimenteller Teil

3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

3.1.1 Kopplung von Peptiden an BSA Beads

Material:

TCEP	300 μM Tris (2-carboxyethyl) phosphin Hydrochlorid 13.4 mg in 1.5 ml PBS vorlösen dann 1:100 in PBS verdünnen
S-SMPB	1.6 mM Sulfosuccinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)-butyrat 5.3 mg in 350 μ l DMSO vorlösen dann mit 6.7 ml PBS verdünnen
Peptide	1 mM Lösung der zu koppelnden Peptide in 50% Acetonitril / PBS

Ablauf:

- Je 400'000 Beads werden in Eppendorf-Cups mit Filtereinsatz vorgelegt und mit 150 μ l S-SMPB im Schüttler (750 rpm, 30 Minuten) inkubiert.
- Die Filtereinsätze werden in der Tischzentrifuge kurz getrocknet und zweimal mit 200 μ l PBS gewaschen.
- In einem Eppendorf-Cup werden 50 μ l Peptidlösung mit 100 μ l TCEP versetzt und 10 Minuten geschüttelt.
- Die Peptidlösung wird in die Filtereinsätze mit den Beads überführt und 2 Stunden geschüttelt.
- Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Beads in 100 μ l Roche Puffer (ggf. mit 0.1% Natriumazid) aufgenommen und in neue Eppendorf-Cups transferiert. Verbleibende Beads in den Filtereinsätze werden erneut mit 100 μ l Roche aufgeschüttelt und transferiert.
- Die gekoppelten Beads können nun in einer 1:400 Verdünnung gezählt werden (100 μ l/well, sample volume=50 μ l, timeout=80s, count=10000 total beads)

3.1.2 Antikörper Assay

Material:

AK 1	Erster Detektionsantikörper z.B. rabbit anti-Peptid (Tierserum) oder mouse anti-c myc
AK 2	Zweiter Detektionsantikörper z.B. donkey anti-rabbit PE 2.5 µg/ml oder goat anti-mouse PE 2.5 µg/ml

Ablauf:

- Eine Mikrotiterplatte mit Filter wird mit 100µl Roche Puffer benetzt und abgesaugt, um unspezifische Bindung an die Membran zu blocken.
- Je 1000 Beads pro Sorte werden in insgesamt 10µl Roche Puffer in ein Well pipettiert. 40µl Tierserum oder Kontroll-Antikörper werden in 5'000- bis 100'000-facher Verdünnung zugegeben. Inkubation bei Raumtemperatur und 650rpm für 1 Stunde.
- Die Mikrotiterplatte wird abgesaugt und zwei Mal mit 100µl PBS gewaschen.
- Pro Well werden 25µl AK 2 aufgetragen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur und 650rpm inkubiert.
- Die Mikrotiterplatte wird abgesaugt und erneut zwei Mal mit 100µl PBS gewaschen.
- Pro Well werden 100µl Roche Puffer hinzugefügt. Nun können Beads und Beladung gemessen werden (sample volume=80µl, timeout=45s, count=100 beads/type)

3.2 Ab-Spezifität unter Verwendung kleiner Epitope

Um zu ermitteln, wie zuverlässig Messungen im Rahmen einer erweiterten pepART Diagnostik mit Epitopen aus nur vier Aminosäurebausteinen durchzuführen sind, wurden Hasen mit ausgewählten Peptidfragmenten immunisiert (True Tryptic Fragments TTF1-TTF4, True LysC Fragment TLCF).

Anschließend wurde die Affinität der gebildeten Antikörper getestet, und zwar sowohl gegen die ursprünglichen Peptidfragmente, als auch gegen synthetisierte Fragmentlibraries, bei denen jeweils eine Aminosäure randomisiert wurde.

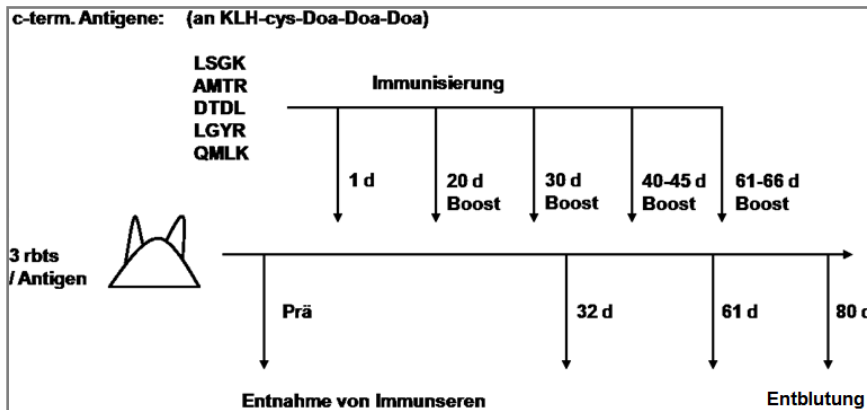


Abbildung 11: Immunisierungsprotokoll

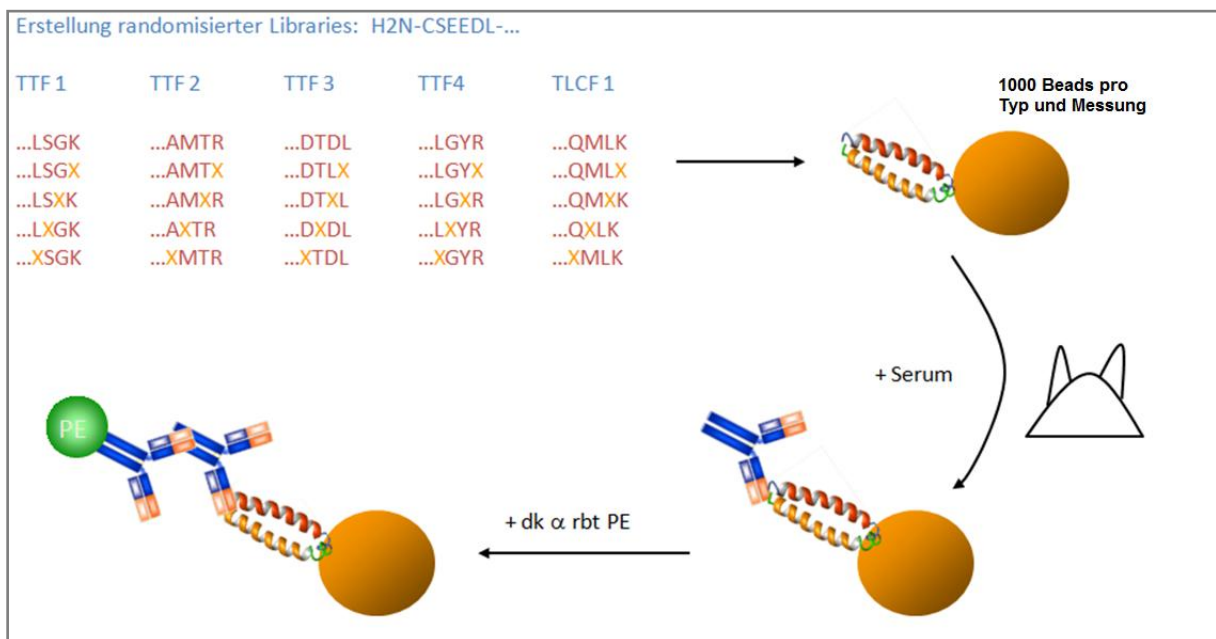


Abbildung 12: Durchführung der Messungen (schematisch)

Die Fluoreszenzwerte wurden auf die Ergebnisse des Immunogens normiert und in Prozent angegeben.

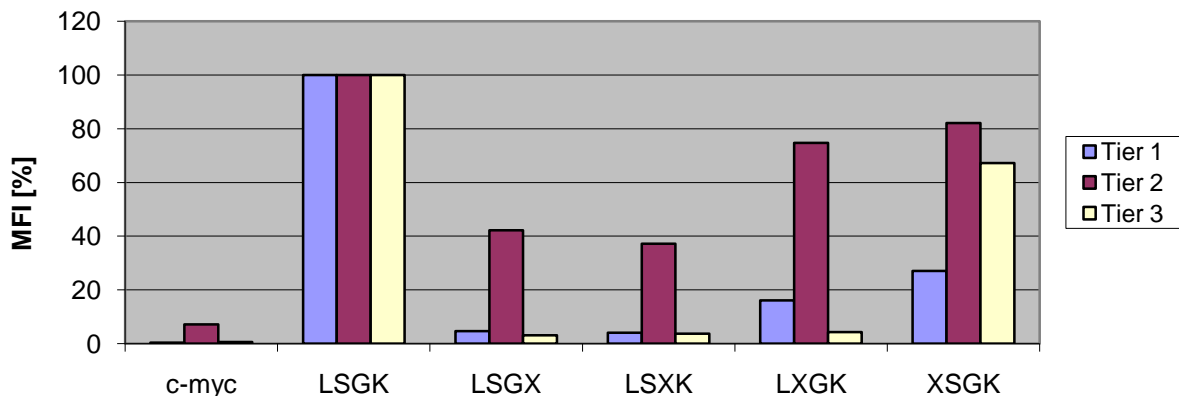


Abbildung 13: Antikörper Assay mit Serum des 32. Immunisierungstages (1:100000), TTF1

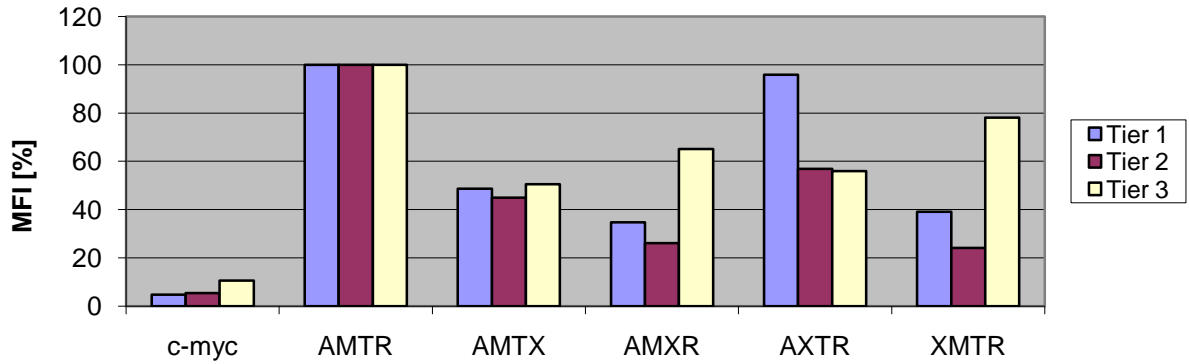


Abbildung 14: Antikörper Assay mit Serum des 32. Immunisierungstages (1:100000), TTF2

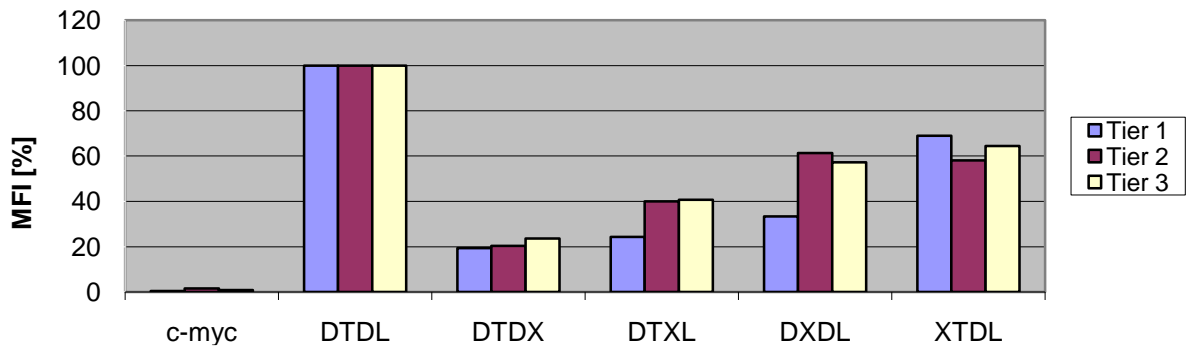


Abbildung 15: Antikörper Assay mit Serum des 32. Immunisierungstages (1:100000), TTF3

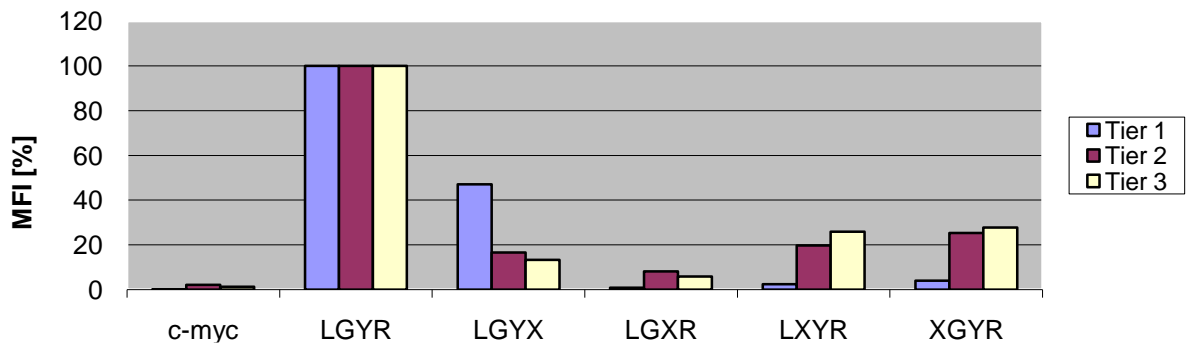


Abbildung 16: Antikörper Assay mit Serum des 32. Immunisierungstages (1:100000), TTF4

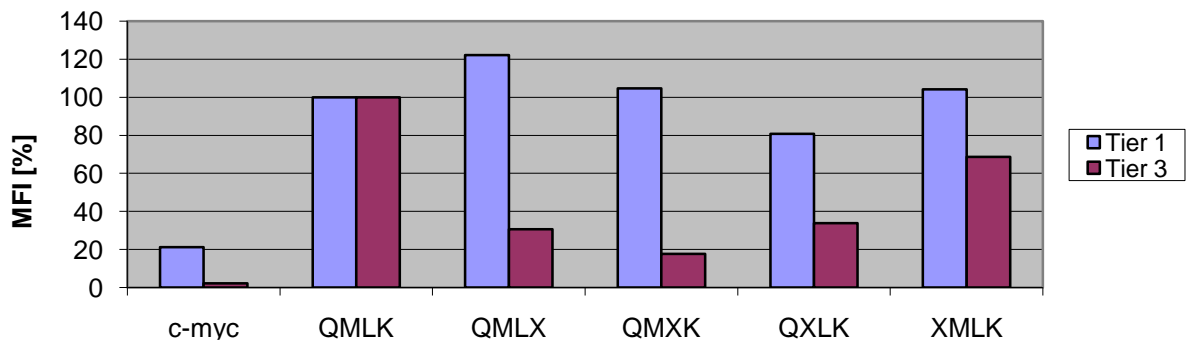


Abbildung 17: Antikörper Assay mit Serum des 32. Immunisierungstages (1:100000), TLCF

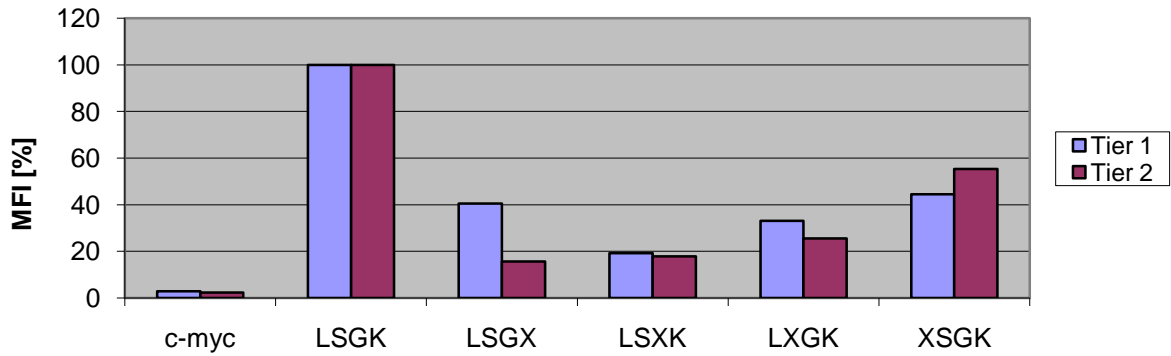


Abbildung 18: Antikörper Assay mit Serum des 61. Immunisierungstages (1:100000), TTF1

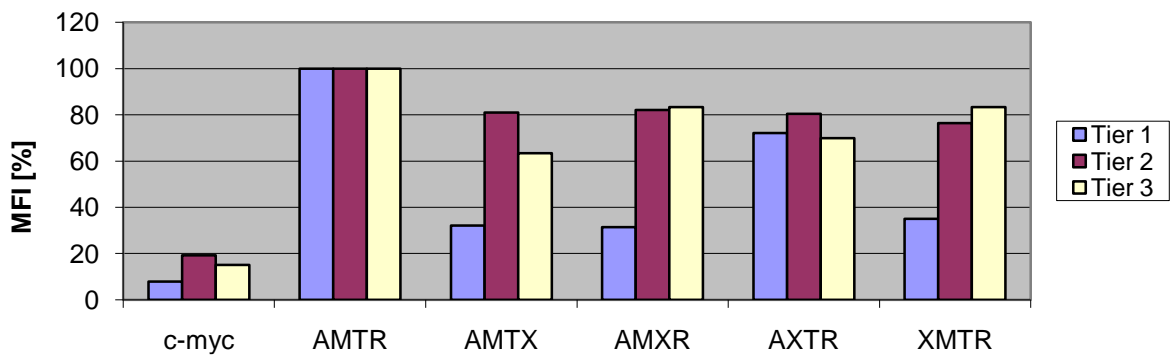


Abbildung 19: Antikörper Assay mit Serum des 61. Immunisierungstages (1:100000), TTF2

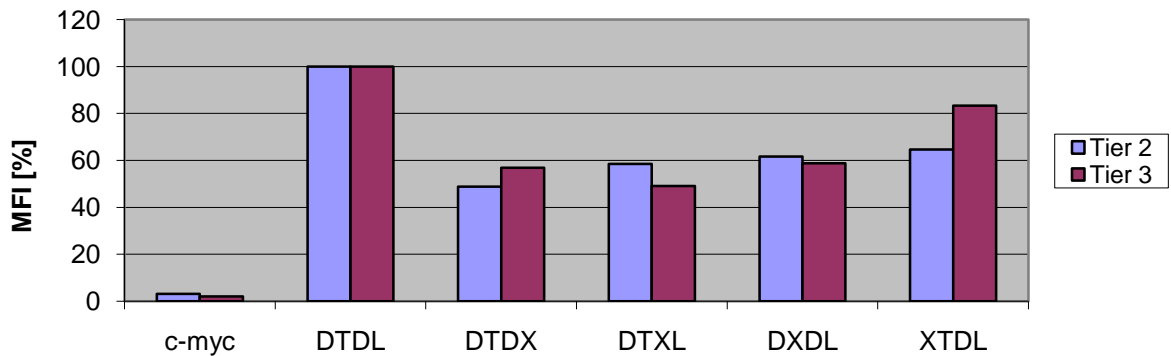


Abbildung 20: Antikörper Assay mit Serum des 61. Immunisierungstages (1:100000), TTF3

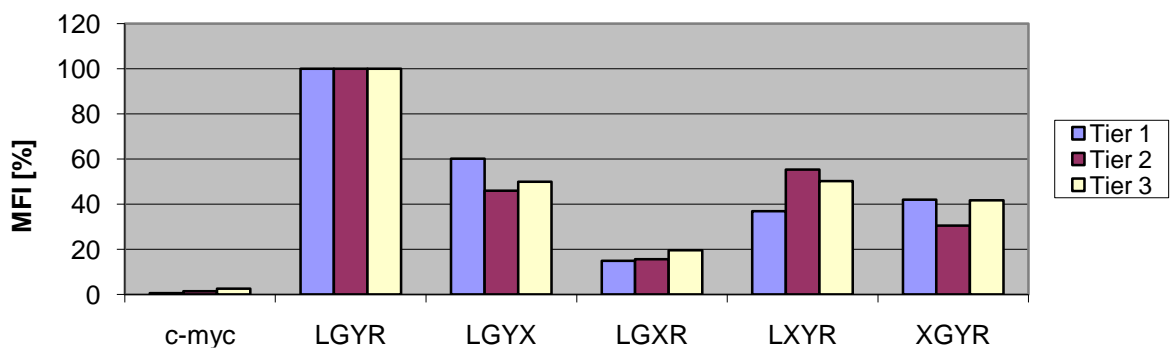


Abbildung 21: Antikörper Assay mit Serum des 61. Immunisierungstages (1:100000), TTF4

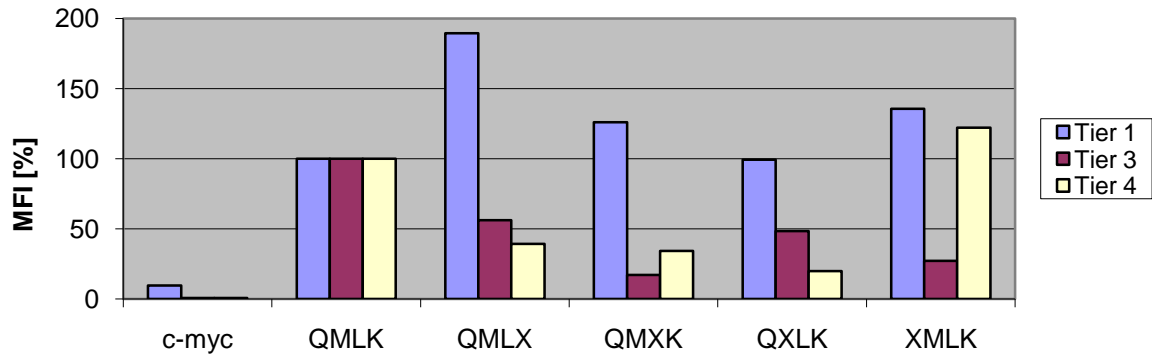


Abbildung 22: Antikörper Assay mit Serum des 61. Immunisierungstages (1:100000), T1CF

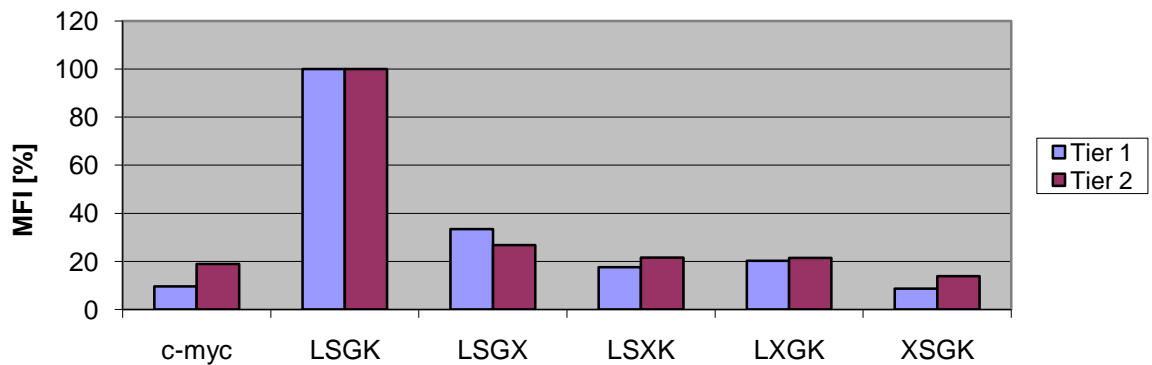


Abbildung 23: Antikörper Assay mit Serum des 80. Immunisierungstages (1:100000), TTF1

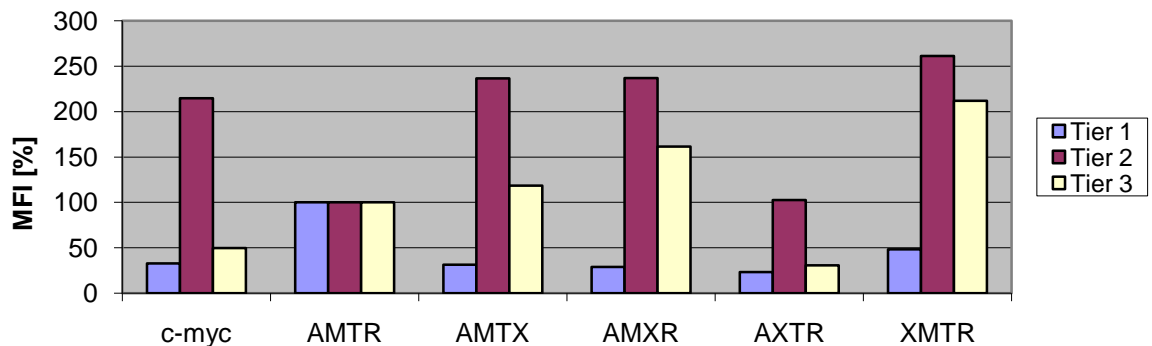


Abbildung 24: Antikörper Assay mit Serum des 80. Immunisierungstages (1:100000), TTF2

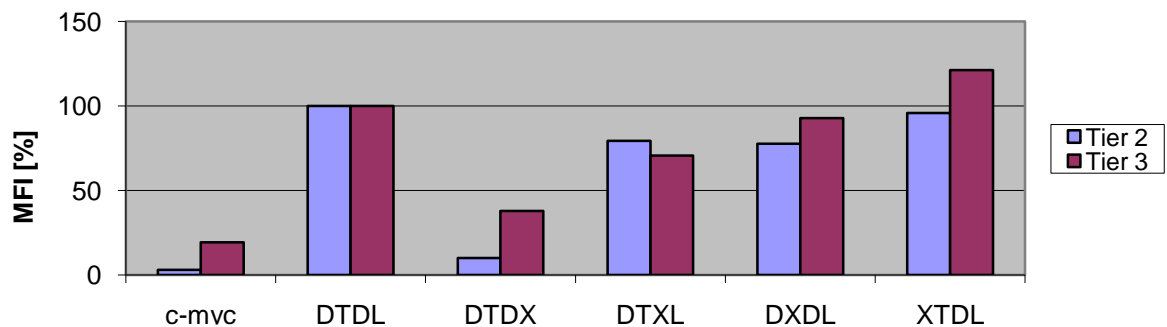


Abbildung 25: Antikörper Assay mit Serum des 80. Immunisierungstages (1:100000), TTF3

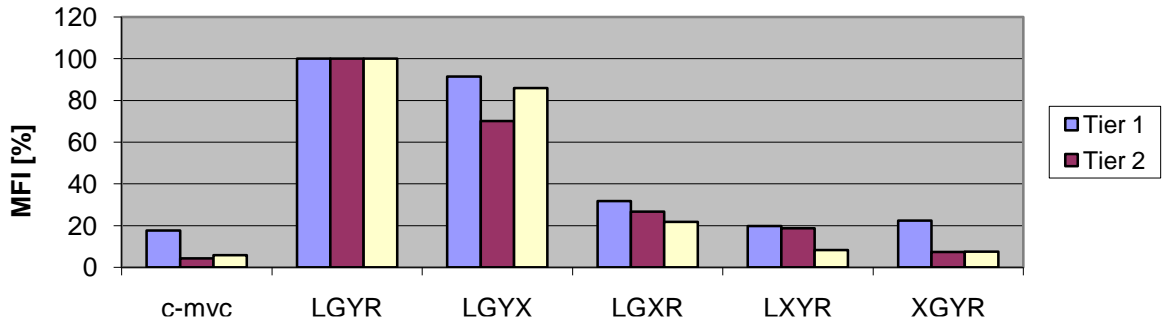


Abbildung 26: Antikörper Assay mit Serum des 80. Immunisierungstages (1:100000), TTF4

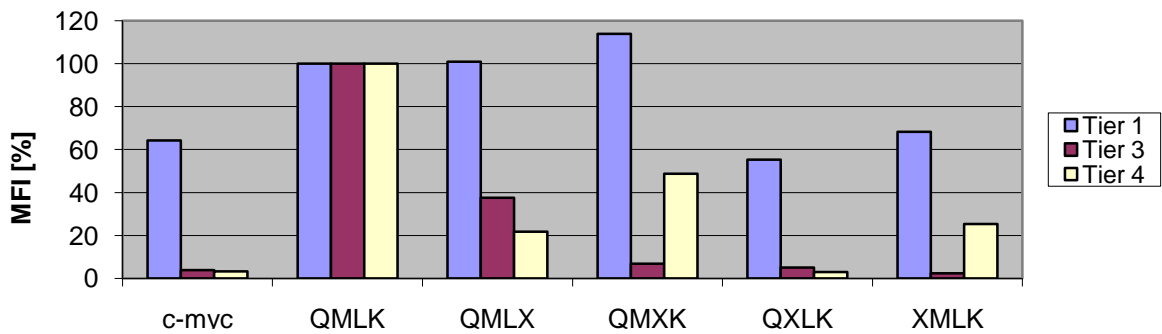


Abbildung 27: Antikörper Assay mit Serum des 80. Immunisierungstages (1:100000), TLCF

Abbildung 28 verdeutlicht, welche Aminosäuren für die Antikörperbindung besonders wichtig sind. Eine groß geschriebene Aminosäure bedeutet dabei, dass sie als Strukturmerkmal des Epitops benötigt wird. Wird sie ausgetauscht, nimmt die prozentuale Erkennung durch die Antikörperseren entsprechend ab.

	32. Immunisierungstag	61. Immunisierungstag
TTF1	LSGK	LSGK
TTF2	A _M TR	A _M TR
TTF3	D _T DL	D _T DL
TTF4	LG _Y R	LG _Y R
TLCF	o _{ML} K	o _{ML} K

Abbildung 28: Einfluss einzelner AS-Positionen auf die Antikörper-Antigen-Bindung

Um den chronologischen Ablauf der Immunreaktion anschaulicher zu gestalten, wurden die Proben eines Versuchstieres über alle Immunisierungstage vermessen und zusammengestellt:

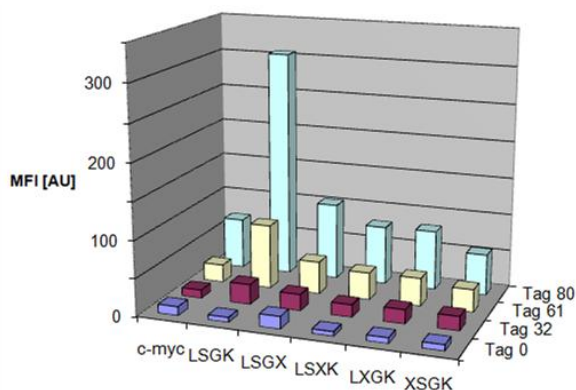


Abbildung 29: Beobachtung eines Tieres über alle Immunisierungstage TTF1

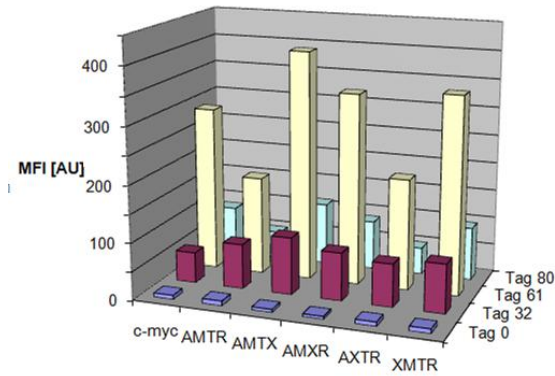


Abbildung 30: Ein Tier, alle Tage, TTF2

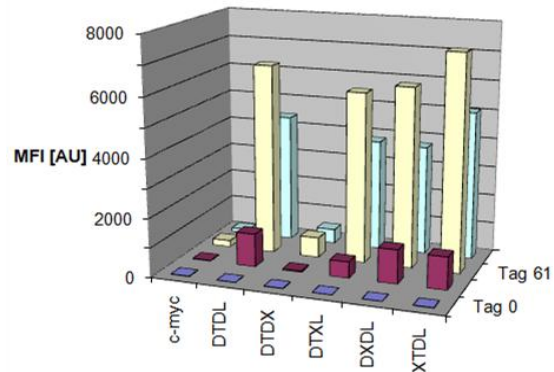


Abbildung 31: Ein Tier, alle Tage, TTF3

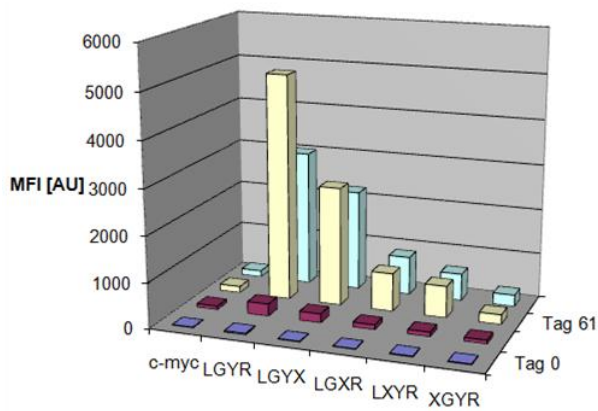


Abbildung 32: Ein Tier, alle Tage, TTF4

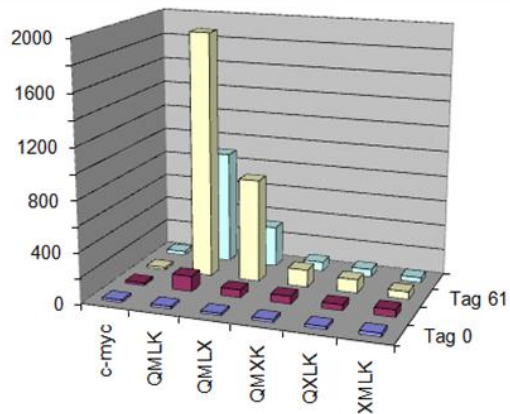


Abbildung 33: Ein Tier, alle Tage, TFCF

Die Seren der mit TTF1 (LSGK) immunisierten Tiere zeigen am 32. Tag (Abbildungen 13 und 28) eine besonders hohe Affinität zu den C-terminalen Aminosäuren Lysin und Glycin. Deren Substitution führt zum nahezu vollständigen Verlust der Antigenerkennung (Tiere 1 und 3) oder einer Abschwächung der Affinität um ca. 60 % (Tier 2). Das unter physiologischen Bedingungen kationische Lysin und das kleine Glycin sind erwartungsgemäß als Strukturmerkmale des Epitops von besonderer Bedeutung. Die Substitution des polaren Serin führt ebenfalls zu einer sehr geringen Affinität von weniger als 10 % (Tier 3), <20 % (Tier 1) und <80% (Tier 2). Hier scheint die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Serin-Hydroxylgruppe stabilisierend auf den Antikörper-Antigen-Komplex zu wirken. Interessant ist die unterschiedliche Empfindlichkeit der Tierseren auf Substitutionen einzelner Aminosäuren: Tier 2 zeigt auch bei randomisierten, strukturell wichtigen Aminosäuren noch beträchtliche Affinitäten.

Am 61. Tag (Abbildung 18) zeigt sich Tierserum 2 deutlich empfindlicher gegen den Austausch einzelner Aminosäuren mit Affinitäten unter 20%. Die Antikörper werden in Folge der wiederholten Immunisierung (dritter Boost an Tag 40-45) zunehmend spezifischer.

Gleichzeitig erhöht sich auch der Einfluss des N-terminalen Leucins auf die Affinität. Dieser Trend hält bis zum 80. Tag (Abbildung 23) an. Tatsächlich ist Leucin dann die strukturell bedeutendste Aminosäure des Epitops. Die Antikörpertiter gegen TTF1 steigt bis zum 80.Tag kontinuierlich an (Abbildung 29).

TTF2 (AMTR) induziert bis zum 32. Immunisierungstag (Abbildungen 14 und 28) die Bildung von Antikörpern mit hoher Affinität gegen Alanin und Threonin. Die beiden Aminosäuren liegen nicht unmittelbar nebeneinander. Zudem wird das Epitop zu diesem Zeitpunkt noch nicht von dem basischen Arginin dominiert. Am 61. Tag (Abbildung 19) stellt Arginin dann jedoch die wichtigste Seitenkette des Epitops bereit. Die höchsten Affinitäten werden am 61. Tag erreicht, mit zunehmender Versuchsdauer werden diese wieder geringer (Abbildung 30). Tiere 2 und 3 zeigen am 80. Tag (Abbildung 24) eine hohe Kreuzreaktivität gegen c-myc und die randomisierten Libraries (auch Abbildung 30).

Am 32. Immunisierungstag sind für TTF3 (DTDL, Abbildungen 15 und 28) besonders die C-terminalen Aminosäuren Leucin und Aspartat von großer Bedeutung. Ihre Substitution führt in allen Tieren zu einer reduzierten Affinität von ca. 20% (für Leu) und 20-40% (für Asp). Ein Austausch der anderen Aminosäuren senkt die Affinität immerhin noch auf 60%. Am 61.Tag (Abbildung 20) scheint Leucin seine Eigenschaft als wichtigstes Strukturmerkmal zu verlieren. Seine Randomisierung liefert dann wieder 50% Bindung bei beiden verbleibenden Tieren. Dieser Wert erscheint allerdings zweifelhaft, da Messungen am 80. Tag (Abbildung 25) Leucin weiterhin als wichtigste Aminosäure des Epitops zeigen. Der direkte Vergleich über alle Versuchstage mit Tierserum 1 (Abbildung 31) zeigt sehr deutlich, dass Leucin nahezu als einzige Aminosäure für die Bindung erforderlich ist. Der höchste Antikörpertiter wird am 61. Tag erreicht.

Alle Aminosäurereste von TTF4 (LGYR) leisten am 32. Immunisierungstag (Abbildungen 16 und 28) einen hohen Beitrag zur Antikörper-Antigen-Bindung. Tierserum 1 weist eine besonders hohe Affinität zu Leucin, Glycin und Tyrosin auf. Damit entspricht es bereits früh dem Ergebnis, das bis zum 80.Tag von allen Seren erreicht wird. Am 61. Tag (Abbildung 21) dominieren Leucin und das aromatische Tyrosin, langfristig (Abbildung 26) sind alle drei N-terminalen Aminosäuren (Leu-Gly-Tyr) von vergleichbarer Bedeutung. Das basische Arginin wird zunehmend unwichtiger für gute Antigenbindung (Abbildungen 16, 21, 26). Insgesamt wird der höchste Antikörpertiter am 62. Tag erreicht (Abbildung 32).

Die Messungen mit TLCF (QMLK) zeigen teilweise hohe Kreuzreaktivitäten gegen c-myc oder randomisierte Peptide (Abbildungen 17, 22 und 27, Tier 1). Am 32. Tag (Abbildung 17) liefert Tier 3 die höchsten Affinitäten für Methionin, Leucin und Lysin. Bis zum 80.Tag

(Abbildung 27) verschiebt sich die Gewichtung hin zu Glutamin, Methionin und Leucin. Lysin gehört trotz seiner Ladung nicht mehr zu den wichtigsten Aminosäuren des Epitops. Dieses Ergebnis wird auch in der Messung eines Tieres über alle Tage deutlich (Abb. 33).

Tatsächlich scheinen Peptide mit einer Epitopgröße von drei Aminosäuren (TTF4 und TLCF) auszureichen, um Antikörper mit hoher Spezifität zu generieren. Bei TTF3 war sogar nur eine einzelne Aminosäure für die Antikörperbindung entscheidend.

Alle bisherigen Messungen wurden mit ungereinigten Tierseren durchgeführt. Es sind also polyklonale Antikörper enthalten, die sich sowohl in Bindungsaffinität, als auch in Konzentration unterscheiden. Insofern stellen die hier dargestellten Ergebnisse additive Effekte der enthaltenen Antikörperspezies dar. Im weiteren Verlauf wird sowohl eine chromatographische Aufreinigung (FPLC), als auch die Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Hybridomazellen angestrebt. Damit sind detaillierte Erkenntnisse zu erwarten über die Spezifität eines definierten Antikörpers gegen randomisierte Antigenlibraries.

3.3 Gerontologische Mutationen im beta-Catenin Stoffwechsel

In der Abwesenheit von Wnt-Liganden bilden APC, Axin, Caseinkinase und Glykogensynthase-Kinase einen Proteinkomplex, welcher beta-Catenin mehrfach phosphoryliert und damit dessen Abbau einleitet. Wenn nun eine Mutation in APC entsteht, die die Affinität zu beta-Catenin herabsetzt, oder die Phosphorylierungsstellen in beta-Catenin selbst verändert werden, akkumuliert beta-Catenin im Zytoplasma, als ob der Wnt-Signalweg aktiviert wäre. Dies führt dazu, dass beta-Catenin in den Zellkern wandert und Wnt-Zielproteine wie c-myc exprimiert werden. Die Zelle proliferiert unkontrolliert und entartet. Insofern kann ein unkontrollierter Anstieg der beta-Catenin Konzentration in adulten Zellen mindestens als Risikofaktor für eine Kanzerogenese angesehen werden.

Hier sollte untersucht werden, inwieweit die hepatozelluläre beta-Catenin Konzentration dem Alterungsprozess unterliegt. Jeweils fünf Mäuse im Alter von zehn Wochen, fünf Monaten und zwölf Monaten wurden immunologisch auf beta-Catenin, sowie mittels Co-Immunpräzipitation auf N-Cadherin-beta-Catenin und E-Cadherin-beta-Catenin untersucht. Cadherine spielen als Adhäsionsproteine der Zell-Zellkontakte (Desmosomen) insofern eine wichtige Rolle in kanzerösen Prozessen, als sich ihre Präsenz mit zunehmender Malignität eines Tumors verändert. Auf diese Weise können sich entartete Krebszellen aus dem Zellverband lösen und metastasieren.

Es wurden sowohl Wildtyp-Mäuse, als auch Ku80-defiziente Mäuse untersucht. Ku80 unterstützt die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen. Es wurde vermutet, dass die Knock-Out Variante für Mutationen der Proteine des Wnt-Stoffwechsels anfälliger ist. Dann wäre es denkbar, dass die beta-Catenin Konzentration in Ku80-defizienten Tieren früher und stärker ansteigt, als in der Wildtyp Population. Allerdings war bei keinem der Tiere histologisch eine Tumormanifestation nachzuweisen. Es handelt sich ausdrücklich um die Untersuchung der altersabhängigen beta-Catenin Konzentration an gesunden Tieren.

Abbildung 34 bis Abbildung 38 stellen die beta-Catenin und Cadherin Konzentrationen der untersuchten Populationen als Box-Whisker-Plots dar. Eine durch zwei Quartile bestimmte Box umfasst dabei 50% der Daten. Die Länge der Box (der Interquartilsabstand) ist ein Maß der Streuung. Der in die Box eingezeichnete Median vermittelt durch seine Lage innerhalb der Box einen Eindruck der „Schiefe“ der Daten. Die beiden Extremwerte bilden die Endpunkte der vertikalen Linien.

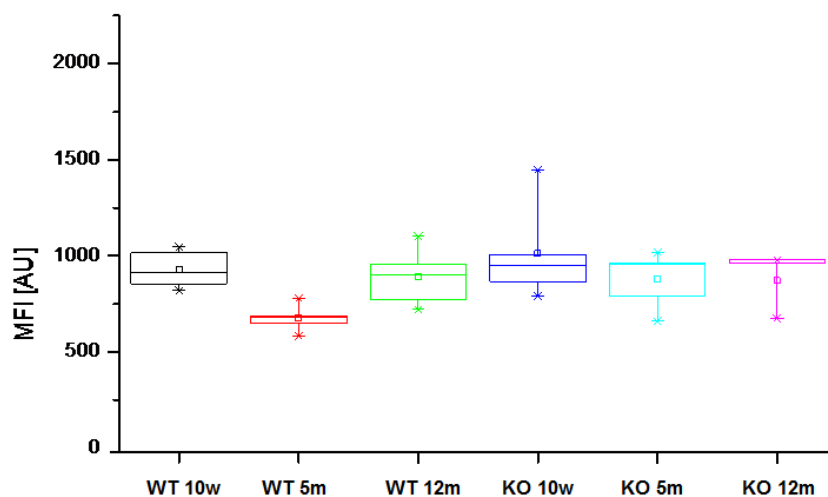


Abbildung 34: beta-Catenin Konzentrationen (gemessen mit Mab 8E 4)

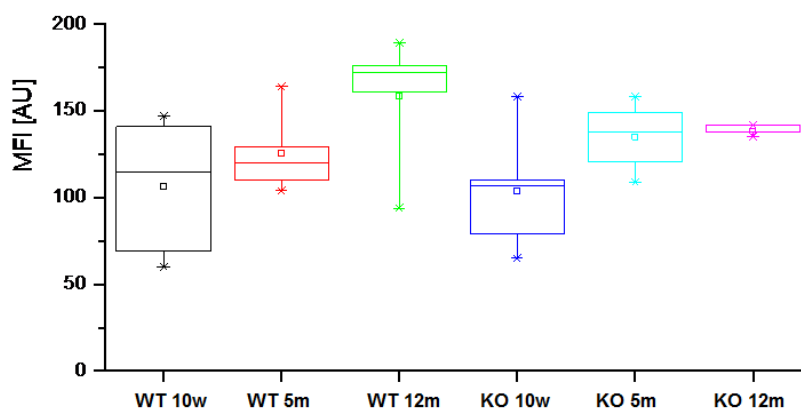


Abbildung 35: beta- Catenin Konzentrationen (gemessen mit Mab 2)

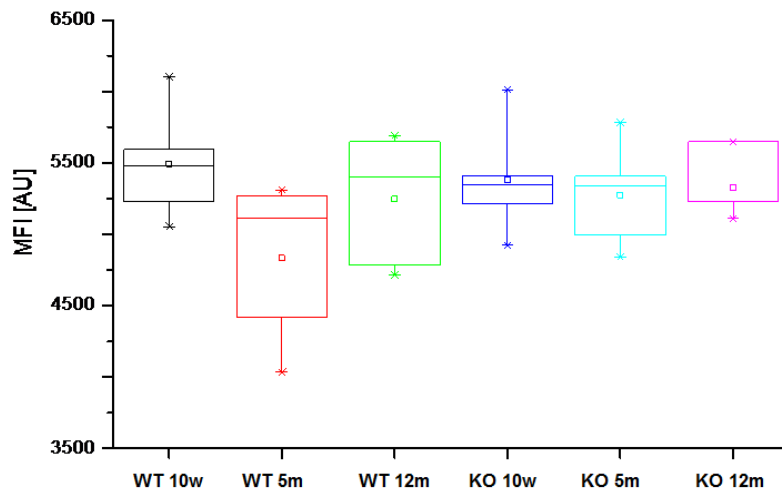


Abbildung 36: beta-Catenin Konzentrationen (gemessen mit BD #69)

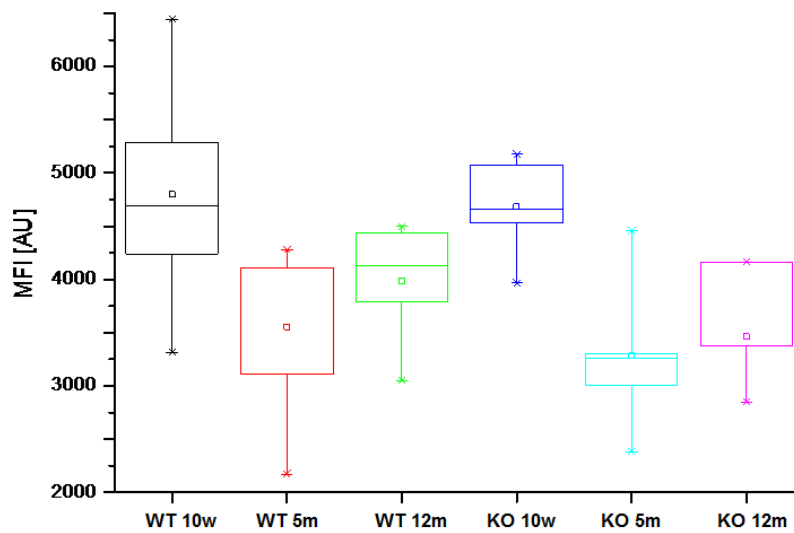


Abbildung 37: E-Cadherin Konzentration

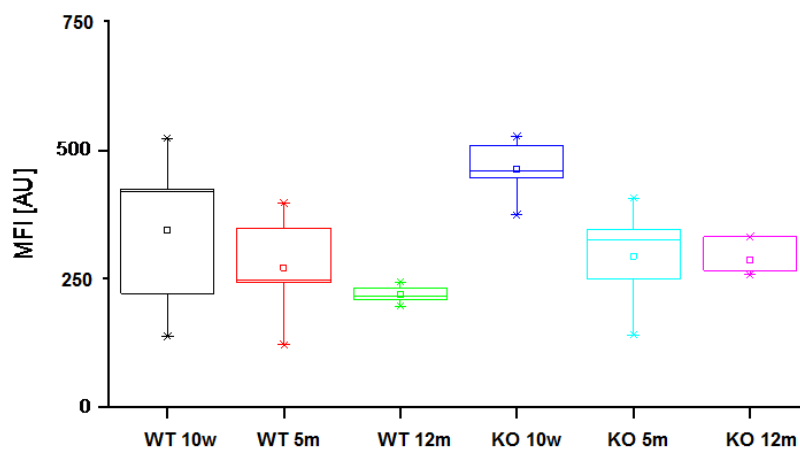


Abbildung 38: N-Cadherin Konzentrationen

Die zehn Wochen und zwölf Monate alten Tiere zeigen vergleichbare beta-Catenin Konzentrationen im Nachweis mit Mab 8E4 (Abbildung 34) und anti-beta-Catenin BD #69 (Abbildung 36). Dagegen ist die beta-Catenin Konzentration in der mittleren Altersgruppe (fünf Monate) signifikant geringer. Wildtyp und Knockout-Varianten unterscheiden sich nicht.

Mit Mab2 (Abbildung 35) findet man eine leichte Erhöhung der beta-Catenin Konzentration mit zunehmendem Alter. Die höchste Konzentration wird vom Wildtyp im Alter von zwölf Monaten, von Ku80⁻ Tieren schon im Alter von fünf Monaten erreicht. Allerdings ist der höchste erreichte beta-Catenin Spiegel in Knockout-Tieren sogar niedriger als in der Wildtyp-Variante.

Insgesamt scheint die beta-Catenin Konzentration von Mäusen im Alter von zehn Wochen noch höher zu sein als mit fünf Monaten. Die Ursache hierfür könnte die in diesem Alter noch anhaltende Wachstumsphase sein. Obwohl Mäuse bereits mit 28-46 Tagen die Geschlechtsreife erreichen, sind sie erst mit fünf bis sechs Monaten ausgewachsen.

Mit zunehmendem Alter steigt die beta-Catenin Konzentration erneut, mindestens bis auf das ursprüngliche Niveau (Abbildung 34 und Abbildung 36) oder darüber hinaus (Abbildung 35). Da es sich um gesunde Tiere handelt, wurden zu keinem Zeitpunkt Werte gemessen, die geeignet wären, Wnt-Zielgene pathologisch zu aktivieren. Dasselbe gilt für die Ku80-defizienten Populationen, deren Werte denen des Wildtyps weitgehend entsprechen. Von einer beta-Catenin Akkumulation im Sinne einer präkanzerösen Entwicklung auf Grund fehlender DNA-Reperaturmechanismen kann auch hier nicht gesprochen werden.

Die E-Cadherin Konzentrationen (Abbildung 37) verhalten sich qualitativ analog zu den abfallenden und erneut ansteigenden beta-Catenin Konzentrationen. Dies kann methodisch durch die Co-Immünpräzipitation der E-Cadherin-beta-Catenin Addukte bedingt sein. Unterschiede zwischen Ku80⁺ und Ku80⁻ Mäusen bestehen nicht. Die N-Cadherin Konzentrationen (Abbildung 38) wiederum nehmen mit zunehmendem Alter der Tiere ab.

Alle Messungen wurden mit homogenisiertem Lebergewebe durchgeführt. Je nach Vaskularisation der entnommenen Proben konnten daher variable Anteile von Endothelzellen im Homogenat enthalten sein. Inwiefern eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedlichen Gefäßstatus zu erwarten ist, wurde anhand eines Vaskularisationsmarkers bestimmt. Hierfür eignet sich insbesondere die Glutaminsynthetase, deren hepatische Expression auf eine kleine Population perivenös lokalisierter Hepatozyten beschränkt bleibt.

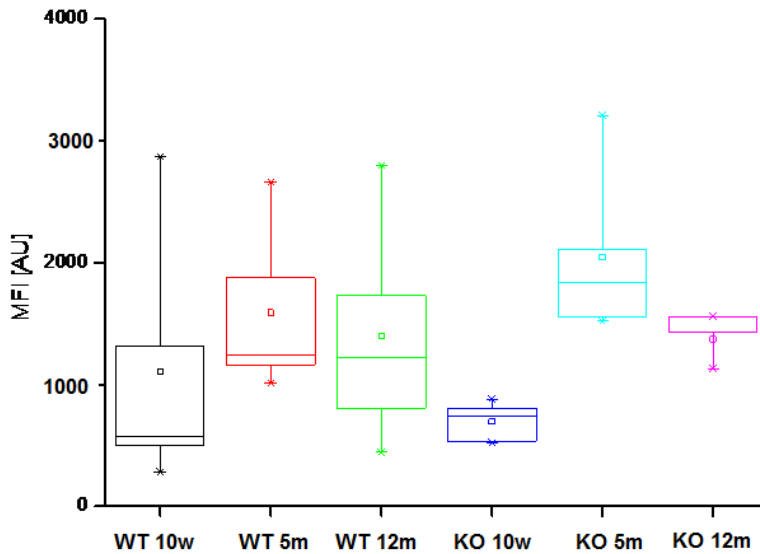


Abbildung 39: Vergleich der
Glutaminsynthetase
Konzentrationen

Die höchsten Glutaminsynthetase Konzentrationen wurden in Homogenaten der fünf Monate alten Mäuse gefunden (Abbildung 39). Auffallend ist, dass Wildtyp und Knockout Mäuse einander entsprechender Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede des Vaskularisationsmarkers aufweisen. Insofern muss in Betracht gezogen werden, dass es sich um eine altersabhängige Expression der Glutaminsynthetase handelt, und nicht etwa um zufällig enthaltene Gefäßanteile in den Gewebeprobe.

In weitere Untersuchungen sollten auch ältere Populationen einbezogen werden, um den hier ermittelten Trend über eine längere Zeitspanne zu verfolgen. Die durchschnittliche Lebenserwartung von Mäusen beträgt 1.5 Jahre, kann jedoch von einzelnen Exemplaren teilweise beträchtlich überschritten werden. Gerade ältere Tiere weisen ein erhöhtes Krebsrisiko auf, was sich gegebenenfalls im beta-Catenin/Wnt-Stoffwechsel nachweisen ließe.

4 Literaturverzeichnis

Elektrospray Massenspektroskopie

1. Fenn et al, *Scienc.* **1989** Oct 6; 246 (4926), 64-71, Electrospray Ionisation for mass spectrometry of large biomolecules
2. Wikipedia, Wikimedia Foundation, **02/2007**, Paul-Falle
<http://de.wikipedia.org/wiki/Paul-Falle>

Protein Microarray Technologie

3. Templin et al, *Proteomics* **2003**, 3, 2155-2166, Protein microarrays: Promising tools for proteomic research
4. Poetz et al, *Proteomics* **2005**, 5, 2402-2411, Protein microarrays for antibody profiling: Specificity and affinity determination on a chip
5. Wikipedia, Wikimedia Foundation, **02/2007**, Microarray
<http://de.wikipedia.org/wiki/Microarray>
6. Luminex Corporation,
<http://www.luminexcorp.com>

Wnt-Signalweg

7. Dihlmann und von Knebel Doeberitz, *Int. J. Cancer* **2005**, 113, 515-524, Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics
8. Kim, Sills, Houle, *Toxic. Pathology* **2005**, 33, 175-180, Overview of the Molecular Biology of Hepatocellular Neoplasms and Hepatoblastomas of the Mouse Liver
9. Wikipedia, Wikimedia Foundation, **02/2007**, Wnt-Signalweg
<http://de.wikipedia.org/wiki/Wnt-Signalweg>
10. Stanford University, **02/2007**, The Wnt Homepage
<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>