Identifizierung gering konzentrierter diagnostischer Glykoproteine in humanem Plasma mittels Affinitäts-Chromatographie und Massenspektrometrie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

am Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Naghmeh Seyed Mortezai

Hamburg, 2010

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Professor Dr. C. WAGENER Weitere Gutachterin der Dissertation: Frau Priv.-Doz. Dr. S. LÜTHJE Tag der Disputation: 04. Dezember 2009

Hamburg, den 19. November 2009



him ant

Professor Dr. Jörg Ganzhorn Leiter des Departments Biologie

"Wo ist die Nadel im Heuhaufen?"

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung		
1.1	Einleitung	1
1.1.1	Proteinglykosylierung und ihre Änderung bei Tumoren	11
1.1.2	Lektine und deren Einsatz	15
1.1.3	Antikörper und ihre Herstellung	16
1.2	Zielsetzung	19
2 N	Naterial und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Chemikalien	22
2.1.2	Puffer, Reagenzien und Lösungen	22
2.2	Methoden	26
2.2.1	Immunisierung von Cameliden-Antikörpern	26
2.2.2	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	27
2.2.3	Western Blot	27
2.2.4	Immunodetektion	28
2.2.5	Immunpräzipitation (IP)	28

2.2.6	Immobilisierung der Cameliden-Antikörper 29
2.2.7	Batch-Chromatographie 31
2.2.7.1	Con A- und WGA-Affinitäts-Chromatographie 31
2.2.7.2	Protein G- und Protein A-Affinitäts-Chromatographie
2.2.7.3	Immun-Affinitäts-Chromatographie im Batch-Verfahren
2.2.8	HPLC-Chromatographie
2.2.8.1	WGA-Affinitäts-Chromatographie
2.2.8.2	Grössen-Ausschluß-Chromatographie 35
2.2.8.3	Immun-Affinitäts-Chromatographie
2.2.9	Proteinkonzentrationsbestimmung
2.2.9.1	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach der Bradford-Methode
2.2.9.2	CEA-Konzentrationsbestimmung
2.2.10	Gelelektrophorese
2.2.10.1	Fällung von Proteinen 38
2.2.10.2	Eindimensionale SDS-PAGE
2.2.10.3	Zweidimensionale SDS-PAGE
2.2.10.4	Proteinfärbungsmethoden 40
2.2.11	Massenspektrometrie 41
2.2.11.1	Einführung in die Massenspektrometrie 41
2.2.11.2	Probenvorbereitung für die nanospray-Massenspektrometrie 45
2.2.11.3	Probenvorbereitung für die LC-MS ^E -Massenspektrometrie

3	3 Ergebnisse 47		
3.1	Glykoproteomanalytik des humanen Plasmas47		
3.1.1	Con A- vs WGA-Lektinfraktionierung 47		
3.1.2	Gel-basierende massenspektrometrische Analyse der WGA-gebundenen Plasmaprotein- fraktion		
3.1.3	LC-MS-Analyse der WGA-gebundenen Plasmaproteine51		
3.2	Aufarbeitung und Charakterisierung antigenspezifischer Cameliden-Antikörper54		
3.2.1	Antikörper-Titer des immunisierten Lamas 54		
3.2.2	Isolierung von Cameliden-Antikörpern über Protein G bzw. Protein A		
3.2.3	Anteil der clgG-Subklassen am Gesamt-IgG 56		
3.2.4	Antigenspezifität der verschiedenen clgG-Subklassen 57		
3.2.5	Zweidimensionale Proteinanalyse der Glykoproteine 59		
3.2.6	Antigen-Protein-Wechselwirkung 60		
3.3	Herstellung des Immunabsorbens und Optimierung der Antikörper-Affinitäts-		
	Chromatographie		
3.3.1	Immobilisierung der Cameliden-Schwerketten-Antikörper clgG3		
3.3.2	Vergleich der Bindungskapazität der verschiedenen Immunmatrizen		
3.3.3	Bindung der clgG3-Hydrazid-Matrix in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und Zeit 63		
3.3.4	Bindungseffektivität des Immunabsorbens 64		
3.3.5	Spezifität des Immunabsorbens		

3.4	Proteinanalytik des mit CEA-versetzem Normalplasmas67
3.4.1	Aufarbeitung des mit CEA-versetzem Normaplasmas 67
3.4.2	Proteinidentifizierung durch LC-MS 74
3.5	Proteinanalytik von Plasmen von Kolonkarznompatienten76
3.5.1	Aufarbeitung der Plasmen von Kolonkarzinompatienten
3.5.2	Proteinidentifizierung durch LC-MS
4 Dis	kussion 87
4.1	Identifizierung von krankheitsspezifischen Proteinen aus humanem Plasma87
4.2	Lektinfraktionierung des huamen Plasmas92
4.2.1	Eindimensionale Lektin-Affinitäts-Chromatographie 92
4.2.2	Massenspektrometrische Analyse der WGA-gebundenen Plasma-proteinfraktion
4.2.3	Abreicherung von nicht-glykosylierten Proteinen
4.3	Gewinnung und Charakterisierung von Cameliden-Antikörpern gegen die WGA- gebundene Plasmafraktion98
4.4	Herstellung und Charakterisierung des Immunabsorbens

4.5	Identifizierung vom CEA in mit CEA-versetztem Normalplasma und Plasma von
	Kolonkarzinompatienten105
4.5.1	Kombinierter Einsatz des WGA-Lektins und der clgG3-Hydrazid-Matrix
4.5.2	Proteinidentifizierung durch LC-MS 109
4.6	Ausblick
5	Zusammenfassung 116
6	Nomenklatur
6.1	Arabische Formelzeichen118
6.2	Abkürzungen
-	
/	Literaturverzeichnis
8	Abbildungsverzeichnis
9	Tabellenverzeichnis
10	Anhang 141
11	Danksagung 143
**	

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Das Humangenom enthält rund 22 000 Gene, die für Proteine kodieren. Deren Expression, alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung etc. können zu mehreren hunderttausend verschiedenen Proteinvarianten führen, die sich in ihrer Stabilität, Löslichkeit, Abundanz und vor allem in ihrer biologischen Funktion unterscheiden. Die Vielfalt an Proteinvarianten einer Zelle oder eines Organismus ist im Gegensatz zum eher statischen Genom dynamisch und kann in seiner qualitativen und quantitativen Proteinzusammensetzung aufgrund veränderter Bedingungen (Genexpression, DNA-Mutation, Umwelteinflüsse, Wirkstoffe etc.) variieren. Beispielsweise unterscheidet sich das Genom einer Raupe in nichts von dem Genom des Schmetterlings. Die unterschiedlichen Phänotypen ergeben sich durch die unterschiedlichen Proteome, d.h. die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle oder eines Organismus unter definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt. Genauso ändert sich das Proteinprofil eines Organismus je nach Gesundheitszustand. Veränderungen der Proteinmuster sind in vielen Fällen ein eindeutiger Hinweis auf eine Erkrankung und evtl. auch deren Ursache. Durch den Vergleich von Proteinexpressions-Profilen von Gesunden mit denen von Kranken können daher krankheitsspezifische Proteine entdeckt werden. Durch ihre Identifizierung und Charakterisierung können dann Krankheiten in einem frühen Stadium diagnostiziert, therapiert und wichtige Rückschlüsse über den Therapieverlauf [116] gezogen werden.

In vielen Studien wurde beispielsweise die Proteinzusammensetzung von normalen mit Tumorgeweben verglichen [115]. Es konnte gezeigt werden, dass einige Proteine in normalen Geweben und Tumorgeweben differentiell exprimiert werden – also in einer normalen Probe desselben Genotyps gar nicht oder in signifikant abweichender Menge exprimiert werden [115]. So wird das Carcinoembryonale Antigen (CEA) [173-176] in einer Konzentration weniger als 5 ng/ml ins Blutplasma sekretiert [46, 47]. Dagegen wird CEA in Plasmen von Patienten mit Kolonkarzinomen in einer Konzentration grösser 5 ng/ml detektiert [46, 47], wobei die CEA-Konzentration mit dem Metastasierungspotential des Tumors korreliert [99]. Aufgrund der unterschiedlichen CEA-Plasmakonzentrationen in Gesunden und Kolonkarzinompatienten kann dieses Protein als Tumormarker für das Kolonkarzinom eingesetzt und für klinische Analysen verwendet werden. Weitere Beispiele für eine unterschiedliche Plasmaproteinkonzentration bei Gesunden und Kranken sind das α -Fetoprotein (AFP) und das Prostata-spezifische Antigen (PSA). Das AFP ist ein Marker für das Leberkarzinom und ein onkofetales Antigen [166]. Onkofetale Antigene werden während der Embryonal- und Fetalzeit produziert. Ihre Expression wird nach dieser Zeit supprimiert. Dagegen stimulieren Tumorzellen ihre Expression. Das PSA gilt zurzeit als der beste Tumormarker für die Früherkennung eines Prostatakarzinoms. PSA wird von normalen Prostata-Epithelzellen mit einer Konzentration bis zu 4 ng/ml ins Blutplasma [100] sekretiert. Dagegen werden in Plasmen von Patienten mit einem Prostatakarzinom stark erhöhte PSA-Werte (abhängig vom Alter des Patienten grösser 4 ng/ml [100]) detektiert. Obwohl noch eine Reihe von tumorassoziierten oder allgemein krankheitsspezifischen Proteinen mit diagnostischer Relevanz bekannt sind [115], ist die Identifizierung und Quantifizierung weiterer diagnostisch einsetzbarer Proteine dringend notwendig, um Krankheiten in einem möglichst frühen Stadium zu entdecken und optimal therapieren [116] zu können.

Für die Analyse von krankheitsspezifischen Proteinen können verschiedene Methoden eingesetzt werden. So kann beispielsweise das Transkriptom der Zellen eines Gewebes mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden (z. B. durch den Einsatz von DNA-Microarrays) [117]. Unter Transkriptom ist die Gesamtheit aller Protein-kodierenden Transkripte (mRNAs) einer Zelle unter definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt zu verstehen. Bei der Analyse des Transkriptoms werden die mRNA-Expressionen verschiedener Transkripte einer kranken mit der einer normalen Zelle verglichen [117]. Hierfür werden entweder cDNAs, Oligonukleotide oder PCR-Fragmente, die einer bestimmten mRNA entsprechen, auf einem Trägermaterial (Array) immobilisiert. Die mRNA-Probe wird durch Fluoreszenzmarkierung und anschließende Hybridisierung mit dem auf dem Array komplementären Gegenstück detektiert [117]. Da jedoch die nach der Transkription vorliegenden mRNAs mit unterschiedlicher Effizienz in Proteine translatiert werden und überdies posttranslationale Modifikationen und unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten der translatierten Proteine nicht erfasst werden, ist das Transkriptom nicht direkt mit dem Proteom einer Zelle vergleichbar. Ein anderes Verfahren zur Analyse der differentiellen Proteinexpression von gesunden mit denen und kranken Zellen kann durch Protein-, Peptid und Glykan-Array-basierende Methoden erfolgen. Auch hier erfolgt die Detektion über Fluoreszenzmarkierung und anschließende Hybridisierung der Probe mit dem Trägermaterial. Im Gegensatz zu DNA-Microarrays wird hierbei eine bestimmte Menge an Proteinen (z. B. Antikörpern) bzw. Peptiden oder auch Glykanen auf dem Array immobilisiert. Gibt man beispielsweise das zu untersuchende Proteingemisch auf einen Antikörper-Array [127], so kann über die Fluoreszenz die Intensität der Antikörper-Protein-Interaktion nachgewiesen werden. Allerdings können mit dieser Methode nur Proteine identifiziert werden, gegen die hochspezifische Antikörper verfügbar sind. Diese Methode kann daher bisher nur für die Charakterisierung einer relativ begrenzten Anzahl von vorab bekannten Proteinen eingesetzt werden.

Für eine globale Proteomanalyse stehen dagegen bisher grundsätzlich nur zwei Verfahren zur Verfügung, die allerdings in vielen experimentellen Varianten [57-61, 88-93, 118-123, 129-140] eingesetzt werden können. Zum einen kann für die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in einem Gemisch eine Kombination aus Gelelektrophorese und darauffolgender Massenspektrometrie eingesetzt werden. Hierfür werden die Proteinproben meistens über eine zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie- oder anderen Proteinfärbungsmethoden wie der Silberfärbung visualisiert. Die sich in ihrer Färbungsintensität unterscheidenden Proteinspots werden dann aus dem Gel ausgeschnitten, typischer Weise mit Trypsin gespalten und anschließend mittels massenspektrometrischer Analysen identifiziert. Eine relative Quantifizierung der einzelnen Proteine wird hierbei durch den Vergleich der Färbungsintensitäten der Proteinspots verschiedener Proben auf den 2D-Gelen erreicht. Allerdings müssen für eine akkurate Quantifizierung eines bestimmten Proteins aufgrund der hohen Gel-zu-Gel-Variabilität bei traditionellen 2D-Experimenten mehrere Elektrophoreseläufe pro Probe durchgeführt werden. Im Gegensatz zu traditionellen 2D-Experimenten erlauben Techniken wie DIGE (Differential Gel Electrophoresis) [118, 119] die Trennung von verschiedenen Proteinproben auf einem einzigen Gel, indem jede Probe mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff kovalent gekoppelt wird. Somit können Konzentrationsunterschiede einzelner Proteine in den verschiedenen Proben auf einem einzigen Gel miteinander verglichen werden, wodurch Gel-zu-Gel-Variabilitätsprobleme behoben werden [118, 119]. Gel-basierende Methoden werden zwar häufig eingesetzt, jedoch bringen sie eine Reihe von Einschränkungen mit sich, besonders bei der Trennung sehr großer oder sehr hydrophober Proteine. Ein weiteres Problem Gel-basierender Quantifizierungsmethoden besteht darin, dass trotz einer hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese ein einzelner Proteinspot aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sein kann. Somit kann eine Intensitätsänderung eines Proteinspots nicht unbedingt auf die Änderung des Expressionsprofils eines einzelnen Proteins zurückgeführt werden. Eine Alternative zu den auf einer gelelektrophoretischen Trennung beruhenden Methoden stellen Gel-freie Quantifizierungsmethoden [61] dar. Diese verwenden Flüssigkeits-Chromatographie (LC)bezogene Systeme, die direkt an ein Massenspektrometer (MS) gekoppelt sind. Die quantitative LC-MS Methode ist momentan das populärste Feld der quantitativen Proteomanalyse, da im Gegensatz zu Gel-basierenden Methoden eine gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in einem komplexen Gemisch möglich ist [61]. Bei LC-MS-Techniken wird zunächst das Proteingemisch mit einer Protease proteolytisch gespalten (typischer Weise mit Trypsin) und die erhaltenen proteolytischen Peptide über eine RP-HPLC (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography) chromatograpisch aufgetrennt. Die auf der RP-HPLC aufgetrennten Peptide erreichen je nach ihrer Hydrophobizität mit unterschiedlichen Retentionszeiten den Ausgang der RP-Säule und werden unmittelbar danach massenspektrometrisch vermessen. Die Identifizierung der Proteine erfolgt

hierbei aufgrund des Fragmentierungsmusters der Peptide mit Hilfe von Proteindatenbanken. Die Quantifizierung der Proteine mittels LC-MS-Analysen basiert auf der Bestimmung relativer Peptid-Signalintensitäten [57, 58, 61, 121]. Allerdings ist die Quantifizierung mittels massenspektrometrischer Analysen wie auch bei 2D-Gel-Experimenten nur mit Einschränkungen möglich. Die derzeitige detektierbare Grössenordnungsdifferenz, der sogenannte dynamische Bereich, liegt sowohl bei DIGE als auch LC-MS bestenfalls bei etwa 10²-10⁴ [59, 63]. Während bei 2D-Gel-Experimenten die Quantifizierung durch die Färbungsintensitäten der Proteinspots bestimmt wird, hängt die massenspektrometrische Quantifizierung von der unterschiedlichen Effizienz der einzelnen Peptid-Ionisierung ab, die je nach chemischen und physikalischen Eigenschaften der Peptide stark variieren kann. Aufgrund der Tatsache, dass diese unterschiedlichen Ionisierungseffekte bislang nicht vorausgesagt werden können, erlaubt die Messung der Signal-Intensität eines Peptids keine Rückschlüsse auf die absolute Proteinmenge, sondern nur eine relative Quantifizierung beim Vergleich mehrerer Proben. Um dabei den experimentellen Fehler möglichst gering zu halten, wurden verschiedene Methoden entwickelt, die Proben mit stabilen Isotopen zu markieren. Die unterschiedlichen Proben können anschließend vereinigt und die relative Proteinabundanz zwischen den Proben durch den Vergleich der Intensitäten der unterschiedlich Isotopen-markierten Peptide bestimmt werden. Methoden wie beispielsweise ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags) [88], SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) [89], ICPL (Isotope-Coded Protein Label) [122] und iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) [93] oder tryptische Spaltung in schwerem Wasser [123] erlauben die relative Quantifizierung von Peptiden durch die Markierung zweier oder mehrerer Proben mit unterschiedlich schweren Isotopen mittels chemischer oder enzymatischer Modifizierung oder aber auch durch in vivo-Markierungen [90-92]. Allerdings bringen die auf Isotopen-Markierung beruhenden massenspektrometrischen Quantifizierungstechniken einige Nachteile [120] mit sich. Bei der Mehrzahl der Methoden (z. B. bei ICAT) können jeweils nur zwei Proben miteinander verglichen werden [88]. Zudem können in vivo-Markierungen (SILAC) nur für Proteinproben eingesetzt werden, deren Expression in Kulturen möglich sind [89]. Messungen mit ICAT und SILAC können nur paarweise miteinander verglichen werden [88, 89]. Die Messung mit iTRAQ erlaubt immerhin den Vergleich von bis zu acht Proben [93]. Allerdings müssen hierfür alle Proben mit einer Referenzprobe versetzt werden. Die iTRAQ-Markierungstechnik setzt weiterhin eine höhere Probenmenge und zusätzliche Probenvorbereitungsschritte voraus, die unter Umständen zu Proteinverlusten und zu falschen Quantifizierungsergebnissen führen können. Im Gegensatz zu Isotopen-markierten Analysen benötigen Markierungs-freie LC-MS Quantifizierungs-Techniken von Proteinen [57, 58, 61] weder eine aufwendige Markierungsstrategie noch eine spezielle Probenvorbereitung. Besonders, wenn eine große Anzahl von Proben gemessen und quantifiziert werden soll, ist dies ein entscheidender Vorteil. Allerdings setzen Markierungs-freie Quantifizierungstechniken

eine hohe Reproduzierbarkeit sowohl der chromatograpischen Trenn- als auch der massenspektrometrischen Messtechniken voraus [6, 121], da die unterschiedlichen Proben nicht, wie bei Markierungs-basierenden Verfahren, vereinigt werden können, sondern separat gemessen werden müssen. Eine neue Variante der Markierungs-freien LC-MS-Quantifizierung ist die MS^E-Methode [121]. Für dieses Verfahren wird ein Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (Q-TOF) eingesetzt. Durch eine abwechselnde Messung bei niedriger und bei erhöhter Kollosionsenergie während der LC-MS-Analyse können Peptide in einem komplexen Gemisch in einem einzigen Experiment gleichzeitig identifiziert und quantifiziert werden [121]. Dabei wird der niedrige Energiemodus verwendet, um exakte Massen der Vorläufer-Ionen und *Peak*-Intensitäten für die Quantifizierung zu erhalten [121]. Die Quantifizierung erfolgt dabei durch den Vergleich der *Peak*-Intensitäten identischer Peptide durch die Integration von exakten Ionen-*Peaks* in zwei oder mehreren Experimenten [121]. Im Gegensatz zu dem niedrigen Energiemodus wird der erhöhte Energiemodus eingesetzt, um möglichst viele Peptid-Fragmente aller Peptid-Vorläufer in dem Gemisch zu generieren, dessen exakte Massezu-Ladung (m/z)-Verhältnis-Informationen für die Datenbanksuche und Proteinidentifizierung liefern [121].

Mit dem signifikanten Fortschritt der Proteomanalysen-Technologien wie DIGE [118, 119] und LC-MS Techniken wie der MS^E-Massenspektrometrie [121] können somit Proteine in einem Gemisch gleichzeitig identifiziert und relativ quantifiziert werden [57, 58, 61]. Für die Entdeckung krankheitsspezifischer Proteine kann das Proteom von Geweben und von Körperflüssigkeiten (Plasma, Serum, Urin, Aszites, etc.) analysiert werden. In Geweben kann eine hohe Konzentration des krankheitsspezifischen Proteins erwartet werden, was ihre Identifizierung mittels der derzeitigen Proteom-Technologien erleichtert. Die diffizile Beschaffung von Geweben durch Biopsie ist jedoch mit einem mehr oder weniger schwerwiegenden Eingriff verbunden. Demgegenüber können Körperflüssigkeiten mit nicht- oder minimal-invasiven [113, 114] Techniken erhalten werden. Für die Diagnose, die Prognose und die Überwachung des Therapieverlaufes einer Krankheit besitzen humane Körperflüssigkeiten daher gegenüber Geweben entscheidende Vorteile durch ihre einfache Beschaffung, ihre minimalen Kosten und ihre einfache Handhabung. Auch in den Körperflüssigkeiten Aszites- und Zysten-Flüssigkeiten kann eine hohe Konzentration der krankheitsspezifischen Proteine erwartet werden [64]. Jedoch können in diesen Körperflüssigkeiten im Gegensatz zu einer Proteomanalyse des Plasmas nicht alle krankheitsassoziierten Proteine des Körpers erfasst werden. Daher wird für klinische Studien in der Regel das Proteom des Blutserums oder des Blutplasmas analysiert. Das Blut steht mit den meisten Zellen, mit allen Organen und Geweben des Organismus entweder direkt oder indirekt in ständigem Kontakt und kann somit potentiell alle Proteine des Körpers und ihre Isoformen repräsentieren [59]. Somit kann das Blut als Träger von Information über alle Gewebe diagnostisch genutzt werden. Beispielsweise könnten bestimmte Tumoren durch die Bestimmung charakteristischer Proteine, die sie in die Blutbahn abgeben, diagnostiziert und diese Proteine als Marker zur Überwachung des Therapieverlaufes eingesetzt werden. Die Proteomanalyse vom Serum und Plasma wird dadurch immer mehr zu einem vielversprechenden Ansatz, neue krankheitsspezifische Proteine mit diagnostischer Relevanz zu entdecken. Die Komplexität und die enorm heterogene Proteinzusammensetzung des Plasmas bzw. Serums stellen allerdings hohe Ansprüche an die Aufbereitungsmethode. Zudem unterscheidet sich das Proteom des Plasmas erheblich von dem Proteom des Serums [111]. Die Entscheidung, wie die Standardisierung der Probenbehandlung und vorbereitung durchgeführt und ob Plasma oder Serum für die Analyse verwendet wird, ist dabei keinesfalls trivial. Allerdings gab das HUPO/Plasma Proteom Projekt (PPP) Komitee die Empfehlung, das Plasma aufgrund seiner geringen Degradation ex vivo dem Serum als Ausgangsmaterial für Proteomanalysen vorzuziehen [69-71]. Unabhängig davon, ob letztendlich mit Serum oder Plasma gearbeitet und welche Aufarbeitungsstrategie angewendet werden soll, dürfen während der gesamten Aufarbeitungsprozedur möglichst keine Aufarbeitungsvariablen geändert werden. Beispielsweise haben Variablen wie die Temperatur und die Zeit der Probenlagerung, die verwendeten Reaktionsgefässe und Auftau-Zyklen signifikante Effekte auf das Ergebnis der Proteomanalyse. Nur wenn diese Variablen für jede zu analysierende Probe gleich sind, ist es möglich, ein potentiell entdecktes krankheitsspezifisches Protein in anderen unabhängigen Proben reproduzierbar zu identifizieren und somit zu validieren.

Obwohl schon intensive Bemühungen in Bezug auf die Analyse des Plasmaproteoms unternommen wurden, konnten bisher nur wenige krankheitsspezifische Proteine im Plasma entdeckt werden. Um die Schwierigkeiten zu verdeutlichen, sollen zunächst die Proteine des Plasmas definiert werden: Als Proteine des Plasmas bezeichnet man die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen im Plasma vorkommen [59] (siehe Abb. 1.1). Dabei handelt es sich überwiegend um Proteine, die ihre Funktion in der Zirkulation ausüben [59]. Diese funktionelle Definition unterstreicht, dass die verschiedenen Proteine aus unterschiedlichen Gründen im Plasma vorkommen können. Die klassischen Plasmaproteine werden überwiegend in der Leber synthetisiert [59] und in das Blutplasma sekretiert (beispielsweise das Serum Albumin und viele andere hoch und mittel abundante Plasmaproteine) [59]. Eine weitere Proteinklasse des Plasmas stellen die Immunglobuline dar, die von Lymphozyten sezerniert werden und im Plasma und in der Gewebeflüssigkeit aller Säuger vorhanden sind. Sie sind eine Gruppe von Glykoproteinen und gehören zu den hoch abundanten Plasmaproteinen. Zusätzlich sind im Plasma Proteine zu finden, die normalerweise ihre Funktion in der Zelle ausführen, jedoch durch Zelllyse oder Zelldefekte ins Plasma gelangen. Allein durch die Auflistung dieser wenigen Plasmaproteinklassen wird die außerordentlich heterogene Zusammensetzung des Plasmaproteoms deutlich. Eine weitere Charakteristik des Plasmaproteoms ist die hohe Variabilität der Gesamtproteinkonzentration von Mensch zu Mensch, die zwischen etwa 50-80 mg/ml betragen kann. Das Plasmaproteinprofil jedes Menschen hängt zudem nicht nur von der genetischen Disposition, dem Geschlecht, dem Körpergewicht und dem Alter ab, sondern kann durch die Lebensweise (körperliche Aktivität, Ernährung, Medikamentengebrauch, Drogenkonsum etc.) und viele andere Umweltfaktoren beeinflusst werden [59]. Das Proteom des Plasmas ist daher komplexer als das Proteom aller anderen Körperflüssigkeiten oder Gewebe [59]. Die Konzentration einzelner Proteine kann sich dabei um viele Größenordnungen unterscheiden (10⁹-10¹⁰) [59, 65] (Abb. 1.1). So tragen 22 hoch und mittel abundante Proteine Plasmaproteine zu 99 % der gesamten Proteinmenge bei [65]. Die restlichen, weit über hunderttausend Plasmaproteine machen somit nur 1 % der gesamten Plasmaproteinmenge aus.



Abb. 1.1: Referenzintervall von 70 analysierten Plasmaproteinen [59]. Die Proteinabundanz ist in einer logarithmischen Skala dargestellt. Pfeile, die nach unten gerichtet sind, zeigen den obersten Grenzwert der Proteinabundanz an. Die klassischen Plasmaproteine sind links (hoch abundant), die von Geweben abgegebenen Proteine sind zentral (mittel abundant, z. B. Enzyme) und die Cytokine (niedrig abundant) sind rechts angeordnet. Für einen Vergleich ist Hämoglobin (ganz links) auf der Skala mit aufgetragen. (TPA: *tissue plasminogen activator*; GCSF: *granulocyte colony-stimulating factor*; TNF: *tumor necrosis factor*.)

In einigen klinischen Studien wurde das Proteinprofil hoch abundanter Proteine analysiert, um Krankheiten zu identifizieren. Seit Tiselius die Methode der Elektrophorese von Serumproteinen eingeführt hat, wurde diese Methode zu einem wichtigen Werkzeug für die Identifizierung von abweichenden Serumproteinprofilen [72, 73]. Bei einer elektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine auf Agarosegelen, erhält man immer fünf abundante Proteingruppen (Albumin, Alpha₁-, Alpha₂-, Beta- und Gamma-Globuline), deren Bandenintensitäten bei gesunden Personen immer gleich sind [72]. Ein anomales Serumproteinprofil tritt beispielsweise beim multiplen Myelom auf und ist dadurch gekennzeichnet, dass im Vergleich zu Proteinprofilen Gesunder eine extrem hohe gamma-Globulin Proteinbande detektiert wird [73]. Somit besitzen hoch abundante Proteine des Blutes ihren eigenen Stellenwert als diagnostisch relevante Proteine. In vielen anderen Studien wurde dagegen das Proteinprofil niedrig abundanter Plasmaproteine analysiert, um zusätzlich zu den regulär vorkommenden Proteinen weitere Proteine zu identifizieren, die beispielsweise unter pathologischen Bedingungen aus Gewebe ins Blutplasma abgegeben werden. Damit sind Proteine gemeint, die bei Gesunden gar nicht oder in nur sehr geringen Mengen im Plasma vorkommen, jedoch bedingt durch eine Erkrankung in erhöhten Konzentrationen ins Blutplasma sezerniert werden [59]. Zu einem kann es sich bei diesen Proteinen unter anderen um tumorassoziierte Proteine handeln [59], die durch ein sogenanntes "shedding" [141] ins Blutplasma gelangen. Ein Beispiel hierfür ist das Carcinoembryonale Antigen, das normalerweise auf Kolon-Epithelzellen durch eine Lipid-Verankerung auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran vorliegt, jedoch durch die Abspaltung ins Blutplasma abgegeben wird. Zum anderen werden einige tumorspezifische Proteine direkt von Tumoren ins Blutplasma sezerniert (z. B. das Prostata-spezifische Antigen von Prostatatumoren [100]).

Die Identifizierung tumorassoziierter oder allgemein krankheitsspezifischer niedrig abundanter Plasmaproteine erweist sich als sehr schwierig, da ihre Analyse durch die im Plasma regulär vorhandenen Proteine, deren Konzentrationen in der Regel um ein vielfaches höher sind, erschwert wird. Die hohe Grössenordnungsdifferenz und die Komplexität der Plasmaproteine sind zwei sehr wichtige und schwer zu bewältigende Hindernisse für die erfolgreiche Analyse des Plasmaproteoms. Betrachtet man die hohen Konzentrationsunterschiede der Proteine im Plasma von etwa 10⁹-10¹⁰ [59, 65, 84] einerseits und die derzeitige detektierbare Grössenordnungsdifferenz von 2D-PAGE und LC-MS, die bestenfalls bei etwa 10²-10⁴ [59, 63] liegen, andererseits, so erklärt dieser einfache Vergleich, dass eine Abreicherung von hoch abundanten Plasmaproteinen unabdingbar ist, um niedrig abundante Proteine im Plasma zu visualisieren. Bisher wurden viele verschiedene Fraktionierungsmethoden auf Proteinebene angewendet, um eine Abreicherung hoch abundanter Plasmaproteine wie des Albumins und der Immunglobuline zu erreichen. Die Entfernung von Albumin kann beispielsweise durch eine Antikörper-Affinitäts-Chromatographie erreicht werden [96, 97, 141]. Immunglobuline können durch die Bindung an Protein G entfernt werden [16, 96, 97]. Erwähnenswert ist ebenfalls die MARS-Strategie (*Multi Affinity Removal System*) [87], mit der eine Abreicherung hoch abundanter Plasmaproteine möglich ist. Eine weitere Methode zur Reduktion der Komplexität des Plasmaproteoms ist die Fraktionierung der Plasmaproteine in Teilproteome [107], sogenannte Subproteome. Mit der Analyse einzelner Subproteome wird allerdings naturgemäß immer nur ein bestimmter Teil der Plasmaproteine analysiert, während die Informationen über die Proteinzusammensetzung anderer Subproteome verloren geht [55, 60]. Ohne die Fraktionierung des Plasmaproteoms ist die Analyse niedriger-abundanter Proteine jedoch beinahe unmöglich, da die hohe Grössenordnungsdifferenz und die Komplexität der Plasmaproteine die Analyse niedrig abundanter Plasmaproteine erschweren. Deshalb ist die Fraktionierung des Plasmaproteoms unabdingbar, um niedrig abundante krankheitsspezifische Plasmaproteine zu identifizieren.

Eine häufig genutzte Möglichkeit, das Plasma in Subproteome zu fraktionieren, stellen die unterschiedlichen posttranslationale Modifikationen der Plasmaproteine dar. So können etwa das Glykoproteom oder das Phosphorproteom des Plasmas analysiert werden. Das Glykoproteom des Plasmas, also die Summe aller glykosylierten Proteine des Plasmas, ist für die Analyse krankheitsspezifischer Proteine besonders interessant, da in vielen Studien gezeigt wurde, dass maligne Transformationen [75-79, 81, 82, 101, 102, 125, 126] und auch viele andere Krankheiten [124: Kapitel 12] häufig mit Glykosylierungsänderungen von Glykoproteinen einhergehen (siehe Kapitel 1.1.1). Es existieren viele Typen von Proteinglykosylierungen, jedoch treten zwei von ihnen besonders häufig auf [125]: Die N- und die Mucin-ähnliche O-Glykosylierung. Bei der N-Glykosylierung erfolgt die kovalente Verknüpfung des Kohlenhydrats an einem Stickstoff der Aminosäure Asparagin mit einer bestimmten Konsensus-Sequenz [124: Kapitel 3, 125]. Dagegen wird bei der O-Glykosylierung das Kohlenhydrat kovalent an die Hydroxyl-Gruppe eines Serin- oder eines Threonin-Restes gebunden [124: Kapitel 4, 125]. Bisher konnten tumorassoziierte Glykanvarianten für einige klassische Plasmaproteine wie α -Fetoprotein [75], Haptoglobin [76, 77], α_1 -saures Glykoprotein [78] und α_1 -Antitrypsin [79] gefunden werden. Bei dem tumorassoziierten Protein des Kolonkarzinoms [82], dem Carcinoembryonalem Antigen (CEA), handelt es ebenfalls um ein Glykoprotein. Das CEA ist ein monomeres Protein von etwa 180 kDa, das 28 N-Glykane, jedoch keine O-Glykane trägt [99]. Das Molekulargewicht variiert um \pm 20 kDa je nach Malignitätsgrad des zugrundeliegenden Tumors, das durch eine unterschiedliche Glykosylierung von 45-60 % bedingt ist [99]. Auch das von Prostata-Tumoren direkt ins Blutplasma sekretierte Prostata-spezifisches Antigen (PSA) ist ein glykosyliertes Protein [101, 102]. Das PSA ist ein 28,4 kDa großes Glykoprotein mit einer N-verknüpften Oligosaccharid-Seitenkette, wobei PSA-Moleküle, die von Prostata-Tumoren sekretiert werden, eine veränderte Oligosaccharid-Struktur aufweisen [103].

Da es sich bei den meisten bisher entdeckten tumorassoziierten Proteinen um glykosylierte Proteine handelt, kann das Glykoproteom als ein vielversprechendes Proteom zur Entdeckung weiterer tumorassoziierter Proteine angesehen werden. Ein häufig eingesetztes Hilfsmittel zur Isolierung und Fraktionierung der Glykoproteine ist die Affinitätsreinigung durch die Bindung an Lektine. Lektine sind Proteine, die Glykan-Strukturen spezifisch erkennen und diese reversibel binden [125] (siehe Kapitel 1.1.2). Es gibt eine Reihe von kommerziell erhältlichen Lektinen, die sich in ihrer Spezifität und Affinität unterscheiden. So wurde in vielen Studien versucht, krankheitsspezifische Plasmaproteine über Affinitäts-Chromatographien an verschiedenen Lektinen [107, 143-146] anzureichern und diese anschließend massenspektrometrisch zu identifizieren. Die Anreicherung von Glykoproteinen des Plasmas bedeutet die gleichzeitige Abreicherung anderer Plasma-Subproteome und bewirkt somit eine Reduktion der heterogenen Zusammensetzung des Plasmas. Obwohl bei diesem Ansatz die Komplexität des Plasmas auf glykosylierte Proteine reduziert wird, behindern weiterhin höher konzentrierte Plasmaproteine des Glykoproteoms die Identifizierung niedrig abundanter Plasmaproteine, indem sie durch Überlagerungen eine massenspektrometrische Analyse niedrig konzentrierter Proteine nicht zulassen. Daher wird durch die alleinige Anreicherung der glykosylierten Plasmaproteine die Grössenordnungsdifferenz der einzelnen Proteinkonzentrationen nicht genügend minimiert, um niedrig abundante Proteine des Plasmas zu visualisieren. Die Entdeckung niedrig konzentrierter krankheitsspezifischer Glykoproteine des Plasmas erfordert daher eine zusätzliche Abreicherung der hoch abundanten Proteine der untersuchten Glykoproteinfraktion.

In der vorliegenden Arbeit wird eine erfolgsversprechende Strategie zur Identifizierung diagnostisch relevanter niedrig abundanter glykosylierter Plasmaproteine durch den kombinierten Einsatz von Lektinen und Antikörpern vorgestellt. Im Folgenden wird zunächst auf die Proteinglykosylierung und ihre Änderung speziell bei maligner Transformation, auf die Begriffsdefinition von Lektinen und auf die besonderen Eigenschaften von den verwendeten Cameliden-Antikörpern eingegangen. Anschließend wird die für die vorliegende Arbeit verwendete Strategie zur Entdeckung diagnostisch relevanter Glykoproteine in humanem Plasma vorgestellt.

1.1.1 Protein-Glykosylierung und ihre Änderung bei Tumoren

Die Eigenschaften der Proteine resultiert nicht allein aus ihrer Aminosäuresequenz. Posttranslationale Modifikationen sind häufig für die korrekte Proteinfaltung, für den zielgerichteten Transport zum Bestimmungsort und für die funktionellen Eigenschaften des Proteins unerlässlich. Eine der häufigsten Formen der Protein-Modifikation stellt die Glykosylierung dar [85]. Glykoproteine findet man vor allem als Membranproteine an der Außenseite der Plasmamembran, in der extrazellulären Matrix und im Blut [125]. So sind zahlreiche Proteine des Plasmas glykosyliert [125]. Durch die meist negative Ladung der Kohlenhydratreste erhöhen sie die Polarität des Proteins und verleihen ihm eine bessere Löslichkeit [125]. Außerdem stabilisieren sie Proteine gegen Denaturierung und Proteolyse und beeinflussen dadurch ihre Halbwertszeit [124 Kapitel 7, 125]. Weiterhin können Kohlenhydrate auf Proteinen der Zytoplasmamembran eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Erkennung (z. B. Integrine, Cadherine) [125] und der Signaltransduktion (Erkennungsstellen für verschiedene Enzyme und Glykorezeptoren) [124: Kapitel 8, 125] spielen und als Oberflächenschutz (Glykokalix) dienen [124: Kapitel 5]. Bei eukaryotischen Glykoproteinen werden im Wesentlichen zwei Arten der Glykosylierung beobachtet: die N-Glykosylierung (Glykosylierung an einem Asparagin) [124: Kapitel 3] und die Mucin-ähnliche O-Glykosylierung (Glykosylierung an einem Serin oder Threonin) [124: Kapitel 4]. Dabei können Glykoproteine sowohl N- als auch O-glykosyliert sein oder auch nur eine der Glykosylierunsarten tragen. Die N-Glykosylierung eines Proteins beginnt im Endoplasmatischem Reticulum (ER) [124: Kapitel 3, 125]. Hierbei vermitteln zunächst mehrere Oligosaccharyl-Transferasen einen en bloc Transfer eines Lipid-verknüpften vorgefertigten Oligosaccharids (Glc₃Man₉GlcNAc₂-Dolichol Diphosphat) an die Amidfunktion einer Asparagin-Seitenkette mit der spezifischen Konsensus-Sequenz Asn-Xxx-Ser/Thr/Cys (Xxx stellt eine beliebige Aminosäure außer Prolin dar) [124: Kapitel 3, 125]. Durch die Entfernung der Glucose-Einheiten des Vorläufers entsteht der High-Mannose-Typ [124: Kapitel 3]. Die Prozessierung der High-Mannose kann beginnend von cis- über medial- bis trans-Golgi fortgesetzt werden. Hierbei entfernen zunächst bestimmte Mannosidasen definierte Mannose-Einheiten der High-Mannose-Struktur. Anschließend katalysieren verschiedene Glykosyl-Transferasen durch die Übertragung unterschiedlicher Phosphat-aktivierter Monosaccharide die Bildung von Hybrid- und Komplex-Strukturen (Abb. 1.2). Dabei können verschiedene Monosaccharide mit der bereits synthetisierten Kette verknüpft werden und/oder zur Erzeugung einer neuen Kette beitragen. Auf diese Weise können zwei- bis fünfantennäre N-Glykan-Strukturen entstehen. Allerdings haben alle N-glykosylierten Proteine eine in gleicher Weise verzweigte Oligosaccharid-Ausstattung, bestehend aus einer pentasaccharidischen Kernregion der Struktur Man(α 1-6)[Man(α 1-3)]Man(β 1-4)-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc, die als *Core*-Region bezeichnet wird [124: Kapitel 3]. Bei hybriden und komplexen N-Glykanen ist außerdem eine Modifizierung der Core-Struktur möglich, indem entweder der interne Mannose-Rest der Core-Struktur mit einem "bisecting"-β1-4-GlcNAc-Rest [125] oder der am Asn-direkt verknüpfte GlcNAc-Rest mit einem α 1-6-Fucose-Rest [125] verknüpft wird. Letztere Verknüpfung ist jedoch nicht möglich, wenn zuvor ein *"bisecting"*-GlcNAc an der *Core*-Mannose gebunden wurde [125].

Die Biosynthese der O-Glykane unterscheidet sich in vielen Punkten von der Synthese der N-Glykane. Die Mucin-ähnliche O-Glykosylierung beginnt direkt im *cis*-Golgi Apparat, durch die Verknüpfung eines N-Acetyl-Galaktosamin-Restes (GalNAc) mit theoretisch jedem auf der Proteinoberfläche exponierten Serin- oder Threonin-Rest (mit der Ausnahme von Ser/Thr-Reste der Konsensus-Sequenz von N-Glykanen) [124: Kapitel 4, 125]. Die Synthese der O-Glykane erfolgt ohne den Einsatz von Glukosidasen. Während das Protein durch den Golgi-Apparat bewegt wird, werden bei der O-Glykosylierung einzelne Phosphat-aktivierte Monosaccharide durch bestimmte Glykosyl-Transferasen der Kette hinzugefügt. Hierbei werden überwiegend biantennäre Glykane gebildet [125]. O-Glykane besitzen keine typische *Core*-Struktur [125], die der pentasaccharidischen Kernregion eines N-Glykans ähnlich wäre. Insgesamt werden acht verschiedene O-*Core*-Strukturen gezählt [125].

Die häufigste Kettenverlängerung sowohl bei der N- als auch bei der O-Glykosylierung wird von der GlcNAc-Transferase IV und der Gal-Transferase III durch eine abwechselnde Verknüpfung von Galund GlcNAc-Resten katalysiert [125]. Diese aus mehreren Serien von wiederholenden Gal-GlcNAc Disaccharid-Einheiten bestehende Sequenz wird als Poly-N-Acetyl-Laktosamin-Verlängerung Typ II bezeichnet und kommt nur dann vor, wenn eine β1-6 Kette durch die GlcNAc-Transferase V erzeugt wurde [124: Kapitel 12]. Als terminale Kohlenhydrat-Reste der N- und O-Glykane kommen Sialinsäure- (N-Acetyl-Neuraminsäure), Fucose-, Gal-, GlcNAc- und GalNAc-Reste vor [125]. Welche Oligosaccharid-Ausstattung tatsächlich synthetisiert wird, hängt nicht nur von der Proteinsequenz und Proteinfaltung, vom Zelltyp, von der Organelle (ER oder Golgi) und von der Verfügbarkeit an Phosphat-aktivierten Monosaccharide ab, sondern wird weitgehend vom Vorhandensein und Aktivitätspotential einer oder mehrerer Glykosyl-Transferasen [125] bestimmt.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass maligne Transformationen und auch viele andere Krankheiten (beispielsweise Blutkrankheiten wie von Willebrand Faktor Defizit [124: Kapitel 12] und rheumatoide Arthritis [124: Kapitel 12]) häufig mit Glykosylierungsänderung von Glykoproteinen einhergehen [81, 124-126]. Deshalb können Glykosylierungsmuster von Proteinen unter anderem als Marker für Veränderungen in den Zellen und besonders für die unterschiedlichen Entwicklungsstufen eines Tumors dienen [125]. Allgemein betrachtet können Änderungen der Glykanstrukturen bei Glykoproteinen auf unterschiedliche Arten erfolgen: Beispielsweise können bestimmte Glykanstrukturen von einer (nahezu) vollständigen Degradation betroffen sein, während andere Glykanstrukturen vollkommen neu oder in einer erhöhten Menge gebildet werden. Bisher konnten Glykosylierungsänderungen auf Zelloberflächen von verschiedenen Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen gezeigt werden.

Beispielsweise besitzen normale Brust- und Kolonzellen auf ihren Zelloberflächen einen hohen Anteil an O-Glykanen, die überwiegend Core1-4 tragen [105, 126], wobei aus dieser Gruppe die Core2-Struktur am häufigsten [105] synthetisiert wird. Dagegen konnte in Brust- und Kolon-Tumorzellen ein erhöhter Anteil an Core1-basierende Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 1.2), die häufig aus Tn-Antigen (GalNAca-Ser/Thr) und Sialyl-Tn-Antigen (Sialyla2-6GalNAca-Ser/Thr) bestehen [105, 126]. Die verkürzte Form der *Core*1-Struktur entsteht durch die weitgehende Supprimierung der *Core*1-β1-3-Gal-Transferase, die einen Gal-Rest an das Tn-Antigen verknüpft und somit die Core1-Struktur erzeugt, und die Hochregulierung der α 2-6-Sialyl-Transferase, die durch die Übertragung eines Sialinsäure-Restes an terminale Kohlenhydrat-Sequenzen einen Kettenverlängerungsabbruch bewirkt. Wird ein Sialinsäure-Rest an das Tn-Antigen geknüpft, bevor die Core1- bzw. Core3-Struktur synthetisiert wurden ist, so wird die Synthese der Core1-4-Strukturen [105] supprimiert, da die Glykosyl-Transferasen, die für die Bildung der Core1- und Core3-Strukturen verantwortlich sind, das sialysierte Tn-Antigen nicht als Substrat erkennen [105]. Die Core1-4 O-Glykanstrukturen können allerdings auch weiterhin synthetisiert werden, wenn die dafür notwendigen Glykosyl-Transferasen vor der α 2-6-Sialyl-Transferase aktiv sind. Allerdings kann auch in diesem Fall die α 2-6-Sialyl-Transferase vor einer Kettenverlängerung der Core1-Struktur bzw. vor der Umstrukturierung der Core1- zu Core2-Struktur aktiv sein (Bildung des sialyl-TF-Antigens) [105, 124-126] und somit ihre Synthese supprimieren.

Während bei Brust-und Kolon-Tumorzellen die O-Glykane in verkürzter Form gebildet werden, wird bei den gleichen Tumorzellen häufig bei Glykosylierungsänderungen von N-Glykanen eine erhöhte Oligosaccharid-Ausstattung gefunden (siehe Abb. 1.2). Der klassische Fall einer Glykosylierungsänderung von N-Glykanen bei Brust-und Kolon-Tumorzellen ist eine relative Zunahme an triantennärer N-Glykanen und somit ein erhöhter Anteil an einer β 1-6-Verzweigung [124: Kapitel 12]. Durch [124: Kapitel 3, 125]. Auch diese Art der Kettenverlängerung korreliert mit dem metastasierenden Potential der Brust- und Kolon-Tumoren [125]. Die Länge der Endstruktur der Laktosamin-Kette resultiert dabei aus der Balance zwischen der Aktivität einer bestimmten Fucosyl- bzw. der Sialyl-Transferase und der Glykosyl-Transferasen, die die Verknüpfung von GlcNAc- und Gal-Resten katalysieren, wobei die entstehenden Lewis^x-oder Lewis^a-Strukturen und ihre sialysierte Isoformen bei Brust-und Kolon-Tumorzellen vermehrt exprimiert werden [125]. Weitere Glykosylierungsänderungen eines N-Glykans, die häufig mit dem metastasierenden Potential eines Brust- oder Kolon-Tumors korrelieren, ist eine relative Zunahme eines GlcNAcβ1-4-Restes an der N-Core-Struktur ("bisecting"-GlcNAc) [125] und eine Zunahme an tetraantennärer Strukturen [125], aus der wiederum eine Zunahme an Sialinsäure-Reste resultiert [125].



Abb. 1.2: Protein-Glykosylierung und ihre Änderung bei Brust- und Kolon-Tumorzellen [modifiziert nach 105, 124-126]. N-Glykosylierung: Diese Abbildung zeigt nur einige möglichen Formen der Oligosaccharid-Ausstattung eines High-Mannose-Typs, eines Hybrid-Typs und eines komplexen N-Glykans (oben links). Die N-Glykan *Core*-Struktur ist mit hell grauen Boxen unterlegt. Die strukturellen Veränderungen von N-Glykanen (oben rechts) lassen sich beispielsweise durch eine relative Zunahme an tri- oder tetraantennärer N-Glykane, eine Zunahme an Poly-N-Acetyl-Laktosaminen ((Galβ1-4GlcNAc1-3)_n), einen erhöhten Anteil an N-Glykanen mit GlcNAc(β1-4)-Verzweigungen, eine erhöhte Kohlenhydratausstattung an Fucose [76, 77, 79], Sialinsäure-Resten und Lewis-Strukturen [80] beschreiben. O-Glykosylierung: Normale Brust- und Kolonzellen besitzen einen hohen Anteil an O-Glykanen, die überwiegend *Core* 1-4 tragen (unten links). Dagegen werden in Brust- und Kolon-Tumorzellen ein erhöhter Anteil an *Core*1-basierenden Strukturen und ihre sialysierten Formen, an Tn-Antigen (GalNAcα-Ser/Thr) und Sialyl-Tn-Antigen (Sialyla2-6GalNAcα-Ser/Thr) nachgewiesen (unten rechts).

1.1.2 Lektine und deren Einsatz

Der Begriff Lektin stammt von lat. "legere" für "auswählen" [125]. Lektine sind Proteine bzw. Glykoproteine, die die Fähigkeit besitzen, spezifische Glykokonjugate (u.a. Glykoproteine, Glykolipide) zu binden [125]. Die meisten Lektinen bestehen aus zwei, vier oder mehr meist gleichartigen Untereinheiten und besitzen eine oder mehrere Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen (Carbohydrate Recognition Domain, CRD), an denen das Glykokonjugat gebunden wird [124: Kapitel 8]. Durch ihre charakteristische Tertiärstruktur in der CRD binden sie spezifisch und reversibel nur an bestimmte terminale oder interne Kohlenhydrat-Reste bzw. Glykan-Motive [125]. Dabei müssen die Glykanstrukturen für das Lektin unbedingt zugänglich sein [125]. Die spezifische und reversible Bindung der CRDs an bestimmte Hydroxylgruppen des Kohlenhydratringes erfolgt dabei vor allem über Wasserstoffbrücken [125]. Die Affinitäten für Monosaccharide liegen in der Regel im millimolaren Bereich [45], dagegen werden Oligosaccharide erheblich besser gebunden [45]. Bei der Komplexbildung zwischen dem Lektin und dem Glykokonjugat sind nicht nur die Kohlenhydratanteile allein entscheidend. Zusätzliche Protein-Protein-Wechselwirkungen (schwache Bindungen zwischen den Aminosäuren des Lektins und denen des Glykoproteins) können den Komplex stabilisieren [45]. Lektine sind ubiquitär in der Natur verbreitet (Viren, Bakterien, Pflanzen, Invertebraten, Vertebraten) [125]. Basierend auf Sequenzhomologien und Strukturanalysen der CRD werden tierische Lektine in acht Familien (Calnexine, M-Typ, L-Typ-, C-Typ-, I-Typ, P-Typ-, R-Typ-Lektine und Galektine) eingeteilt [124: Kapitel 8]. Die Klassifizierung der Lektine basiert dabei auf der Primärstruktur ihrer CRDs. Trotzdem können die CRDs verschiedener Lektinklassen gleiche Glykane binden [124, Kapitel 8]. Obwohl Lektine in den verschiedensten Pflanzen und Mikroorganismen gleiche spezifische Glykan-Strukturen erkennen, zeigen tierische Lektine einige spezielle biologische Funktionen. Während beispielsweise pflanzliche Lektine auch freie Oligosaccharide (Oligosaccharine) für Signalkaskaden (z. B. Wachstum, Entwicklung und Abwehr) verwenden können [124, Kapitel 10], erfolgt die Steuerung wichtiger Erkennungs- und Signalprozesse in Säugerzellen nur über Zellmembran-gebundene Lektine [124, Kapitel 8]. Bei maligner Transformation spielen diese sogenannten Glykorezeptoren eine wichtige Rolle, indem sie elementare Funktionen wie die Zell-Zell-Interaktion, Zell-Adhäsion und Zell-Erkennung steuern. Für die Unterscheidung von Glykanstrukturen auf Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen werden Zellmembran-gebundene Lektine aus Säugetieren, deren Expressionsmuster auf bestimmten Zellen bekannt ist, gegenüber von Pflanzenlektinen zunehmend der Vorzug gegeben, da ihr charakteristisches Kohlenhydrat-Erkennungsmuster Rückschlüsse auf mögliche Zell-Zell-Erkennung erlaubt. Dagegen werden für affinitätschromatographische Aufarbeitungen von Glykokonjugaten (Glykoproteine, Glykolipide) in einem Gemisch pflanzliche Lektine aufgrund ihrer leichteren Verfügbarkeit häufiger als tierische Lektine eingesetzt. Beispielsweise kann zur Anreicherung von Glykoproteinen das Wheat Germ Agglutinin (WGA) aus Tritium vulgaris (Familie *Gramineae*) verwendet werden. Das WGA-Lektin ist ein extrem stabiles Protein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa [106]. Es liegt als Homodimer vor, wobei jede Polypeptidkette zwei CRDs besitzt [106]. Das WGA bindet spezifisch an N- und O-Glykane von Glykoproteinen mit β 1-4-N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc(β 1-4))-Resten [106-109]. Damit sind auch GlcNAc(β 1-4)-Reste in Poly-N-Acetyl-Laktosamine Typ II [108] und GlcNAc(β 1-4)-Reste von Lewis-Strukturen und *"bisecting"*-GlcNAc(β 1-4)-Resten [109] gemeint, wobei ein *"bisecting"*-GlcNAc(β 1-4) nur bei N-Glykanen vorkommt. Das WGA-Lektin bindet ferner unabhängig von der Art der glykosidischen Bindung (α 2-3, α 2-6) an terminale Sialinsäure-Reste von N- und O-Glykanen [106, 107], somit auch an Sialinsäure-Reste von Sialyl-Lewis-Strukturen. Dabei ist die Affinität des WGA-Lektins zu GlcNAc(β 1-4) drei- bis fünfmal höher als die zu Sialinsäure-Resten [110]. Ein anderes Pflanzenlektin, das auch häufig für eine Affinitätsreinigung von Glykoproteinen eingesetzt wird, ist das Concanavalin A (Con A) aus der Jackbohne. Das Con A-Lektin besitzt Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen für Glukose und Mannose [107] und bindet spezifisch nur N-glykosylierte Proteine, die diese Kohlenhydratreste tragen.

1.1.3 Antikörper und ihre Herstellung

Die Immunglobuline oder Antikörper sind die wichtigsten Funktionsträger der humoralen Immunantwort bei höheren Vertebraten [1]. Sie besitzen die Fähigkeit, immunogene Strukturen hochspezifisch zu binden und Effektorfunktionen zu vermitteln. Sie sind eine Gruppe von Glykoproteinen, die im Serum und in der Gewebeflüssigkeit aller Säuger vorhanden sind und die gebildet werden, wenn das lymphatische System des Organismus mit fremden immunogenen Molekülen (Antigenen) in Kontakt kommt [2]. Da nur Wirbeltiere über die Möglichkeiten einer klonalen Immunantwort verfügen, kann die Generierung von poly- oder monoklonalen Antikörpern nur durch Tierversuche ermöglicht werden. Dies bedarf der Immunisierung von Tieren mit dem jeweiligen Antigen und die nachfolgende Isolierung der Antikörper. Die Herstellung polyklonaler Antiseren ist verhältnismäßig einfach und für das Versuchstier wenig belastend. Durch die Immunisierung eines Säugers mit einem bestimmten Antigen entwickelt das Immunsystem spezifische Antikörper gegen einige der Epitope des Antigens [3]. Die Gesamtheit aller Antikörper im Serum gegen das Antigen ist polyklonal (pAk). Jeder aktivierte Plasmazell-Klon sezerniert jedoch Antikörper einer bestimmten Spezifität, gerichtet gegen eine antigene Determinante, d. h. einen monoklonalen Antikörper (mAk).

Antikörper werden in fünf Hauptklassen unterteilt, die sich anhand ihrer schweren Ketten den Isotypen IgG, IgM, IgA, IgE und IgD zuordnen lassen [1]. Sie unterscheiden sich voneinander in Größe, elektrischer Ladung, Zusammensetzung ihrer Aminosäuren, in ihrem Kohlenhydratanteil und der Art der Glykosylierung [2, 3, 124: Kapitel 4, 12]. Konventionelle Säuger-IgG-Antikörper sind aus vier Polypeptidketten (Abb. 1.3, links), jeweils zwei identischen leichten Ketten (L-Kette, ca. 25 kDa) und

zwei schweren Ketten (H-Ketten, ca. 50 kDa) aufgebaut, die dem Immunglobulin eine Y-förmige Struktur verleihen [3]. Die einzelnen Ketten falten sich in mehrere kompakte Immunglobulin-Domänen mit einer Größe von ca. 110 Aminosäuren [3]. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne, die schweren Ketten aus einer variablen (V_H) und mehreren konstanten Domänen (C_H1 bis C_H3). Dabei tragen die C_H2-Domänen ein definiertes komplexes biantennäres desialysiertes N-Glykan [124, Kapitel 12]. Zwischen der C_H1- und der C_H2-Domäne befindet sich eine Scharnier-Region (*hinge region*). Die Scharnier-Regionen beider schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander kovalent verknüpft [3]. Die C-terminalen konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten sind hoch konserviert, während die N-terminalen Regionen sich durch eine hohe Sequenzvariabilität auszeichnen und verantwortlich für die Antigenbindung sind [3]. Die antigenbindenden variablen Regionen bestehen aus sogenannten CDR-(*Complementary Determining Regions*) und FR-Regionen (*Framework Regions*). Sowohl schwere als auch leichte Ketten weisen je 3 CDRs auf, die eine extrem hohe Variabilität hinsichtlich der Sequenz und der Länge zeigen [1, 3]. Die Sequenz der die CDRs trennenden FR-Regionen ist höher konserviert.

Neben den beschriebenen konventionellen Antikörpern enthalten Cameliden (Kamele und Lamas) und Elasmobranchier (Haifische und ihre Verwandte) in ihrem Serum zusätzlich homodimere Antikörper, bei denen die leichten Ketten und die C_H1-Domänen fehlen [5, 24-28, 30] (Abb. 1.3, rechts). Sie setzen sich lediglich aus zwei schweren Ketten zusammen, bestehend aus den konstanten Domänen C_H2 und C_H3 sowie der variablen Domäne der schweren Kette [24, 25]. Die eigentlichen Antigenbindungsstellen dieser Schwerketten-Antikörper werden V_HH-Domänen genannt und sind mit einer Größe von 11-15 kDa die kleinsten natürlich vorkommenden Antigenbindungsstellen [1]. Die verbesserte Löslichkeit dieser Antikörper ergibt sich aus Substitutionen von Aminosäuren an deren Oberfläche, die normalerweise durch die hydrophobe variable Region einer leichten Kette abgedeckt wäre [5, 25-28, 30]. Die durch Fehlen der V_L-Domänen verringerte Komplexität dieses Antikörper-Repertoires gleichen die Tiere dadurch aus, daß die CDR3-Regionen dieser Immunglobuline, verglichen mit humanen Sequenzen, länger und heterogener aufgebaut sind [1, 29-31].



Abb. 1.3: Konventionelle Antikörper versus Cameliden-Schwerketten-Antikörper [42].

Zur Gewinnung von Antikörpern wurde in der vorliegenden Arbeit Antikörpern aus Lama glama vor anderen Spezies der Vorzug gegeben, da die Schwerketten-Antikörper in einigen Eigenschaften den konventionellen Antikörpern überlegen sind. Die Schwerketten-Antikörper besitzen zwar vergleichbare Bindungseigenschaften wie die konventionellen Antikörper, allerdings weisen sie eine erhöhte Stabilität gegenüber Temperatur und niedrigen pH-Werten auf [5, 25]. In der vorliegenden Arbeit sollen die Antikörper auf einer Matrix immobilisiert und für eine Immun-Affinitäts-Chromatographie eingesetzt werden, wobei mehrere Male bei extrem niedrigen pH-Werte gearbeitet werden soll. Daher ist es von Vorteil, mit Antikörpern zu arbeiten, die durch niedrige pH-Werte nicht irreversibel denaturiert werden. Eine weitere Besonderheit der Schwerketten-Antikörper, die jedoch für die vorliegende Arbeit nicht von zentraler Bedeutung war, ist die verhältnismäßig einfache heterologe Expression ihrer Antigenbindungsstellen. Zur Klonierung der konventionellen Antikörper müssen stets zwei Strukturgene parallel gehandhabt und gleichzeitig exprimiert werden, während die Expression der V_HH-Domänen aus Cameliden Schwerketten-Immunglobulinen einen Ausweg bieten, aufwendige technische Produktionsverfahren (Hybridom-Technik) zu umgehen und Antikörper z. B. in prokaryotischen Systemen zur Expression zu bringen. Eine der grundlegenden Techniken zur Selektion von Antikörpern beruht dabei in der Präsentation auf der Oberfläche von Phagen, dem so genannten Phage-Display [41].

1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines empfindlichen Verfahrens, das es ermöglichen soll, gering konzentrierte diagnostisch relevante Proteine im Blutplasma zu quantifizieren, ohne daß deren Identität im vorhinein bekannt ist. Die großen Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Proteine im Plasma (10⁹-10¹⁰) [59, 65] erfordert zwingend eine Abreicherung der hoch abundanten Plasmaproteine, um niedrig abundante Proteine im Plasma zu detektieren und zu quantifizieren, da der dynamische Bereich (also der Bereich, in dem eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Signalintensität besteht) für das derzeit empfindlichste Detektionsverfahren, die LC-MS, bei nur etwa 10²-10⁴ liegt [59, 63]. Eine der gängigsten Methoden zur Reduktion der Komplexität des Plasmas ist die Aufteilung des Plasmaproteoms in Subproteome. Da es sich bei den meisten bisher entdeckten diagnostisch relevanten Proteinen um glykosylierte Proteine handelt [125], kann das Glykoproteom als vielversprechendes Proteom zur Entdeckung weiterer krankheitsspezifischer Proteine angesehen werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Suche nach diagnostisch relevanten Proteinen auf glykosylierte Proteine beschränkt.

Um die Analyse diagnostisch relevanter Glykoproteine in humanem Plasma zu ermöglichen, sollen in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz von Lektinen und Antikörpern zwei affinitätschromatographische Schritte miteinander kombiniert werden (Abb. 1.4). Dafür sollen zunächst zwei unterschiedliche Glykoproteomfraktionen eines Normalplasmas, die über die affinitätsschromatographische Aufarbeitung mit den Pflanzenlektinen Concanavalin A (Con A) und Wheat Germ Agglutinin (WGA) gewonnen werden, miteinander verglichen werden. Das Con A-Lektin besitzt Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen für Glukose- und α -Mannose-Reste [107], die überwiegend in N-verknüpften Glykanen vorkommen. Dagegen bindet das WGA hochspezifisch an N-Acetyl-Glukosamin- und Sialinsäure-Reste sowohl von N- als auch von O-Glykanen [106-110]. Durch die Anreicherung glykosylierter Plasmaproteine über eine Lektin-Affinitäts-Chromatographie wird somit eine entsprechende Abreicherung von Albumin, von anderen nicht glykosylierten Plasmaproteinen und von Glykoproteinen, die nicht spezifisch von dem jeweiligen Lektin gebunden werden, erreicht. Um einen möglichst hohen Abreicherungsgrad an Plasmaproteinen zu erreichen, soll dann das Lektin gewählt werden, mit dem eine kleinere Fraktion der Glykoproteine selektiert werden kann. Die massenspektrometrische Analyse unbekannter gering konzentrierter Plasmaproteine ist jedoch durch die alleinige Anreicherung von Glykoproteinen nicht möglich [107, 143-146], da höher konzentrierte Plasmaproteine des untersuchten Glykoproteoms ihre Analyse erschweren, indem sie durch Überlagerungen eine massenspektrometrische Analyse niedrig konzentrierter Proteine nicht zulassen. Die Identifizierung niedrig konzentrierter krankheitsspezifischer Glykoproteine des Plasmas erfordert daher eine zusätzliche Abreicherung der hoch abundanten Plasmaproteine des untersuchten Teilglykoproteoms. Die Lektin-gebundene Plasmaproteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen soll deshalb für die Immunisierung eines Säugers eingesetzt werden, um spezifische Antikörper gegen diese Proteinfraktion aus Normalplasma zu erhalten. Aufgrund der biologischen Varianz des Plasmaproteinprofils jedes Menschen [59], das von der genetischen Disposition, dem Geschlecht, dem Körpergewicht, dem Alter und durch die Lebensweise (Ernährung, körperliche Aktivität, Medikamentengebrauch, Drogenkonsum etc.) und viele andere Umweltfaktoren beeinflusst werden kann, soll für die Induktion von Antikörpern ein Plasmagemisch von gesunden Kontrollpersonen eingesetzt werden, um möglichst viele Antikörper gegen die Proteine aus Normalplasma zu induzieren.



Abb. 1.4: Nachweis von diagnostisch relevanten gering konzentrierten Glykoproteine in humanem Plasma. Erläuterungen siehe Text.

Zur Gewinnung von Antikörpern gegen die Lektin-gebundenen Proteine aus Normalplasma soll ein *Lama glama* gegen diese Proteinfraktion immunisiert werden. Cameliden (Kamele und Lamas) bilden neben konventionellen Antikörpern auch Antikörper, denen die leichte Kette und die C_H1-Domäne fehlen [5, 24-28, 30]. Im Vergleich zu konventionellen Antikörpern besitzen diese sogenannten Schwerketten-Antikörper eine höhere chemische und thermische Stabilität [24, 25]. Deshalb sollen aus dem Lama-Antiserum nur die Schwerketten-Antikörper isoliert und auf eine Matrix immobilisiert werden. Durch die Immobilisierung der Cameliden-Schwerketten-Antikörper soll dann ein Immunabsorbens hergestellt werden, das die regulär vorkommenden Proteine der Lektingebundenen Plasmafraktion vollständig bindet. Dadurch würde die Möglichkeit bestehen, die Proteine, die nur im Plasma von Gesunden enthalten sind, abzureichern und so die Proteine, die erst krankheitsbedingt ins Blutplasma sezerniert werden, im Durchlauf der Affinitäts-Chromatographie anzureichern.

Bevor jedoch das Immunabsorbens für die Analyse diagnostisch relevanter gering konzentrierter Plasmaproteine eingesetzt werden kann, ist es notwendig, seine Bindungseigenschaften gegenüber den Proteinen des Normalplasmas zu charakterisieren. So muss der genaue Abreicherungsgrad der einzelnen Plasmaproteine quantifiziert werden. Dadurch soll eine Optimierung der Bedingungen für eine Immun-Affinitäts-Chromatographie (IAC) ermöglicht werden, um eine maximale Anreicherung analytisch interessanter Proteine in den untersuchten Patientenplasmen zu erreichen. Nach erfolgreicher Optimierung der IAC soll zum Nachweis unbekannter, gering konzentrierter, diagnostisch relevanter Glykoproteine im Blutplasma wie folgt vorgegangen werden: Das Blutplasma des Patienten soll ebenfalls an das Lektin gebunden werden. Durch die Anreicherung von Glykoproteinen des Patientenplasmas wird eine erste Reduktion der Plasmakomplexität und der Konzentrationsdifferenz der Plasmaproteine erreicht. Um eine zweite Reduktion der Plasmakomplexität zu erzielen, soll die Lektin-gebundene Plasmaproteinfraktion des Patienten weiter über das Immunabsorbens passiert werden. Da die Cameliden-Antikörper nur gegen Glykoproteine gerichtet sind, die im Normalplasma vorkommen, sollten Proteine, die bedingt durch eine Krankheit ins Blut abgegeben werden, nicht gebunden werden. Diagnostisch relevante Glykoproteine sollten sich demnach in der nicht gebundenen Fraktion der Antikörper-Chromatographie befinden und sollen dann mittels einer LC-MS-Analyse identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob ein solches Verfahren zur Identifizierung diagnostisch relevanter gering konzentrierter Glykoproteine des Plasmas realisierbar ist. Hierfür soll das Verfahren mit Plasmen von Patienten getestet werden, die unter einer definierten Krankheit leiden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, von höchstem erhältlichen Reinheitsgrad und wurden nicht weiter gereinigt. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde durch eine Reinstwasser-Anlage gereinigt, für die HPLC- und Massenspektrometrie-Experimente wurde LiChrosolv-Wasser (Merck, Darmstadt) verwendet.

2.1.2 Puffer, Reagenzien und Lösungen

Für HPLC-Verfahren wurde 1 Tablette *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) (Invitrogen, Karlsruhe) pro 100 ml LiChrosolv Wasser aufgelöst. Dieser PBS-Puffer enthält 10 mM Phosphat, 150 mM Natriumchlorid, pH 7.2. Für andere Arbeiten wurden Dulbecco's *Phosphate-Buffered Saline* (D-PBS) (1X) liquid (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

ELISA- und Western Blotting-Puffer:

10xTBST (in 2 l dH₂O): 180 g NaCl 200 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0 50 ml Tween Blotting-Puffer: 10 % Methanol 25 mM Tris, pH 8.3 150 mM Glycin

<u>SDS-PAGE:</u>	
Proteinfällung:	50% Ethanol
	25% Aceton
	25% Methanol
10 x Lämmli-Laufpuffer:	55,6 g Tris-Base
	288,2 g Glycin
	10 % SDS
	ad 2 I dH ₂ O
5 x Lämmli-Probenpuffer:	8 ml 1 M Tris-HCl, pH 6.8
	2 g SDS
	1,5 g DTT
	10 ml Glycerol
	500 μl 0,02 % Bromphenolblau
	ad 20 ml dH ₂ O

SDS-Gelzusammensetzung:

Tab. 2.1: Sammel- und Trenngel-Zusammensetzung.

Sammelgel:	5 %	Trenngel (1,5 mm):	9 %	12%
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bis	670 μl	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bis	6 ml	8 ml
1 M Tris/HCl, pH 6.8	870 μl	3 M Tris/HCl, pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	70 µl	10 % SDS	200 µl	200 µl
10 % APS	70 µl	10 % APS	60 µl	60 µl
TEMED	7 µl	TEMED	8 µl	8 µl
dH ₂ O	5,2 ml	dH ₂ O	11,5 ml	9,5 ml

2D-SDS-PAGE:

Lysemix:	8 M Harnstoff
	30 mM Tris
	15 mM EDTA
Resuspendierungspuffer:	7 M Harnstoff
	2 M Thiobarnstoff
	0,02 % Bromphenolblau
Elektrodenpuffer:	250 mM Tris
	200 mM Glycin
	0,1 % SDS
Äquilibrierungspuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8,8
	6 M Harnstoff
	30 % Glycerin
	2 % SDS
	0,02 % Bromphenolblau
Transferpuffer:	50 mM Tris
	40 mM Glycin
	0,02 % SDS
	10 % Ethanol
Fixierlösung:	30 %Ethanol
	2 % Phosphorsäure

Proteinfärbung:

kolloidales Coomassie:	10 % Ammoniumsulfat
	1 % Brilliantblau Coomassie G-250
	8 % ortho-Phosphorsäure
	20 % ml Ethanol

Proteinmarker:

- Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Karlsruhe)
- Mark12[™] Unstained Standard (Invitrogen, Karlsruhe)

Lektinfraktionierung:

WGA-Waschpuffer:	0,2 M Tris HCl, pH 7.5
	0,1 M NaCl
	1 mM EDTA
WGA-Elutionspuffer:	0,5 M N-Acetyl-D-Glukosamin in WGA-Waschpuffer
Con A-Waschpuffer:	0,2 M Tris HCl, pH 7.5
	0,1 M NaCl
	1 mM CaCl ₂
	1 mM MnCl ₂
Con A-Elutionspuffer:	0,2 M α -Methyl-D-Mannosid in Con A-Waschpuffer

2.2 Methoden

2.2.1 Immunisierung von Cameliden-Antikörpern

Für die Aufkonzentrierung der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus humanem Plasma wurden Microcon *YM-10 Centrifugal Filter Unit* (Millipore, USA, Billerica) mit einer Molekulargewicht-Ausschlußgrenze von 10 kDa verwendet. Es wurden jeweils 500 μl Probe in das Probenresevoir pipettiert, die Probe für 15 min bei 10 000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Antigenpräparationen für die Injektion bestand aus jeweils 625 μl Adjuvant (Stimmune, Cedi Diagnostics B.V.) und 500 μl der WGA-gebundenen Proteinfraktion mit einer Konzentration von 2 mg/ml. Für die Immunisierung eines Cameliden wurde ein *Lama glama*, das im Institut für Tierzucht und Haustiergenetik in Göttingen untergebracht ist, eingesetzt. Das Schema für die Protein-Immunisierungen und Blutprobeentnahmen sind aus Tab. 2.2 zu entnehmen. Dem Lama wurde die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen injiziert. Die Blutentnahme erfolgte nach drei Wochen. Die Proben wurden für 10 min bei 2 500 rpm abzentrifugiert, um die zellulären Bestandteile vom Serum abzutrennen. Das Lama-Antiserum wurde bei - 20 °C gelagert.

Immunisierung	Datum
Blutentnahme & Prä-Immunisierung	14.12.2005
Blutentnahme & Protein-Boost	25.01.2006
Blutentnahme & Protein-Boost	15.02.2006
Blutentnahme & Protein-Boost	08.03.2006
Blutentnahme	16.03.2006
Blutentnahme	12.04.2006
Blutentnahme	03.05.2006
Protein- <i>Boost</i>	07.09.2006
Blutentnahme	20.09.2006
Protein- <i>Boost</i>	22.02.2007
Blutentnahme	20.03.2007
Protein- <i>Boost</i>	07.06.2007
Blutentnahme	03.07.2007
Protein-Boost	11.10.2007
Blutentnahme	05.11.2007
Protein-Boost	11.04.2008
Blutentnahme	06.05.2008
Protein- <i>Boost</i>	19.09.2008
Blutentnahme	07.10.2008
Protein- <i>Boost</i>	07.11.2008
Blutentnahme	01.12.2008

Tab.2.2: Schema für die Proteinimmunisierungen und Blutprobeentnahmen.

2.2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In 22 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (MaxiSorp Nunc-Immuno Moldule, Nunc, Dänemark, Roskilde) wurden jeweils 100 µl einer 0,004 µg/µl WGA-gebundenen Proteinfraktion aus Normalplasma für sieben Doppelbestimmungen und acht Leerwerte pipettiert und über Nacht unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit jeweils 200 µl TBST wurden unspezifische Bindungsstellen mit 200 µl einer 3 %-igen BSA-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) in PBS pro Vertiefung für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Vertiefungen wurden dreimal mit TBST gewaschen. Für den Nachweis der WGA-gebundenen Proteinfraktion wurden die Vertiefungen mit jeweils 100 µl einer 0,01 µg/µl Lama-Antiserum-Lösung des jeweiligen Zeitraums 14.12.2005 (Prä-Immunserum) bis 03.05.2006 inkubiert, wobei immer eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Die Inkubation mit den Lama-Antiseren erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden dreimal mit 200 µl TBST gewaschen. Die Bindung von Cameliden-IgG an der WGAgebundenen Proteinfraktion wurde durch Zugabe von jeweils 100 µl 1:30 000 in TBST Llama IgG (h+l) Antibody HRP conjugated (BETHYL Laboratories, USA, Montgomery) und darauf folgender einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur nachgewiesen. Anschließend wurden alle Vertiefungen dreimal mit 200 µl TBST gewaschen und durch eine Farbreaktion mittels ABTS detektiert (PCR ELISA DIG Detection, Roche, Mannheim). Hierfür wurden 200 µl der Färbelösung in jede Vertiefung gegeben und 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen.

2.2.3 Western Blot

Für den Transfer wurde das "*Semidry-Blot*"-Verfahren [9] verwendet. Eine auf Gelgrösse zugeschnitte Polyvinyldifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore, USA, Billerica) wurde für 30 s in Methanol äquilibriert, 1 min lang in dH₂O geschwenkt und bis zum Transfer im Blottingpuffer (siehe Kapitel 2.1.2) aufbewahrt. Anschließend wurde das Gel im Transfergerät (Pegasus S, Firma Phase, Lübeck) auf der PVDF-Membran zwischen drei Lagen zuvor in Blotpuffer getauchtem Blotpapier gelagert und der Transfer bei einer Stromstärke von 300 mA über 60 min durchgeführt.
2.2.4 Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden freie Bindungsstellen der Membran mit einer 3 %-igen BSA-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) in TBST über Nacht bei 4 °C blockiert. Die Membran wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt und mit dem Primär-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Spezifitätsuntersuchungen der Cameliden-Antikörpern wurde 1 ml einer 1 µg/µl Antikörperlösung eingesetzt. Für den Nachweis einer CEA-Bindung wurde die Membran mit 1 ml einer monoklonalen Maus-T84.1 Antikörper-Lösung (2 ml, 1:500, Institut für Klinische Chemie, UKE) inkubiert. Die Membran wurde sechsmal für je 10 min mit TBST gewaschen. Cameliden-Antikörper wurden mit Llama IgG (h+l) Antibody HRP conjugated (BETHYL Laboratories, USA, Montgomery) (1: 50 000) für 1 h bei Raumtemperatur nachgewiesen. Der Maus-T84.1-Antikörper wurde durch die Inkubation der Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Rabbit-Anti-Mouse-HRP (1:25 000, Institut für Klinische Chemie, UKE) nach gewiesen. Die Membran wurde anschließend sechsmal für je 10 min mit TBST gewaschen. Zur Visualisierung der Proteine wurde die Membran für 1 min mit der ECL-Lösung (GE Healthcare, München) inkubiert, anschließend für 1 min getrocknet und zwischen Klarsichtfolie in eine Entwicklungskassette gelegt. Die Membran wurde im Dunkelraum auf einen Amersham Hyperfilm[™] ECL (GE Healthcare, München) gelegt, der durch die Chemolumineszenz der ECL-Färbung belichtet wurde. Falls nicht anderes erwähnt, betrug die Zeit der Exponierung 3 min.

2.2.5 Immunpräzipitation

100 µl Protein G-SepharoseTM 4 Fast flow (GE Healthcare, München) Material wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Auf das Säulenmaterial wurden 100 µl PBS gegeben und für 15 s bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, so dass das Säulenmaterial mit etwa 30 µl Flüssigkeit überbeschichtet war. Dieser Vorgang wurde zum Äquilibrieren des Protein G-Materials zweimal wiederholt. Zur Protein G-Sepharose wurden 25 µg Cameliden-Antikörper clgG3 (gelöst in 100 µl PBS) gegeben und über Nacht unter Mischen inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz dreimal mit 100 µl PBS gewaschen und der Überstand verworfen. Die an das Protein G-Säulenmaterial gebundenen Antikörper wurden anschließend zusammen mit 5 µg der WGAgebundenen Proteinfraktion (in 100 µl PBS) für 2 h bei 4 °C über Kopf inkubiert. Nach 10 s Zentrifugation bei 14 000 rpm wurden die nicht gebundenen Proteine vom Präzipitat abgetrennt und der Überstand in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Der Ansatz wurde drei weitere Male mit jeweils 100 µl PBS gewaschen und die Überstände gesammelt. Um die gesamte nicht gebundene Proteinfraktion mittels einer SDS-PAGE zu analysieren, wurde der Überstand der Immunpräzipitation (IP) einer Proteinfällung unterzogen (Kapitel 2.2.10.1). Das gefällte Proteinpellet wurde in 40 µl Lämmli-Puffer für 5 min bei 95°C erhitzt und für 30 s bei 14 000 rpm zentrifugiert und bis zur SDS-PAGE auf Eis aufbewahrt. Das Protein G-Material wurde mit 40 µl Lämmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt und für 30 s bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die gesamte Proteinfraktion des Überstandes wurde auf einem 9 %-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Um eine Proteinüberladung (bedingt durch die relativ hohe Antikörpermenge) zu vermeiden, wurde vom immunpräzipitierten Material nur 10 µl auf das Gel aufgetragen. Zur Kontrolle der IP wurde eine gleiche Proteinmenge der WGA-gebundenen Lektinfraktion (5 µg) auf das Gel mit aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5 µl *SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained* Standard der Firma Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Das Western Blotting und die Immunodetektion mit den Schwerketten-Antikörpern clgG3 erfolgte wie oben beschrieben (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4).

2.2.6 Immobilisierung der Cameliden-Antikörper (clgG)

Für die Immobilisierung von Cameliden-Schwerketten-Antikörpern clgG3 an vier verschiedene kommerziell erhältliche Matrizen wurde eine gegen PBS dialysierte Antikörper-Lösung eingesetzt. Für die Dialyse wurden Slide-A-Lyser[®]-Dialyse-Kassetten (Pierce, USA, Rockford) mit einer Molekulargewicht-Ausschlußgrenze von 30 kDa eingesetzt [21]. Für die Aufkonzentrierung der Antikörper-Lösung wurden *Microcon YM-50 Centrifugal Filter Unit* (Millipore, USA, Billerica) mit einer Molekulargewicht-Ausschlußgrenze von 50 kDa verwendet. Es wurden 1 mg Cameliden-Schwerketten-Antikörper Subtyp clgG3 an jeweils 1 ml Trägermaterial nach Vorschrift des jeweiligen Herstellers kovalent an die Matrix gebunden.

Für die ungerichtete Immobilisierung der clgG3 wurden *CNBr-activated Sepharose*TM 4B [4] und *NHS-activated Sepharose*TM [12] (GE Healthcare, München) verwendet. Bei der Aktivierung von Sepharose mit CNBr (Abb. 2.1) und NHS (Abb. 2.2) erfolgt die kovalente Bindung von Antikörpern über die primären Amine der Antikörper [4, 14]. Diese Bindung kann spontan an jeder primären Aminogruppe des Antikörpers geschehen und ist somit nicht auf die konstante Fc-Region beschränkt [4, 14], d. h. die Antikörper werden ungerichtet an die Matrix kovalent gebunden [149].

Für eine gerichtete Immobilisierung der clgG3 wurden zwei Säulenmatrizen getestet. Zu einem wurden die Antikörper an eine Hydrazid-Matrix [14] gekoppelt (*CarboLink™ Coupling Gel*, Pierce, USA, Rockford). Bei der Immobilisierung der Antikörper an eine Hydrazid-Matrix werden die biantennären komplexen N-verknüpften [124] Kohlenhydratreste der Immunglobuline ausgenutzt [14]. Diese Art der Immobilisierung basiert auf einer Oxidierung der *cis*-Hydroxylgruppen von Kohlenhydratringen mit dem Natrium *meta*-Periodat [14]. Die resultierende Aldehyd-Gruppe reagiert dann spontan mit der Hydrazid-Gruppe der Matrix [14]. Auf diese Weise entsteht eine stabile Hydrazon-Bindung [14]. Da die Immunglobuline nur in der CH₂-Domäne Kohlenhydratreste tragen

[124], kann bei einer optimalen Einstellung des Oxidationsmittels eine kovalente Bindung der Hydrazid-Matrix mit der Antigenbindungsstelle des Antikörpers ausgeschlossen werden. Ansonsten können bei dem Einsatz einer hohen Konzentration des Oxidationsmittels auch die OH-Gruppen von Aminosäuren-Resten des Antikörpers oxidiert werden, die dann ebenfalls mit der Hydrazid-Matrix zu einer stabilen Bindung reagieren und somit zu einer verringerten Bindungskapazität des Immunabsorbens führen. Zum anderen wurden die Cameliden-Schwerketten-Antikörper kovalent an einer Protein G-Matrix (*Seize X Protein G Immunoprecipitation Kit*, Pierce, USA, Rockford) gebunden. Die Immobilisierung von Antikörpern an Protein G beruht auf einer verbesserten klassischen Methode einer Immunpräzipitation. Hierbei werden die Antikörper zunächst über die Fc-Region an Protein G gebunden und anschließend mit Disuccinimidylsuberat (DSS) durch Quervernetzung an das Protein G kovalent verknüpft [141]. Bei dieser Immobilisierung resultiert eine gerichtete Bindung der Antikörper an die Matrix [141]. Allerdings können bei einer hohen Konzentration des Quervernetzers DSS auch die Aminosäuren-Reste des Antikörpers miteinander verknüpft werden, die dann die Bindungscharakteristik des Antikörpers negativ beeinflussen.

$$KP_{clgG3} = 100\% - \frac{m_{clgG3,D}}{m_{clgG3,Input}} \cdot 100\%$$
 (Gleichung 2.1)

Aus dem Waschpuffer nach der Kopplung wurde mittels einer Absorptions-Messung bei 260 nm und 280 nm die Menge an nicht gebundenem Protein bestimmt und daraus die Kopplungsrate (Gleichung 2.1) ermittelt. Für die gerichtete Immobilisierung der Cameliden-Antikörper im präparativen Maßstab wurde das *CarboLink™ Coupling Gel*-Material der Firma Pierce (USA, Rockford) eingesetzt. Hierfür wurden 60 ml einer 3 mg/ml Cameliden-Antikörper-Lösung in PBS für die Kopplung auf 60 ml Matrix eingesetzt. Die Immobilisierung der Cameliden-Antikörper erfolgte wie oben beschrieben nach Angaben des Herstellers [14].

2.2.7 Batch-Chromatographie

2.2.7.1 Con A- und WGA-Affinitäts-Chromatographie

Für die Concanavalin A (Con A)-Lektinfraktionierung wurden 7 ml Con A-Agarose (7,6 mg Lektin/ml, Sigma Aldrich, München) in eine 10 ml Zentrifugalsäule (Pierce, USA, Rockford) überführt. Das Con A-Material wurde mit 25 ml dH₂O gewaschen. Das humane Plasma (Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) aus gesunden Kontrollpersonen (1 ml) wurde auf Eis aufgetaut und anschließend 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand des Plasmas wurde über eine 0,22 µm Zentrifugaleinheit (Spin-X, Omnilab, Bremen) steril filtriert. Das Plasma wurde mit 9 ml Con A-Waschpuffer versetzt und auf die Con A-Säule geladen. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur mit Rotation. Der Durchlauf der Con A-Lektinfraktionierung wurde verworfen. Das Lektin-Säulenmaterial wurde solange mit Con A-Waschpuffer gewaschen, bis in der letzten Fraktion die OD bei 280 nm < 0,01 betrug. Zur Elution der Con A-gebundenen Proteinfraktion wurden 10 ml 0,2 M α-Methyl-D-Mannosid in Con A-Waschpuffer auf die Lektin-Säule gegeben und der Ansatz für 2 h bei Raumtemperatur mit Rotation inkubiert. Die eluierte Proteinfraktion wurde in 2 ml-Fraktionen in LoBind Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) gesammelt. Anschließend wurde die Con A-Säule solange mit dem Con A-Elutionspuffer gespült, bis die gemessene Absorption bei 280 nm der Absorption einer Protein-freien Lösung des Con A-Elutionspuffers entsprach. Das Säulenmaterial wurde dann mit dem Waschpuffer gewaschen. Auf diese Weise wurden die am Lektin gebundenen Mannose-Reste vom Säulenmaterial entfernt. Das Säulenmaterial wurde insgesamt mit dem fünffachen Säulenvolumen Con A-Waschpuffer gewaschen, mit LiChrosolv Wasser gespült und anschließend mit 20%-igem LiChrosolv Ethanol (Merck, Darmstadt) bei 4 °C gelagert. Auf die gleiche Weise wurde eine Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Lektinfraktionierung des humanen Plasmas nach dem Batch-Verfahren durchgeführt. Hierbei wurden 7 ml WGA-Agarose (4,8 mg Lektin/ml, Sigma Aldrich, München) eingesetzt. Als Waschpuffer wurde der WGA-Waschpuffer verwendet. Die Elution der WGA-gebundenen Proteine erfolgt durch kompetitive Verdrängung mit einer 0,5 M N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc)-haltigen Lösung in dem WGA-Waschpuffer.

Protein G und Protein A sind Zellwandkomponenten von Bakterien der Gattung Streptococcus, die an der Fc-Region von Immunglobulinen binden. Protein G besitzt am C-Terminus drei homologe Bindungsdomänen mit hoher Bindungsaffinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG [16]. Protein G weist keine nennenswerte Affinität für die Immunglobuline IgA, IgD, IgE, IgM oder IgY auf [20]. Darüber hinaus bindet es an Albumin [16]. Rekombinant hergestelltes Protein G wird in der immunologischen Forschung zur Reinigung von IgG-Antikörpern mittels Affinitäts-Chromatographie und zum Nachweis von IgG in Immunoassays genutzt [16]. Um für diese Anwendungen die Spezifität zu erhöhen, weist rekombinantes Protein G im Gegensatz zur natürlichen Form keine Bindungsstellen für Albumin auf [17]. Die Bindungsstärke für die Subklassen IgG1, IgG2 und IgG4 von humanem IgG ist vergleichbar mit der von Protein A, im Gegensatz zu diesem bindet Protein G jedoch auch an IgG3 [18, 19]. Protein A bindet selektiv ganz bestimmte Subklassen der Immunglobuline G und A sowie M. Verglichen mit Protein A bindet Protein G stärker an polyklonales IgG [16]. Für Isolierung der verschiedenen Antikörper-Subklassen wurde rekombinantes, an einen Träger gekoppeltes Protein G und Protein A eingesetzt. Von dem Protein G- bzw. Protein A-Sepharose[™] 4 Fast flow (GE Healthcare, München) Material wurden 5 ml in eine 10 ml Zentrifugalsäule (Pierce, USA, Rockford) überführt und mit 25 ml dH₂O gewaschen. In der Zwischenzeit wurde 2 ml Lamaserum auf Eis aufgetaut und anschließend 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand des Serums wurde über eine 0,22 µm Zentrifugaleinheit (Spin-X, Omnilab, Bremen) steril filtriert und der Durchlauf der Filtereinheit 1:1 mit PBS verdünnt. Das verdünnte Lamaserum wurde auf die Protein G-Säule geladen und für 2 h bei Raumtemperatur unter Mischen inkubiert. Der Durchlauf der Protein G-Chromatographie wurde gesammelt und für eine folgende Protein A-Affinitäts-Chromatographie bei 4 °C aufbewahrt. Die Protein G-Säule wurde solange PBS gewaschen, bis in der letzten Fraktion die OD bei 280 nm < 0,01 betrug. Für die Elution der Antikörper von der Protein G-Säule wurden 15 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt) mit 1 M Tris-HCl pH 9.0 Neutralisationspuffer (NP) vorgelegt. Für die Elution der clgG3-Subklasse wurde ein Reaktionsgefäß mit 1,5 ml NP und für die Elution der clgG1-Subklasse ein Reaktionsgefäß mit 0,5 ml NP vorgelegt. Um die Cameliden-Antikörper clgG3 vom Protein G-Säulenmaterial zu eluieren, wurden 10 ml Elutionspuffer 150 mM NaCl- 0,58% HAc pH 3.5 auf die Säule gegeben und kurz durchmischt. Das Eluat wurde in den mit NP vorgelegten Reaktionsgefäßen abgefangen. Anschließend wurden auf das Protein G-Säulenmaterial solange Elutionspuffer gegeben, bis die OD bei 280 nm < 0, 01 betrug. Die Elution der an die Protein G-Säule gebundenen konventionellen Antikörper erfolgte auf die gleiche Weise, jedoch mit dem Elutionspuffer 0,1 M Glycin-HCl pH 2.7. Das Protein G-Material wurde nach der Elution der Cameliden-Antikörper solange mit PBS gewaschen, bis im Durchlauf der Säule ein neutraler pH-Wert nachgewiesen werden konnte. Der aufbewahrte Durchlauf der Protein G-Säule wurde auf die Protein A-Säule geladen. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur unter Mischen inkubiert. Der Durchlauf der Protein A-Chromatographie wurde verworfen. Das Protein A-Säulenmaterial wurde solange PBS gewaschen, bis in der letzten Fraktion die OD bei 280 nm < 0,01 betrug. Für die Elution der Antikörper von der Protein A-Säule wurde der obengenannte Neutralisationspuffer (NP) in 15 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt) vorgelegt: für die Elution der IgG2a-Subklasse wurde 1 ml NP und für die Elution der IgG2b-Subklasse 0,5 ml NP vorbelegt. Um die Cameliden-Antikörper-Subklasse clgG2a vom Protein A-Säulenmaterial zu eluieren, wurden 10 ml des Elutionspuffers 150 mM NaCl- 0,58 % HAc pH 4.5 auf die Protein A-Säule gegeben und kurz durchmischt. Die Antikörper-Eluate wurden in dem mit NP vorlegten Reaktionsgefäßen gesammelt. Anschließend wurde auf das Protein A-Säulenmaterial solange Elutionspuffer gegeben, bis die Absorption bei 280 nm < 0,01 betrug. Die Elution der an die Protein A-Säule gebundenen clgG2b-Antikörper erfolgte auf die gleiche Weise, jedoch mit dem Elutionspuffer 0,1 M Glycin-HCl pH 2.7. Das Protein A-Säulenmaterial wurde solange mit PBS gewaschen, bis im Durchlauf der Protein A-Säule ein neutraler pH-Wert nachgewiesen werden konnte. Die Protein G- und Protein A-Säulen wurden nach der Chromatographie mit 25 ml dH₂0, mit 25 ml 20 %-igem Ethanol gewaschen und bis zur nächsten Anwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.7.3 Immun-Affinitäts-Chromatographie im Batch-Verfahren

Zur Analyse der Bindungskapazität der Antikörpermatrizen wurden 50 μg der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus Normalplasma in 0,5 ml PBS eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben erfolgte eine Inkubation für 2 h auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur. Der Durchlauf jeder Säule wurde gesammelt. Anschließend wurden die Säulen (soweit nicht anders angegeben) mit 2 ml PBS gewaschen und die Durchlauffraktion gesammelt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit dem Elutionspuffer 0,1 M Glycin-HCl pH 1.4. Hierfür wurden 2 ml des Elutionspuffers auf die Säule gegeben und das Eluat gesammelt. Die Antikörper-Säule wurde solange mit PBS gewaschen, bis im Durchlauf der Säulen ein neutraler pH-Wert nachgewiesen werden konnte. Die Säulen wurden anschließend erst auf dH₂O, dann mit 20 %-igem Ethanol gespült und bis zur nächsten Anwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.8 HPLC-Verfahren

Alle HPLC-Läufe wurden mit der ÄKTA Explorer[™] Anlage (GE Healthcare, München) durchgeführt. Für die Kontrolle der Proteinaufarbeitung wurde das Softwarepaket UNICORN[™] 4.00 (GE Healthcare, München) eingesetzt. Jedes eingesetzte Säulenmaterial wurde vor dem HPLC-Lauf mit einem dreifachen Säulenvolumen LiChrosolv Wasser gespült und mit einem dreifachen Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert. Die Proben wurden und unter der *Load*-Einstellung der HPLC-Anlage in eine 50 ml Glass-Superloop (GE Healthcare, München) eingebracht. Die Anlage wurde auf die *Inject*-Einstellung umgestellt und die Probe mit einer Flußrate von 0,5 ml/min auf das Säulenmaterial injiziert. Nachdem das gesamte Probenvolumen auf die Säule injiziert worden war, erfolgte die Umstellung des Loops auf die *Load*-Position. Während des gesamten HPLC-Laufes wurden die Leitfähigkeit, der Druck (p_{max} = 0,5 MPa) und die UV-Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm, 260 nm und 220 nm detektiert. Nach jedem HPLC-Lauf wurde das Säulenmaterial mit einem fünffachen Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, mit LiChrosolv Wasser gespült und anschließend mit 20%-igem LiChrosolv Ethanol (Merck, Darmstadt) bei 4 °C gelagert.

2.2.8.1 WGA-Affinitäts-Chromatographie

Zur Herstellung der Wheat Germ Agglutinin (WGA)-gebundenen Proteinfraktion wurde 1 ml humanes Heparin-Plasma gesunder Kontrollpersonen (Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) (entspricht 61 mg Gesamtprotein) über 7 ml WGA-Agarose (4,8 mg Lektin/ml, Sigma Aldrich, München) aufgearbeitet. Hierfür wurde das Lektin-Säulenmaterial in eine C 10/10-Säule (GE Healthcare, München) gepackt und mit einem AD 10 Adapter (GE Healthcare, München) geschlossen. Das humane Plasma wurde zunächst auf Eis aufgetaut und durch Zentrifugation (10 min, 14 000 rpm) von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen befreit. Anschließend wurde das Plasma über eine 0,22 µm Zentrifugationseinheit (Spin-X, Omnilab, Bremen) steril filtriert und mit dem WGA-Waschpuffer 1:10 verdünnt. Die nicht an das Lektin gebundene Proteinfraktion wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Das Lektin-Säulenmaterial wurde solange mit dem WGA-Waschpuffer gewaschen, bis die gemessenen Absorptionen bei den oben genannten Wellenlängen < 0,01 betrugen. Zur Elution der Glykoproteine wurde eine 0,5 M N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc)-haltige Lösung (gelöst in WGA-Waschpuffer) mit einer Flußrate von 0,3 ml/min auf das Lektin-Säulenmaterial injiziert. Die eluierten Proteinfraktionen wurden in 2 ml Fraktionen in LoBind-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) gesammelt. Sobald eine konstante Leitfähigkeit von 16 mS/cm (entspricht der Leitfähigkeit einer Protein-freien Lösung eines 0,5 M GlcNAc-haltigen Puffers) erreicht war, wurde das Säulenmaterial mit Wasch-puffer gespült. Auf diese Weise wurden die am Lektin gebundenen GlcNAc-Reste vom Säulenmaterial entfernt.

Um möglichst viele Antikörper gegen das Albumin zu erhalten, wurde für die Induktion von Antikörpern eine WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion Gesunder eingesetzt, die über einen kurzen Waschschritt (80 ml) aufgearbeitet wurde und somit relativ viel Albumin enthält. Für andere Experimente wurde das WGA-Material vor der Elution der Glykoproteine mit einem höheren Volumen (150 ml) gewaschen.

Zur Aufkonzentrierung der am Immunabsorbens nicht gebundenen Proteinfraktion (nach der zweiten Immun-Affinitäts-Chromatographie) wurde die Proteinfraktion erneut an das WGA-Lektin gebunden. Hierfür wurde eine mit 1 ml Lektin-Agarose (4,8 mg Lektin/ml, Sigma Aldrich, München) gepackte C 10/10-Säule verwendet. Die HPLC erfolgte wie oben beschrieben. Für dieses Experiment stellte PBS die mobile Phase dar und die 0,5 M GlcNAc-haltige Lösung wurde in PBS hergestellt.

2.2.8.2 Grössen-Ausschluß-Chromatographie (SEC)

Bei der Grössen-Ausschluß-Chromatographie besteht die stationäre Phase aus einem Gel mit definierter Porengröße. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Eindringmöglichkeit von Probenmolekülen unterschiedlicher Größe in die Poren. Moleküle ab einer bestimmten Größe werden vom Porenvolumen ausgeschlossen und eluieren mit einer kurzen Retentionszeit [7]. Dagegen werden Moleküle, die in den Poren des Gels ein diffundieren können, zurückgehalten [7] und erreichen den Ausgang des Säulenmaterials mit steigendender Retentionszeit. Als Säulenmaterial der Grössen-Ausschluß-Chromatographie wurde das HiPrep[™] 26/10 der Firma GE Healthcare (München) eingesetzt. Für die Umpufferung der WGA-gebundenen Proteinfraktion vor der Immun-Affinitäts-Chromatographie (IAC) wurde PBS verwendet. Für die Aufkonzentrierung des Durchlaufs der IAC wurde eine 50 mM NH₄HCO₃-Lösung verwendet. Beim Anstieg der Extinktionen bei den oben genannten Wellenlängen wurde der Probendurchlauf in 2 ml *LoBind*-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) gesammelt. Ein zweiter *Peak*-Anstieg wurde beobachtet, wenn das GlcNAc den Detektor erreichte. Diese Fraktion wurde verworfen.

2.2.8.3 Immun-Affinitäts-Chromatographie

Für die Abreicherung der Wheat Germ Agglutinin (WGA)-gebundenen Proteinfraktion aus humanem Plasma wurde eine Immun-Affinitäts-Chromatographie (IAC) durchgeführt. Hierfür wurden maximal 2,4 mg der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion über 60 ml clgG3-Hydrazid-Agarose (etwa 3 mg clgG3/ml) aufgearbeitet. Das clgG3-Säulenmaterial wurde in eine C 26/70-Säule (GE Healthcare, München) gepackt und mit einem AD 26 Adapter (GE Healthcare, München) geschlossen. Der Durchlauf der IAC wurde in 2 ml *LoBind*-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) aufgefangen. Die Antikörper-Säule wurde solange mit PBS gewaschen, bis die Absorption bei den oben genannten Wellenlängen < 0,01 betrug. Die an die Cameliden-Antikörper gebundenen Proteine wurden mit einem 0,1 M Glycin-HCI-Puffer pH 1.4 von der Antikörpermatrix eluiert. Hierfür wurden 50 ml Elutionspuffer auf die Antikörper-Säule geladen. Das Eluat der IAC wurde ebenfalls in 2 ml *LoBind*-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) gesammelt. Nachdem die gesamte Antikörper-gebundene Proteinfraktion vollständig vom Säulenmaterial eluiert worden war, wurde auf die Antikörper-Säule solange der Neutralisationspuffer (NP) 0,2 M Tris-HCI-Puffer pH 8.5 gegeben, bis die gemessene Leitfähigkeit der einer Protein-freien Lösung des NPs entsprach. Das Säulenmaterial wurde dann mit einem dreifachen Säulenvolumen PBS (entspricht etwa 180 ml) gewaschen.

2.2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.2.9.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde mit einem Bradford-Kit (Pierce, USA, Rockford) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels eines im Kit mit gelieferten BSA-Standards im Bereich von 1-25 µg/µl bzw. 125-1500 µg/µl. Es wurden 150 µl bzw. 10 µl des Standards bzw. der Probe in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (MaxiSorp Nunc-Immuno Moldule, Nunc, Dänemark, Roskilde) vorgelegt, mit 150 µl bzw. 300 µl Bradford Reagenz versetzt und für 30 s in einem ELISA-Reader geschüttelt. Nach 10 min folgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Aus den Extinktionsdaten der BSA-Standardreihe, die in Form von Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, wurde ein Polynom zweiter Ordnung approximiert. Mit Hilfe der Funktionsgleichung konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

2.2.9.2 Bestimmung der CEA-Konzentration

Die Bestimmung der CEA-Konzentration wurde im Zentrallaboratorium des Instituts für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Hierfür wurden die Proben verdünnt und auf Eis abgegeben. Die CEA-Konzentration jeder Probe wurde mittels eines CEA-ELISA-*Assays* von der Firma Roche [13] bestimmt.

2.2.10 Gelelektrophorese

2.2.10.1 Fällung von Proteinen

Zur Proteinfällung wurde zu der Probe das sechsfache Volumen eines organischen Lösungsgemisches (50 % Ethanol- 25 % Aceton- 25 % Methanol) auf Eis pipettiert und für 3 h bei -80 °C gelagert. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 4 °C und 14 000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Proteinpellet mit 80 %-igem Ethanol gewaschen und erneut für 30 min bei 4 °C bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Proteinpellet bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.10.2 Eindimensionale SDS-PAGE

Bei der eindimensionalen Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) erfolgt die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen. Für die SDS-PAGE wurden ausschließlich selbst hergestellte denaturierende 9 %-ige oder 12 %-ige SDS-Gele verwendet. Gefällte Proteinproben wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit 30 µl Lämmli-Puffer für 5 min bei 95 °C erhitzt. Proteinproben aus Lösung wurden (soweit nicht anders angegeben) mit 5xLämmli-Puffer für 5 min bei 95 °C erhitzt. Bis zur Elektrophorese wurden die Ansätze bei -20 °C gelagert. Als Elektrophorese-Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer (Lämmli-Laufpuffer) verwendet.

2.2.10.3 Zweidimensionale SDS-PAGE

Bei der Zweidimensionalen (2D)-Gelelektrophorese stellt die Isoelektrische Fokussierung (IEF) die erste Dimension dar [10,11]. Bei der IEF wird die Eigenladung der Proteine gezielt ausgenutzt, um sie voneinander zu trennen. Das IEF-Gel ist ein sehr schwach polymerisiertes Gel, in dem ein pH-Gradient eingebettet ist. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine in diesem Gel bis zu dem pH-Bereich, an dem die Nettoladung der Proteine 0 ist (isoelektrischer Punkt) [10]. Die SDS-PAGE des IEF-Geles stellt die zweite Dimension der Gelelektrophorese dar [10,11]. Bei der SDS-PAGE, bei dem durch Zugabe von SDS die Eigenladung der Proteine für die Trennung vernachlässigbar ist, werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht [10,11] aufgetrennt.

Die WGA-gebundene Proteinfraktion aus Normalplasma wurde in einer 2D-SDS-PAGE analysiert. Es wurden 250 μ l einer 1,5 μ g/ μ l WGA-gebundenen Proteinfraktion (entspricht 375 μ g) für 5 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Proteinfraktion wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 25 μ l 500 mM DTT-Lösung in Lysemix-Puffer versetzt. Die Probe wurde für 1 h bei

Raumtemperatur bei 1 400 rpm geschüttelt. Die Proteinprobe wurde auf zwei Reaktionsgefäße (187 µg Gesamtproteinmenge pro Reaktionsgefäß) verteilt, mit jeweils 600 µl der Precipitant-Lösung (2-D Quant Kit, GE Healthcare, München) gefällt und für 1 min geschüttelt. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 10 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde in 80 % Aceton aufgenommen, für 5 min bei 10 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Das Proteinpellet wurde anschließend mit 80 mM Tris in 80 % Aceton versetzt, für 1 min bei 1 400 rpm geschüttelt, für 5 min bei 10 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Das Proteinpellet wurde in 50 µl Resuspendierungspuffer mit 3 % CHAPS (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst und für 1 h bei 1 400 rpm geschüttelt. Es wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit den im *2-D Quant Kit* (GE Healthcare, München) enthaltenen Reagenzien nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Von der Proteinprobe wurden für das Western Blotting 25 µg und für ein Coomassie-2D-Gel 50 µg eingesetzt und wie folgender Weise vorbereitet:

Western Blotting 2D-Gel	Coomassie 2D-Gel
4,4 μl WGA-gebundene Proteinfraktion	8,7 μl WGA-gebundene Proteinfraktion
141,2 μl Resuspendierungspuffer	136,9 μl Resuspendierungspuffer
3,6 μl HED	3,6 μl HED
0,81 μl IPG	0,81 μl IPG
∑ 150 µl Gesamtvolumen	∑ 150 µl Gesamtvolumen

Die Proteinproben wurden für 20 min bei 1 400 rpm geschüttelt, auf zwei 7 cm lange Immobiline *DryStrip* pH 4-7 (GE Healthcare, München) blasenfrei verteilt, mit Öl beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Des Weiteren wurden zwei 9 %-ige Trenngele gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur auspolymerisieren lassen.

1. Dimension: Auftrennung der Proteine nach ihrem p_l:

Der *DryStrip* wurde mit LiChrosolv Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Strip mit dem Pluspol nach oben in die Isoelektrische Fokussierung (IEF)-Zelle gelegt. Folgender Spannungsprofil (Tab. 2.3) wurde verwendet:

_			
	Spannung [V]	Zeit [min]	Lauf
	150	45	konstant
	500	60	Gradient
	5000	90	Gradient
	5000	150	Gradient

Tab. 2.3: Spannungsprofil der IEF.

Nach der IEF wurden beide *DryStrips* zweimal in Elektrodenpuffer gewaschen. Anschließend wurden sie zweimal in Äquilibrierungspuffer getaucht und 22 min lang in 7 ml Äquilibrierungspuffer mit 1 % DTT quellen lassen. Die *DryStrips* wurden mit Äquilibrierungspuffer (Kapitel 2.1.2) versetzt mit 2,5 % lodacetamid im Dunkeln inkubiert. Die *DryStrips* wurden zweimal in Elektrodenpuffer gewaschen. Im SDS-Gel wurde eine Spur für die Beladung eines Molekulargewichtsmarkers geschnitten. Die *DryStrips* wurden anschließend blasenfrei über das Gel gelegt und mit 1 %-iger Agarose in Elektrodenpuffer überschichtet.

2. Dimension: Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht:

50 μg (Coomassie-Gel) bzw. 25 μg (Western Blotting) WGA-gebundene Proteinfraktion wurden gelelektrophoretisch nach dem Spannungsprofil Tab. 2.4 aufgetrennt.

Tab. 2.4: Spannungsprofil der SDS-PAGE.

Spannung [V]	Zeit [min]
20	30
40	30
60	30
90	30
140	30

2.2.10.4 Proteinfärbungsmethoden

Nach der Gelelektrophorese können die Proteine als gefärbte Komplexe mit Farbstoffen wie Coomassie oder mit Silbersalzen visualisiert werden. Bei der Färbung mit kolloidalem Coomassie (Brilliantblau Coomassie G-250, Carl Roth, Karlsruhe) wurden die Gele ohne Fixierschritt direkt in die Färbelösung gegeben und unter Schwenken für mindestens 24 h gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit 25 %-igem Methanol. Für die Färbung von Proteinen mit Silber wurde ein Silber Färbungs-Kit (Biorad, München) nach Herstellerangabe verwendet.

2.2.11 Massenspektrometrie

2.2.11.1 Einführung in die Massenspektrometrie

In der Proteinanalytik haben sich massenspektrometrische Techniken in den letzten Jahren zu einer wertvollen Methode entwickelt, mit der Proteine identifiziert und teilweise guantifiziert werden können. Die Identifizierung von Proteinen basiert auf die Messung von Masse-zu-Ladung-Verhältnissen (m/z) von Peptid-Ionen, die zunächst in einer Ionenquelle erzeugt, anschließend in einem Massenanalysator nach ihrem m/z-Werten getrennt (MS-Spektrum) und dann in einem Detektor registriert werden. Die Masse eines Peptid-Ions ergibt sich aus seiner Elementarzusammensetzung und unterliegt der Isotopenverteilung der Elemente, aus denen es aufgebaut ist (H, C, N, O, S). Dabei ist jedoch nur das schwere Kohlenstoff-Isotop ¹³C hinreichend häufig (1,1 % gegenüber 98,9 % ¹²C), um zu einer messbaren Isotopenverteilung des Peptids im Massenspektrum zu führen. Bei der Ionisierung von Peptiden können grundsätzlich sowohl positive als auch negative Ionen erzeugt werden. Negative Ionen werden in der Regel durch die Abspaltung und positive Ionen durch Anlagerung eines oder mehrerer Protonen erzeugt. In den weitaus meisten Fällen werden dabei Messungen von Proteinen und Peptiden im Positiv-Modus durchgeführt, weil eine Ladungsübertragung durch Protonierung experimentell leichter zu erreichen ist. Messungen im Negativ-Modus werden nur für spezielle Fragestellungen eingesetzt, etwa für die Messung von Phosphopeptiden oder Glykopeptiden.

Die Typenvielfalt von Massenspektrometern ist außerordentlich groß. Für die Proteinidentifizierung wurden in der die vorliegenden Arbeit Massenspektrometer eingesetzt, die Peptide nach dem Elektrospray-Ionisierungs-Verfahren (ESI) ionisieren und die Peptid-Ionen durch zwei hintereinander geschaltete Massenanalysatoren, einen Quadrupol und einen Flugzeit-Massenanalysator (*time-of-flight*, TOF), nach ihren m/z-Werten trennen. Im Folgenden wird zunächst auf die Peptid-Ionisierung nach dem ESI-Verfahren und die Massentrennung mit den Massenanalysatoren Quadrupol- und Flugzeit-Massenanalysatoren eingegangen, um anschließend das Prinzip der Tandem- und MS^E-Massenspektrometrie zu erläutern.

Bei der Aufnahme eines Massenspektrums nach dem ESI-Verfahren wird die Probe aus einer dünnen Kapillare (einer Stahlnadel oder einer dünn ausgezogenen, mit Metall beschichteten Kapillare) versprüht, an der gegenüber dem Eingang des Massenspektrometers eine hohe Spannung anliegt [142, 160]. Bei Atmosphärendruck wird die Peptidprobe durch die Potentialdifferenz in die Ionenquelle gezogen, wobei feine Tröpfchen entstehen [142, 160]. Diese Tröpfchen verdampfen und setzen schließlich die gelösten Peptide als (in der Regel) mehrfach geladene Ionen frei [142, 160].

Ein Quadrupol-Massenanalysator besteht aus vier hyperbolischen Metallstäben, die paarweise als Elektroden dienen [160]. An die jeweils genüberliegenden Stäbe wird eine positive bzw. negative Gleichspannung angelegt, die von einer Wechselspannung überlagert ist [160]. In diesen hochfrequenten elektrischen Wechselfeldern werden die in den Quadrupol eintretenden Ionen auf spiralförmige Flugbahnen gezwungen. (Abb. 2.1). Je nach Einstellung des Quadrupols ist diese Flugbahn nur für Ionen mit einem bestimmten Verhältnis von m/z stabil, während Ionen mit einem anderen m/z-Verhältnis Spiralbewegungen mit zunehmender Amplitude ausführen und schließlich auf die Elektroden des Quadrupols treffen und dort entladen werden. Ein Qudrupol wirkt also wie ein Filter, der nur Ionen mit einem bestimmten m/z-Verhältnis passieren lässt.



Abb. 2.1: Trennung von Ionen über einen Quadrupol-Massenanalysator [160].

Beim TOF-MS werden die in der Ionenquelle erzeugten Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt. Dabei ist die Energieaufnahme proportional zu der angelegten Potentialdifferenz (q) und der Ladung der Ionen (z). Es gilt also:

$$q x z = m/2 x v^2$$
 bzw. $m/z = 2q/v^2$

Die beschleunigten Ionen fliegen im Hochvakuum über eine feldfreie Messstrecke zum Detektor [10]. Das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) kann durch Messung der Flugzeit bestimmt werden. Durch ein Reflektron (Abb. 2.2) (einen elektrischen "Spiegel", in dem die Ionen durch ein gegengerichtetes Potential in umgekehrter Richtung beschleunigt werden) kann die Flugstrecke verlängert und damit kleine Unterschiede in der kinetischen Energie der Ionen ausgeglichen werden. Dadurch kann die Auflösung des TOF-Massenanalysators verbessert werden.



Abb. 2.2: Trennung von Ionen über einen Flugzeit-Massenanalysator mit eingebautem Reflekton [160].

Nano-Spray-Massenspektrometrie

Bei der nanospray-Massenspektrometrie wird die Probe aus einer ausgezogenen, mit Metall (in unserem Fall mit Gold) bedampften Glasnadel versprüht. Der Spray erfolgt dabei passiv, ausschließlich durch die Wirkung der angelegten Potentialdifferenz zwischen der Kapillare und dem konisch geformten Einlass des Massenspektrometers. Die nano-Spray-Technik erlaubt einem sehr langsamen Sprühen (15-20 µl/min) und damit eine sehr empfindliche Messung. In der vorliegenden Arbeit wurde die nano-Spray-Technik für die Identifizierung von Proteinen aus Gelbanden eingesetzt. Die Probenvorbereitung ist in Kap. 2.2.11.2 beschrieben. Die angelegte Spannung betrug 750-800 V.

Bei der Messung wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde der Quadrupol so eingestellt, dass alle Ionen durchtreten konnten. Auf diese Weise wurde ein MS-Spektrum des gesamten, in der Probe enthaltenen Peptid-Gemischs aufgenommen (MS-Spektrum). Anschließend wurde für jedes der im MS-Spektrum detektierten Peptide ein MS/MS-Spektrum aufgenommen. Dazu wurde der Quadrupol so eingestellt, dass nur Ionen mit einem bestimmten m/z-Verhältnis, also Ionen, deren m/z-Verhältnisse dem m/z-Verhältnis des jeweiligen Vorläufer-Ions entsprachen, durchtreten konnten [142]. In der sich an den Quadrupol sich anschließenden Stoßzelle wurden dann die Peptid-Ionen fragmentiert, und zwar bevorzugt an den Peptidbindungen. Es entstehen so Serien von Fragment-Ionen, die sich jeweils um die Masse einzelner Aminosäuren unterscheiden [142]. Dieses Fragment-Muster wird im TOF-Analysator aufgenommen. Durch die manuelle Auswertung von MS/MS-Spektren kann die Sequenz eines unbekannten Proteins ganz oder teilweise bestimmt werden. Da sie jedoch sehr zeitaufwändig ist, können stattdessen bekannte Proteine durch eine Datenbanksuche identifiziert werden [142]. Die gemessenen MS/MS-Spektren werden dabei mit dem für eine bestimmte Peptid-Sequenz theoretisch zu erwartenden Spektrum verglichen. Ein Maß für die Signifikanz der ermittelten Übereinstimmungen stellt dabei der "score" dar. Dementsprechend ist eine Übereinstimmung umso signifikanter, je höher dieser Wert ist. Die Auswertung der MS/MS-Spektren erfolgte in der vorliegenden Arbeit online mit dem Suchalgorithmus Mascot (Matrix Science, London) mit der humanen Datenbank Swissprot.

LC/MS/MS^E-Massenspektrometrie:

Für diese Messungen wurde eine LC/MS-Kopplung durchgeführt, d.h., die Probe wurde über ein HPLC-System (nano-UPLC, Waters, Eschborn) getrennt und direkt über eine Stahlkapillare in die lonenquelle des verwendeten Massenspektrometers (QTOF Premier, Waters, Eschborn) eingespritzt. Durch LC/MS-Kopplung können wesentlich komplexere Gemische als bei der nano-Spray-Technik vermessen werden. Für die Trennung wurde eine Vorsäule (20 x 0.18 mm, C18 nano Aquity UPLC column, Waters) und eine Trennsäule (100 x 0.1 mm, C18 nano Acquity UPLC column, Waters) eingesetzt, der Fluß betrug 400 nl/min. Es wurde ein Gradient von Wasser/0.1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril/0.1 % Ameisensäure (B) von 5-40 % B über 90 Min. gefahren. Die angelegte Spannung an der Kapillare betrug 2 600 V. Als Kapillare wurden Stahlnadeln mit einem Innendurchmesser von 30 μm (Proxion, Odense, Dänemark) verwendet. Eine Kalibrierung wurde mit dem [Glu¹]-Fibrino-peptid B *human-Peptid* (EGVNDNEEGFFSAR) (Sigma Aldrich) durchgeführt.

Auch bei einer LC-MS-Kopplung sind MS/MS-Messungen möglich, wobei allerdings die Precurser-Selektion automatisch erfolgen muss. Wenn die Messungen allerdings gleichzeitig auch quantitativ ausgewertet werden sollen, hat dieses Verfahren bedeutende Nachteile, weil durch das Umschalten vom MS- in den MS/MS-Modus eine Integration der Elutions-Peaks im MS-Modus unmöglich wird. Um gleichzeitig die Proteine der Plasmaprotein-Präparationen identifizieren und relativ quantifizieren zu können, wurde daher die MS^E-Technik eingesetzt. Bei dieser Technik werden abwechselnd Spektren mit niedriger Kollisionsenergie in der Stoßzelle (MS-Spektren) und Spektren mit hoher Kollisionsenergie (MS^E-Spektren) aufgenommen. Bei der Aufnahme der MS^E-Spektren werden die Peptide in der Stoßzelle fragmentiert, aber ohne dass vorher eine Precursor-Selektion im Quadrupol stattfindet. Es werden also Fragment-Ionen aller zu dem betreffenden Zeitpunkt von der UPLC-Säule eluierenden Peptide aufgenommen. Durch das schnelle Umschalten (einmal pro Sekunde) kann gleichzeitig für die Precursor-Massen ein integrierbares Peak-Profil erhalten werden. Problematisch bei der Identifizierung von Peptiden durch MS^E-Messungen ist die Zuordnung der Fragment-Massen zu ihren Precursor-Massen, da ja keine Precursor-Selektion im Quadrupol erfolgt. Stattdessen erfolgt die Zuordnung durch nachträgliche Korrelation der Elutionsprofile der Precursor-Ionen im MS- und der Fragment-Ionen im MS^E-Elutionsprofil. Dazu und für die guantitative Auswertung der Elutionsprofile wurde das Programm "Proteinlynx Global Server" (Waters, Eschborn) Version 4.0 benutzt. Für die Datenbanksuche wurde die Datenbank "Swissprot" release 56 verwendet. Jeder LC/MS/MS^E-Lauf wurde dreifach reproduziert.

2.2.11.2 Probenvorbereitung für die nanospray-Massenspektrometrie

Für die Proteinanalyse wurden die einzelnen Proteinbanden mit einem sauberen Skalpell (Braun) aus dem Gel ausgeschnitten und diese auf Parafilm zerkleinert. Die Proteinproben wurden mit 40 µl Acetonitril bedeckt und für 15 min auf einem Vortexer inkubiert. Das Acetonitril besitzt die Eigenschaft, sowohl das Wasser als auch Salze dem Gel zu entziehen. Der Überstand wurde verworfen, die Gelstücke mit 40 µl 100 mM NH₄HCO₃-Waschpuffer zur Rehydrierung des Gels bedeckt und für 10 min geschüttelt. Die Behandlung des Gels mit dem Acetonitril wurde einmal wiederholt und der Überstand verworfen. Vorhandene Disulfidbrücken im Protein wurden durch eine Inkubation mit 40 µl 10 mM DTT für 50 min bei 57 °C reduziert. Es folgte ein Waschschritt mit Acetonitril. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt. Durch Behandlung mit 40 µl 55 mM Iodacetamid für 45 min bei Raumtemperatur im Dunklen wurde eine Modifizierung von Cysteinseitenketten zu Carbamidocysteine erreicht. Erneut wurde zweimal abwechselnd mit Acetonitril für 15 min und mit Waschpuffer für 10 min, sowie ein drittes Mal mit Acetonitril für 15 min gewaschen. Nach fünf minütiger Vakuumzentrifugation bei 14 000 rpm wurde der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Proteinproben mit der Protease Trypsin in Peptide gespalten. Hierfür wurden die Gelstücke mit 30 μ l einer 8 ng/ μ l Trypsin-Lösung in 50 mM NH₄HCO₃ bei 4 °C für 45 min quellen lassen und der Überstand verworfen. Die Gelstücke wurden anschließend mit 40 µl 50 mM NH₄HCO₃ gewaschen, der Überstand verworfen, erneut mit Waschlösung überschichtet und die Reaktionsgefäße zum vollständigem Verdau der Proteine über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend erfolgte die Extraktion des Gels mit 40 µl eines Lösungsgemisch aus 5 % HCOOH-65 % Acetonitril für 20 min, mit 40 µl HPLC Wasser für 15 min, erneut mit einem Lösungsgemisch aus 5 % HCOOH-65 % Acetonitril für 20 min, mit HPLC-Wasser für 15 min und darauf folgend mit 40 µl 100 %-igem Acetonitril, wobei alle Überstände vereinigt wurden. Die vereinigten Überstände wurden für mindestens 30 min bei -80 °C gelagert und anschließend für 4-5 h im Vakuum eingedampft. Um die getrockneten Proben wieder in Lösung zu bringen, wurden diese in 10 µL eines wässrigen Lösungsgemisches aus 5 % CH₃OH-5 % HCOOH 15 min lang geschüttelt. Für jede Probe wurde eine vergoldete Glaskapillare mit 10 μl 65 % CH₃OH-5 % HCOOH gespült, indem zuerst die Flüssigkeit mit Hilfe eines Gel-Loadertips (Eppendorf, Hamburg) eingebracht und mittels Zentrifugation wieder entfernt wurde. Anschließend wurde eine C18-ZipTip-Spitze (Millipore, USA, Billerica) mit 65 % CH₃OH-5 % HCOOH und dann mit 5 % CH₃OH-5 % HCOOH äquilibriert. Die Probe wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren an die äquilibrierte ZipTip-Spitze gebunden und anschließend mit 5 % CH₃OH-5 % HCOOH gewaschen, mit 10 μL 65 % CH₃OH-5 % HCOOH aus der ZipTip-Spitze in ein neues Reaktionsgefäß eluiert und mit einem Gel-Loadertip in die Glaskapillare überführt. Die ESI-Q-TOF-Messungen erfolgten an dem Micromass Q-TOF 2[™]-Tandem-Massenspektrometer der Firma Waters.

2.2.11.3 Probenvorbereitung für die LC-MS^E-Massenspektrometrie

Vor der Massenspektrometrie wurden die Proteinproben zunächst in 50 mM NH₄HCO₃ umgepuffert und bei - 55 °C lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 35 μ l 50 mM NH₄HCO₃ aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren in Lösung gebracht. Es wurden 5 μ l 1%-RapiGest (Waters, USA) hinzu pipettiert und die Probe für 10 min bei 80 °C inkubiert. Anschließend wurden die Disulfidbrücken der Proteine mit 2,5 μ l einer 50 mM DTT-Lösung (ergibt 2,5 mM DTT) reduziert, wobei die Probe für 10 min bei 60 °C inkubiert wurde. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 2,5 μ l einer 150 mM lodacetamid-Lösung versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Probe wurden 2,5 μ l einer 200 ng/ μ l Trypsin-Lösung (Promega) hinzu pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefässe für 30 s bei 14 000 rpm und zentrifugiert. Zur Probe wurden 2,5 μ l einer 1 pM/ μ l Enolase-Standard-Lösung (Waters) hinzu pipettiert (entspricht 50 fmol Enolase pro μ l Spray für die Massenspektrometrie) und mit 1 μ l 37 %-HCl versetzt. Nach 45 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und anschließend für 30 min bei 4 °C und 14 000 rpm zentrifugiert. Von der Probe wurden 15 μ l entnommen, blasenfrei in einem Glasgefäß (Waters) pipettiert und in dem *Auto Sampler* der RP-HPLC-Anlage gestellt. Für jede Messung wurde(n) 1 bis 3 μ l der Probe (abhängig von der Peptidkonzentration) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Glykoproteomanalytik des humanen Plasmas

3.1.1 Con A- vs. WGA-Lektinfraktionierung

Die Spezifität des Concanavalin A (Con A)- und des Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Lektins wurden mit einer gleichen Plasmaproteinmenge von 61 mg über eine Affinitäts-Chromatographie geprüft (Kapitel 2.2.7.1). Das Con A-Lektin besitzt Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen für Glucose und α -Mannose [107] und bindet spezifisch nur N-glykosylierte Proteine, die diese Kohlenhydratreste tragen. Die an dem Con A-Lektin reversibel gebundenen Glykoproteine wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Monosaccharid α -D-Mannose durch kompetitive Verdrängung vom Säulenmaterial eluiert. Das WGA-Lektin bindet spezifisch an β 1-4-N-Acetyl-D-Glukosamin- (β 1-4-GlcNAc) und Sialinsäuren-Reste von Glykoproteinen [106-109]. Die Elution der Glykoproteine vom WGA-Lektin erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch die kompetitive Verdrängung mit dem Monosaccharid GlcNAc. Ein Beispiel für den Verlauf einer WGA-Lektinfraktionierung des humanen Plasmas ist in der Abb. 3.1 dargestellt.



Abb. 3.1: Chromatogramm einer WGA-Lektinfraktionierung vom humanen Plasma. Auf das WGA-Lektin (30 mg) Agarose-gekoppeltes Säulenmaterial wurden 1 ml humanes Plasma aus einem Pool gesunder Kontrollpersonen in einer zehnfachen Verdünnung in dem WGA-Waschpuffer geladen und eine HPLC (Kapitel 2.2.8.1) mit einer Flussrate von 0,3 ml/min durchgeführt. Während des HPLC-Laufes wurden die Leitfähigkeit (rechte Y-Achse) und die Absorptionen (linke Y-Achse) bei den Wellenlängen 280 nm (A_{280nm}), 260 nm (A_{260nm})

und 220 nm (A_{220nm}) gemessen. Nach Entfernung der am Lektin nicht gebundenen Proteinfraktion und einem Waschschritt mit dem WGA-Waschpuffer wurde die Lektin-gebundene Proteinfraktion durch kompetitive Verdrängung mit einem 0,5 M GlcNAc-haltigen Puffer eluiert. Über eine Bradford-Messung konnte für die Con A-gebundene Proteinfraktion eine Gesamtproteinmenge von 16 mg bestimmt werden. Somit wurden über die Con A-Affinitäts-Chromatographie 26 % der Gesamtproteinmenge des eingesetzten Plasmas angereichert. In der WGA-gebundenen Proteinfraktion wurde mittels einer Bradford-Messung eine Gesamtproteinmenge von 2,8 mg ermittelt. Das bedeutet, dass über eine WGA-Lektinfraktionierung ca. 4,6 % der im humanen Plasma enthaltenen Glykoproteine selektiv angereichert wurden. Die gebundene Proteinfraktion beider Lektine wurde auf einem SDS-Gel analysiert und mit kolloidalem Coomassie visualisiert (Abb. 3.2). Beide Lektingebundenen Proteinfraktionen zeigen ein unterschiedliches SDS-PAGE Proteinmuster. Einige Proteinbanden wie a-g sind nur in der Con A-gebundene Fraktion, andere wie h-j nur in der WGAgebundenen Fraktion zu sehen, während zahlreiche Proteine in den gebundenen Proteinfraktionen beider Lektine detektiert werden.



Abb. 3.2: Spezifität des Con A- und des WGA-Lektins. I: Con A-gebundene Proteinfraktion, II: WGA-gebundene Proteinfraktion. Es wurde ein gleiches Volumen beider Lektin-gebundenen Proteinfraktionen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Proteinbanden, die im Gel nur in einer Lektin-gebundenen Fraktion zu sehen sind, sind mit den Buchstaben a-g (Con A-gebundene Proteinfraktion) und h-k (WGA-gebundene Proteinfraktion) gekennzeichnet.

3.1.2 Gel-basierende massenspektrometrische Analyse der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion

Jeweils eine gleiche Proteinmenge des unfraktionierten humanen Plasmas, der am Lektin nicht gebundenen Proteinfraktion und der Lektin-gebundenen Proteinfraktion wurden auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Mit den gut sichtbaren Proteinbanden, die im Gel (Abb. 3.3) mit den Buchstaben a-n gekennzeichnet sind, wurde eine Tandem-Massenspektrometrie (Kapitel 2.2.11.1) mit dem ESI-Q-TOF durchgeführt. Nahezu alle Proteine der WGA-gebundenen Proteinfraktion, die mittels der Tandem-Massenspektrometrie identifiziert wurden, sind Glykoproteine. Eine Ausnahme bildete das Serum Albumin.



Abb. 3.3: SDS-Gel der WGA-gebundenen Proteinfraktion. Auf jeder Spur wurden 30 µg Gesamtprotein aufgetragen. I: unfraktioniertes humanes Plasma. II: Durchlauf der WGA-Affinitäts-Chromatographie. III: WGA-gebundene Proteinfraktion. a: Apolipoprotein A, α_2 -Macroglobulin, Albumin; b: Apolipoprotein B; c: α_1 -Microglobulin, Inter- α -Trypsin Inhibitor schwere Kette, d: α_2 -Macroglobulin; e: α_2 -Macroglobulin; f: α_2 -Macroglobulin, Inter- α -Trypsin Inhibitor schwere Kette, d: α_2 -Macroglobulin; e: α_2 -Macroglobulin; f: α_2 -Macroglobulin, Inter- α -Trypsin Inhibitor schwere kette; g: Plasma Protease C1 Inhibitor; h: α_2 -Macroglobulin, Histidin-reiches Glykoprotein; i: Hämopexin, HSA, α_1 -Antichymotrypsin, Haptoglobin; j: Haptoglobin, β -1,4-Galactosyl-Transferase; k: α_2 -Macroglobulin, I: Complement C3; m: Serotransferrin, Albumin; n: IgG Kette C Region, Albumin, α_1 -Antitrypsin.

Als Beispiel für die Proteinidentifizierung mittels der Tandem-Massenspektrometrie soll im Folgenden der Identifizierungsweg für ein tryptisches Peptid des Proteins α_2 -Macroglobulin aus der WGAgebundenen Fraktion gezeigt werden. In einem MS/MS-Spektrum wird das Fragmentmuster dargestellt, das bei der Stoßfragmentierung des betreffenden Peptids entsteht. Die Differenz zwischen den einzelnen Fragmentmassen entspricht der Masse der Aminosäure in der jeweiligen Position. Aus einer Serie von Fragmentmassen kann daher Sequenzinformation abgeleitet werden. In der Abb. 3.4 wurde durch manuelle Auswertung die C-terminale Teilsequenz (Y-Serie) LEEVMFLTVQVK des Peptids bestimmt und auf diese Weise das betreffende Protein identifiziert.



Abb. 3.4: MS/MS-Spektrum des Proteins α₂-Macroglobulin der WGA-Lektinfraktion.

Die manuelle Auswertung von MS/MS-Spektren ist allerdings sehr zeitaufwändig. Stattdessen können bekannte Proteine durch eine Datenbanksuche identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mascot-Algorithmus der Firma Matrix Science verwendet. Dabei werden die gemessenen MS/MS-Spektren mit dem für eine bestimmte Peptid-Sequenz theoretisch zu erwartenden Spektrum verglichen. Somit beruht die Proteinsequenzierung per Massenspektrometrie auf der Basis einer Wahrscheinlichkeitsberechnung. Ein Maß für die Signifikanz der ermittelten Übereinstimmungen stellt dabei der *"score"* dar, der sich aus dem Vergleich der Trefferzahl mit der in der jeweiligen Datenbank zufällig zu erwartenden Trefferzahl ergibt. Dementsprechend ist eine Übereinstimmunge



Peptide Summary Report AAH26246 Mass: 39550 Score: 58 Queries matched: 1 alpha-2-Macroglobulin: - Homo sapiens

Abb. 3.5: Ergebnis der Datenbanksuche für das α_2 -Macroglobulin.

Aus dem Ergebnis der Datenbanksuche (Abb. 3.5) ist zu entnehmen, dass unter den gewählten Bedingungen (Datenbank: Swissprot, Spezies: Human) für die Suche Peptide mit einem *"score"* von >22 eine signifikante Homologie und Peptide mit einer Trefferzahl von >41 eine weitgehende Homologie oder Identität zu dem analysierten Peptid besitzen. In diesem Beispiel wurde ein *"score"* von 58 erreicht. Somit liegt eine signifikante Übereinstimmung zwischen dem gemessenen MS/MS-Spektrum und dem für eine Peptid-Sequenz des α_2 -Macroglobulins theoretisch zu erwartenden Spektrum vor.

3.1.3 LC-MS-Analyse der WGA-gebundenen Plasmaproteine

Für die Proteinidentifizierung der WGA-Lektin-gebundenen Proteinfraktion per LC-MS (Flüssigkeits-Chromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie) wurde das Massenspektrometer QTOF Premier eingesetzt. Dabei wurden die nach dem Proteinverdau erhaltenen proteolytischen Peptide zunächst über eine RP-HPLC chromatograpisch aufgetrennt (Abb. 3.6) und danach direkt massenspektrometrisch vermessen.





Mittels der LC-MS^E-Massenspektrometrie (siehe Kapitel 2.2.11.1) konnten insgesamt 63 Proteine in der WGA-gebundenen Fraktion identifiziert werden, die in Tab. 3.1 absteigend nach der Signifikanz ihrer Identifizierung (ausgedrückt als *"scores"*) dargestellt sind. Außerdem wurden mit der LC-MS^E-Massenspektrometrie die Proteine im unfraktioniertem Plasma identifiziert. Hierfür wurde eine zu der WGA-gebundenen Proteinfraktion gleiche Proteinmenge vermessen. Im unfraktionierten Plasma wurden insgesamt 59 Proteine identifiziert, die im Kapitel 10 (Anhang, Tab 10.1) dargestellt sind. Für eine relative Quantifizierung wurden die Daten mit dem Program *"*ProteinLynx-Expression Analysis" ausgewertet. Der Quotient R_{WGA/Plasma}, der in Tab. 3.1 dargestellt ist, gibt die relative Menge des jeweiligen Proteins in den Proben an. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Lektinfraktion nur ca. 4 % der Proteinmenge des Plasmas enthält. Die Größe des Quotienten R ist ein Maß für die An- bzw. Abreicherung des betreffenden Proteins durch die WGA-Lektin-Affinitäts-Chromatographie.

Rang	Identifiziertes Protein	R _{WGA/Plasma}
1	Humanes Serum Albumin*	0,38
2	Serotransferrin (Transferrin)	0,03
3	Fibronectin	
4	Kininogen-1 (α_2 -thiol Proteinase Inhibitor)	
5	IgG-C _H 1 Region	0,09
6	Plasma Protease C1 Inhibitor (C1INH)	
7	Haptoglobin	0,73
8	Apolipoprotein A-I	0,23
9	Hämopexin (Beta-1B-glycoprotein)	6,49
10	Ceruloplasmin (Ferroxidase)	5,42
11	Complement Faktor H	0,43
12	Coagulation Faktor XII	
13	Attractin (Mahogany Homolog)	
14	Pregnancy-zone Protein	3,29
15	Ig Kappa Kette C Region	0,07
16	Histidin-reiches Glykoprotein	
17	α_1 -saures Glykoprotein 1 (Orosomucoid-1)	7,32
18	Carboxypeptidase N Untereinheit 2	
19	Inter-α-Trypsin Inhibitor schwere Kette H4	6,62
20	IgG-C _H 3 Region	0,22
21	Inter-α-Trypsin Inhibitor schwere Kette H2	
22	C4b-bindendes Protein α -Kette (Prolin-reiches Protein)	
23	Haptoglobin-verwandtes Protein	0,37
24	IgA-C _H 1 Region	0,25
25	Keratin, Typ II Zytoskeletal 1 (Cytokeratin-1)*	
26	Ig Lambda Kette C Region	0,10
27	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase	
28	α_1 -Antichymotrypsin	2,05
29	Inter-a-Trypsin Inhibitor schwere Kette H1	
30	Complement C1r Subkomponente	

Tab. 3.1: Mittels LC-MS	⁵ identifizierte und quantifizierte P	roteine in der WGA-gebundenen Proteinfraktion
-------------------------	--	---

31	Keratin, Typ I Zytoskeletal 10 (Cytokeratin-10)*	
32	Hämoglobin Untereinheit Alpha	
33	IgA C _H 2-Kette C Region	0,20
34	Clusterin (Apolipoprotein J)	8,08
35	α_1 -Microglobulin	
36	Keratin, Typ I Zytoskeletal 9 (Cytokeratin-9)*	
37	α_2 -HS-Glykoprotein (Fetuin-A)	0,29
38	IgM schwere Kette	0,23
39	Vitronectin	
40	Complement Faktor I	
41	α_2 -Macroglobulin	3,25
42	α_1 -saures Glycoprotein 2 (Orosomucoid-2)	8,50
43	IgM-C _H 1 Region	0,24
44	Apolipoprotein E	0,94
45	Plasma Kallikrein (Kininogenin)	
46	Lumican (Keratansulfat Proteoglykan Lumican)	
47	Fibulin-1	
48	Serum Paraoxonase/Arylesterase 1	
49	Keratin, Typ II Zytoskeletal 2 Epidermal (Cytokeratin-2e)*	
50	Phosphatidylcholinsterol Acyltransferase	
51	Apolipoprotein F (Lipid Transfer Inhibitor Protein)	
52	Carboxypeptidase B2	
53	Sulfhydryloxidase 1	
54	Keratin, Typ I Zytoskeletal 23 (Cytokeratin-23)*	
55	Hämoglobin Untereinheit Beta*	3,74
56	Hämoglobin Untereinheit Delta*	
57	Apolipoprotein-L1	
58	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor (IGF)-bindendes Protein	
59	Hämoglobin Untereinheit Gamma-1*	
60	Hämoglobin Untereinheit Gamma-2*	
61	Apolipoprotein D	
62	Chromobox Protein Homolog 5	
63	Hämoglobin Untereinheit Zeta*	

Jede Probe wurde dreimal vermessen. Proteine, die nur in einem Lauf identifiziert wurden, wurden aus der Proteinliste entfernt. Der Rang bzw. die Reihenfolge der Protein-Nummerierung basiert auf die Signifikanz der ermittelten Übereinstimmungen, die in der Swissprot-Datenbank gefunden wurden. Jede Probe wurde vor der LC-MS^E-Massenspektrometrie mit einem Enolase-Standard (50 fmol/µl) versetzt. Bei der Quantifizierung wurde jede Probe auf die Enolase normalisiert. * Nicht glykosyliertes Protein bzw. Untereinheit eines Proteins. Im Weiteren wurde die Schnittmenge aller identifizierten Proteine im unfraktionierten und in der WGA-gebundenen Proteinfraktion berechnet (Abb. 3.7). Dadurch konnte gezeigt werden, dass im unfraktionierten Plasma und in der Lektin-gebundenen Proteinfraktion insgesamt 26 gemeinsame Plasmaproteine detektierbar sind. Im unfraktionierten Plasma konnten 33 Proteine detektiert werden, die die WGA-gebundene Proteinfraktion entweder gar nicht oder in so geringer Menge enthält, dass diese Proteine in der WGA-gebundenen Proteinfraktion über die LC-MS nicht detektiert werden konnten. Daher werden diese 33 Proteine durch die Lektinfraktionierung auf jeden Fall abgereichert. Das Albumin, das nicht glykosyliert ist und daher nicht signifikant an das Lektin binden sollte, wird durch die Lektinfraktionierung des Plasmas zwar nicht vollständig, jedoch weitgehend entfernt. Über die WGA-Lektinfraktionierung konnten insgesamt 37 weitere Plasmaproteine visualisiert werden, die im unfraktioniertem Plasma nicht zu detektieren waren.



Abb. 3.7: Vergleich der Anzahl der mittels LC-MS identifizierten Proteine im Plasma und in der WGA-gebundenen Proteinfraktion. Bei diesem Experiment wurde sowohl von unfraktioniertem Plasma (A) als auch von der WGA-gebundenen Fraktion (B) eine gleiche Proteinmenge tryptisch verdaut. Von jeder Probe wurden drei LC-MS-Läufe durchgeführt. Die Proteinidentifizierung basierte auf die Signifikanz der ermittelten Über-

einstimmungen, die in der humanen Swissprot-Datenbank gefunden wurden. Peptide mit einem *"score"* unter 100 wurden aus der Liste entfernt.

3.2 Aufarbeitung und Charakterisierung antigenspezifischer Cameliden-Antikörper

3.2.1 Antikörper-Titer des immunisierten Lamas

Die WGA-gebundene Proteinfraktion aus einem Plasmagemisch gesunder Kontrollpersonen wurde für die Immunisierung eines Lamas eingesetzt (Kapitel 2.2.1). Um die Entwicklung des Antikörper-Titers im Verlauf der Immunisierung zu verfolgen, wurde ein *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) für die WGA-gebundene Lektinfraktion (Kapitel 2.2.2) eingesetzt. In diesem Testverfahren wurden die Lama-Antiseren vom Zeitraum vom 14.12.2005 (Prä-Immunserum) bis 03.05.2006 analysiert. Das ELISA-Ergebnis (Abb. 3.8) zeigte, dass im Prä-Immunserum des Lamas keine Antikörperaktivität gegenüber der Lektin-gebundenen Proteinfraktion vorhanden war. Dagegen konnte schon nach der ersten Immunisierung eine signifikante Antikörperantwort detektiert werden. Nach der dritten Protein-Immunisierung konnte keine deutliche Steigerung des Titers mehr detektiert werden. Ab diesem Zeitpunkt wurde dem Lama in regelmäßigen Zeitabständen (2-3 Monate) die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen injiziert, um den Antikörpertiter gegen diese Proteinfraktion konstant zu halten.



Abb. 3.8: Lama-Antiserum-Titer. Die Immunantwort des unfraktionierten Lama-Antiserums (Zeitraum: 14.12.2005 bis 03.05.2006) wurde mit Hilfe eines antigenspezifischen ELISA-Verfahren analysiert. Auf der Y-Achse ist die optische Dichte (OD) bei der Wellenlänge 405 nm dargestellt. Protein-Immunisierungen sind durch Pfeile gekennzeichnet. LS:=Lama-Antiserum. Das Lamaserum wurde über Protein G- und Protein A-Säulen-Chromatographie aufgearbeitet (Kapitel 2.2.7.2). Die Cameliden-Antikörper werden dabei über ihre Fc-Domänen an das Protein G bzw. Protein A-Material reversibel gebunden. Durch einen Waschschritt wurden alle übrigen Bestandteile des Lamaserums entfernt. Da das jeweilige Bindungsverhalten der Antikörper an Protein G bzw. Protein A pH-Wert abhängig ist [23], wurde über eine pH-Veränderung eine Fraktionierung der Cameliden-Immunglobuline (clgG) nach verschiedenen Subklassen erreicht. Die Elution der Antikörper mit langer Scharnier-Region von der Protein G-Säule erfolgte bei pH 3.5 und die der konventionellen Antikörper bei pH 2.7. Die Elution der Antikörper mit kurzer Scharnier-Region von der Protein A-Säule erfolgte über eine pH-Veränderung nach pH 4.5 und pH 2.7. Die Fraktionierung der verschiedenen Antikörper-Subklassen wurde in einer SDS-PAGE (Abb. 3.9) analysiert. Dabei wurden die unterschiedlichen Antikörper-Subklassen sowohl in ihrem reduzierten Zustand (Disulfidbrücken gespalten) als auch in ihrem nicht reduzierten Zustand (Disulfidbrücken intakt) auf einem 12 % SDS-Gel untersucht. Bei einer nicht reduzierenden SDS-PAGE erhält man bei den isolierten Cameliden-Schwerketten-Antikörpern (Spur V, VII, VIII) (96 kDa, 88 kDa, 92 kDa) und konventionellen Antikörpern (Spur VI) (160 kDa) eine einzelne Hauptbande, die das Molekulargewicht des kompletten Antikörpers wiedergibt.



Abb. 3.9: Isolierung von verschiedenen clgG-Subklassen. Das SDS-Gel ist wie gekennzeichnet in einen reduzierten und einen nicht reduzierten Teil aufgeteilt. I,V: Schwerketten-Antikörper mit langer Scharnier-Region (clgG3). II,VI: Konventionelle Antikörper (clgG1). III,VII: Schwerketten-Antikörper mit kurzer Scharnier-Region (clgG2a). IV,VIII: Schwerketten-Antikörper mit kurzer Scharnier-Region (clgG2b). BSA:= Bovine Serum Albumin.

Unter reduzierenden Bedingungen zeigen Cameliden-Schwerketten-Antikörper (I, III, IV) eine einzelne Proteinbande (46 kDa, 43 kDa, 45 kDa), die das Molekulargewicht einer schweren Kette des Antikörpers wieder gibt. Konventionelle Cameliden-Antikörper zeigen unter reduzierenden Bedingungen dagegen zwei Proteinbanden, die leichte und die schwere Kette. Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigt weiterhin, dass keine Proteinkontamination in den einzelnen Fraktionen vorhanden ist. Zusammengefasst konnten vier verschiedene Cameliden-IgG-Subklassen im Lamaserum nachgewiesen werden: ein konventionelles Heterodimer aus vier Polypeptidketten und drei Typen von Schwerketten-Antikörpern. Durch Vergleich mit der Literatur [23 ,25] konnte folgende Zuordnung durchgeführt werden:

- Das Eluat der Protein G-Affinitäts-Chromatographie bei pH 3.5 enthält Cameliden-Schwerketten-Antikörper clgG3 (ca. 96 kDa) mit langer Scharnier-Region.
- Das Eluat der Protein G-Affinitäts-Chromatographie bei pH 2.7 enthält konventionelle Cameliden-Heterotetramer-Antikörper clgG1 (ca. 160 kDa).
- Das Eluat der Protein A-Affinitäts-Chromatographie bei pH 4.5 enthält Cameliden-Schwerketten-Antikörper clgG2a (ca. 88 kDa) mit kurzer Scharnier-Region.
- Das Eluat der Protein A-Affinitäts-Chromatographie bei pH 2.7 enthält Cameliden-Schwerketten-Antikörper clgG2b (ca. 92 kDa) mit kurzer Scharnier-Region.

3.2.3 Anteil der clgG-Subklassen am Gesamt-IgG

Die Tab. 3.2 gibt den relativen prozentualen Anteil der verschiedenen IgG-Subklassen am Gesamt-IgG wieder. Die Proteingehalte der vier Antikörper-Subklassen wurde mittels einer Bradford-Messung bestimmt. In allen Lamaseren konnte vor der Protein G- bzw. Protein A-Affinitäts-Chromatographie eine gesamte Serumproteinkonzentration von 60 bis 70 mg/ml ermittelt werden. Die gesamte IgG-Konzentration, die nach der Affinitäts-Chromatographie als Summe aller IgG-Subklassen gebildet wurde, lag zwischen 24-28 mg/ml. Dies bedeutet, dass das Lamaserum aus zu 40-50 % aus Immunglobulinen besteht. In diesem Anteil sind die konventionellen Antikörper clgG1 prozentual mit 50-70 % am stärksten vertreten, gefolgt von den Schwerketten-Antikörpern mit langer Scharnier-Region clgG3, die 15-20 % des gesamten IgG-Anteils ausmachen. Die Schwerketten-Antikörper mit kurzer Scharnier-Region clgG2a und clgG2b konnten mit einem relativen Anteil von je 5-10 % im Lamaserum nachgewiesen werden.

IgG-Subklasse	[%]
clgG3	15 – 20
clgG1	50 – 70
clgG2a	5 - 10
clgG2b	5 - 10

Tab. 3.2: Relativer prozentualer Anteil der verschiedenen clgG-Subklassen am Gesamt-lgG.

3.2.4 Antigenspezifität der verschiedenen clgG-Subklassen

Zur Untersuchung der Antigenspezifität der verschiedenen Cameliden-Antikörper-Subklassen wurden jeweils gleiche Mengen der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion Gesunder unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, das SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert (Kapitel 2.2.3) und die Proteinbindung mit den verschiedenen Antikörper-Subklassen analysiert (Kapitel 2.2.4).



Abb. 3.10: Vergleich der Antigenspezifität der clgG-Subklassen. I: Schwerketten-Antikörper mit langer Scharnier-Region clgG3. II: Konventionelle Antikörper clgG1. III: Schwerketten-Antikörper mit kurzer Scharnier-Region clgG2a. IV: Schwerketten-Antikörper mit kurzer Scharnier-Region clgG2b. V: WGA-Lama-Antiserum. A: Fünf Spuren wurden mit jeweils 4 μg der WGA-gebundenen Proteinfraktion auf einem SDS-Gel aufgetrennt, das Gel auf eine PVDF-Membran transferiert und die einzelnen Membranstreifen entweder mit einem der verschiedenen Cameliden-Antikörper-Subklassen (I-IV) (1 ml, 0,1 μg/μl) oder mit dem gesamten Lama-Antiserum (V) (1 ml, 0,1 μg/μl) hybridisiert. Die Bindung der Cameliden-Immunglobuline wurde mit dem Sekundär-Antikörper *Goat-Anti Llama IgG (h+l) Antibody HRP conjugated* nachgewiesen. B: Unter reduzierenden Bedingungen wurde jeweils eine gleiche Proteinmenge jeder Antikörper-Subklasse (I-IV) elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immunodetektion der verschiedenen Antikörper-Subklassen erfolgte mit dem Sekundär-Antikörper *Goat-Anti Llama IgG (h+l) Antibody HRP conjugated*. Die Exponierungszeit für beide Immunodetektions-Experimente betrug 3 min, so dass ein direkter Vergleich beider *Blots* (A und B) möglich ist.

Abb. 3.10 (A) zeigt, dass die Cameliden-Schwerketten Antikörper vergleichbare Bindungseigenschaften wie die konventionellen Cameliden-Antikörper besitzen. Alle Proteine, die sowohl vom Lamaserum als auch von den konventionellen Antikörpern erkannt wurden, wurden auch von den Schwerketten-Antikörpern clgG3, clgG2a und clgG2b detektiert.

In einem anschließenden Western Blot Experiment (Abb. 3.10, B) wurde die Affinität des Sekundär-Antikörpers zu den einzelnen Cameliden-Antikörper-Subklassen analysiert. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Spezifität des Sekundär-Antikörpers zu den verschiedenen clgG-Subklassen nicht gleich ist. Zu einem erkennt der verwendete Sekundär-Antikörper die leichte Kette der konventionellen Antikörper nicht, da bei ca. 30 kDa keine Färbung zu detektieren ist. Zum anderen ist die Färbungsintensität der Schwerketten-Antikörper mit kurzer Scharnier-Region (Spur III, IV) im Vergleich zu den konventionellen Antikörpern (Spur II) und Schwerketten-Antikörpern mit langer Scharnier-Region (Spur I) schwächer, obwohl eine gleiche Antikörpermenge in jeder Spur analysiert wurde. Die unterschiedlichen Färbungsintensitäten der einzelnen Proteinbanden sind somit auf die höhere Affinität des verwendeten Sekundär-Antikörpers zu den konventionellen Antikörpern zurückzuführen. Im Falle der Schwerketten-Antikörper besitzt der Sekundär-Antikörper eine höhere Affinität zu den Schwerketten-Antikörpern mit langer Scharnier-Region (clgG3), so dass diese intensiver angefärbt werden.

3.2.5 Zweidimensionale Proteinanalyse der Glykoproteine

Durch eine Zweidimensionale (2D) SDS-PAGE wurde mit der gebundenen WGA-Plasmaproteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen eine hochauflösende Auftrennung der Proteine nach ihren isoelektrischen Punkt (1. Dimension) und Molekulargewicht (2. Dimension) unter denaturierenden Bedingungen erreicht (Kapitel 2.2.10.3). Das Coomassie-gefärbte Gel der 2D-PAGE (Abb. 3.11, links) zeigt einen Ausschnitt (pl = 4-7, M_w = 25-260 kDa unter reduzierenden Bedingungen) der hoch bis mittel abundanten Proteine der Lektin-gebundenen Fraktion. Proteinspots, die mit Buchstaben von a-I gekennzeichnet sind, wurden mittels der Tandem-Massenspektrometrie (Kapitel 2.2.11) identifiziert und sind aus der Bildunterschrift zu entnehmen. Unter identischen Bedingungen wurde ein zweites 2D-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den Schwerketten-Antikörperfraktion clgG3 hybridisiert (Kapitel 2.2.4). Alle Proteinspots, die auf dem Coomassie-gefärbten Gel zu sehen sind, wurden auch von den Schwerketten-Antikörpern (Abb. 3.11, rechts) detektiert. Zusätzlich zu diesen Proteinspots erkennen die Cameliden-Schwerketten-Antikörper viele niedrig abundante Proteine, die mit kolloidalem Coomassie nicht zu detektieren sind.





3.2.6 Antikörper-Protein-Wechselwirkung

Vor einer kovalenten Immobilisierung der Cameliden-Antikörper an einer Matrix wurde die Antiköper-Protein-Wechselwirkung durch eine Immunpräzipitation (IP) mit anschließender Immundetektion analysiert (Kapitel 2.2.5). Hierfür wurden die Schwerketten-Antikörper über ihren Fc-Bereich an Protein G-Matrix gebunden und durch die Zugabe der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen eine Antikörper-Antigen-Komplexbindung erreicht. Die nicht gebundene Proteinfraktion wurde durch einen Waschschritt entfernt und gefällt. Die Elution der Antikörpergebundenen Proteinfraktion wurde durch die Zugabe des Lämmli-Puffers erreicht. Die einzelnen Proteinfraktionen wurden auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Durch die Hybridisierung der Membran mit den Schwerketten-Antikörpern clgG3 wurde die Antikörper-Protein-Bindung nachgewiesen. Die Ergebnis (Abb. 3.12) zeigt, dass im Überstand der IP (Spur III) keine Proteine angefärbt werden. Dagegen werden im immunpräzipitierten Material (Spur II) und in der Spur der für die IP eingesetzten Proteinmenge (Spur I) zahlreiche Proteine von den Schwerketten-Antikörpern detektiert. Allerdings wurde vom immunpräzipitierten Material nur 1/4-des gesamten Präzipitats aufgetragen, um eine Proteinüberladung (bedingt durch die relativ hohe Menge der ebenfalls eluierten Antikörper) zu vermeiden. Bei der breiten Proteinbande zwischen 52 kDa und 66 kDa, die nur in der Spur II detektiert wird, handelt es sich um die Cameliden-Schwerketten-Antikörper, die für die IP verwendet wurden. Die konnte durch ein paralleles Coomassie-gefärbtes Gel (nicht gezeigt) mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie detektiert werden.



Abb. 3.12: Antikörper-Protein-Bindung in Lösung. Es wurden 5 µg der WGA-gebundenen Proteinfraktion (Spur I), ¼ des gesamten immunpräzipitierten Materials (Spur II) und die gesamte Proteinfraktion des Überstandes der IP (Spur III) auf einem SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit der clgG3-Antikörperfraktion hybridisiert. Die Detektion der clgG3-Antikörper erfolgte mit *Goat-Anti Llama IgG (h+l) Antibody HRP conjugated*.

3.3 Herstellung des Immunabsorbens und Optimierung der Antikörper-Affinitäts-Chromatographie

3.3.1 Immobilisierung der Cameliden-Schwerketten-Antikörper clgG3

Für die vorliegende Arbeit wurden vier verschiedene kommerziell erhältliche Matrizen für die Immobilisierung der Cameliden-Schwerketten-Antikörper clgG3 getestet. Für die Immobilisierung wurden für 1 ml Trägermatrix jeweils 1 mg Antikörper eingesetzt. Die kovalente Verknüpfung der Antikörper mit dem Trägermaterial wurde dabei entweder über eine ungerichtete Immobilisierung der Antikörper über ihre Aminofunktionen an CNBr-aktivierte Sepharose bzw. an NHS-aktivierte Sepharose oder über eine gerichtete Immobilisierung der Antikörper über die Fc-Region der Immunglobuline an Protein G-Agarose bzw. über das N-Glykan in der C_H2-Domäne der Immunglobuline an eine Hydrazid-aktivierte Agarose erreicht (Kapitel 2.2.6). Aus dem Waschpuffer nach der Kopplung wurde mittels einer Bradford-Messung die Menge an nicht gebundenem Protein bestimmt und daraus die Kopplungsrate (Kapitel 2.2.6, Gleichung 2.1) ermittelt. Die Kopplungsrate der Cameliden-Schwerketten-Antikörper KP_{clgG3} an die jeweilige Matrix ist aus der Tab. 3.3. zu entnehmen.

	CNBr-Sepharose	NHS-Sepharose	Protein G-Agarose	Hydrazid-Agarose
m _{clgG3, Input} [μg]	1000	1000	1000	1000
m _{clgG3,D} [μg]	170	150	925	160
KP _{clgG3} [%]	83	85	7,5	84

Tab. 3.3: Immobilisierungseffizienz der eingesetzten Matrizen.

Jedes Immobilisierungsexperiment wurde zweimal durchgeführt. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Messungen dargestellt. KP_{clgG3}:= Kopplungsrate der Cameliden-Schwerketten-Antikörper an die Matrix; m_{clgG3,Input}:= für die Immobilisierung eingesetzte Menge von Cameliden Schwerketten-Antikörpern clgG3; m_{clgG3,D}:= nicht immobilisierte Menge der Cameliden-Schwerketten-Antikörper an die Matrix.

Die Immobilisierung der Antikörper an die Protein G-Matrix zeigte die geringste Kopplungsrate. Für weitere Untersuchungen wurde daher eine Immobilisierung der Antikörper an die Protein G-Agarose ausgeschlossen.

3.3.2 Vergleich der Bindungskapazität der verschiedenen Immunmatrizen

Die Bindungskapazität der CNBr-, NHS-Sepharose und Hydrazid-Agarose Antikörper-Matrizen wurde in einer Immun-Affinitäts-Chromatographie im Batch-Verfahren getestet (Kapitel 2.2.7.3). Hierfür wurde jede Antikörper-Matrix (Antikörpermenge pro Matrix sind aus der Tab. 3.3 zu entnehmen) mit einer gleichen Proteinmenge der WGA-gebundenen Fraktion inkubiert und die Proteinkonzentration im Durchlauf der Chromatographie mittels einer Bradford-Proteinmessung bestimmt. Das Ergebnis der Affinitäts-Chromatographie (Tab. 3.4) zeigte, dass die untersuchten Immunmatrizen die Fähigkeit besitzen, etwa 92-96 % der eingesetzten Proteinmenge zu binden. Dabei zeigten die clgG3-CNBr-Säule und die clgG3-NHS-Säulen im Vergleich zu der clgG3-Hydrazid-Säule eine um 4 % geringere Proteinbindung. In einem anschließenden Experiment wurden die Immunmatrizen auf ihre Bindungsfähigkeit nach mehrfacher Benutzung geprüft. Hierfür wurde nach jeder Affinitäts-Chromatographie die Proteinkonzentration im Durchlauf gemessen. Dieses Experiment wurde solange durchgeführt, bis die Proteinmenge, die im Durchlauf der Chromatographie detektiert wurde, höher war als die Proteinmenge, die in der Tab. 3.4 angegeben ist. War dies der Fall, so wurde die nicht gebundene Proteinfraktion mit einer SDS-PAGE analysiert und die mit kolloidal-Coomassie gefärbten Proteinbanden mittels der Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Ab 15-facher Benutzung der clgG3-CNBr-Matrix wurden Immunglobuline aus Lama glama im Durchlauf der Affinitäts-Chromatographie detektiert werden. Hingegen wurde beim 15-fachen Gebrauch der clgG3-NHS- und clgG3-Hydrazid-Säulen weder Antikörper im Durchlauf der Chromatographie noch Antikörperverlust des Säulenmaterials detektiert. Allerdings zeigte sich ab 40-facher Verwendung der clgG3-NHS-Matrix und der clgG3-Hydrazid-Matrix eine verringerte Bindungskapazität. Auch dann wurden keine Immunglobuline im Durchlauf der Affinitäts-Chromatographie detektiert. Da die clgG3-Hydrazid- im Vergleich zu der clgG3-NHS-Matrix eine um 4 % höhere Bindungskapazität zu der WGA-gebundenen Proteinfraktion zeigte, wurde diese Matrix für weitere Experimente eingesetzt.

	CNBr-Sepharose	NHS-Sepharose	Hydrazid-Agarose
m _{IAC, Input} [μg]	50	50	50
m _{IAC,D} [μg]	4	4	2
nicht gebunden [%]	8	8	4

Tab. 3.4: Bindungskapazität der Antikörper-Matrizen.

Jede IAC wurde dreimal durchgeführt. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Messungen dargestellt. m_{IAC,Input}:= für die IAC eingesetzte Menge der WGA-gebundenen Proteinfraktion; m_{IAC,D}:= nicht gebundene Proteinmenge vom Immunabsorbens.
3.3.3 Bindung der clgG3-Hydrazid-Matrix in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und Zeit

Die Analyse der optimalen Pufferbedingungen für die Bindung der WGA-gebundenen Plasmafraktion an das Immunabsorbens erfolgte durch Variieren des pH-Wertes unter der Verwendung von PBS bei pH 7.2, eines Tris-HCI-Puffers sowohl bei pH 8.0 als auch bei pH 9.0 und einer 50 mM NH₄HCO₃-Lösung bei pH 8.3 (Kapitel 2.2.7.3). Zur Beurteilung des Bindungspuffers spielte dabei die von der Antikörper-Matrix nicht gebundene Proteinmenge die entscheidende Rolle. Hierfür wurden vier clgG3-Hydrazid-Matrizen, die jeweils mit einer gleichen Antikörpermenge (900 µg) gekoppelt worden waren, mit einer gleichen Proteinmenge der WGA-gebundenen Fraktion (50 µg) in den verschiedenen Pufferlösungen inkubiert und die Proteinkonzentration im Durchlauf der Chromatographie mittels einer Bradford-Messung bestimmt. Die nicht gebundene Proteinmenge der Antikörper-Affinitäts-Chromatographien ist aus der Tab. 3.5 zu entnehmen. Die optimale Pufferlösungen eine geringere Proteinmenge im Durchlauf der Affinitäts-Säule detektiert wurde.

Puffer	10 mM PBS	100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl	50 mM NH ₄ HCO ₃
рН	7.2	8.0	9.0	8.3
m _{clgG, Input} [μg]	50	50	50	50
m _{clgG,D} [μg]	2	5	6	6
nicht gebunden [%]	4	10	12	12

Tab. 3.5: Bindungskapazität der Immun-Affinitäts-Säulen in verschiedenen Pufferlösungen.

Jede IAC wurde dreimal durchgeführt. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Messungen dargestellt. m_{IAC,Input}:= für die IAC eingesetzte Menge der WGA-gebundenen Proteinfraktion; m_{IAC,D}:= nicht gebundene Proteinmenge vom Immunabsorbens.

Darauffolgend wurde die Bindungskapazität der Antikörper-Säulenmatrix bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht (Kapitel 2.2.7.3). Darüber hinaus wurde bei diesem Experiment die Inkubationszeit variiert. Zu sechs clgG3-Hydrazid-Matrizen, auf denen die gleiche Antikörpermenge (900 µg) immobilisiert waren, wurden eine gleiche Proteinmenge (50 µg) der WGA-gebundenen Fraktion in PBS gegeben. Die Bindungsfähigkeit zweier Immunabsorbienten wurde bei 4 °C für 16 h bzw. 3 h analysiert. Vier weitere Immunabsorbienten wurden entweder für 16 h, für 3 h, für 2 h bzw. für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die jeweilige Proteinmenge im Durchlauf der Affinitäts-Chromatographie wurde durch eine Bradford-Messung bestimmt. Die Tab. 3.6 zeigt die Abhängigkeit der Bindungsfähigkeit der Immunabsorbienten von den Parametern Temperatur und Inkubationszeit.

Temperatur [°C]	4	4	21	21	21	21
Zeit [h]	16	3	16	3	2	1
m _{clgG, Input} [μg]	50	50	50	50	50	50
m _{clgG,D} [μg]	3	4	3	3	3	4
nicht gebunden [%]	6	8	6	6	6	8

Tab. 3.6: Abhängigkeit der Proteinbindung von Inkubations-Temperatur und -Zeit.

Jede IAC wurde dreimal durchgeführt. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Messungen dargestellt. m_{IAC,Input}:= für die IAC eingesetzte Menge der WGA-gebundenen Proteinfraktion; m_{IAC,D}:= nicht gebundene Proteinmenge vom Immunabsorbens.

Um eine optimale Bindungskapazität bei der Immun-Affinitäts-Chromatographie zu erzielen, sollte eine Inkubation bei 4 °C unbedingt für 16 h bzw. über Nacht durchgeführt werden, da ansonsten eine größere Proteinmenge von der Antikörper-Säule nicht gebunden wird. Bei der Inkubation bei Raumtemperatur sollte die Inkubationszeit mindestens 2 h betragen, da auch in diesem Fall eine größere Menge der eingesetzten Proteinfraktion vom Immunabsorbienten nicht gebunden wird.

3.3.4 Bindungseffektivität des Immunabsorbens

Die Bindungseffektivität des Immunabsorbens wurde über eine Immun-Affinitäts-Chromatographie (IAC) der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen mit anschließender SDS-PAGE analysiert (Kapitel 2.2.7.3). Hierfür wurden die für die Affinitäts-Chromatographie eingesetzte Proteinmenge und der Durchlauf der Affinitäts-Chromatographie nach einer Proteinfällung gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Das Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen wiederholt, wobei diesmal die Proteinbanden mit einer Silberfärbung visualisiert wurden. Das Ergebnis der IAC ist in Abb. 3.13 gezeigt. Auf dem mit kolloidal-Coomassie gefärbtem Gel konnten mit Ausnahme einer sehr schwachen Proteinbande bei etwa 50 kDa keine weiteren Proteine detektiert werden. Auch mit einer empfindlicheren Silberfärbung konnten im SDS-Gel mit Ausnahme einer auf gleicher Höhe in dem Coomassie-gefärbten Gel detektierten Proteinbande keine weiteren Proteine visualisiert werden. Über das Immunabsorbens konnte eine hohe Abreicherung der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen erzielt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass das Immunabsorbens eine hohe Bindungseffektivität zu der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion Gesunder aufweist.



Abb. 3.13: Bindungseffektivität der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus Normalplasma an das Immunabsorbens. Die Affinitäts-Chromatographie wurde in einem Batch-Verfahren durchgeführt. Auf das Immunabsorbens wurde ein Aliquot (50 µg) der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen gegeben. Das Verhältnis der eingesetzten Antikörpermenge (4 mg) zu der Lektin-gebundenen Proteinmenge betrug 80:1. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die am Immunabsorbens nicht gebundene Proteinfraktion (Durchlauf der IAC) abgefangen und eine Proteinfällung durchgeführt. Mit einer entsprechenden Proteinmenge wurde ebenfalls eine Proteinfällung durchgeführt. Sowohl die für die Chromatographie eingesetzte Proteinmenge als auch der Durchlauf der IAC wurde auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel mit kolloidalem Coomassie (linkes Gel) gefärbt. Das Experiment wurde ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen wiederholt. Für die SDS-PAGE wurden diesmal nur 12,5 µg der WGAgebundenen Proteinfraktion aufgetragen. Dagegen wurde die gesamte Durchlauffraktion der IAC auf das Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel mit Silber (rechtes Gel) angefärbt.

Der Vergleich der (Coomassie-) Färbungsintensität der Proteinbande im Durchlauf mit der Proteinbande auf gleicher Höhe in der Spur der WGA-gebundenen Proteinfraktion zeigt, dass auch dieses Protein zum größten Teil gebunden wird. Allerdings ist der Abreicherungsgrad anderer Proteine der WGA-gebundenen Proteinfraktion höher, da keine weiteren Proteinfärbungen in der nicht gebundenen Antikörperfraktion visualisiert werden konnten. Die im Durchlauf der IAC detektierten Proteinbanden des Coomassie- und des Silber-gefärbten Gels wurden für eine massenspektrometrische Analyse aus den Gelen ausgeschnitten und mit Trypsin proteolytisch gespalten. Mittels der Tandem-Massenspektrometrie und anschließender Proteinsuche in der humanen Swissprot-Datenbank konnten diese Proteinbanden in beiden Fällen als das α_1 -saure Glykoprotein identifiziert werden.

3.3.5 Spezifität des Immunabsorbens

Um die Spezifität des Immunabsorbens zu überprüfen, wurde zu der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus Normalplasma das Testprotein Carcinoembryonales Antigen (CEA) hinzu pipettiert und mit dem CEA-versetzten Plasmaproteingemisch eine Antikörper-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt (Kapitel 2.2.7.3). Eine der Chromatographie entsprechenden Proteinmenge, die nicht gebundene und die gebundene Proteinfraktion wurden nach einer Proteinfällung (Kapitel 2.2.10.1) auf einem SDS-Gel aufgetrennt. In einem Western Blot Experiment wurde die Bindung des CEAs am Immunabsorbens analysiert (Kapitel 2.2.4). Das Ergebnis des Immunoblots zeigt die Abb. 3.14. Für das Testprotein CEA, das im Plasma Gesunder nur in sehr geringen Mengen vorkommt, konnte gezeigt werden, dass es an das verwendete Immunabsorbens nicht signifikant bindet. Dagegen ist die Färbungsintensität der CEA-Bande in der Durchlauffraktion vergleichbar mit dem für die Chromatographie eingesetzte Proteinmenge des CEA-versetzten Proteingemischs.



Abb. 3.14: Überprüfung der Spezifität des Immunabsorbens. Die Affinitäts-Chromatographie wurde in einem Batch-Verfahren durchgeführt. 50 μg der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion aus gesunden Kontrollpersonen wurden mit 1 μg CEA versetzt. Das CEA-versetzte Proteingemisch wurde auf das Immunabsorbens (4 mg Cameliden-Antikörper) geladen. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die am Immunabsorbens nicht gebundene Proteinfraktion (Durchlauf der IAC) abgefangen und die Antikörper-gebundene Proteinfraktion mit einem 0,1 M Glycin-HCI Puffer pH 1.4 von der Antikörpermatrix eluiert. Nach der Proteinfällung einer für die Chromatographie entsprechenden Proteinmenge, der nicht gebundenen und der Antikörper-gebundenen Proteinfraktion wurden die einzelnen Proteinfraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit dem monoklonalen Maus-Antikörper T84.1, der spezifisch die CEACAM-Familienmitglieder CEACAM1, CEACAM5 (CEA) und CEACAM6 bindet.

3.4 Proteinanalytik des mit CEA-versetztem Normalplasmas

3.4.1 Aufarbeitung des mit CEA-versetztem Normalplasmas

Zur Aufarbeitung eines Plasmagemisches aus gesunden Kontrollpersonen wurde 1 ml des Plasmas mit einer Gesamtproteinkonzentration von 61 mg/ml mit 3 620 ng CEA versetzt. Das Verhältnis der CEA-Menge zu der Gesamtproteinmenge im unfraktioniertem CEA-versetzten Plasma betrug somit R_{mCEA/mptot} = 5,9x10⁻⁵. Mit dem CEA-versetzten Plasma aus gesunden Kontrollpersonen wurde eine Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt (Kapitel 2.2.8.1). Die Abb. 3.15 zeigt den Verlauf der WGA-Affinitäts-Chromatographie. Da über Vorversuche (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3) in der WGA-gebundenen Proteinfraktion Serum Albumin detektiert wurde, wurde bei diesem Experiment das WGA-Lektin-Säulenmaterial vor der Elution der Glykoproteine mit dem 18-fachen Säulenvolumen gewaschen, um die unspezifische Albumin-Bindung zu reduzieren. In der WGAgebundenen Proteinfraktion, die durch die kompetitive Verdrängung der Glykoproteine mit einem 0,5 M GlcNAc-haltigen Puffer eluiert wurde, konnte über eine Bradford-Messung eine Gesamtproteinmenge von 2,4 mg (in 10 ml) bestimmt werden (siehe Tab. 3.7). Somit konnten über die WGA-Lektinfraktionierung etwa 96 % der eingesetzten Gesamtproteinmenge abgereichert werden. Durch die Abreicherung von nicht glykosylierten Proteinen und von Glykoproteinen, die vom WGA-Lektin nicht spezifisch gebunden werden, konnte das Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten Proteinmenge der WGA-gebundenen Proteinfraktion auf 1,3x10⁻³ vergrößert werden.

WGA-Affinitäts-Chromatographie	m _{Ptot} [μg]	m _{cea} [ng]	R _{mCEA/mptot} [-]	Abreicherung [%]
nicht gebundene Lektinfraktion	58 000	150	-	-
WGA-gebundene Proteinfraktion	2 400	3 143	1,3x10 ⁻³	96,06

Tab. 3.7: Autarbeitung des CEA-versetzen Plasmas über die WGA-Aminitats-Chromatograph	ographie.
---	-----------

 m_{Ptot} := Menge der WGA-gebundenen Proteinfraktion; m_{CEA} := CEA-Menge. $R_{mCEA/mptot}$:= Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten Proteinmenge.

Von der CEA-Ausgangsmenge wurden 150 ng in der nicht gebundenen Lektinfraktion detektiert. Dagegen konnten etwa 87 % (3 143 ng) der eingesetzten CEA-Menge in der WGA-gebundenen Proteinfraktion bestimmt werden. Der Verbleib einer CEA-Menge von 127 ng konnte nicht bestimmt werden.



Abb. 3.15: Chromatogramm der WGA-Affinitäts-Chromatographie. Die gemessenen Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (A_{280nm}), 260 nm (A_{260nm}) und 220 nm (A_{220nm}) sind auf der Y-Achse dargestellt. Links: WGA-Affinitäts-Chromatographie des CEA-versetzten Plasmas aus gesunden Kontrollpersonen. Etwa 61 mg Gesamtproteinmenge aus einem Plasmagemisch gesunder Kontrollpersonen wurde mit 3 640 ng CEA (Sigma Aldrich) versetzt und mit dem CEA-versetztem Plasma eine WGA-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. Nach der Entfernung der am Lektin nicht gebundenen Proteine durch einen Waschschritt mit dem WGA-Waschpuffer (130 ml) wurde die WGA-gebundene Proteinfraktion durch kompetitive Verdrängung mit einer 0,5 M GlcNAc-haltigen Lösung eluiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit dem WGA-Waschpuffer gespült, bis die Absorptionen auf den Wert des WGA-Waschpuffers gesunken waren. Rechts: Kontroll-Lauf ohne Proteinprobe.

Wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, ist die optimale Proteinbindung des Immunabsorbens in PBS gegeben. Die WGA-gebundene Proteinfraktion des Plasmas, die in einer 0,5 M GlcNAc-haltigen Lösung vorlag, wurde über eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie (Abb. 3.16) in PBS umgepuffert (Kapitel 2.2.8.2), wobei das Volumen des Proteingemisches auf 14 ml vergrößert wurde.

Tab. 3.8: Umpufferung der WGA-gebundenen Proteinfraktion in PBS.

	m _{Ptot} [μg]	m _{cea} [ng]	R _{mCEA/mptot} [-]
Grössen-Ausschluß-Chromatographie	2 252	2 996	1,3x10 ⁻³

 m_{Ptot} := Menge der WGA-gebundenen Proteinfraktion; m_{CEA} := CEA-Menge. $R_{mCEA/mptot}$:= Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten Proteinmenge.

Durch eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford konnte im umgepufferten Proteingemisch eine Gesamtproteinmenge von 2 252 μ g (Tab.3.8) bestimmt werden. Dies bedeutet, dass durch die Grössen-Ausschluß-Chromatographie ein Gesamtproteinverlust von etwa 6,2 % verursacht wurde. Die CEA-Menge in der WGA-gebundenen Proteinfraktion nach der Umpufferung in PBS betrug 2 996 ng (entspricht 82,3 % der Ausgangs-CEA-Menge).





Die in PBS vorliegende WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion wurde auf das Immunabsorbens gegeben und eine Immun-Affinitäts-Chromatographie (IAC) durchgeführt (Kapitel 2.2.8.3). Wie aus dem Chromatogramm der ersten IAC (IACI) (Abb. 3.17, oben links) zu sehen ist, konnte an das Immunabsorbens eine relativ große Menge der Probe gebunden werden. Allerdings konnte keine vollständige Abtrennung der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion erreicht werden, da im Vergleich zu einer Protein-freien IAC (Abb. Abb. 3.17, unten links) im Durchlauf der IACI ein größerer *Peak* zu sehen ist. Das Volumen der Durchlauffraktion von IACI betrug 40 ml. Über eine Bradford-Messung konnte in dieser Fraktion eine Gesamtproteinmenge von 312 µg bestimmt werden (Tab. 3.9).

	m _{Ptot} [μg]	m _{cea} [ng]	R _{mCEA/mptot} [-]	Abreicherung [%]
Immun-Affinitäts-Chromatographie I				
Durchlauf	312	2 690	8,6x10 ⁻³	99,48
gebundene Antikörperfraktion	1 840	52	-	-
Immun-Affinitäts-Chromatographie II				
Durchlauf	48	2 333	4,9x10 ⁻²	99,92
gebundene Antikörperfraktion	260	8	-	-

Tab. 3.9: Immun-Affinitäts-Chromatographie der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus CEA-versetztem Normalplasma.

Der Abreicherungsgrad bezieht sich auf die gesamte Plasmaproteinmenge von 61 mg. m_{Ptot}:= Menge der WGA-gebundenen Proteinfraktion; m_{CEA}:= CEA-Menge. R_{mCEA/mptot} := Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten Proteinmenge.

Somit konnten in der ersten IAC etwa 85 % der WGA-gebundenen Proteinmenge abgetrennt werden. Im Durchlauf der IACI konnte eine CEA-Menge von 2 690 ng (74,3 % der CEA-Ausgangsmenge) detektiert werden. Vom Immunabsorbens wurden etwa 52 ng CEA gebunden. Von der eingesetzten CEA-Menge konnten 306 ng in keinem der Proteinfraktionen (Durchlauf und Eluat der Chromatographie) nachgewiesen werden. Durch den hohen Abreicherungsgrad konnte das Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten WGA-gebundenen Proteinmenge auf $R_{mCEA/mptot} = 8,6x10^{-3}$ vergrößert werden. Um die Plasmaproteine noch weiter abzureichern, wurde mit dem Durchlauf der der ersten IAC eine zweite IAC (IACII) durchgeführt (Abb. 3.17, oben rechts).



Abb. 3.17: Chromatogramm der Immun-Affinitäts-Chromatographie. Die gemessenen Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (A_{280nm}), 260 nm (A_{260nm}) und 220 nm (A_{220nm}) sind auf der Y-Achse dargestellt. Oben links: Immun-Affinitäts-Chromatographie I (IACI). Die in PBS umgepufferte WGA-gebundene Proteinfraktion wurde auf 60 ml Cameliden-Antikörpermatrix (3 mg clgG3/ml Agarose) aufgegeben. Nach etwa 45 ml Volumenverbrauch wurde ein Absorptionsanstieg der genannten Wellenlängen detektiert. Die Durchlauffraktion der IAC wurde gesammelt. Die Elution der Antikörpergebundenen Proteinfraktion wurde mit 0,1 M Glycin-HCl pH 1.4 erreicht. Oben rechts: Immun-Affinitäts-Chromatographie II (IACII). Die IAC erfolgte wie oben beschrieben. Hierfür wurde der Durchlauf der ersten IAC mit einem Volumen 40 ml eingesetzt. Unten links: Kontroll-Lauf ohne aufgetragenes Protein. Unten rechts: Elution des CEAs während IACI und IACII.

Das Volumen der Durchlauffraktion von IACII betrug 60 ml. Über eine Bradford-Messung konnte in dieser Fraktion eine Gesamtproteinmenge von 48 µg bestimmt werden (Tab. 3.9). Durch die zweite IAC konnten abermals etwa 85 % der eingesetzten Proteinmenge abgetrennt werden (Tab. 3.9). Auch bei diesem Experiment wurde ein Verlust der eingesetzten CEA-Menge beobachtet. Im Durchlauf der IACII konnte eine CEA-Menge von 2 333 ng (entspricht 64,4 % der CEA-Ausgangsmenge) detektiert werden. Dagegen wurden im Eluat nur 8 ng CEA nachgewiesen. Durch den hohen Abreicherungsgrad konnte das Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten WGA-gebundenen Proteinmenge auf 4,9x10⁻² vergrößert werden.

Über Vorversuche wurde gezeigt, dass das WGA-Lektin eine Proteinlösung sowohl in PBS als auch in einem WGA-Waschpuffer mit einer vergleichbaren Effizienz hochspezifisch bindet. Zur Aufkonzentrierung der Durchlauffraktion der IACII (60 ml) wurde das Proteingemisch erneut auf das WGA-Lektin gegeben und eine Lektin-Affinitäts-Chromatographie (Kapitel 2.2.8.1) durchgeführt. Die WGAgebundene Proteinfraktion wurde durch die kompetitive Verdrängung der Glykoproteine mit einem 0,5 M GlcNAc-haltigen Puffer in 6 ml eluiert (Abb. 3.18, links). Über eine Bradford-Messung konnte eine Gesamtproteinmenge von 46 µg bestimmt werden (siehe Tab. 3.10). In der WGA-gebundenen Proteinfraktion wurde eine CEA-Menge 2 250 ng (62,2 % der Ausgangs-CEA-Menge) detektiert. Auch durch diesen Chromatographie-Schritt wurde ein Proteinverlust verursacht. Allerdings blieb das Verhältnis der CEA-Konzentration zu der Gesamtproteinkonzentration des Proteingemisches mit $R_{mCEA/mptot} = 4,9x10^{-2}$ konstant.

	m _{Ptot} [μg]	m _{cea} [ng]	R _{mCEA/mptot} [-]
WGA-Affinitäts-Chromatographie II			
nicht gebundene Lektinfraktion	n.d.	70	-
WGA-gebundene Proteinfraktion	46	2 250	4,9x10 ⁻²
Grössen-Ausschluß-Chromatographie II	43	2 103	4,9x10 ⁻²

Tab. 3.10: Aufkonzentrieru	ng und Umpufferung	der Proteinprobe nach	der zweiten IAC in 50) mM NH₄HCO ₃ .
----------------------------	--------------------	-----------------------	-----------------------	----------------------------

 m_{Ptot} := Menge der WGA-gebundenen Proteinfraktion; m_{CEA} := CEA-Menge. $R_{mCEA/mptot}$:= Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten Proteinmenge. n.d.: = nicht detektierbar.

Das um den Faktor 10 aufkonzentrierte Proteingemisch (6 ml) wurde in einem nächsten Schritt über eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie in 50 mM NH₄CO₃ umgepuffert (Kapitel 2.2.8.2). Hierbei fand eine Volumenvergrößerung (Faktor 3/2) auf 9 ml statt (Abb. 3.18, rechts). Die CEA-Menge in dem umgepuffertem Proteingemisch betrug 2 103 ng (58,1 % der CEA-Ausgangsmenge). Auch bei dieser Chromatographie blieb das $R_{mCEA/mptot} = 4,9x10^{-2}$ konstant, da der prozentuale Verlust des CEAs und der gesamten Proteinmenge gleich war.



Abb. 3.18: Aufkonzentrierung der Durchlauffraktion von IACII und Umpufferung des Proteingemisches in einer 50 mM NH₄HCO₃-Lösung. Die gemessenen Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (A_{280nm}), 260 nm (A_{260nm}) und 220 nm (A_{220nm}) sind auf der Y-Achse dargestellt. Links: Aufkonzentrierung der Durchlauffraktion von IACII. Das gesamte Durchlauf-volumen der zweiten IAC wurde auf 1 ml WGA-Säulenmaterial (4,8 mg WGA-Lektin/ml Agarose) geladen und eine WGA-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. Die WGA-gebundene Proteinfraktion wurde mit 6 ml einer 0,5 M GlcNAc-haltigen Lösung in PBS eluiert. Rechts: Umpufferung der WGA-gebundenen Proteinfraktion in 50 mM NH₄CO₃-Lösung. Das Proteinhaltige Gemisch wurde zwischen dem Volumenintervall 14 ml und 23 ml gesammelt. Somit wurde über die Grössen-Ausschluß-Chromatographie das Volumen des Proteingemisches von 6 ml auf 9 ml vergrößert.

3.4.2 Proteinidentifizierung durch LC-MS

Vom unfraktionierten Plasma, von der WGA-gebundenen Proteinfraktion des mit CEA-versetzten Plasmas und von der durch die Immun-Affinitäts-Chromatographie (IAC) weiter abgereicherten Proteinfraktion wurde jeweils eine gleiche Proteinmenge für eine LC-MS vorbereitet und (Kapitel 2.2.11.3) mit der Protease Trypsin proteolytisch verdaut. Von jeder Probe wurden drei LC-MS/MS^E-Läufe unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Proteinidentifizierung basierte auf dem Abgleich der im MS^E-Experiment parallel zu den MS-Daten erhaltenen Fragmentierungsmustern der tryptischen Peptide mit den theoretisch zu erwartenden Fragmentmustern für die tryptischen Peptide von humanen Proteinen in der Datenbank "Swissprot". Für eine relative Quantifizierung wurden die *Peak*-Intensitäten im LC/MS-Chromatogramm herangezogen. Die Auswertungen wurden mit dem Program "ProteinLynx-Expression Analysis" durchgeführt.

Tab. 3.11: Durch die LC-MS^E-Massenspektrometrie identifizierte und quantifizierte Proteine des aufgearbeiteten, CEAversetzten Plasmas.

Rang	Proteine in aufgearbeitetem, CEA-versetztem Plasma	R _{D-IAC/Plasma}	R _{D-IAC/WGA}
1	Attractin (Mahogany Homolog)		3,23
2	α_1 -saures Glykoprotein 1 (Orosomucoid-1)	12,50	1,75
3	Cholinesterase		
4	α_2 -Macroglobulin	0,10	0,03
5	α_1 -saures Glykoprotein 2 (Orosomucoid-2)	8,33	0,97
6	Lumican (Keratansulfat Proteoglykan Lumican)		0,49
7	Carcinoembryonales Antigen (CEA)		
8	L-Selectin (Leukozyt Adhäsions-Molekül)		
9	Corticosteroid binding globulin		
10	Lysosome-assoziiertes Membran Glykoprotein 2 (CD107b Antigen)		

Proteine, die nur in einem LC-MS-Lauf identifiziert wurden, wurden aus der Proteinliste entfernt. Der Rang bzw. die Reihenfolge der Protein-Nummerierung basiert auf die Signifikanz der ermittelten Übereinstimmungen, die in der Swissprot-Datenbank gefunden wurden. Peptide mit einem *"score"* <100 wurden aus der Liste entfernt. Jede Probe wurde vor der LC-MS^E-Massenspektrometrie mit einem Enolase-Standard (50 fmol/µl) versetzt. Bei der Quantifizierung wurde jede Probe auf die Enolase normalisiert. R_{D-IAC/Plasma}:= Verhältnis der Proteinabundanz der Durchlauffraktion der IAC zum unfraktioniertem Plasma. R_{D-IAC/WGA}:= Verhältnis der Proteinabundanz der Durchlauffraktion der IAC zu der WGA-gebundenen Proteinfraktion.

Im Durchlauf der IAC konnten insgesamt 10 Proteine detektiert werden, die in Tab. 3.11 absteigend nach ihrer Rangstufe (aus der Signifikanz der ermittelten Übereinstimmungen abgeleitete "scores") dargestellt sind. Die Größe des Quotienten R ist ein Maß für die An- bzw. Abreicherung des betreffenden Proteins durch die WGA-Lektin-Affinitäts-Chromatographie. Der Quotient R_{DclgG3/WGA} bzw. R_{DcleG3/Plasma} gibt somit die relative Proteinabundanz der Durchlauffraktion der IAC zu der WGAgebundenen Proteinfraktion bzw. zum unfraktioniertem Plasma wieder. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Durchlauffraktion der IAC nur ca. 1,8 % der Proteinmenge der WGA-gebundenen Proteinfraktion und nur ca. 0,07 % des Plasmas enthält. Fünf der 10 Proteine, die in der Durchlauffraktion der IAC detektiert wurden, konnten erst durch die Abreicherungsprozedur über die IAC visualisiert werden und sind in Tab. 3.11 fett unterlegt. Unter diesen 10 Proteinen konnte das Carcinoembryonales Antigen (CEA) identifiziert werden. Somit gehört das CEA zu den abundanten Proteinen des Proteingemisches, die vom Immunabsorbens nicht gebunden wurden. Das oben beschriebene Verfahren zur Aufarbeitung des mit CEA-versetzten Normalplasmas wurde insgesamt viermal durchgeführt. Hierbei wurden immer wieder die gleichen Proteine im Durchlauf der IAC identifiziert. Von den 10 Proteinen konnten für jede Aufarbeitung drei Proteine im unfraktioniertem Plasma und fünf in der Lektin-gebundenen Proteinfraktion ohne den zusätzlichen Abreicherungsprozedur über IAC identifiziert werden (Abb. 3.19).



Abb. 3.19: Schnittmenge der mittels LC-MS identifizierten Proteine in den Plasmaproteinproben. Proteine des mit CEA-versetzten unfraktioniertem Plasmas (A), der WGA-gebundenen Proteinfraktion (B) und der Durchlauffraktion der IAC (C). In dem unfraktioniertem mit CEA-versetztem Plasma konnten insgesamt 59 Proteine (Anhang, Tab. 11.1) identifiziert werden. Von diesen Proteinen konnten 26 gemeinsame Proteine in der WGA-gebundenen Fraktion (Tab. 3.1) und 3 Proteine im Durchlauf der IAC (Tab.

3.11) identifiziert werden. In der WGA-gebundenen Proteinfraktion des mit CEA-versetzten Plasmas konnten 63 Proteine identifiziert werden, wobei fünf dieser Proteine auch im Durchlauf der IAC identifiziert werden konnten. Im Durchlauf der IAC konnten 10 Proteine identifiziert werden. Insgesamt wurden drei Proteine identifiziert, die jede Proteinprobe enthält.

3.5 Proteinanalytik von Plasmen von Kolonkarzinompatienten

3.5.1 Aufarbeitung der Plasmen von Kolonkarzinompatienten

Um über das entwickelte Verfahren ein bekanntes gering konzentriertes Markerprotein in Patientenplasmen zu identifizieren, wurden die Plasmen von Kolonkarzinompatienten analysiert, die im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte CEA-Konzentration in ihren Plasmen aufweisen. Die Aufarbeitung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.4 beschrieben. In einem ersten Experiment wurde von einem männlichen Patienten das Plasma analysiert, das eine Gesamtproteinkonzentration von 66,8 mg/ml und eine CEA-Konzentration von 5 212 ng/ml enthielt. In dem unfraktionierten Patientenplasma betrug das Verhältnis der CEA-Menge zu der Gesamtproteinmenge $R_{mCEA/mPtot} = 7,8x10^{-5}$. Zur Aufarbeitung des Patientenplasmas wurde das Plasma in einem Volumen von 900 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Gesamtproteinmenge 60,12 mg mit 4 690 ng CEA. Die Gesamtproteinmenge, die nach einer Bradford-Messung, und die CEA-Menge, die im Zentrallaboratorium des Instituts für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, mittels eines CEA-spezifischen ELISA-*Assays* (Roche [13]) bestimmt wurde, ist für die Proteinprobe in Tab. 3.12 dargestellt.

Zur Anreicherung der Glykoproteine wurde mit dem Patientenplasma eine Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt (Kapitel 2.2.8.1). Durch die WGA-Lektinfraktionierung des Patientenplasmas konnten ca. 96 % der gesamten Plasmaproteinmenge abgetrennt werden. Durch die kompetitive Verdrängung der WGA-gebundenen Plasmaproteine mit einem 0,5 M GlcNAc-haltigen Puffer konnte eine Gesamtproteinmenge von etwa 2,28 mg (10 ml) von dem Lektin-Säulenmaterial eluiert werden. Von der CEA-Ausgangsmenge (4690 ng) konnten etwa 86 % in der WGA-gebundenen Proteinfraktion detektiert werden. Etwa 3 % des CEAs (153 ng) wurden im Durchlauf der WGA-Affinitäts-Chromatographie detektiert. Der Rest der CEA-Menge konnte in keiner der Proteinfraktionen nachgewiesen werden. Das CEA wurde hierbei mit einem R_{mCEA/mptot} = 1,8x10⁻³ angereichert. Wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, ist die optimale Proteinbindung des Immunabsorbens in PBS gegeben. Da die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion mit einem 0,5 M GlcNAc-haltigen Puffer vom WGA-Säulenmaterial eluiert wurde, musste für eine optimale Antikörperbindung eine Umpufferung des Proteingemischs in PBS vorgenommen werden. Hierfür wurde eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie durchgeführt (Kapitel 2.2.8.2). Durch diesen Schritt wurde das Volumen des Proteingemischs auf 14 ml vergrößert. In der PBS-umgepufferten WGA-gebundenen Proteinfraktion konnte eine CEA-Menge detektiert werden, die etwa 77,5 % der CEA-Ausgangsmenge entsprach. Da ein gleicher prozentualer Verlust für die gesamte Proteinmenge bestimmt wurde, veränderte sich das Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten Proteinmenge ($R_{mCEA/mptot} = 1,8x10^{-3}$) durch die Umpufferung nicht.

Im nächsten Schritt wurde das Proteingemisch über das Immunabsorbens passiert (Kapitel 2.2.8.3). Mit der Durchlauffraktion der ersten Immun-Affinitäts-Chromatographie (IACI) (40 ml) wurde eine zweite Immun-Affinitäts-Chromatographie (IACII) durchgeführt. Dadurch vergrößerte sich das Volumen des Proteingemischs um den Faktor 3/2 (60 ml). Durch die Bindung der WGA-gebundenen Plasmafraktion an das Immunabsorbens konnten nach den zwei IAC-Schritten insgesamt 97 % der WGA-gebundenen Plasmafraktion abgereichert werden. Im Vergleich zum unfraktioniertem Plasma betrug die gesamte Proteinmenge im Durchlauf der zweiten IAC nur noch 0,099 %. Somit konnten insgesamt ca. 99,9 % der gesamten Plasmaproteinmenge abgetrennt werden. Das Verhältnis der CEA-Menge zur Gesamtproteinmenge im Durchlauf der IAC wurde mit $R_{mCEA/mptot} = 4,8x10^{-2}$ bestimmt. Dagegen betrug das Verhältnis der CEA-Menge zur Gesamtproteinmenge im unfraktioniertem Plasma $R_{mCEA/mptot} = 7,8x10^{-5}$. Das bedeutet, dass das CEA im Vergleich zum unfraktioniertem Plasma Patientenplasma um den Faktor F = 615 (4,8x10⁻²/7,8x10⁻⁵) angereichert wurde. Allerdings führte die Aufarbeitung über das Immunabsorbens auch zu einem Verlust, da nur etwa 60 % der CEA-Ausgangsmenge (2 880 ng von 4 690 ng) im Durchlauf der IAC detektiert wurde.

Abreicherung [%] m_{CEA} [ng] R_{mCEA/mptot} [-] m_{Ptot} [μg] 7,8x10⁻⁵ Plasma 60 120 4690 WGA-Affinitäts-Chromatographie Durchlauf 58 500 153 gebundene Lektinfraktion 2 280 4164 $1,8x10^{-3}$ 96,20 Grössen-Ausschluß-Chromatographie in PBS 2 0 2 0 3635 1,8x10⁻³ Antikörper-Affinitäts-Chromatographie I $8,5x10^{-3}$ nicht gebundene Antikörperfraktion 368 3135 99,38 gebundene Antikörperfraktion 1 540 64 Antikörper-Affinitäts-Chromatographie II $4,8x10^{-2}$ nicht gebundene Antikörperfraktion 60 2880 99,90 gebundene Antikörperfraktion 250 17

Tab. 3.12: Aufarbeitung von 4 690 ng CEA in 900 μI Plasma eines Kolonkarzinompatienten.

Der Abreicherungsgrad bezieht sich auf die gesamte Plasmaproteinmenge von 60,12 mg. m_{Ptot} : = Gesamtproteinmenge; m_{CEA} := CEA-Menge; $R_{mCEA/mptot}$:= Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten Proteinmenge. Die Durchlauffraktion der IAC wurde zur Aufkonzentrierung des Proteingemisches über eine Affinitäts-Chromatographie an das WGA-Lektin gebunden und mit 6 ml eines 0,5 M GlcNAc-haltigen Puffers durch kompetitive Verdrängung der Glykoproteine vom Lektin-Säulenmaterial eluiert (Kapitel 2.2.8.1). Dadurch konnte das Volumen des Proteingemisches auf 1/10 reduziert werden. Da GlcNAc-Monosaccharide nicht flüchtig sind, wurde das Proteingemisch über eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie in 50 mM NH₄HCO₃ umgepuffert (Kapitel 2.2.8.2). Auch bei dieser Chromatographie wurde das Volumen des Proteingemischs um den Faktor 3/2 (9 ml) vergrößert. Nach diesem Konzentrierungsschritt wurden in dem aufgearbeiteten Proteingemisch durch einen ELISA-*Assay* 2 380 ng CEA nachgewiesen (51 % der ursprünglichen CEA-Menge von 4 690 ng). Die Gesamtproteinmenge betrug nach der Umpufferung des Proteingemisches 51 μ g. Das Verhältnis des CEAs zu der Gesamtproteinmenge konnte mit R_{mCEA/mptot} = 4,7x10⁻² bestimmt werden.

In einem weiteren Experiment wurde das Plasma einer Kolonkarzinompatientin analysiert. Die Gesamtproteinkonzentration des Plasmas betrug 71 mg/ml mit einer CEA-Konzentration von 4 454 ng/ml. In dem unfraktionierten Patientenplasma betrug das Verhältnis der CEA-Menge zu der Gesamtproteinmenge $R_{mCEA/mPtot} = 6,3x10^{-5}$. Zur Aufarbeitung des Patientenplasmas wurde ein Volumen von 850 µl Plasma eingesetzt. Dies entspricht einer Gesamtproteinmenge von 60,35 mg mit einer CEA-Menge von 3 786 ng. Die Gesamtproteinmenge, die durch eine Bradford-Messung, und die CEA-Menge, die mittels eines CEA-spezifischen ELISA-Assays (Roche [13]) bestimmt wurde, ist für die einzelnen Aufarbeitungsschritte in Tab. 3.13 dargestellt. Zur Anreicherung der Glykoproteine wurde eine WGA-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt (Kapitel 2.2.8.1). Durch die WGA-Lektinfraktionierung des Patientenplasmas konnten 96,12 % der gesamten Plasmaproteinmenge abgereichert werden. Durch die kompetitive Verdrängung der WGA-gebundenen Plasmaproteine mit einem 0,5 M GlcNAc-haltigen Puffer konnte eine Gesamtproteinmenge von 2,34 mg (10 ml) von dem Lektin-Säulenmaterial eluiert werden. Von der CEA-Ausgangsmenge (3 786 ng) konnten 88,8 % (3 364 ng) in der WGA-gebundenen Proteinfraktion detektiert werden. Etwa 5 % (198 ng) der CEA-Ausgangsmenge wurden im Durchlauf der WGA-Lektin-Säule nachgewiesen. Der Rest der CEA-Menge konnte in keiner der Proteinfraktionen nachgewiesen werden. Durch die WGA-Lektinfraktionierung des Patientenplasmas konnte das CEA auf ein Verhältnis von $R_{mCEA/mptot} = 1,4x10^{-3}$ angereichert werden.

Wie auch zuvor für das andere Patientenplasma beschrieben, wurde über eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie eine Umpufferung des Proteingemischs in PBS vorgenommen (Kapitel 2.2.8.2), wobei das Volumen des Proteingemischs auf 14 ml vergrößert wurde. In der PBS-umgepufferten WGA-gebundenen Proteinfraktion konnte eine CEA-Menge detektiert werden, die etwa 78,6 % der CEA-Ausgangsmenge entsprach.

	m _{Ptot} [µg]	m _{cea} [ng]	R _{mCEA/mptot} [-]	Abreicherung [%]
Plasma	60 350	3786	6,3x10 ⁻⁵	-
WGA-Affinitäts-Chromatographie				
Durchlauf	58 000	198	-	-
gebundene Lektinfraktion	2 340	3 364	1,4x10 ⁻³	96,12
Grössen-Ausschluß-Chromatographie				
in PBS	2 126	2 977	1,4x10 ⁻³	-
Antikörper-Affinitäts-Chromatographie I				
nicht gebundene Antikörperfraktion	329	2 573	7,8x10 ⁻³	99,45
gebundene Antikörperfraktion	1 658	45	-	-
Antikörper-Affinitäts-Chromatographie II				
nicht gebundene Antikörperfraktion	49	2 192	4,5x10 ⁻²	99,92
gebundene Antikörperfraktion	262	12	-	-

Tab. 3.13: Aufarbeitung von 3 786 ng CEA in 850 µl Plasma eines Kolonkarzinompatienten.

Der Abreicherungsgrad bezieht sich auf die gesamte Plasmaproteinmenge von 60,35 mg. m_{Ptot} : = Gesamtproteinmenge; m_{CEA} := CEA-Menge; $R_{mCEA/mptot}$:= Verhältnis der CEA-Menge zu der gesamten Proteinmenge.

Mit dem in PBS-umgepufferten Proteingemisch wurde eine Immun-Affinitäts-Chromatographie (IAC) durchgeführt (Kapitel 2.2.8.3). Mit der Durchlauffraktion der ersten IAC (40 ml) wurde eine weitere IAC durchgeführt und die Durchlauffraktion der IAC erneut abgefangen (60 ml). Durch die Bindung der WGA-gebundenen Plasmafraktion an das Immunabsorbens konnte eine Abreicherung der gesamten Plasmaproteinmenge von ca. 98 % erreicht werden. Im Vergleich zum unfraktioniertem Plasma betrug die gesamte Proteinmenge im Durchlauf der zweiten IAC nur noch 0,081 %. Somit konnten insgesamt ca. 99,92 % der gesamten Plasmaproteinmenge abgetrennt werden. In der Durchlauffraktion der IAC wurde ein Verhältnis des CEAs zu der Gesamtproteinmenge von $R_{mCEA/mptot} = 4,5x10^{-2}$ bestimmt; das CEA wurde also im Vergleich zum unfraktioniertem Patientenplasma um den Faktor F = 714 ($4,5x10^{-2}/6,3x10^{-5}$) angereichert. Auch hier führte die Aufarbeitung über das Immunabsorbens auch zu einem Verlust, da nur etwa 58 % der CEA-Ausgangsmenge (2 192 ng von 3 786 ng) im Durchlauf der IAC detektiert wurde.

Wie oben beschrieben, wurde das Proteingemisch zur Aufkonzentrierung über eine Affinitäts-Chromatographie an das WGA-Lektin gebunden durch eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie in 50 mM NH₄HCO₃ umgepuffert (Kapitel 2.2.8.1 und Kapitel 2.2.8.2). In der Abb. 3.20 ist der prozentuale Verlauf der CEA-Menge und der Gesamtproteinmenge für die einzelnen Proteinfraktionen während der Aufarbeitung von den Patientenplasmen (A und B) und vom CEA-versetztem Plasma aus gesunden Kontrollpersonen (C) (Kapitel 3.4) dargestellt.





Abb. 3.20: Prozentualer Verlauf der CEA-Menge und der Gesamtproteinmenge im aufgearbeiteten Plasma. Etwa 60 mg Plasmagesamtproteinmenge wurde für jede Aufarbeitung eingesetzt. A: Aufarbeitung von 4 690 ng CEA in 900 µl Patientenplasma. B: Aufarbeitung von 3 786 ng CEA in 850 µl Patientenplasma. C: Aufarbeitung von 3 620 ng in 1 ml CEA-versetztem Plasmapool aus gesunden Kontrollpersonen (100%: CEA-Menge und die Gesamtproteinmenge im Plasma (1)). Mit den Patientenplasmen (A und B) bzw. mit dem CEA-versetztem Plasmagemisch aus gesunden Kontrollpersonen (C) wurden eine WGA-Affinitäts-Chromatographie (2) durchgeführt und die nicht glykosylierten Plasmaproteine abgereichert. Die WGAgebundene Plasmaproteinfraktion wurde über eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie (SEC) (3) in PBS umgepuffert. Das in PBS-umgepufferte Plasmaproteingemisch wurde auf das Immunabsorbens gegeben und eine Immun-Affinitäts-Chromatographie (4) durchgeführt. Mit der nicht gebundenen Antikörperfraktion wurde zur weiteren Abreicherung der Plasmaproteine eine zweite Immun-Affinitäts-Chromatographie (5) durchgeführt. Zur Aufkonzentrierung des Proteingemisches der Durchlauffraktion der IAC wurden die Proteine über eine Affinitäts-Chromatographie an das WGA-Lektin gebunden (6). Die WGA-gebundene Proteinfraktion wurde anschließend über eine SEC in eine Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung umgepuffert (7). Ptot:= Gesamtprotein. Die Abb. 3.20 zeigt, dass durch die WGA-Lektinfraktionierung der Plasmen eine hohe Abreicherung der gesamten Plasmaproteine gegeben ist. Während die Kurve, die die prozentuale Plasmagesamtproteinmenge (Ptot) beschreibt, durch die Aufarbeitung gegen null tendiert, fällt die CEA-Menge maximal auf 51 % ab. Insgesamt wird gezeigt, dass die Abreicherung der Gesamtproteinmenge und die Anreicherung des CEAs durch die Aufarbeitungsprozedur reproduzierbar sind.

3.5.2 Proteinidentifizierung durch LC-MS

Die Durchlauffraktionen der IAC der Patientenplasmen wurden für eine LC-MS-Analyse vorbereitet und mit der Protease Trypsin proteolytisch gespalten (Kapitel 2.2.11.3). Von jeder Probe wurden drei LC-MS/MS^E-Läufe unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Proteinidentifizierung basierte auf dem Abgleich der im MS^E-Experiment parallel zu den MS-Daten erhaltenen Fragmentierungsmustern der tryptischen Peptide mit den theoretisch zu erwartenden Fragmentmustern für die tryptischen Peptide von humanen Proteinen in der Datenbank "Swissprot". Peptide mit einem *"score"* von <100 wurden aus der erhaltenen Proteinliste entfernt.

Rang	Proteine in aufgearbeitetem Patientenplasma
1	Plasma Protease C1 Inhibitor (C1INH)
2	α_1 -saures Glykoprotein 1 (Orosomucoid-1)
3	α_1 -saures Glykoprotein 2 (Orosomucoid-2)
4	Lumican (Keratansulfat Proteoglykan Lumican)
5	Humanes Serum Albumin [*]
6	Carcinoembryonales Antigen (CEA)
7	Attractin (Mahogany Homolog)
8	Carboxypeptidase N Untereinheit 2
9	IgA-C _L 1 Region

Tab. 3.14: Mittels der MS^E-Massenspektrometrie identifizierte Proteine des aufgearbeiteten Patientenplasmas (A).

* nicht glykosyliertes Protein.

Tab. 3.14 zeigt die mittels der LC-MS-Analyse identifizierten Proteine im Durchlauf der IAC des Patientenplasmas, das eine CEA-Ausgangsmenge von 4 690 ng aufwies. Mit Ausnahme des Serum Albumins handelte es sich bei den neun identifizierten Proteinen um Glykoproteine. Unter diesen Proteinen wurde das CEA mit dem sechsbesten *"score"* detektiert. Hierbei wurden sechs von insgesamt 36 möglichen tryptischen Peptiden der CEA-Polypeptidkette identifiziert (Abb. 3.21).

1	MESPSAPPHR	WCIPWQR <mark>LLL</mark>	TASLLTFWNP	PTTAK LTIES	TPFNVAEGKE
51	VLLLVHNLPQ	HLFGYSWYK <mark>G</mark>	ERVDGNRQII	GYVIGTQQAT	PGPAYSGREI
101	IYPNASLLIQ	NIIQNDTGFY	TLHVIKSDLV	NEEATGQFRV	YPELPKPSIS
151	SNNSKPVEDK	DAVAFTCEPE	TQDATYLWWV	NNQSLPVSPR	LQLSNGNRTL
201	TLFNVTRNDT	ASYKCETQNP	VSARRSDSVI	LNVLYGPDAP	TISPLNTSYR
251	SGENLNLSCH	AASNPPAQYS	WFVNGTFQQS	TQELFIPNIT	VNNSGSYTCQ
301	AHNSDTGLNR	TTVTTITVYA	EPPKPFITSN	NSNPVEDEDA	VALTCEPEIQ
351	NTTYLWWVNN	QSLPVSPRLQ	LSNDNR <mark>TLTL</mark>	LSVTRNDVGP	YECGIQNELS
401	VDHSDPVILN	VLYGPDDPTI	SPSYTYYRPG	VNLSLSCHAA	SNPPAQYSWL
451	IDGNIQQHTQ	ELFISNITEK	NSGLYTCQAN	NSASGHSRTT	VKTITVSAEL
501	PKPSISSNNS	KPVEDKDAVA	FTCEPEAQNT	TYLWWVNGQS	LPVSPRLQLS
551	NGNRTLTLFN	VTRNDARAYV	CGIQNSVSAN	RSDPVTLDVL	YGPDTPIISP
601	PDSSYLSGAN	LNLSCHSASN	PSPQYSWRIN	GIPQQHTQVL	FIAKITPNNN
651	GTYACFVSNL	ATGRNNSIVK	SITVSASGTS	PGLSAGATVG	IMIGVLVGVA
701	LI				



Abb. 3.21: Abdeckung der Sequenz des CEAs durch identifizierte Peptide. Peptid-Sequenzen, die in blau und grün unterlegt sind, wurden mittels der LC-MS^E-Analyse detektiert. Grün hinterlegte Peptide tragen Cystein-Seitenreste, die durch die Behandlung der Proteinprobe mit Iodacetamid zu Carbamidocystein modifiziert wurden.

Außerdem wurden im Durchlauf des Patientenplasmas drei Glykoproteine (Plasma Protease C1 Inhibitor, Carboxypeptidase N Untereinheit 2, IgA-C_H1 Region) (Tab. 3.14) identifiziert, die im Durchlauf der IAC des Normalplasmas (Tab. 3.11) nicht identifiziert wurden. Die Übereinstimmung der jeweiligen Polypeptid-Sequenz mit den identifizierten proteolytischen Peptiden ist in Abb. 3.22 dargestellt.

C1 Plasma Protease Inhibitor

1	MASRLTLLTL	LLLLLAGDRA	SSNPNATSSS	SQDPESLQDR	GEGKVATTVI
51	SKMLFVEPIL	EVSSLPTINS	TINSATKITA	NTTDEPTTQP	TTEPTTQPTI
101	QPTQPTTQLP	TDSPTQPTTG	SFCPGPVTLC	SDLESHSTEA	VLGDALVDFS
151	LKLYHAFSAM	KKVETNMAF S	PFSIASLLTQ	VLLGAGENTK	TNLESILSYP
201	K DFTCVHQAL	KGFTTKGVTS	VSQIFHSPDL	AIRDTFVNAS	RTLYSSSPRV
251	LSNNSDANLE	LINTWVAKNT	NNKISR <mark>LLDS</mark>	LPSDTRLVLL	NAIYLSAKWK
301	TTFD PKKTR <mark>M</mark>	EPFHFKNSVI	KVPMMNSKKY	PVAHFIDQTL	KAKVGQLQLS
351	HNLSLVILVP	QNLKHR <mark>LEDM</mark>	EQALSPSVFK	AIMEKLEMSK	FQPTLLTLPR
401	IKVTTSQDML	SIMERLEFFD	FSYDLNLCGL	TEDPDLQVSA	MQHQTVLELT
451	ETGVEAAAAS	AISVAR <mark>TLLV</mark>	FEVQQPFLFV	LWDQQHKFPV	FMGR VYD PRA



Carboxypeptidase N Untereinheit 2

1	MLPGAWLLWT	SLLLLARPAQ	PCPMGCDCFV	QEVFCSDEEL	ATVPLDIPPY
51	TKNIIFVETS	FTTLETRAFG	SNPNLTKVVF	LNTQLCQFRP	DAFGGLPRLE
101	DLEVTGSSFL	NLSTNIFSNL	TSLGK <mark>LTLNF</mark>	NMLEALPEGL	FQHLAALESL
151	HLQGNQLQAL	PRRLFQPLTH	LKTLNLAQNL	LAQLPEELFH	PLTSLQTLKL
201	SNNALSGLPQ	<mark>GVFGK</mark> LGSLQ	ELFLDSNNIS	ELPPQVFSQL	FCLERLWLQR
251	NAITHLPLSI	FASLGNLTFL	SLQWNMLRVL	PAGLFAHTPC	LVGLSLTHNQ
301	LETVAEGTFA	HLSNLRSLML	SYNAITHLPA	GIFRDLEELV	KLYLGSNNLT
351	ALHPALFQNL	SKLELLSLSK	NQLTTLPEGI	FDTNYNLFNL	ALHGNPWQCD
401	CHLAYLFNWL	QQYTDRLLNI	QTYCAGPAYL	KGQVVPALNE	KQLVCPVTR <mark>D</mark>
451	HLGFQVTWPD	ESKAGGSWDL	AVQERAARSQ	CTYSNPEGTV	VLACDQAQCR
501	WLNVQLSPWQ	GSLGLQYNAS	QEWDLRSSCG	SLRLTVSIEA	RAAGP

IgA-C_H1 Region

1	ASPTSPKVFP	LSLCSTQPDG	NVVIACLVQG	FFPQEPLSVT	WSESGQGVTA
51	RNFPPSQDAS	GDLYTTSSQL	TLPATQCLAG	KSVTCHVKHY	TNPSQDVTVP
101	CPVPSTPPTP	SPSTPPTPSP	SCCHPRLSLH	RPALEDLLLG	SEANLTCTLT
151	GLRDASGVTF	TWTPSSGKSA	VQGPPERDLC	GCYSVSSVLP	GCAEPWNHGK
201	TFTCTAAYPE	SKTPLTATLS	KSGNTFRPEV	HLLPPPSEEL	ALNELVTLTC
251	LARGFSPKDV	LVR <mark>WLQGSQE</mark>	<mark>lpr</mark> ekyltwa	SRQEPSQGTT	TFAVTSILRV
301	AAEDWKKGDT	FSCMVGHEAL	PLAFTQKTID	RLAGKPTHVN	VSVVMAEVDG
351	TCY				

Abb. 3.22: Abdeckung der Sequenz durch identifizierte Peptide. Peptid-Sequenzen, die in blau oder grün unterlegt sind, wurden mittels der LC-MS^E-Analyse detektiert. Grün hinterlegte Peptid-Sequenzen tragen Cystein-Seitenreste, die durch die Behandlung der Proteinprobe mit Iodacetamid zu Carbamidocystein modifiziert wurden. Für C1 Plasma Protease Inhibitor wurden 14 von 44 möglichen tryptischen Peptiden identifiziert, die sich zum Teil in ihrer Sequenz überlappen. Für die Carboxypeptidase N Untereinheit 2 wurden 6 von 30 möglichen tryptischen Peptiden und für die IgA-C_H1 Region 3 von 23 identifiziert.

Tab. 3.15 zeigt die mittels der LC-MS/MS^E-Massenspektrometrie identifizierten Proteine im Durchlauf der IAC des Patientenplasmas (B), das eine CEA-Ausgangsmenge von 3 786 ng aufwies. Insgesamt konnten sechs Proteine in dieser Proteinfraktion identifiziert werden. Unter diesen Proteinen wurde das CEA mit dem niedrigsten *"score"* (Rang 5) gefunden. Hierbei wurden die gleichen tryptischen Peptide gefunden, wie sie zuvor in Abb. 3.21 für die Plasmaprobe des anderen Kolonkarzinompatienten (A) gezeigt sind.

Tab. 3.15: Mittels der MS^E-Massenspektrometrie identifizierte Proteine des aufgearbeiteten Patientenplasmas (B).

Rang	Proteine in aufgearbeitetem Patientenplasma
1	Plasma Protease C1 Inhibitor (C1INH)
2	α_1 -saures Glykoprotein 1 (Orosomucoid-1)
3	α_1 -saures Glykoprotein 2 precursor (Orosomucoid-2)
4	Lumican (Keratansulfat Proteoglykan Lumican)
5	Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Abb. 3.23 zeigt die Schnittmenge der mittels der LC-MS-Analyse identifizierten Proteine im Durchlauf der IAC des Patientenplasmas (A) (Tab. 3.14), des Patientenplasmas (B) (Tab. 3.15) und im CEA-versetzten Plasmagemisch gesunder Kontrollpersonen (C) (Tab. 3.11).



Abb. 3.23: Schnittmenge der mittels LC-MS identifizierten Proteine im Durchlauf der IAC verschiedener Plasmaproben. Proteine im Durchlauf der IAC des Patientenplasmas (A), des Patientenplasmas (B) und des CEA-versetzten Plasmas aus einem Pool gesunder Kontrollpersonen(C).

Von den zehn Proteinen (Tab. 3.11), die im Durchlauf der IAC des CEA-versetzten Plasmas identifiziert wurden, konnten fünf (u.a. das CEA) gemeinsame Proteine im Durchlauf der IAC des Patientenplasmas A und vier im Durchlauf der IAC des Patientenplasmas B gefunden werden. Im Durchlauf der IAC jeder Plasmaprobe konnten vier gemeinsame Proteine identifiziert werden. Dagegen wurden im Durchlauf der IAC von beiden Patientenplasmen fünf gemeinsame Proteine identifiziert. Bei dem

Protein, das nur im Durchlauf der IAC beider Patientenplasmen gefunden wurde, handelt es sich um den C1 Plasma Protease Inhibitor (C1INH). Das C1INH-Protein besitzt in beiden Plasmaproben den höchsten Protein-*"score"* (Tab. 3.14 und Tab 3.15, Rang 1). In beiden Patientenplasmaproben zeigte von den insgesamt 14 identifizierten tryptischen Peptiden für das C1INH-Protein ein Peptid-Ion, dass bei etwa 90 min von der RP-Säule eluiert wird und ein m/z-Verhältnis von 863.2 besitzt, die grösste Signal-Intensität. Die Signal-Intensitäten für Ionen mit einem m/z-Verhältnis von 863.2 zeigt Abb. 3.24 als Elutions-Diagramm der LC-MS-Läufe für den Durchlauf der IAC des mit CEA-versetzen Normalplasmas (A) und des Patientenplasmas (B), das eine CEA-Ausgangsmenge von 4 690 ng aufwies.



Abb. 3.24: Vergleich der Signal-Intensitäten von Peptid-Ionen mit einem m/z-Wert von 863.2 während des LC-MS-Laufes. Die maximale Signal-Intensität (100 %) entspricht für A einer Signal-Intensität von 1 000, für B von 3 180. A: Proteinprobe des CEA-versetzen Normalplasmas. B: Proteinprobe eines Kolonkarzinompatientenplasmas. Das Peptid-Ion, das die grösste Signal-Intensität zeigt (Probe B) diente zur Identifizierung des C1INH-Proteins.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung von krankheitsspezifischen Proteinen aus humanem Plasma

Die Identifizierung tumorassoziierter oder allgemein krankheitsspezifischer niedrig abundanter Proteine im Plasma wird durch die im Plasma regulär vorhandenen Proteine erschwert, deren Konzentration in der Regel um ein vielfaches höher ist. Beispielsweise kommen viele der Proteine, die von Geweben unter pathologischen Bedingungen ins Blutplasma abgegeben werden, im Plasma mit einer Konzentrationen < 1pg/ml vor, während die Plasmakonzentration des Albumins, des abundantesten Plasmaproteins, zwischen 30-45 mg/ml liegt [145, 167]. Außerdem machen nur 22 Proteine 99 % der gesamten Plasmaproteinmenge aus [59, 167]. Die hohen Konzentrationsunterschiede und die Komplexität der Plasmaproteine sind zwei wichtige und schwer zu bewältigende Probleme für eine erfolgreiche Analyse niedrig abundanter krankheitsspezifischer Proteine. Um gering konzentrierte krankheitsspezifische Proteine im Plasma zu detektieren, ist daher eine Abreicherung von hoch konzentrierten Plasmaproteinen unabdingbar.

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Abreicherungsstrategien beschrieben, um hoch abundante Proteine des Plasmas selektiv zu entfernen. In einer Studie von Pieper et al. [168] konnten über eine affinitätschromatographische Aufreinigung des Plasmas einige hoch konzentrierte Plasmaproteine (Albumin, Immunglobuline A und G, Transferrin, Haptoglobin, α₁-Antichymotrypsin, Hämopexin, α_1 -saures Glykoprotein, α_2 -Macroglobulin und Fibrinogen) abgereichert werden. Durch die Abreicherung dieser hoch konzentrierten Plasmaproteine konnten nach einer 2D-PAGE etwa 350 gering konzentrierte Plasmaproteine visualisiert werden. In einer anderen Studie von Pieper et al. [167] wurden nach der Abreicherung von hoch abundanten Serumproteinen über eine Immun-Affinitäts-Chromatographie die erhaltenen Proteine über eine kombinierte Anionen-Austausch- und Grössen-Ausschluß-Chromatographie in 74 Fraktionen aufgeteilt und die einzelnen Proteinfraktionen einer 2D-PAGE unterzogen. Durch dieses Verfahren konnten etwa 3 700 Proteinspots detektiert werden, von denen jedoch nur 1 800 durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden konnten. Adkins et al. [169] konnten durch die Bindung von Immunglobulinen an Protein G/A einige wenige gering konzentrierte Proteine identifizieren, die im unfraktioniertem Plasma nicht zu detektieren waren. Hierfür wurde die Immunglobulin-abgereicherte Plasmaproteinfraktion zunächst tryptisch gespalten, die erhaltenen Peptide über eine Kationen-Austausch-Chromatographie in verschiedene Fraktionen aufgeteilt und die einzelnen Fraktionen anschließend über eine LC/MS/MS vermessen. Mit diesem Verfahren konnte im Vergleich zum unfraktionierten Plasma allerdings nur eine 3-5-fach höhere Anzahl an Proteinen identifiziert werden. Eine andere Methode zur Reduktion der Komplexität der Plasmaproteine ist die Fraktionierung des Plasmaproteoms in Teilproteome [107], sogenannte Subproteome. Eine häufig genutzte Möglichkeit, das Plasma in Subproteome zu fraktionieren, stellen die unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen (Phosphorylierung, Glykosylierung, Ubiquitinylierung etc.) der Plasmaproteine dar. Dabei ist neben dem Phosphoproteom das Glykoproteom des Plasmas für die Analyse krankheitsspezifischer Proteine besonders interessant, da in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass bösartige Erkrankungen [75-79, 81, 82, 101, 102, 124-126] und auch viele andere Krankheiten (z. B. Rheumatoide Arthritis und Blutkrankheiten wie von Willebrand Faktor Defizit [124, Kapitel 12]) häufig mit Glykosylierungsänderungen von Glykoproteinen einhergehen. Da es sich bei den meisten bisher bekannten krankheitsspezifischen Proteinen um glykosylierte Proteine handelt, sollte in der vorliegenden Arbeit die Suche nach diagnostisch relevanten Proteinen gezielt auf glykosylierte Plasmaproteine beschränkt werden. Um krankheitsspezifische Glykoproteine des Plasmas gezielt zu identifizieren, werden die Glykokonjugate der Glykoproteine spezifisch ausgenutzt. Das Verfahren einer Studie von Zhang et al. [170] basiert auf die Bindung von oxidierten Glykokonjugaten der Glykoproteine an eine Hydrazid-Matrix und die anschließende tryptische Spaltung der an die Matrix gebundenen Glykoproteine. Die erhaltenen tryptischen Glykopeptide wurden dann durch die spezifische Spaltung der Glykokonjugate mit dem Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) von der Matrix eluiert und anschließend durch eine massenspektrometrische Analyse identifiziert. Auch in einer Studie von Liu et al. [145] wurde ein Verfahren basierend auf der Hydrazid-Chemie angewendet. Hierfür wurden zunächst die sechs abundantesten Plasmaproteine über eine Immun-Affinitäts-Chromatographie entfernt, die Glykoproteine der abgereicherten Plasmafraktion an eine Hydrazid-Matrix gekoppelt und durch die enzymatische Spaltung der Glykokonjugate mit PNGase F die N-glykosylierten Proteine von der Matrix eluiert. Nach einer Kationen-Austausch-Chromatographie konnten durch LC-MS/MS-Messungen 303 Glykoproteine identifiziert werden. Ein Problem, das sich bei Verfahren ergibt, die auf der Hydrazid Chemie basieren, besteht darin, dass aufgrund der unterschiedlichen Glykosylierung der Glykoproteine eine unterschiedliche Konzentration des Oxidationsmittels (z. B: Natrium-meta-Periodat) erforderlich ist, um sie mit gleicher Effizienz an die Hydrazid-Matrix zu koppeln. Ein anderer Nachteil der oben genannten Verfahren [145, 170] besteht darin, dass nur glykosylierte Plasmaproteine, die einen N-Glykan tragen, identifiziert werden können, da mit der PNGase F nur eine enzymatische Spaltung von N-verknüpften Glykokonjugate möglich ist.

89

Um sowohl N- als auch O-glykosylierte diagnostisch relevante Plasmaproteine zu erfassen, können zur Isolierung und Fraktionierung von Glykoproteinen des Plasmas Lektine mit unterschiedlicher Spezifität eingesetzt werden. So wurde in vielen Studien [107, 143, 144, 146] versucht, durch die Anreicherung von glykosylierten Plasmaproteinen über verschiedene Lektin-Affinitäts-Chromatographien und eine anschließende massenspektrometrische Analyse diagnostisch relevante Glykoproteine des Plasmas zu identifizieren. In einer Studie von Jung et al. [144] wurden zunächst die glykosylierten Plasmaproteine über eine Affinitäts-Chromatographie mit den Pflanzen-Lektinen Concanavalin A (Con A), Helix Pomatia Agglutinin (HPA), Lycopersicon Esculentum Lektin (LEL), Aleuria Aurantia Lektin (AAL) und Lens Culinaris Agglutinin (LCA) angereichert. Nach tryptischer Spaltung der Lektin-gebundenen Proteine wurden die einzelnen Fraktionen durch LC-MS/MS-Messungen analysiert. Hierdurch wurden veränderte Glykosylierungen auf Grund unterschiedlicher Bindungsmuster der Lektine HPA, LEL, AAL und LCA zwischen Proteinen aus dem Plasma von Brustkarzinompatientinnen und aus dem Plasma Gesunder detektiert. Auch das in einer Studie von Hancock et al. [107] beschriebene Verfahren kann zur Analyse der Glykosylierungsmuster von Plasmaproteinen eingesetzt werden. Der Nachteil der genannten Verfahren [107, 143] ist allerdings, dass, obwohl die Komplexität des Plasmas auf glykosylierte Proteine reduziert wird, die Identifizierung von gering konzentrierten diagnostisch relevanten Glykoproteinen des Plasmas nur eingeschränkt möglich ist. Der Grund hierfür ist, dass hoch konzentrierte Plasmaproteine des untersuchten Glykoproteoms durch Überlagerungen eine massenspektrometrische Analyse niedrig konzentrierter Proteine erschweren. Daher wird allein durch die Anreicherung der glykosylierten Plasmaproteine die Konzentrationsdifferenz der einzelnen Proteine nicht genügend verringert, um niedrig abundante Plasmaproteine zu detektieren.

Die Identifizierung niedrig konzentrierter Glykoproteine des Plasmas erfordert eine zusätzliche Abreicherung der hoch abundanten Proteine der untersuchten Glykoproteinfraktionen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung von diagnostisch relevanten glykosylierten Plasmaproteinen zuerst eine Anreicherung von glykosylierten Plasmaproteinen über eine Lektin-Affinitäts-Chromatographie vorgenommen, um anschließend die regulär vorkommenden Proteine der angereicherten Glykoproteinfraktion über eine Antikörper-Affinitäts-Matrix abzureichern, die spezifisch nur gegen diese Plasmaproteinfraktion gerichtet ist. Proteine, die bedingt durch eine Krankheit ins Blutplasma abgegeben werden, sollten von der Antikörper-Matrix nicht gebunden werden, da gegen sie keine gerichteten Antikörper auf der Matrix vorhanden sein sollten. Diagnostisch relevante Proteine sollten sich demnach im Durchlauf der Antikörper-Affinitäts-Chromatographie befinden und sollen dann nach einer tryptischen Spaltung mittels der LC-MS^E-Analyse [121] identifiziert werden können. Das vorgestellte Verfahren stellt eine erfolgversprechende Strategie zur Identifizierung von gering konzentrierten Glykoproteinen des humanen Plasmas dar, annten Strategien [107, 143-146, 167-70] eine tiefer gehende Analys

mit der im Vergleich zu den genannten Strategien [107, 143-146, 167-70] eine tiefer gehende Analyse des Plasmaproteoms ermöglicht werden sollte.

Bevor die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im einzelnen diskutiert werden, soll auf ein wesentliches Problem hingewiesen werden, das durch jede Abreicherungsprozedur bzw. Fraktionierung entsteht. Während mit der z. B. Analyse des Glykoproteoms die Identifizierung weiterer Proteine ermöglicht wird, die im unfraktionierten Plasma aufgrund der hohen Konzentrationsunterschiede der einzelnen Proteine nicht zu detektieren sind, bewirkt die Reduzierung des Plasmas auf ein bestimmtes Subproteom den Verlust der Information über die Proteinzusammensetzung anderer Subproteome [55, 60]. Dabei kann es sich auch um Proteine handeln, die möglicherweise wichtige biologische Informationen tragen, aber durch die Fraktionierung des Plasmas verloren gehen. Bei diesen Proteinen kann es sich beispielsweise um Proteine handeln, die von Albumin gebunden, transportiert und vor Degradation geschützt werden [53,54]. Lowenthal et al. [60] berichten von Brust- und Ovarialkarzinom bedingtem BRCA2 (breast cancer 2, early onset)-Protein, einem 390 kDa großen, niedrig abundanten Tumor-Supressor-Protein, dass es im Serum von Albumin spezifisch gebunden wird. In einer Studie von Gundry et al. [56] wurden 35 (sowohl hoch als auch mittel abundante) Proteine identifiziert, die im Serum von Albumin gebunden werden. Besonders interessant war, dass neun der 35 Albumin-assoziierten Proteine in einer Albumin-abgereicherten Fraktion nicht mehr zu detektieren waren [56]. Durch die Abreicherung der häufigen Plasmaproteine können also krankheitsspezifische Proteine, die mit Plasmaproteinen wie Albumin eine Komplexbildung eingehen, verloren gehen. Um den Informationsverlust zu umgehen, der bedingt durch die Aufteilung des Plasmaproteoms in Subproteome entsteht, könnte bei der Suche nach diagnostisch relevanten Proteinen Gewebe an Stelle von Plasma ausgegangen werden, da zu erwarten ist, dass dort krankheitsspezifische Proteine in höherer Konzentration vorliegen und daher eine Aufteilung in Subproteome häufig nicht erforderlich ist. Ein weiterer Vorteil bestünde darin, dass aufgrund der höheren Konzentration der krankheitsspezifischen Proteine im Vergleich zum Plasma ihre Identifizierung mit den derzeit zur Verfügung stehenden Proteom-Analyse-Technologien [57-61, 88-93, 118-123, 129-140] leichter möglich wäre. Allerdings ist die diffizile Beschaffung von Geweben durch Biopsie mit einem mehr oder weniger schwerwiegenden Eingriff verbunden. Demgegenüber können Körperflüssigkeiten mit nicht- oder minimal-invasiven [113, 114] Techniken erhalten werden. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, weil die natürliche biologische Varianz die Analyse einer großen Anzahl von Proben erfordert, um statistisch signifikante Aussagen zu erhalten. Obwohl also die Komplexität und die enorm heterogene Zusammensetzung des Plasmaproteoms hohe Ansprüche an die Aufbereitungsmethode stellen und eine Fraktionierung und Abreicherung der abundanten Proteine mit den damit verbundenen, oben dargestellten Problemen unbedingt erforderlich machen, stellt insbesondere das Plasma ein vielversprechendes biologisches Material zur Entdeckung neuer diagnostisch relevanter Proteine, da das Blut mit allen Organen und Geweben des Organismus in ständigem Kontakt steht. Dabei soll die Analyse des Plasmas die Analyse anderer Proben, etwa aus Geweben, nicht ersetzen, sondern ergänzen. Es sei auch darauf hingewiesen, dass die Aufarbeitung jeder biologischen Probe mit Verlusten von biologisch interessanten Informationen verbunden ist. Erst durch die Vereinigung aller Informationen der einzelnen Analysen kann das Proteinprofil einer bestimmten Krankheit charakterisiert werden.

4.2 Lektinfraktionierung des humanem Plasmas

4.2.1 Eindimensionale Lektin-Affinitäts-Chromatographie

Ein häufig eingesetztes Hilfsmittel zur Isolierung und Fraktionierung der Glykoproteine ist die Affinitätsreinigung durch die Bindung an Lektine. In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der leichteren Verfügbarkeit gegenüber humanen Lektinen pflanzliche Lektine verwendet. In einer ersten Analyse wurde die Qualität der Anreicherung von Glykoproteinen des humanen Plasmas durch zwei sehr häufig eingesetzte Pflanzenlektine bewertet. Für die Affinitäts-Chromatographie wurden das Concanavalin A (Con A)-Lektin, das spezifisch Mannose-Reste von N-Glykanen bindet, und das Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Lektin, das eine spezifische Bindung zu β 1-4-N-Acetyl-D-Glukosamin- (β 1-4-GlcNAc)- und Sialinsäure-Resten von N- und O-Glykanen eingehen kann, eingesetzt (Kapitel 3.3.1).

Die Elution der Lektin-gebundenen Glykoproteine kann durch den Einsatz verschiedener Pufferlösungen erreicht werden. Beispielsweise kann durch eine pH-Veränderung im sauren Bereich oder durch Pufferlösungen mit hoher Salzkonzentration die Lektin-Glykan-Bindung aufgeboben werden. Ein Nachteil solcher Puffer ist eine irreversible Konformationsänderung des Lektins, die beim häufigen Gebrauch des Lektinmaterials verursacht werden kann und damit eine verringerte Bindungskapazität des Lektins zur Folge hat. Ein weiterer Nachteil solcher Puffer ist, dass auf diese Weise auch Proteine eluiert werden, die unspezifisch von der Matrix (z. B. Agarose, Sepharose) gebunden werden. Dagegen ist die Elution der Glykoproteine durch eine kompetitive Verdrängung der Glykoproteine mit dem jeweiligen Monosaccharid (Abb. 3.1) eine schonende und gleichzeitig spezifische Methode. Allerdings muss hierfür eine sehr hohe Konzentration des Monosaccharids für die Elution der Glykoproteine eingesetzt werden, da die Affinität der Lektine für Monosaccharide im millimolaren Bereich liegt [45]. Der Einsatz solcher Puffer hat den Nachteil, dass die Proteinlösung für darauffolgende Experimente in der Regel von dem Zucker befreit werden muss und damit ein zusätzlicher Aufarbeitungsschritt notwendig wird.

Die gebundenen Proteinfraktionen beider Pflanzenlektine wurden in einer SDS-PAGE (Abb. 3.2) analysiert. Einige Proteinbanden wie a-g sind nur in der Con A-gebundenen Fraktion, andere wie h-j nur in der WGA-gebundenen Fraktion nachzuweisen. Außerdem zeigt das Ergebnis, dass einige Überlappungen im Proteinbindungsverhalten vorhanden sind. Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein gemeinsamer Proteine ist, dass ein einzelnes Protein bei Vorhandensein mehrerer potentioneller Glykosylierungsstellen mit mehreren unterschiedlichen Oligosaccharid-Strukturen modifiziert sein kann (eine sogenannte Makroheterogenität [125]). Ein einzelnes Protein, das von beiden Lektinen gebunden wird, könnte daher über verschiedene Oligosaccharid-Strukturen

gebunden werden. Eine spezifische Bindung eines Glykans an beide Lektine ist möglich, wenn das Protein mindestens zwei verschiedene Oligosaccharid-Strukturen trägt, wobei mindestens eine Struktur Mannose-Reste (Con A-Bindung) und eine andere Struktur in seiner Oligosaccharid-Ausstattung β1-4-GlcNAc- bzw. Sialinsäure-Reste (WGA-Bindung) enthält. Aufgrund einer möglichen nicht äquivalenten Verteilung der durch die Makroheterogenität entstehenden Oligosaccharid-Strukturen im Molekül [125], könnten dabei einige Glykoproteine mit einer stärkeren Affinität von dem Con A- andere wiederum stärker von dem WGA-Lektin gebunden werden. Eine andere Erklärung für das Vorhandensein gleicher Proteine in beiden gebundenen Lektinfraktionen basiert auf einer sogenannten Mikroheterogenität [125], die dann entsteht, wenn im Falle gleicher Polypeptidketten die Oligosaccharid-Ausstattung an derselben Glykosylierungsstelle zwischen Proteinmolekülen variiert. Überwiegt dabei eine Oligosaccharid-Struktur, die mehr Mannose enthält, so wird dieses Protein mit einer höheren Konzentration in der Con A-gebundenen Proteinfraktion zu finden sein. Wird durch die Mikroheterogenität eine Oligosaccharid-Struktur erzeugt, die überwiegend aus β1-4-GlcNAc- bzw. Sialinsäure-Resten besteht, so erfolgt dann eine stärkere Bindung des Proteins zum WGA-Lektin. Im Falle, dass weder eine Makroheterogenität noch eine Mikroheterogenität im Molekül gegeben ist, kann das Vorhandensein von gemeinsamen Proteinen in beiden Lektingebundenen Proteinfraktion dadurch begründet werden, dass das WGA- und das Con A-Lektin z. B. den gleichen N-glykosidisch verknüpften Hybrid-Typ eines einzelnen Proteins spezifisch binden können, da der Hybrid-Typ sowohl Man- als auch β 1-4-GlcNAc-Reste trägt [125].

In einer Studie von Hancock *et al.* [107] wurde, basierend auf den Ergebnissen der unterschiedlichen Bindungsspezifitäten von Lektinen, eine Multi-Lektin-Affinitäts-Säule aus den Lektinen Con A, WGA und Jacalin (bindet spezifisch GalNAc-Reste) hergestellt, um möglichst viele Glykoproteine des humanen Serums anzureichen. Auf diese Weise konnten mehr als 50 % der glykosylierten Serumproteine angereichert werden [107]. Eine Multi-Lektin-Affinitäts-Säule bietet gegenüber einer einfachen Lektin-Affinitäts-Säule den Vorteil, einen höheren Anteil der Glykoproteine zu erfassen. Somit erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit, in der Glykoproteinfraktion krankheitsspezifische Proteine anzureichern. Der Einsatz einer solchen Multi-Lektin-Affinitäts-Säule hat allerdings den Nachteil, dass dadurch, dass gerade die Ausbeute an Glykoproteinen sehr hoch ist, eine sehr hohe Abtrennung von regulär vorkommenden Proteinen erforderlich ist, um eine massenspektrometrische Analyse gering konzentrierter diagnostisch relevanter Proteine zu ermöglichen. Um einen möglichst hohen Abreicherungsgrad an Plasmaproteinen zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Multi-Lektin-Affinitäts-Säule verzichtet. Um zunächst eine Fraktion an glykosylierte Plasmaproteine zu analysieren, wurde dabei das WGA-Lektin dem Con A-Lektin aus zwei Gründen vorgezogen:

(a) Aus den Daten der Proteinmengenbestimmung der Lektin-gebundenen Fraktionen (Kapitel 3.3.1) geht hervor, dass mit einer Con A- im Vergleich zu einer WGA-Lektinfraktionierung des humanen Plasmas eine deutlich höhere Ausbeute an Glykoproteinen erzielt wird. Die Analyse von gering konzentrierten diagnostisch relevanten Glykoproteine der Con A-Fraktion erfordert daher eine höhere Abreicherung von regulär vorkommenden Proteinen.

(b) In vielen Studien wurde gezeigt, dass eine Zunahme von $\beta(1-4)$ -GlcNAc- und Sialinsäure-Resten im Glykokonjugat von Glykoproteinen mit malignen Transformationen korrelieren [124: Kapitel 3 und 12, 125]. Daher eignet sich das WGA-Lektin besonders gut, um tumorassoziierte Proteine des Plasmas anzureichern.

Allerdings ergibt sich durch den Einsatz eines einzelnen Lektins das Problem, dass die Information von Proteinen verloren geht, die nur in einer anderen Lektin-gebundenen Plasmafraktion vorkommen.

Die Anreicherung der WGA-gebundenen Glykoproteine aus dem humanen Plasma ist auf dem Gel (Ab. 3.3) dadurch gekennzeichnet, dass in der WGA-gebundenen Proteinfraktion (Spur III) mehr intensive und diskrete Bandenmuster (a, b, d, f, h, i) relativ zu der Durchlauffraktion (Spur II) bzw. zum unfraktionierten Plasma (Spur I) erkennbar sind. Im Falle der Proteine c und e, die sowohl in der WGA-gebundenen Fraktion als auch in der Durchlauffraktion auf gleicher Höhe im Gel laufen, ist anhand der Färbungsintensität eine signifikante Anreicherung in der WGA-gebundenen Proteinfraktion relativ zu der Durchlauffraktion zu sehen. Die nicht vollständige Anreicherung dieser Proteine könnte durch nicht glykosylierte Protein-Isoformen oder durch unterschiedliche Glykoformen begründet werden. Eine Kapazitätsausschöpfung des Lektinmaterials kann ausgeschlossen werden, da über Vorversuche die optimale Lektinmenge für die Aufarbeitung von 60 mg Plasmaproteinmenge eingestellt wurde. Die Spezifität des WGA-Lektins ist durch die Abwesenheit der Proteinbanden m, n und l in der WGA-gebundenen Proteinfraktion zu erkennen. Durch die SDS-PAGE konnten insgesamt neun Proteine der WGA-gebundenen Proteinfraktion mit einer hohen Intensität angefärbt werden. Dagegen zeigen die Spuren I und II nur vier abundante Proteinbanden. Dies ist auf die Präsenz einer großen Menge von nicht glykosylierten Proteinen wie Albumin [59] in der unfraktionierten Plasmaprobe zurückzuführen. Bei gleicher aufgetragener Proteinmenge sind daher die in Spur III nachgewiesenen Proteine nur nach Anreicherung durch WGA-Affinitäts-Chromatographie zu detektieren

4.2.2 Massenspektrometrische Analyse der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion

Eindimensionale Gel-basierende massenspektrometrische Analysen setzten keine anspruchsvollen Probenvorbereitungen voraus und sind relativ schnell durchführbar. Eine relative Quantifizierung der einzelnen Proteine in verschiedenen Proben kann hierbei durch den Vergleich der Färbungsintensitäten erreicht werden. Die Proteinbanden können dann aus dem Gel ausgeschnitten, proteolytisch gespalten und anschließend mittels massenspektrometrischer Analysen identifiziert werden. Allerdings kann eine einzelne Proteinbande aus mehreren Proteinbanden zusammengesetzt sein, falls die Proteine das gleiche Molekulargewicht besitzen. Daher kann die Identifizierung niedrig konzentrierter Proteine, die mit höher konzentrierten Proteinen auf gleicher Höhe im Gel laufen (bedingt durch ihre niedrigere Stoffmenge, die für die Massenspektrometrie zur Verfügung steht), erschwert werden. Um eine verbesserte gelelektrophoretische Proteinauftrennung zu erzielen, könnte eine zwei-dimensionale (2D) Gelelektrophorese durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil der 2D-SDS-PAGE gegenüber der eindimensionalen SDS-PAGE ist, dass durch die höherauflösende Trennung eine verbesserte Quantifizierung durch den Vergleich von Färbungsintensitäten der einzelnen Proteinspots gegeben ist. Allerdings müssen aufgrund der hohen Gel-zu-Gel-Variabilität bei traditionellen 2D-Experimenten mehrere Elektrophoreseläufe pro Probe wiederholt werden. Eine Alternative zu den klassischen 2D-Experimenten ist die DIGE (Differential Gel Electrophoresis)-PAGE [118, 119], die eine Trennung von zwei Proteinproben auf einem einzigen Gel erlaubt, wobei jede Probe mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff versetzt wird. Auf diese Weise können Gelzu-Gel-Variabilitätsprobleme behoben werden [118, 119]. Allerdings kann auch trotz einer hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese ein einzelner Proteinspot aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sein kann. Auch ist bei jeder 2D-PAGE das Problem der schlechten Auftrennung von sehr grossen oder sehr hydrophoben Proteinen vorhanden. Dagegen können mit LC-MS-Techniken über eine der Massenspektrometrie vorgeschalteten RP-HPLC eine gezielte Auftrennung der Peptide nach ihrer Hydrophobizität erzielt werden, die es ermöglicht, eine größere Anzahl von Proteinen zu identifizieren. Der wesentliche Vorteil der LC-MS gegenüber Gel-basierenden massenspektrometrischen Methoden besteht darin, dass eine gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung in einem komplexen Gemisch möglich ist [61]. Da aber die Signalintensität eines Peptids von der unterschiedlichen Effizienz der Ionisierung abhängt, die je nach chemischen und physikalischen Eigenschaften der Peptide stark variieren kann, und diese unterschiedlichen Ionisierungseffekte nicht vorausgesagt werden können, können durch die Messung der Signal-Intensität der Peptide keine Rückschlüsse auf die absolute Proteinmenge gezogen werden, sondern lediglich eine relative Quantifizierung beim Vergleich mehrerer Proben durchgeführt werden. Um dabei den experimentellen Fehler möglichst gering zu halten, wurden verschiedene Methoden entwickelt, die Proben mit stabilen Isotopen zu markieren [88, 89, 93, 122]. Der Vorteil dieser Verfahren besteht darin, dass die Proben vereinigt und somit gleichzeitig vermessen werden können. Allerdings erfordern die auf einer Isotopen-Markierung beruhenden massenspektrometrische Quantifizierungs-Techniken eine spezielle, aufwendige Proben-vorbereitung. Im Gegensatz dazu benötigen Markierungs-freie LC-MS Quantifizierungs-Techniken von Proteinen [57, 58, 61] keine spezielle Probenvorbereitung. Besonders, wenn eine große Anzahl von Proben gemessen und quantifizierungstechniken eine hohe Reproduzierbarkeit sowohl der chromatographischen Trenn- als auch der massenspektrometrischen Messtechniken voraus, da die unterschiedlichen Proben nicht, wie bei Markierungs-basierenden Verfahren, vereinigt werden können, sondern separat gemessen werden müssen. Für die vorliegende Arbeit wurde eine Markierungs-freie LC-MS-Technik, die MS^E-Massenspektrometrie, eingesetzt, da zur Entdeckung diagnostisch relevanter Proteine eine Validierung von einigen hundert Plasmaproben erforderlich ist und der Einsatz von Isotopen-markierten Analysen, die eine zusätzliche Probenvorbereitung erfordern, mit einem beträchtlich höheren experimentellen Aufwand verbunden wäre.

4.2.3 Abreicherung von nicht-glykosylierten Proteinen

Nicht glykosylierte Proteine sollten durch die Lektin-Affinitäts-Chromatographie vollständig entfernt werden. Von den 63 Proteinen (Tab. 3.1), die in der WGA-gebundenen Fraktion identifiziert wurden, handelt es sich jedoch bei 11 Proteinen (Albumin, fünf verschiedene Keratine und fünf Hämoglobin-Untereinheiten) um nicht glykosylierte Proteine. Bei allen identifizierten Keratinen handelte es sich um Cytokeratine, also nicht um Plasmaproteine. Ihre Detektion in der WGA-gebundenen Proteinfraktion kann durch Kontamination der Probe mit Keratinen aus Haaren oder Epithelzellen begründet werden. Die Anwesenheit von Hämoglobin und Albumin in der WGA-gebundenen Proteinfraktion könnte durch Komplexbildungen mit Glykoproteinen erklärt werden. Auf diese Weise könnten sie indirekt in der WGA-gebundenen Proteinfraktion angereichert werden. Beispielsweise kann Hämoglobin eine Komplexbildung sowohl mit Hämopexin als auch mit Haptoglobin eingehen [159]. Auch Albumin kann mit Haptoglobin eine Komplexbildung eingehen, ferner kann es von IgG gebunden werden [52]. Die Komplexbildung von Proteinen unter nativen Bedingungen stellt bei jeder Affinitäts-Chromatographie ein Problem dar und soll im Folgenden für Albumin erläutert werden: Die Gesamtproteinmenge des humanen Plasmas besteht zu etwa 50 % aus Albumin [59]. Für die WGA-Affinitäts-Chromatographie wurde eine Gesamtproteinmenge von 61 mg eingesetzt; dies entspricht einer Albuminmenge von etwa 30 mg. Über die WGA-Affinitäts-Chromatographie konnte eine Proteinmenge von etwa 2,8 mg angereichert werden (siehe Ergebnis Kapitel 3.1.1). Für die LC-MS Analyse des unfraktionierten Plasmas und der WGA-gebundenen Proteinfraktion wurde jeweils eine gleiche Proteinmenge vermessen. Mit Hilfe des Programs "ProteinLynx-Expression Analysis" lies sich berechnen, dass Albumin im unfraktionierten Plasma im Vergleich zu der WGA-gebundenen Proteinfraktion 1,82-fach (Reziprok von R_{WGA/Plasma} (Albumin) = 0,55) höher konzentriert ist (Ergebnis nicht gezeigt). Somit kann eine Albuminmenge in der WGA-gebundenen Proteinfraktion von 770 µg berechnet werden. Ausgehend von einer Albuminmenge von etwa 30 mg im unfraktionierten Plasma konnten somit über die WGA-Affinitäts-Chromatographie 97,4 % der Albuminmenge abgereichert werden. Obwohl durch die Lektinfraktionierung der weitaus größte Teil des Albumins entfernt werden konnte, ist die Albuminmenge in der WGA-gebundenen Proteinfraktion im Vergleich zu anderen Proteinen des Gemisches weiterhin um viele Größenordnungen höher. Dies hat zur Folge, dass trotz der Abreicherung die Identifizierung gering konzentrierter Proteine der WGA-gebundenen Plasmafraktion weiterhin durch das Albumin erschwert wird. Um die Albumin-Protein-Bindungen zu unterbrechen, könnte dem Waschschritt beispielsweise 5-20 % Acetonitril [112] (oder auch 8 M Harnstoff) hinzugesetzt werden. Allerdings würde die Zugabe an Acetonitril im Vergleich zur der Lektinfraktionierung unter nativen Bedingungen die Denaturierung zahlreicher Proteine zur Folge haben, die dann ausfallen und somit einer Analyse nicht mehr zugänglich sein würden. Um eine Reduzierung der Albuminmenge in der Glykoproteinfraktion zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit daher auf den Einsatz von Acetonitril oder denaturierenden Reagenzien verzichtet, allerdings wurde ein intensiverer Waschschritt des Lektin-Säulenmaterials vor der Elution der Glykoproteine eingeführt. In diesem Fall betrug die über die Lektinfraktionierung angereicherte Gesamtproteinmenge 2,4 mg. Aus dem Quotienten $R_{WGA/Plasma}$ für Albumin mit 0,38 lässt sich in diesem Fall berechnen, dass durch das längere Waschen des Lektin-Säulenmaterials in der WGA-gebundenen Proteinfraktion nur noch 456 µg Albumin vorhanden sind (Tab. 3.1). Somit wurde eine im Vergleich zum vorigen Experiment höhere Abreicherung des Albumins von 98,5 % erzielt. Durch das Waschen des Säulenmaterials mit einem noch größeren Volumen konnte die Albuminmenge in der WGAgebundenen Plasmafraktion nicht weiter reduziert werden. Somit ist eine Abreicherung des Albumins durch die Lektinfraktionierung, die unter nativen Bedingungen durchgeführt wird, limitiert.

4.3 Gewinnung und Charakterisierung von Cameliden-Antikörpern gegen die WGA-gebundene Plasmafraktion

Die Anreicherung von Glykoproteinen des Plasmas bedeutet die gleichzeitige Abreicherung anderer Plasma-Subproteome und bewirkt somit eine Reduktion der heterogenen Zusammensetzung des Plasmas. Obwohl bei diesem Ansatz die Komplexität des Plasmas auf glykosylierte Proteine reduziert wird, behindern weiterhin höher konzentrierte Plasmaproteine des angereicherten Glykoproteoms die Identifizierung niedrig abundanter Plasmaproteine, indem sie durch Überlagerungen eine massenspektrometrische Analyse niedrig konzentrierter Proteine nicht zulassen. Beispielsweise ist auch ein relativ hoher Abreicherungsgrad des Albumins mit 98,5 % nicht ausreichend, um die Identifizierung niedrig abundanter Plasmaproteine wie z. B. des Carcinoembryonalen Antigens (CEA), das in Plasmen von Gesunden mit einer Konzentration von weniger als 5 ng/ml [46, 47] vorliegt, zu erlauben. Sogar, wenn in der WGA-gebundenen Proteinfraktion nur noch 456 µg Albumin vorhanden sind, so entspricht die Albuminmenge einer gegenüber CEA um etwa 1x10⁵ größere Proteinmenge. Der dynamische Bereich liegt jedoch für das derzeit empfindlichste Detektionsverfahren, die LC-MS, bestenfalls bei etwa 10²-10⁴ [59, 63]. Durch die alleinige Anreicherung der glykosylierten Plasmaproteine wird der Konzentrationsunterschied der einzelnen Proteine somit nicht genügend minimiert, um mittels der LC-MS-Analyse niedrig abundante Proteine des Plasmas zu detektieren. Die Entdeckung niedrig konzentrierter krankheitsspezifische Glykoproteine des Plasmas erfordert daher eine zusätzliche Abreicherung der hoch abundanten Proteine des untersuchten Plasmaglykoproteoms. Eine Abreicherung von hoch abundanten Proteinen der Glykoproteinfraktion kann durch die Affinitätsreinigung mit Hilfe von hochspezifischen Antikörpern gegen die Lektin-gebundene Proteinfraktion erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion Gesunder für die Induktion von Antikörpern in Lama verwendet, um Antikörper gegen regulär vorkommende Plasmaproteine zu erhalten. Aufgrund der biologischen Varianz des Plasmaproteinprofils jedes Menschen [59] wurde für die Immunisierung ein Plasmagemisch von gesunden Kontrollpersonen eingesetzt. Mit den Cameliden-Antikörpern sollte dann ein Immunabsorbens hergestellt werden, das im optimalen Fall die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion Gesunder vollständig binden sollte. Auf diese Weise sollte durch die Abreicherung der Proteine in der WGA-gebundenen Fraktion eine weitere Verringerung der Konzentrationsunterschiede der Plasmaproteine erreicht werden.

99

Zur Gewinnung von Antikörpern gegen die WGA-gebundene Proteinfraktion aus Normalplasma wurden Cameliden vor anderen Spezies der Vorzug gegeben, da in der Literatur [5, 25] beschrieben wird, dass die Cameliden-Schwerketten-Antikörper gegenüber von konventionellen Antikörpern eine höhere chemische und thermische Stabilität besitzen. Daher war es von Vorteil, nur die Schwerketten-Antikörper für die Herstellung eines Immunabsorbens einzusetzen, um somit eine affinitätschromatographische Aufarbeitung auch bei niedrigen pH-Bedingungen durchzuführen, ohne dass eine Konformationsänderung von Antikörpern und damit eine geringe Bindungskapazität der Affinitätsmatrix verursacht werden. Der Einsatz von Schwerketten-Antikörpern als Immunabsorbens setzt allerdings voraus, dass die konventionellen und die Schwerketten-Antikörper vergleichbare Bindungseigenschaften gegenüber ihren Antigenen aufweisen. Einerseits wird in der Literatur [5, 24, 25] beschrieben, dass die Cameliden-Schwerketten-Antikörper und konventionelle Cameliden-Antikörper vergleichbare Bindungseigenschaften besitzen. Andererseits wird aber auch beschrieben [23], dass bei der Immunisierung von Lamas mit einem sehr heterogenen Antigengemisch (Bakterienextrakt aus Staphylococcus mutans) die Schwerketten-Antikörper nur gegen eine bestimmte Fraktion des Antigengemisches, nämlich die Proteine im Molekulargewichtsbereich zwischen 60 kDa und 90 kDa, gebildet werden. Deshalb wurde vor einer Immobilisierung der Schwerketten-Antikörper geprüft, ob im Falle der WGA-gebundenen Proteinfraktion die Schwerketten-Antikörper ein anderes Antigenmuster erkennen als die konventionellen Antikörper des Lama-Antiserums. Im Falle, dass die Schwerketten-Antikörper weniger Antigene als die konventionellen Antikörper erkennen, wäre die Herstellung eines Immunabsorbens mit den Schwerketten-Antikörpern für eine Abtrennung der WGA-gebundenen Proteinfraktion Gesunder ungünstig, da nur eine geringe Abreicherung erreichbar wäre. Da aber gezeigt werden konnte (Abb. 3.8), dass im Falle der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion keine Spezifitätsunterschiede der verschiedenen clgG-Subklassen in Bezug auf die Größenerkennung der Antigene vorhanden sind, bedeutet dies, dass das Fehlen der leichten Ketten sowie das Fehlen der C_H1-Domänen der schweren Kette der Schwerketten-Antikörper als auch die Länge der Scharnier-Region im Falle der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion die Antigenspezifität der verschiedenen Cameliden-Antikörper nicht beeinflusst und somit ein Immunabsorbens, bestehend aus Cameliden-Schwerketten-Antikörpern die Antigene mit gleicher Spezifität binden kann.
Eine weitere Frage, die vor einer Immobilisierung geklärt werden musste, war, ob die WGAgebundene Plasmafraktion Gesunder Proteine enthält, die im Lama keine oder nur eine schwache Antikörperantwort auslösen und somit nicht oder wenig immunogen sind. Für eine Immun-Affinitäts-Chromatographie der WGA-gebundenen Proteinfraktion hätte dies zur Folge, dass diese Proteine vom Immunabsorbens nicht gebunden und daher nicht oder nur wenig abgereichert werden könnten. Um das Problem einer geringen Abreicherung zu lösen, könnten dann gegen die nicht immunogenen Proteine der WGA-gebundenen Plasmafraktion Gesunder beispielsweise kommerziell erhältliche Antikörper auf eine Matrix immobilisiert und eine zusätzliche Affinitätsreinigung mit dem Durchlauf des Immunabsorbens durchgeführt werden. Um nicht oder schwach immunogene Proteine zu identifizieren, können die Antigene zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Antigenbindung in einem Western Blot-Experiment mit anschließender Immundetektion mit den jeweiligen Antikörpern nachgewiesen werden. Dieses Experiment setzt allerdings voraus, dass parallel zu der Immunodetektion alle Proteine der Fraktion auf einem zweiten Gel visualisiert werden, um eine anschließende massenspektrometrische Identifizierung nicht immunogener Proteine zu erlauben. Um eine hochauflösende Auftrennung des Proteingemischs zu erhalten, wurde mit der Glykoproteinfraktion eine zwei-dimensionale (2D)-SDS-PAGE durchgeführt. Auf der Abb. 3.9 ist zusehen, dass alle Proteinspots, die auf dem Coomassie-gefärbten Gel zu sehen sind, auch von den Schwerketten-Antikörpern detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass zumindest gegen alle abundanten Proteine der WGA-gebundenen Fraktion des Normalplasmas, die mit kolloidalem Coomassie detektierbar sind, Antikörper im Lama induziert werden konnten. Aus diesem Ergebnis kann aber nicht entnommen werden, dass gegen alle Proteine der WGA-gebundenen Fraktion Schwerketten-Antikörper vorhanden sind, da nicht alle Proteine auf einem kolloidal Coomassie Gel angefärbt werden können. Warum nicht alle Proteine, die vom Antikörper detektiert wurden, nicht auch auf dem Coomassie-gefärbten Gel angefärbt wurden, kann durch die gegenüber einem Western Blot geringere Sensivität der Anfärbung mit kolloidalem Coomassie [8] erklärt werden.

Vor einer kovalenten Immobilisierung der Cameliden-Antikörper an einer Matrix wurde auch die Antikörper-Protein-Wechselwirkung durch eine Immunpräzipitation (IP) mit anschließender Immunodetektion analysiert. Die Fragestellung für dieses Experiment war, ob die Cameliden-Schwerketten-Antikörper Subtyp clgG3 die WGA-gebundene Proteinfraktion in Lösung vollständig binden können. Die Abb. 3.10 zeigt, dass im Überstand der IP keine Proteinbanden angefärbt wurden. Dies bedeutet, dass gegen die Proteine der WGA-gebundenen Fraktion, die mit der Detektionsgrenze eines IPs mit anschließendem Immunoblot nachweisbar sind, Cameliden-Schwerketten-Antikörper Subtyp clgG3 vorhanden sind, die in Lösung zur Proteinbindung fähig sind.

4.4 Herstellung und Charakterisierung des Immunabsorbens

In der vorliegenden Arbeit wurde die WGA-gebundene Plasmafraktion Gesunder für die Immunisierung eines Lamas (Abb. 3.8) eingesetzt, um Cameliden-Antikörper zu gewinnen, mit denen über eine Affinitätsreinigung eine Abreicherung von hoch abundanten Proteinen der Glykoproteinfraktion erzielt werden sollte. Die Affinitätsreinigung von Proteinen kann beispielsweise durch eine Immunopräzipitation erfolgen [172]. Für technische Anwendungen ist allerdings der Einsatz löslicher Antikörper zumeist ungünstig, da sie nicht zurückgewonnen werden können. Daher ist es vorteilhaft, sie durch Immobilisierung in eine wieder verwendbare Form zu bringen [147, 148]. Dabei ist es wichtig, dass zwischen Träger und Antikörper eine feste kovalente Bindung besteht, die die spezifische Bindungscharakteristik des Liganden nicht beeinflusst. Eine kovalente Verknüpfung des Antikörpers mit einem Trägermaterial kann über Amino-, Sulfhydryl-, Hydroxylfunktionen oder über die Glykane der Fc-Region des Antikörpers erfolgen. Um sterische Effekte zu vermindern, sollten dabei in jedem Fall die aktiven Gruppen des Antikörpers über einen sogenannten Spacer von dem Träger auf Abstand gehalten werden [34]. In der vorliegenden Arbeit wurden vier verschiedene kommerziell erhältliche Matrizen für die Immobilisierung der Schwerketten-Antikörper getestet (Tab. 3.3), die über einen Spacer verfügen. Allerdings wurden nicht alle drei Schwerketten-Antikörper-Subklassen, sondern nur die Subklasse clgG3 auf eine Matrix immobilisiert und als Immunabsorbens eingesetzt. Die über Protein A fraktionierten Schwerketten-Antikörper clgG2a und clgG2b wurden nicht als Immunabsorbens verwendet, da ihr Anteil im Lamaserum nur etwa 5-10 % der Gesamtproteinmenge ausmacht (Tab. 3.2) und ihre Isolierung mit einem höheren Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden gewesen wäre. Wie in Tab. 3.3 gezeigt, konnten bei der gerichteten kovalenten Bindung von Antikörpern an Protein G nur etwa 7,5 % der eingesetzten Antikörpermenge immobilisiert werden, obwohl die vom Hersteller [141] vorgeschlagene Menge des Quervernetzers (Disuccinimidylsuberat) eingesetzt wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Einsatz einer zu hohen Antikörpermenge, die eine Kapazitätsüberschreitung des Protein G-Materials zur Folge hatte. Für jede Immobilisierung wurde jeweils 1 mg Cameliden-Schwerketten-Antikörper clgG3 auf 1 ml Matrix eingesetzt. So müsste für die Immobilisierung an Protein G eine viel geringe Antikörpermenge eingesetzt werden, um eine vergleichbare hohe Kopplungsrate, wie sie bei den drei anderen Methoden erzielt werden konnte, zu erreichen. Allerdings müsste dementsprechend ein größeres Volumen des Säulenmaterials eingesetzt werden. Dies würde sich dann für eine Immun-Affinitäts-Chromatographie nachteilig auswirken, da die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und den Antigenen mit steigendem Säulenvolumen zunimmt [151]. Da durch die Immobilisierung der Antikörper an Protein G die spezifische Bindungskapazität einer solchen Antikörper-Matrix zu gering bzw. der Verlust der aufwändig isolierten Antikörper aus dem

102

Lama-Antiserum zu groß ist, wurde dieses Säulenmaterial für die Herstellung eines Immunabsorbens im präparativen Maßstab ausgeschlossen.

Die Kopplungsrate an Antikörper für die Immobilisierung an CNBr-, NHS- und Hydrazid-Matrizen war zwar vergleichbar hoch, aber die Antikörpermatrizen unterschieden sich in ihrer Bindungskapazität (Tab. 3.4). Die clgG3-CNBr- und die clgG3-NHS-Matrix zeigten eine um 4 % geringere Bindungskapazität gegenüber der clgG3-Hydrazid-Matrix. Dies kann dadurch erklärt werden, dass, im Gegensatz zu der gerichteten Immobilisierung der Antikörper an die Hydrazid-Matrix, die Antikörper bei der Immobilisierung an CNBr bzw. NHS ungerichtet an die Matrix gekoppelt werden (siehe Kapitel 2.2.6) [4, 12]. Durch eine ungerichtete Immobilisierung wird immer nur ein Teil der immobilisierten Antikörpermenge für die Proteinbindung genutzt. Ein anderer Teil der Antikörper ist aufgrund der teilweise ungünstigen lokalen Immobilisierung, die auch die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers betreffen kann, und der resultierenden sterischen Hinderung zur Proteinbindung nicht mehr fähig [149]. Somit binden ungerichtet immobilisierte Antikörper-Matrizen im Vergleich zu gerichtet immobilisierung die Wahrscheinlichkeit kovalent gebundener Antikörper zu erhöhen, deren Antigenbindungsstellen für ihre Antigene frei zugänglich sind, müsste eine größere Antikörpermenge eingesetzt werden.

Außerdem wurde beobachtet, dass ab 15-facher Benutzung des CNBr-gekoppelten Immunabsorbens die Bindung zwischen dem Träger und Antikörper nicht mehr stabil ist, da im Durchlauf der Affinitäts-Chromatographie Immunglobuline aus Lama glama über eine Tandem-Massenspektrometrie detektiert wurden (Kapitel 3.3.2). Aus der Literatur [35, 36] ist bekannt, dass bei der CNBr-Aktivierung die entstehende Isoharnstoffbindung bei neutralem pH eine positive Ladung trägt, wodurch Ionenaustauscheffekte erzeugt werden [171]. Dies führt dazu, dass die Bindung relativ instabil ist und somit bei mehrfachem Gebrauch des Materials zum stetigen Verlust von Immunglobulinen [35, 36] führt. Der Verlust von Immunglobulinen bringt zwei wesentliche Nachteile mit sich: (a) Verringerung der Säulenkapazität und (b) Antikörperkontamination im Durchlauf der Immun-Affinitäts-Chromatographie. Deshalb wurde die Immobilisierung der Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose für die Herstellung eines Immunabsorbens im präparativen Maßstab ausgeschlossen. Im Gegensatz zu der CNBr-Antikörper-Matrix wurde nach keiner affinitätschromatographischen Aufarbeitung mit den NHS- und Hydrazid-Antikörper-Matrizen ein Antikörperverlust beobachtet. In der Literatur [35, 36] wird beschrieben, dass die Aktivierung mit NHS eine stabile Amidbindung ergibt, die jedoch empfindlich gegenüber Alkali ist [35, 36]. Bei neutralem und saurem pH ist dagegen kein Ligandenverlust zu erwarten [35, 36]. Auch bei der Kopplung der Antikörper an die Hyrazid-Matrix ist eine stabile Bindung bei neutralem und saurem pH gegeben [14].

Allerdings zeigte sich nach 40-fachem Gebrauch sowohl der NHS-gekoppelten als auch der Hydrazidgekoppelten Antikörper-Matrix eine verringerte Bindungskapazität gegenüber der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion (Kapitel 3.3.2). Eine verringerte Bindungskapazität einer Antiköper-Matrix kann durch viele Faktoren verursacht werden. Beispielsweise können das Alter der Antiköper-Matrix, die Häufigkeit des Materialgebrauchs, die verwendeten Puffer und die Temperatur eine irreversible Konformationsänderung der Antikörper bewirken, die dann einen Aktivitätsverlust der Antikörper zur Folge hat. Die Wiederverwendbarkeit jedes Protein-gekoppelten Säulenmaterials kann daher durch diese Faktoren limitiert werden. Für die Herstellung eines Immunabsorbens im präparativen Maßstab wurde die clgG3-Hydrazid-Matrix bevorzugt, da diese im Vergleich zu der clgG3-NHS-Matrix bei gleicher Antikörpermenge eine größere Proteinmenge bindet. Die maximale Antikörpermenge, die für die vorliegende Arbeit auf 1 ml CarboLink Coupling Gel-Säulenmaterial [14] immobilisiert wurde, betrug 3 mg clgG3/ml Agarose, da über Vorversuche bestimmt wurde, dass die Bindungskapazität der clgG3-Hydrazid-Säulenmatrix nicht proportional mit der eingesetzten Antikörperkonzentration stieg. Dies ist dadurch zu erklären, dass bei einer zu hohen Konzentration der Antikörper die Antikörper sich gegenseitig blockieren und deren Paratope durch die Nähe zu einem anderen Antikörper teilweise für das Antigen nicht mehr zugänglich sind [35, 36].

Bevor jedoch das Immunabsorbens für die Analyse diagnostisch relevanter gering konzentrierter Plasmaproteine eingesetzt wurde, musste eine Optimierung der Bedingungen für eine Immun-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.3.3), um eine maximale Anreicherung analytisch interessanter Proteine in den untersuchten Patientenplasmen zu erreichen. Eine optimale Antikörper-Antigen-Bindung hängt beispielsweise von der Salzkonzentration, vom Salztyp, vom pH-Wert des Laufpuffers, der Inkubationszeit und der Temperatur ab, bei der die Chromatographie durchgeführt wird [151]. Außerdem mussten die Pufferbedingungen für die Elution der Antikörper-gebundenen Proteinfraktion so eingestellt werden, dass die Proteinbindung zu der Affinitätssäule vollständig aufgehoben wurde, um eine Wiederverwendung der Säule zu ermöglichen. Da die Cameliden-Schwerketten-Antikörper gegenüber niedrigen pH-Werten eine hohe Stabilität aufweisen [5, 25], wurde die Elution der Antikörper-gebundenen Proteine durch eine pH-Veränderung in einen extrem sauren Bereich durchgeführt. Allerdings können auch die Schwerketten-Antikörper, obwohl sie eine höhere chemische Stabilität gegenüber konventionellen Antikörpern aufweisen [5, 25], bedingt durch den niedrigen pH eine irreversible Konformationsänderung erfahren. Daher war es sehr wichtig, dass die Antikörper-Matrix direkt nach der Elution der Proteine wieder auf einen neutralen pH-Wert umgepuffert wurde. Erst nachdem all diese Parameter für die Immun-Affinitäts-Chromatographie optimal eingestellt worden waren, konnte eine optimale Bindungseffektivität des Immunabsorbens erzielt werden (Abb. 3.10).

In einem weiteren Experiment wurde anschließend die Spezifität der Antikörper-Matrix überprüft, um auszuschließen, dass auch andere als die Proteine des Antigen-Gemischs, mit dem das Lama immunisiert worden war, von der Säule abgefangen werden. Dazu wurde die Bindungsspezifität des Immunabsorbens mit einem Testprotein, dem Carcinoembryonalen Antigen (CEA) [173-176], geprüft, das im Plasma Gesunder in nur geringer Konzentration vorhanden ist. Mit dem Ergebnis (Abb. 3.11) konnten zwei Fragen beantwortet werden:

(a) Das Ergebnis zeigt, dass das CEA nicht signifikant vom Immunabsorbens gebunden wird, da CEA in der gebundenen Antikörperfraktion durch einen Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen wird CEA in der Durchlauffraktion der Affinitäts-Chromatographie detektiert. Dies spricht für den Erfolg der entwickelten Methode, da für die Immunisierung des Lamas die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion Gesunder eingesetzt wurde, demnach die Cameliden-Antikörper nur gegen diese Proteinfraktion spezifisch gerichtet sein sollten und Proteine, die die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion Gesunder nicht enthält, nicht binden sollten. Somit ist eine hohe Bindungsspezifität des Immunabsorbens gegeben.

(b) Das Immunabsorbens wurde aus einem polyklonalen Antiserum hergestellt. Jeder auf dem Immunabsorbens vorhandene Antikörper ist spezifisch gegen eine bestimmte Bindungsstelle (Epitop) eines einzelnen Antigens gerichtet. Allerdings kann ein Antikörper auch an zwei oder mehreren unterschiedliche Antigene binden [2], die über ein identisches oder sehr ähnliches Epitop verfügen. Dieses als Kreuzreaktivität bezeichnetes Phänomen kann bei jeder Antikörper-Affinitäts-Chromatographie auftreten. Ihre Wahrscheinlich erhöht sich besonders dann, wenn das Verhältnis der für die Chromatographie eingesetzten Antikörpermenge zu der Menge des zu analysierten Proteins zu hoch gewählt wird. Die für dieses Experiment eingesetzte Antikörpermenge entsprach etwa der 80-fachen Menge des Proteingemischs (4 mg clgG3 zu 51 μg WGA-gebundene Proteinfraktion). Das Ergebnis zeigte, dass die Kreuzreaktivität der immobilisierten Antikörper im Falle des Testproteins CEA so gering ist, dass es vom Immunabsorbens nicht signifikant gebunden wird.

4.5 Identifizierung vom CEA in mit CEA-versetztem Normalplasma und Plasma von Kolonkarzinompatienten

4.5.1 Kombinierter Einsatz des WGA-Lektins und der clgG3-Hydrazid-Matrix

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer empfindlichen Analysemethode, die es ermöglichen soll, gering konzentrierte diagnostisch relevante Glykoproteine im Blutplasma zu identifizieren. Es sollte geprüft werden, ob mit dem entwickelten Verfahren die Identifizierung diagnostisch relevanter gering konzentrierter Glykoproteine des Plasmas überhaupt realisierbar ist. Hierfür sollte das Verfahren mit Plasmen von Patienten getestet werden, die unter einer definierten Krankheit leiden. Da das Carcinoembryonales Antigen (CEA) [173-176] ein glykosyliertes Protein ist und im Plasma Gesunder nur in geringer Konzentration vorkommt, jedoch bei einem Kolonkarzinom in erhöhter Konzentration ins Blutplasma sezerniert wird [46, 47, 99], bot es sich an, zur Überprüfung der Strategie (Abb. 1.4) Plasmen von Kolonkarzinompatienten zu analysieren. Zunächst wurde eine Aufarbeitung von einem mit CEA-versetztem Plasmagemisch aus gesunden Kontrollpersonen (Kapitel 3.4) durchgeführt, da dieses Material in beliebiger Menge reproduzierbar zur Verfügung stand. Erst dann wurden die Plasmen von zwei Kolonkarzinompatienten (Kapitel 3.5) über das entwickelte Verfahren und unter den gleichen Bedingungen aufgearbeitet. Im Folgenden wird die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

Zur Anreicherung der glykosylierten Plasmaproteine wurde sowohl mit dem CEA-versetzten Plasma als auch mit den Plasmen von zwei Kolonkarzinompatienten eine Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt, wobei für jede Plasmaprobe eine gleiche Gesamtproteinmenge (etwa 60 mg) mit unterschiedlicher CEA-Menge eingesetzt wurde. Allerdings konnte für keine Plasmaprobe in der WGA-gebundenen Fraktion die gesamte CEA-Menge detektiert werden, die im unfraktioniertem Plasma bestimmt wurde. Bei den CEA-Molekülen, die im Durchlauf der Chromatographie detektiert wurden, kann es sich zu einem um unterschiedliche Glykoformen [99] handeln, die das WGA-Lektin nicht mit hoher Spezifität bindet. Zum anderen konkurrieren bei jeder Affinitäts-Chromatographie die Analyten untereinander um die Bindung an den Liganden. Daher ist es möglich, dass andere glykosylierte Plasmaproteine in ihrer Oligosaccharid-Ausstattung eine erhöhte Anzahl an β1-4-GlcNAc- und Sialinsäure-Resten tragen und daher im Vergleich zum CEA mit einer höheren Affinität vom WGA-Lektin gebunden werden. Eine Erklärung, die auf die Kapazitäts-Ausschöpfung des Lektin-Materials basieren würde, kann ausgeschlossen werden, da über Vorversuche die Menge des WGA-Lektins für die Aufarbeitung von 60 mg Gesamtplasmamenge optimal eingestellt wurde.

Besonders auffällig war das Ergebnis, dass nach der WGA-Affinitäts-Chromatographie die Summe der CEA-Menge des Durchlaufs und der eluierten Proteinfraktion nicht der gesamten eingesetzten CEA-Menge des unfraktionierten Plasmas entsprach. Der Verbleib einer CEA-Menge von 4,1-7,9 % in den einzelnen Experimenten konnte nicht geklärt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die CEA-Menge, die nicht bestimmt werden konnte, an das Säulenmaterial oder an der Glasoberfläche des Säulengehäuses gebunden [151] wurde. Zum anderen wurde im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, dass sogar weit höhere Verluste auftraten, wenn konventionelle Plastikgefäße an Stelle von Spezialmaterial mit besonders niedriger Proteinbindung benutzt wurden (Daten nicht gezeigt). Die unspezifische Bindung an Oberflächen wird besonders dann zu einem großen Problem, wenn in dem Reaktionsgefäß eine gering konzentrierte Proteinlösung gesammelt wird. Im Vergleich zu einer hoch konzentrierten Proteinlösung steht dann ein einzelnes Proteinmolekül mehr Bindungsfläche zur Verfügung. Hinzu kommen noch die charakteristischen Eigenschaften des Proteins wie die Hydrophobizität und die Ladungen von Aminosäuren, die eine Bindung an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes vermitteln können. Um die Bindungsaffinität der Proteinlösung an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes zu minimieren, wurden für die gezeigten Experimente (Kapitel 3.4 und Kapitel 3.5) alle Proteinproben in LoBind-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) gesammelt. Diese sind nach Herstellerangaben weder silikonisiert noch in einer anderen Weise beschichtet, jedoch besitzen sie im Vergleich zu herkömmlichen Reaktionsgefäßen eine niedrige unspezifische Bindung, die aus der der Verwendung einer speziellen Polypropylensorte und optimierten Herstellungsbedingungen resultiert. Obwohl die LoBind-Reaktionsgefäße im Vergleich zu herkömmlichen Reaktionsgefäßen eine niedrigere Bindungsaffinität besitzen, ist trotzdem die Möglichkeit einer Proteinbindung an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes gegeben. Daher kann der Verlust der CEA-Menge, die in keiner Proteinfraktion bestimmt werden konnte, auch durch die Bindung an die Oberfläche der verwendeten LoBind-Reaktionsgefäße erklärt werden.

Insgesamt konnte eine große Gesamtproteinmenge jeder Plasmaprobe abgereichert und gleichzeitig ein hoher Anteil der CEA-Menge angereichert werden (Abb. 3.20). Somit konnte die Grössenordnungsdifferenz der CEA-Konzentration zu der gesamten Proteinkonzentration des Gemisches deutlich verringert werden. Trotzdem war es für keine Plasmaprobe möglich, das CEA in der WGAgebundenen Plasmafraktion über eine LC-MS^E-Analyse zu detektieren. Auch die Ergebnisse vieler anderer Studien [107, 143, 144, 146] zeigen, dass die massenspektrometrische Analyse gering konzentrierter Plasmaproteine, die über verschiedene Lektin-Affinitäts-Chromatographien angereichert wurden, erfolglos blieb. Der Grund hierfür ist, dass, obwohl bei diesem Ansatz eine Reduktion der heterogenen Zusammensetzung des Plasmas erreicht und die Komplexität des Plasmas auf glykosylierte Proteine reduziert wird, weiterhin höher konzentrierte Plasmaproteine des untersuchten Glykoproteoms die Identifizierung niedrig abundanter Plasmaproteine behindern, indem sie durch Überlagerungen eine massenspektrometrische Analyse niedrig konzentrierter Proteine nicht zulassen. Um eine weitere Verringerung der Konzentrationsunterschiede in der Plasmaproteinpräparation zu erreichen, wurde gegen die WGA-gebundene Proteinfraktion eine Antikörper-Affinitäts-Matrix hergestellt, die die regulär vorkommenden Proteine der WGAgebundenen Plasmafraktion binden sollte. Dagegen sollten Proteine der WGA-gebundenen Fraktion, die im Normalplasma nicht enthalten sind, vom Immunabsorbens nicht gebunden werden, da gegen sie keine spezifischen Antikörper auf der Matrix vorhanden sein sollten. Bei der Aufarbeitung von Patientenplasmen können so im Durchlauf der Chromatographie potentielle krankheitsspezifische Proteine angereichert werden. Um also die regulären Proteine der WGA-gebundenen Fraktion zu entfernen, wurden die angereicherten Glykoproteine im nächsten Schritt über das Immunabsorbens aufgearbeitet. Da aber, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, eine optimale Antikörper-Antigen-Bindung in PBS gegeben ist, die WGA-gebundene Fraktion jedoch in einem GlcNAc-haltigen Puffer gelöst ist, mussten die WGA-gebundenen Plasmaproben zunächst in PBS umgepuffert werden. Die Umpufferung von Proteinlösungen kann durch Dialyse mit herkömmlichen Dialysemembranen erreicht werden. Der Nachteil solcher Dialysemembranen ist, dass ihr Einsatz für niedrig konzentrierte Proteinlösungen mit einem erheblichen Proteinverlust verbunden ist, da die Bindungsspezifität der Membran-Oberfläche für Proteine relativ groß ist. Stattdessen können Proteinlösungen über eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie (SEC) umgepuffert werden. Allerdings wurde auch bei der SEC ein Proteinverlust nachgewiesen und kann, wie oben beschrieben, entweder durch die unspezifische Bindung der Proteine an die verwendeten LoBind-Reaktionsgefäße, durch Interaktionen mit dem Säulenmaterial oder Säulengehäuse [151] begründet werden. Da aber das Verhältnis der CEA-Menge zu der Gesamtproteinmenge gleich geblieben war, ist dieser Verlust tolerierbar.

Schon bei einer ersten IAC konnte eine hohe Abreicherung der Proteinmenge jeder Plasmaprobe erreicht werden. Da allerdings über Vorversuche mit einem CEA-versetzten Plasma bei dem Einsatz einer gleichen Proteinmenge gezeigt wurde, dass das CEA im Durchlauf einer ersten IAC über eine LC-MS-Analyse nicht detektiert werden konnte, wurde mit dem ersten Durchlauf der IAC aller Plasmaproben eine zweite IAC durchgeführt. Während eine große Plasmaproteinmenge durch die Aufarbeitung über das Immunabsorbens abgereichert wurde, wurde das CEA vom Immunabsorbens nicht signifikant gebunden. Um die Elution von CEA in einem Chromatogramm (Abb. 3.17) zu zeigen, wurden für die IAC-Experimente zur Aufarbeitung des mit CEA-versetzten Plasmas Fraktionen von 2 ml des Protein-Eluats zur Bestimmung der CEA-Konzentration gesammelt. Der *Peak*-Anstieg bei der ersten IAC ist deutlich schmaler und spitzer als von der zweiten IAC. Die breite Kurve der zweiten IAC ist darauf zurückzuführen, dass bei der ersten IAC das Volumen der Probe um den Faktor 3/2 vergrößert und somit die CEA-Konzentration im Durchlauf der Chromatographie verringert wurde. Bei einer Integration beider Funktionskurven erhält man eine Fläche, die der jeweiligen CEA-Menge der Durchläufe der IACs entspricht. Wie aus dem Chromatogramm (Abb. 3.17) entnommen werden kann, konnte im Eluat beider IAC-Läufe eine sehr geringe CEA-Menge detektiert werden. Eine mögliche Kreuzreaktivität der Antikörper kann aufgrund des Ergebnisses in Kapitel 3.3.5 ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein der CEA-Moleküle im Eluat der IAC ist die Bindung einer geringen CEA-Menge an das Säulenmaterial oder an die Glasoberfläche des Säulengehäuses [151], die nicht durch den Waschschritt mit PBS, sondern erst durch Waschen des Säulenmaterials mit dem Elutionspuffer, der aus einem anderen Salztyp und einer anderen Salzkonzentration zusammengesetzt ist, eluiert wurde. Eine andere Erklärung für die Detektion von CEA im Eluat der IAC ist, dass CEA auch mit Proteinen Interaktionen eingehen kann, die vom Immunabsorbens spezifisch gebunden werden. Auf diese Weise könnte eine kleine CEA-Menge indirekt vom Immunabsorbens gebunden werden.

Das Volumen der Durchlauffraktion der IAC (60 ml) stellte zunächst ein Problem für die Identifizierung des Proteingemisches mittels einer massenspektrometrischen Analyse dar. Eine proteolytische Spaltung des Proteingemisches in einem solch großen Volumen wäre zwar realisierbar gewesen, aber die Konzentration einzelner Proteine wäre zu gering gewesen, um sie über die LC-MS^E-Analyse mit dem Q-TOF Premier detektieren zu können, da hierfür maximal ein Probenvolumen von etwa 4 μl injiziert werden kann. Wenn beispielsweise in einer 60 ml-Proteinlösung eine CEA-Menge von 6 µg vorliegt, was 0,1 ng/µl entspricht, und davon 4 µl injiziert werden, so würde für die LC-MS^E-Analyse eine Stoffmenge von 0,037 fmol vermessen werden. Für eine massenspektrometrische Analyse unter den gewählten Bedingungen ist jedoch in der Regel mindestens die 100-fache Menge erforderlich, um das Protein sicher detektieren zu können. Daher musste die Proteinlösung vor einer proteolytischen Spaltung zunächst aufkonzentriert werden. Die Aufkonzentrierung von Protein-Lösungen kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Es können kommerziell erhältliche Zentrifugaleinheiten eingesetzt werden, die durch eine Membran Moleküle ab einem bestimmten Molekulargewicht zurückhalten. Der Nachteil solcher Einheiten besteht darin, dass der zur Aufkonzentrierung verwendete Filter eine unspezifische Bindungsaffinität zu Proteinen besitzt und daher zum Verlust von Proteinen führt. Da die jeweilige Proteinkonzentration im Durchlauf der IAC-Plasmaproben sehr gering war und ein Verlust weiterer Proteine eine massenspektrometrische Analyse erschwert hätte, war der Einsatz der Zentrifugaleinheiten zur Aufkonzentrierung von Nachteil. Eine andere Methode zur Aufkonzentrierung einer Proteinlösung stellt die Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln und das anschließende Lösen der Proteinpellets mit Detergenzien dar. Dabei werden die Proteine allerdings in jedem Fall irreversibel denaturiert und sind zum Teil für die anschließende proteolytische Spaltung nur schwer wieder in Lösung zu bringen. Für die Aufkonzentrierung der Proteinlösungen (Durchlauf der IAC) wurde eine weitere WGA-Affinitäts-Chromatographie (Kapitel 3.4.1 und 3.5.1) durchgeführt. Die Aufkonzentrierung über die WGA-

Affinitäts-Chromatographie hat gegenüber anderen Konzentrierungsmethoden den Vorteil, dass hierbei nur eine geringe Proteinmenge durch Denaturierung oder Bindung an das Säulenmaterial bzw. an das Säulengehäuse verloren geht. Bei Vorversuchen zeigte sich, dass das WGA-Lektin eine Proteinlösung in PBS mit einer vergleichbaren Effizienz wie in einem WGA-Waschpuffer hochspezifisch bindet. Der Nachteil einer Aufkonzentrierung über eine WGA-Affinitäts-Chromatographie ist, dass durch die Elution der Glykoproteine mit dem GlcNAc-haltigen Puffer ein zusätzlicher Aufarbeitungsschritt erforderlich ist, um die Proteinlösung einengen zu können. Da die GlcNAc-Moleküle nicht flüchtig sind, wurde die Proteinlösung zunächst über eine Grössen-Ausschluß-Chromatographie in eine Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung umgepuffert und erst dann durch Gefriertrocknung eingeengt.

4.5.2 Proteinidentifizierung durch LC-MS

Analyse des mit CEA-versetzten Normalplasmas

Das beschriebene Verfahren zur Aufarbeitung des mit CEA-versetzten Plasmas aus gesunden Kontrollpersonen wurde insgesamt viermal durchgeführt, wobei ein reproduzierbares Ergebnis erzielt wurde. In allen Proben konnten das Carcinoembryonale Antigen (CEA) sowie neun weitere Proteine identifiziert werden (Tab. 3.11). Bei allen identifizierten Proteinen handelte es um glykosylierte Proteine. Dass weitere Proteine nicht detektiert wurden, bedeutet jedoch nicht notwendig, dass sie durch das angewendete Abreicherungsverfahren vollständig entfernt wurden, sondern nur, dass sie bis unter der Detektionsgrenze des angewendeten Analyseverfahrens abgereichert wurden. Es stellt sich die Frage, wieso bestimmte im Normalplasma regulär vorkommende Proteine, die im Durchlauf der IAC detektiert werden, im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen nicht bis unterhalb der Detektionsschwelle vom Immunabsorbens gebunden wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass nur wenige Antikörper gegen diese Proteine gebildet wurden und daher nicht die gesamte Proteinmenge abgereichert werden konnte. Die erhaltenen Ergebnisse belegen, dass gegen Attractin, α_1 -saures Glykoprotein 1 und 2, α_2 -Macroglobulin und Lumican Antikörper gebildet worden sind, da diese Proteine abgereichert wurden (Tab. 3.11). Die Anzahl der Antikörper gegen diese Proteine ist jedoch offenbar zu gering, um diese Proteine vollständig zu binden. Im Falle der Proteine, die erst durch die Abreicherung der abundanten Proteine der WGAgebundenen Proteinfraktion, also nur im Durchlauf der IAC, detektiert werden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, um wie viel oder ob sie überhaupt abgereichert werden. In jedem Fall scheint die für diese Proteine erhaltene Antikörperantwort im Lama nach Injektion der WGAgebundenen Plasmaprotein-Präparation nicht ausgereicht zu haben, um diese Proteine vollständig zu binden. Eine mögliche Erklärung für die schwache Immunantwort für bestimmte Proteine könnte ein hoher Konservierungsgrad der betreffenden Proteine sein. Diese Hypothese lässt sich jedoch nicht überprüfen, da die jeweiligen Proteinsequenzen für *Lama glama* nicht bekannt sind. Auch ein hoher Glykosylierungsgrad, der die Proteinstruktur abschirmt, könnte verhindern, dass das betreffende Protein eine starke Immunantwort auslöst.

Analyse der Plasmen von Kolonkarzinompatienten

Im Durchlauf der IAC des Patientenplasmas A konnten durch die LC-MS^E-Analyse insgesamt neun Proteine identifiziert werden, wobei fünf von ihnen auch im Durchlauf der IAC des mit CEAversetzten Normalplasmas detektiert wurden (Abb. 3.23). Dagegen wurden im Durchlauf der IAC der Plasmaprobe des Kolonkarzinompatienten B nur fünf Proteine identifiziert, wobei in diesem Fall vier Proteine auch im Durchlauf der IAC des mit CEA-versetzten Normalplasmas detektiert wurden. Dieses Ergebnis kann durch die biologische Varianz des Plasmaproteinprofils [59] begründet werden. Ein besonders erfreuliches Ergebnis war die Detektion des tumorassoziierten CEAs im Durchlauf der IAC beider Kolonkarzinompatientenplasmen (Tab. 3.14 und 3.15), was erst durch die Abreicherung der abundanten Proteine der WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktion über das Immunabsorbens ermöglicht wurde. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, derartige Affinitäts-Säulen einzusetzen, um durch die Abreicherung der im Plasma regulär vorhandenen Glykoproteine eine entsprechende Anreicherung von diagnostisch relevanten Markerproteinen zu erreichen, die bisher aufgrund ihrer relativen geringen Konzentration im Plasma einer Analyse nicht zugänglich sind:

(I) Insbesondere können mit dem vorgestellten Verfahren diagnostisch relevante Glykoproteine entdeckt werden, die im Plasma Gesunder gar nicht oder nur in äußerst geringer Konzentration vorkommen, sondern erst bedingt durch eine bestimmte Krankheit ins Blutplasma abgegeben werden (z. B. tumorassoziierte Proteine). Diese Glykoproteine müssten allerdings in ihrer Oligosaccharid-Ausstattung Glykan-Reste tragen, die eine spezifische Bindung zum Lektin erlauben.

(II) Über das vorgestellte Verfahren können krankheitsspezifische Glykoproteine entdeckt werden, die sowohl bei Gesunden als auch bei Kranken zwar das gleiche Glykokonjugat tragen, aber bedingt durch eine bestimmte Krankheit in erhöhter Konzentration ins Blutplasma abgegeben werden. Die Konzentration dieser Proteine wäre dann in der Lektin-gebundenen Plasmafraktion des Patienten höher als in der Lektin-gebundenen Fraktion des Normalplasmas, was zur Folge hätte, dass sie vom Immunabsorbens nicht vollständig gebunden werden können. (III) Auch können über das entwickelte Verfahren krankheitsspezifische Proteine entdeckt werden, die zwar sowohl bei Gesunden als auch bei Kranken in gleicher Konzentration vorkommen, aber krankheitsbedingt einen veränderten Glykan-Rest tragen und somit erst dann spezifisch von dem für die Affinitäts-Chromatographie eingesetzten Lektin gebunden werden.

(IV) Das vorgestellte Verfahren kann auch zur Analyse von Proteinmarker-Mustern [62] eingesetzt werden, also zur Erfassung von mehreren Proteinen dienen, die mit einer einzigen Krankheit assoziiert sein können.

Da die Proteine C1 Plasma Protease Inhibitor (C1INH), Carboxypeptidase N Untereinheit 2 und IgA- C_{H1} Region (Abb. 3.22) nur im Durchlauf der IAC des Patientenplasmas A (Tab. 3.14), aber nicht im Durchlauf der IAC des Normalplasmas gefunden wurden, können sie zunächst als Kandidaten für potentionelle Markerproteine für ein Kolonkarzinom betrachtet werden. Ein besonders auffälliges Ergebnis war, dass das C1INH-Protein in den Durchläufen der IAC von beiden Patientenplasmen (Tab. 3.14 und Tab 3.15, Rang 1) detektiert wurde. Beim C1INH handelt es sich um ein 104 kDa großes Glykoprotein [153], das hauptsächlich von der Leber synthetisiert wird [155, 163, 164]. Die normale C1INH-Plasmakonzentration beträgt 250 µg/ml. Bei Patienten mit einem Hereditären Angioödem besteht ein Mangel an diesem Protein [157]. Liang et al. [161] zeigten mittels einer SILAC-Analyse von normalen und Brusttumorzellen, dass das C1INH-Protein und auch andere Protease-Inhibitoren wie z. B. das SerpinE2-Protein (Protease Nexin 1) bei maligner Transformation von Brustzellen um etwa das 13-fache herunterreguliert werden. Dagegen zeigten Odening et al. [162], dass Ovarialtumorzellen, die durch eine Chemotherapie und Medikamentenbehandlung eine Resistenz gegenüber Arzneimitteln entwickelt haben, eine erhöhte Expression des C1INHs aufweisen. Das C1INH-Protein gehört der Serpin Superfamilie [161] an und besteht aus zwei unterschiedlichen Domänen [153]: einer Serpin-Domäne und einer Anker-ähnlichen aminoterminalen Domäne. Die Serpin-Domäne besitzt eine Serin Protease-Inhibitor-Funktion [153, 161]. Sie kontrolliert die Aktivierung des Komplementfaktors C1 und reguliert so das Komplementsystem [157]. Die aminoterminale Domäne trägt die meisten Glykosylierungsstellen (10 von 13, dabei sieben O-Glykane und drei N-Glykane) [153, 157] und kann unabhängig von der Serpin-Domäne wichtige biologische Aktivitäten ausführen [165]. Beispielsweise werden auf der aminoterminalen Domäne des C1IHNs Sialyl-Lewis^x-Epitope (SLe^x) exprimiert, die von E- und P-Selektinen gebunden werden können [153]. Auch zirkulierende Leukozyten können über SLe^x-Strukturen, die sie auf ihren Transmembranproteinen exprimieren, von E- und P-Selektinen gebunden werden [124, Kapitel 8]. Die Selektin-vermittelte Leukozyten-Endothel-Adhäsion führt bei Entzündungen im Gewebe zum Abbremsen der Leukozyten im Blutstrom. Diese schwachen und transienten Interaktionen zwischen den Leukozyten und den Endothelzellen ist die Grundlage für den Vorgang, der als *"rolling"* bezeichnet wird. In entzündeten Gewebsarealen kommt es schließlich zur Transmigration der Leukozyten durch die Endothelschicht, wobei stärkere Adhäsionskräfte durch die Bindung von L-Selektinen auf Leukozyten an das glykosylierte Zell-Adhäsionsmolekül (GlyCAM), Mukosal Addressin Zell-Adhäsionsmolekül (MadCAM) und CD34 erfolgen, die auf Endothelzellen exprimiert sind [124, Kapitel 8]. Interessanterweise wurde gezeigt, dass bei einer Entzündung im Gewebe das C1INH-Protein 2,5-fach erhöht ins Blutplasma sezerniert wird [156]. Dies kann möglicherweise die Leukozyten-Endothel-Adhäsion regulieren, indem das C1INH-Protein (über SLe[×]-Strukturen) von E- und P-Selektinen gebunden und dadurch eine Bindung der Leukozyten an die Epithelzellen verhindert wird.

Obwohl das C1INH-Protein zu den abundanten Proteinen der WGA-gebundenen Fraktion des Normalplasmas gehört (Tab. 3.1, Rang 6), wurde es im Durchlauf der IAC des Normalplasmas nicht detektiert. Dies bedeutet, dass spezifische Antikörper gegen das C1INH-Protein auf der Antikörper-Matrix vorhanden sind. Für die Detektion des C1INHs im Durchlauf beider Patientenplasmen gibt es mehrere Erklärungen. Die fünf plausibelsten Erklärungen basieren darauf, dass das C1INH-Protein im Patientenplasma im Vergleich zum Normalplasma in der WGA-gebundenen Fraktion mit einer höheren Konzentration angereichert wird und deshalb nicht genügend Antikörper gegen das C1INH-Protein auf der Antikörper-Matrix vorhanden sind, um die Proteinmenge vollständig zu binden:

- (a) Bedingt durch das Kolonkarzinom könnte das C1INH-Protein hochreguliert sein.
- (b) Das C1INH-Protein könnte bedingt durch das Kolonkarzinom eine Glykosylierungsänderung erfahren haben, durch die das Protein mit einer höheren Affinität an das WGA bindet.
- (c) Da das C1INH-Protein ein Akut-Phase-Protein [156] ist, könnte es aufgrund einer Entzündungsreaktion, die durch eine Operation der Patienten ausgelöst wurde, in einer erhöhten Konzentration in beiden Patientenplasmen vorkommen.
- (d) Die Patienten haben eine Resistenz gegenüber Medikamenten entwickelt, wobei das C1INH-Protein vermehrt exprimiert wird [162].
- (e) Da das Plasmaproteinprofil jedes Menschen unterschiedlich ist [59], ist es möglich, dass das C1INH-Protein zufällig bei beiden Patientenplasmen in einer höheren Konzentration vorkommt als im Normalplasma.

In der Literatur ist bisher weder beschrieben, ob bei maligner Transformation eine Hochregulierung (a) oder eine Glykosylierungsänderung des C1INH-Proteins (b) stattfindet. Mit dem vorgestellten Verfahren ist es zwar nicht möglich, zwischen einer Hochregulierung oder einer Glykosylierungsänderung des C1INHs zu unterscheiden, aber es ist möglich, eine Erhöhung der C1INH-Plasmakonzentration zu zeigen. Für eine solche Aussage reicht allerdings das Ergebnis der Proteomanalyse von nur zwei Plasmen von Kolonkarzinompatienten nicht aus, da die Erklärungen (c), (d) und (e) nicht ausgeschlossen werden können. Um eine mögliche Assoziation des C1INHs zu einem Kolonkarzinom statistisch signifikant zu belegen, müsste eine Validierung durch die Untersuchung des Plasmas einer größeren Zahl von Kolonkarzinompatienten durchgeführt werden.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine erfolgsversprechende Analyse zur Entdeckung diagnostisch relevanter gering konzentrierter Glykoproteine in humanem Plasma durch den kombinierten Einsatz des Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Lektins und der Cameliden-Schwerketten-Antikörper vorgestellt. Unter Ausnutzung der besonderen Eigenschaften der Schwerketten-Antikörper konnte durch eine Immun-Affinitäts-Chromatographie (IAC) eine starke Abreicherung der im Plasma regulär vorkommenden Glykoproteine erreicht und eine massenspektrometrische Analyse eines tumorassoziierten Proteins, des Carcinoembryonalen Antigens (CEA), in Plasmen von Kolonkarzinompatienten durchgeführt werden. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, derartige Affinitäts-Säulen einzusetzen, um durch die Abreicherung der im Plasma Gesunder regulär vorhandenen Glykoproteine eine entsprechende Anreicherung von diagnostisch relevanten gering konzentrierten glykosylierten Markerproteinen zu erreichen (siehe Kapitel 4.5.2).

Da im Durchlauf der IAC des mit CEA-versetzten Plasmas nicht nur CEA, sondern auch einige häufige, offenbar nur unzureichend abgereicherte Plasmaproteine identifiziert wurden, ist eine weitere Optimierung der IAC notwendig, um eine maximale Anreicherung analytisch interessanter Proteine in den untersuchten Patientenplasmen zu erreichen. Um die regulär vorkommenden Proteine, die im Durchlauf der IAC der Plasmaproben sowohl von Gesunden als auch von Kranken detektiert wurden, noch weiter abzureichern, können gegen diese Proteine hochspezifische Antikörper auf einer zusätzlichen Matrix eingesetzt werden. Hierfür könnten entweder kommerziell erhältliche Antikörper erworben, durch Immunisierung eines Versuchstiers induziert oder monoklonale Antikörper über die Hybridom-Technik [40] gewonnen werden. Die heterologe Expression der Antigenbindungsstellen, V_HH-Domänen, aus Immunglobulinen von Cameliden erweitert den biotechnologischen Einsatzbereich. Zur Klonierung der konventionellen Antikörper müssen stets zwei Strukturgene parallel gehandhabt und gleichzeitig exprimiert werden, während die Expression der V_HH-Domänen aus Cameliden-Schwerketten-Antikörpern auch z. B. in prokaryotischen Systemen möglich ist. Eine der grundlegenden Techniken zur Selektion von Antikörpern beruht dabei auf der Präsentation auf der Oberfläche von Phagen, dem so genannten Phage Display [41]. Über das Phage Display-Verfahren könnten so spezifische Antikörper gegen regulären Plasmaproteine hergestellt und als standardisierte Immunabsorbienten mit äquivalenten Antigenbindungsstellen eingesetzt werden.

Um mit dem vorgestellten Verfahren gering konzentrierte diagnostisch relevante glykosylierte Plasmaproteine entdecken zu können, dürfen während der gesamten Aufarbeitungsprozedur keine Variablen geändert werden. Nur dann ist es möglich, ein potentiell entdecktes Markerprotein in anderen unabhängigen Proben reproduzierbar zu identifizieren und somit zu validieren.

Außerdem kann ein potentiell entdecktes Markerprotein nur dann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Krankheit zugeordnet werden, wenn das Plasmaproteom einer größeren Anzahl von Patienten analysiert wird, die unter einer definierten Krankheit leiden. Parallel zu der Proteomanalyse dieser Patientenplasmen sollte das Plasmaproteom einer gleichen Anzahl von Patienten analysiert werden, die unter einer anderen definierten Krankheiten leiden, wobei möglichst das gleiche Organ bzw. Gewebe betroffen sein sollte. Beispielsweise kann das Plasmaproteom von Leberkarzinompatienten mit dem Plasmaproteom von Patienten verglichen werden, die unter einer Leberzirrhose leiden. Ein potentielles Markerprotein für ein Leberkarzinom kann erst dann als ein spezifischer Marker betrachtet werden, wenn dieses Protein in den Plasmen von Leberzirrhosepatienten nicht detektiert wurde. Ansonsten kann nicht ausgeschlossen werden kann, dass die differentielle Proteinkonzentration im Vergleich zu Gesunden nicht nur durch ein Leberkarzinom sondern unspezifisch durch Leberkrankheiten entsteht.

Da allerdings die Aufarbeitung vieler Plasmaproben über das vorgestellte Verfahren sehr arbeits- und zeitaufwendig ist, könnte die Suche nach einem Markerprotein zunächst mit einer kleinen Anzahl von Plasmaproben über das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Verfahren begonnen und anschließend mit anderen Methoden fortgesetzt werden. Für ein potentionelles Markerprotein könnte die quantitative Proteinbestimmung in den übrigen Plasmaproben mit Methoden erfolgen, die in einem einzigen, schnellen und relativ einfachen Schritt realisierbar sind. Beispielsweise könnte hierfür ein ELISA-Verfahren eingesetzt werden. Eine andere Methode, mit der eine gezielte Proteinidentifizierung und eine relative Quantifizierung möglich sind, ist die *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)-Massenspektrometrie [158]. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte MS^E-Massenspektrometrie [121], bei der alle Fragment-Massen in einem vorgegebenen Massenbereich ständig erfasst werden, können bei der MRM-Massenspektrometrie ausgewählte Ionen selektiv registriert werden. Die MRM-Massenspektrometrie kann deshalb zur gezielten Analyse bekannter Proteine eingesetzt werden. Die Protein-Quantifizierung per MRM setzt allerdings voraus, dass mehrere signifikante Ionen des gesuchten Proteins detektierbar sind.

Die qualitative und quantitative Information von diagnostisch relevanten Plasmaproteinen in einem niedrigen Konzentrationsbereich kann dann dazu dienen, Krankheiten in einem frühen Stadium zu diagnostizieren, zu therapieren und wichtige Rückschlüsse über den Therapieverlauf [116] zu ziehen.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung eines empfindlichen Verfahrens, das es ermöglichen soll, gering konzentrierte diagnostisch relevante Glykoproteine in humanem Plasma zu identifizieren, ohne dass deren Identität im Vorhinein bekannt ist. Hierfür wurden zwei affinitätschromatographische Schritte miteinander kombiniert. Zunächst wurde eine Anreicherung der im Plasma vorhandenen Glykoproteine aus einem Pool gesunder Kontrollpersonen über eine Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Affinitäts-Chromatographie vorgenommen. Durch die Lektinfraktionierung des humanen Plasmas konnten ca. 96 % der gesamten Plasmaproteinmenge abgetrennt werden. Um die Analyse gering konzentrierter Plasmaproteine in der WGA-gebundenen Fraktion zu ermöglichen, war eine selektive Abtrennung von regulär vorkommenden Proteinen der Glykoproteinfraktion erforderlich. Die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion Gesunder wurde für die Immunisierung eines Lamas eingesetzt, um hochspezifische Antikörper gegen die Glykoproteine des Normalplasmas zu erhalten. Cameliden (Kamele und Lamas) bilden neben konventionellen Antikörpern eine besondere Form von Antikörpern, bei denen die leichte Kette und die C_H1-Domäne deletiert sind. Diese sogenannten Schwerketten-Antikörper besitzen im Vergleich zu konventionellen Antikörpern eine höhere chemische und thermische Stabilität. Durch die gerichtete Immobilisierung der Schwerketten-Antikörper an eine Hydrazid-Matrix wurde ein Immunabsorbens mit hoher Stabilität hergestellt, das bis zu 98 % der WGA-gebundenen Plasmaproteine binden konnte. Da die Cameliden-Antikörper nur gegen Glykoproteine gerichtet sind, die in Normalplasma vorkommen, sollten Proteine, die die WGAgebundene Proteinfraktion aus Normalplasma nicht enthält, nicht gebunden werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein glykosyliertes Testprotein eingesetzt, das Carcinoembryonale Antigen (CEA), das im Plasma Gesunder nur in sehr geringen Mengen vorkommt, dessen Plasmakonzentration jedoch beim Kolonkarzinom stark erhöht ist. Ein Plasma-Pool aus gesunden Kontrollpersonen wurde mit CEA (20 pmol/ml) versetzt, die WGA-gebundene Glykoprotein-Fraktion isoliert und eine Abreicherung der Proteine des Normalplasmas mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Matrix aus immobilisierten Cameliden-Schwerketten-Antikörpern durchgeführt. Hierbei wurde das CEA nicht signifikant vom Immunabsorbens gebunden. Im Durchlauf der Immun-Affinitäts-Chromatographie konnte das CEA mittels einer LC-MS^E-Analyse detektiert werden. Anschließend wurden die WGA-gebundenen Plasmaproteinfraktionen von zwei Kolonkarzinompatienten über das Immunabsorbens aufgearbeitet. Auch in diesem Fall konnte das CEA im Durchlauf der Affinitäts-Säule angereichert und mittels der LC-MS^E-Analyse detektiert werden.

Durch den Einsatz derartiger Affinitäts-Säulen eröffnet sich daher die Möglichkeit, durch die Abreicherung der im Plasma Gesunder regulär vorkommender Glykoproteine eine entsprechende Anreicherung von diagnostisch relevanten gering konzentrierten Markerproteinen zu erreichen. In jedem Fall muss das diagnostisch relevante Glykoprotein Glykan-Reste tragen, die eine spezifische Bindung zum Lektin erlauben und in der angereicherten Glykoproteinfraktion mit einer Konzentration von \geq 20 pmol/ml vorkommen.

6 Nomenklatur

6.1 Arabische Formelzeichen

A ₂₂₀	:= Absorption bei der Wellenlänge 220 nm	[1]
A ₂₆₀	:= Absorption bei der Wellenlänge 260 nm	[1]
A ₂₈₀	:= Absorption bei der Wellenlänge 280 nm	[1]
C _{Ptot}	:= totale Proteinkonzentration	[mg [·] ml ⁻¹]
KP _{clg3}	:= Kopplungsrate der immobilisierten Cameliden-	
	Schwerketten-Antikörper	[%]
m _{CEA}	:= CEA-Menge	[ng]
m _{clgG3,D}	:= clgG3-Menge im Durchlauf	[mg]
m _{clgG3,Input}	:= eingesetzte clgG3-Menge	[mg]
m _{IAC,D}	:= Proteinmenge im Durchlauf der IAC	[µg]
m _{IAC,Input}	:= eingesetzte Proteinmenge für die IAC	[µg]
m _{Ptot}	:= Menge der WGA-gebundenen Proteinfraktion	[µg]
OD	:= Optische Dichte	[1]
OD ₄₀₅	:= Optische Dichte bei der Wellenlänge 405 nm	[1]
p _{max}	:= maximaler Druck	[MPa]
R _{D-IAC} /Plasma	:= Verhältnis der Proteinabundanz der Durchlauf-	
	fraktion der IAC zum unfraktioniertem Plasma	[1]
R _{D-IAC/WGA}	:= Verhältnis der Proteinabundanz der Durchlauffraktion	
	der IAC zu der WGA-gebundenen Proteinfraktion	[1]
R _{mCEA/mptot}	:= Verhältnis der CEA- zu der gesamten	
	Proteinmenge	[1]
R _{WGA/Plasma}	:= relative Abundanz eines Proteins in der WGA-gebunden-	-
	en Proteinfraktion zum unfraktionierten Plasma	[1]
т	:= Temperatur	

6.2 Allgemeine Abkürzungen

AAL	:= Aleuria Aurantia Lektin
ABTS	:= 2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonicacid
AFP	:= α-Fetoprotein
AMBP	:= α_1 -Microglobulin
APS	:= Ammoniumperoxodisulfat
AS	:= Aminosäure
Asn	:= Asparagin
BRCA2	:= breast cancer 2, early onset, ein Tumor-Supressor-Protein
BSA	:= Bovine Serum Albumin
CaCl ₂	:= Calciumchlorid
CEA	:= Carcinoembryonales Antigen
CEACAM1	:= Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1
CEACAM5	:= Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 5, CEA
CEACAM6	:= Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6
CDR	:= Complementary Determining Regions
clgG	:= Cameliden-Immunglobulin
clgG1	:= konventionelles Cameliden-Immunglobulin
clgG2a	:= Cameliden-Schwerketten-Immunglobulin mit kurzer Scharnier-Region
clgG2b	:= Cameliden-Schwerketten-Immunglobulin mit kurzer Scharnier-Region
clgG3	:= Cameliden-Schwerketten-Immunglobulin mit langer Scharnier-Region
cDNA	:= complementary DNA
CDR	:= Complementary Determining Regions
С _н	:= konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
CHAPS	:= 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CL	:= konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
CNBr	:= Cyanbromid
C1INH	:= Plasma Protesa C1 Inhibitor
Con A	:= Concanavalin A
Core1	:= Galβ1-3GalNAc-Ser/Thr (T-Antigen)
Core2	:= GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAc-Ser/Thr
Core3	:= GlcNAcβ1-3GalNAc-Ser/Thr
Core4	:= GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-3)GalNAc-Ser/Thr
CRD	:= Carbohydrate Recognition Domain (Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne)

C-Typ-Lektin	:= tierisches Lektin; Ca ²⁺ -abhängige Kohlenhydrat-Bindung
Cys	:= Cystein
2D-PAGE	:= zweidimensionale PAGE
Da	:= Dalton
dH ₂ O	:= deionisiertes Wasser
DIGE	:= Differntial Gel Glectrophoresis
DNA	:= Desoxy Ribonucleic Acid
DTT	:= Dithiothreitol
ECL	:= Enhanced Chemoluminescence
EDTA	:= Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	:= Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	:= Electrospray-Ionisierung
FR	:= Framework Regions
Gal	:= Galaktose
GalNAc	:= N-Acetyl-Galaktosamin
GCFS	:= granulocyte colony-stimulating factor
GlcNAc	:= N-Acetyl-Glukosamin
Glu	:= Glukose
GlyCAM	:= glykosyliertes Zell-Adhäsionsmolekül
h	:= Stunde
HAc	:= Essigsäure
HCI	:= Salzsäure
His	:= Histidin
H-Kette	:= schwere Kette eines Antikörpers (heavy chain)
НРА	:= Helix Pomatia Agglutinin
HPLC	:= High Performance Liquid Chromatography
HRP	:= Horse Radish Peroxidase
HSA	:= Humanes Serum Albumin
HUPO	:= Human Proteome Organisation
IAC	:= Immun-Affinitäts-Chromatographie
IACI	:= erste IAC
IACII	:= zweite IAC
ICAT	:= Isotope-Coded Affinity Tags
ICPL	:= Isotope-Coded Protein Label
IEF	:= Isoelektrische Fokussierung

IgA	:= Immunglobulin A
IgD	:= Immunglobulin D
IgE	:= Immunglobulin E
lgG	:= Immunglobulin G
lgM	:= Immunglobulin M
IP	:= Immunopräzipitation
IPG	:= Immobilized pH gradient
itraq	:= isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation
I-Typ-Lektin	:= tierisches Lektin; CRD mit Homologie zu Immunglobulin-ähnlicher Domäne
kDa	:= kilo Dalton
KCI	:= Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	:= Kalium-Dihydrogenphosphat
LC	:= Liquid Chromatography (Flüssigkeits-Chromatographie)
LCA	:= Lens Culinaris Agglutinin
LC-MS	:= Flüssigkeits-Chromatographie-bezogene Massenspektrometrie
LC-MS ^E	:= Flüssigkeits-Chromatographie-bezogene MS ^E -Massenspektrometrie
LEL	:= Lycopersicon Esculentum Lektin
L-Kette	:= leichte Kette eines Antikörpers (light chain)
LS	:= Lama Serum
LSA	:= Lama Serum Albumin
L-Typ-Lektin	:= tierisches Lektin; CRD mit Homologie zu Leguminosen-Pflanzenlektinen
m	:= Masse eines Ions bei der MS
MadCAM	:= Mukosal Addressin Zell-Adhäsionsmolekül
mAK	:= monoklonale Antikörper
Man	:= Mannose
MARS	:= Multi Affinity Removal System
min	:= Minute
MnCl ₂	:= Mangandichlorid
mRNA	:= messenger-RNA
MS	:= Massenspektrum
M-Typ-Lektin	:= tierisches Lektin; CRD mit Homologie zu Mannosidase-Enzymen
m/z	:= Massen/Ladungs-Verhältnis
NaCl	:= Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	:= Di-Natriumhydrogenphosphat

NH₄HCO₃ := Ammoniumhydrogencarbonat

NHS	:= N-Hydroxysuccinimid
NP	:= Neutralisationspuffer
OD	:= optische Dichte
OH-	:= Hydroxyl-Gruppe
PAGE	:= Polyacrylamid-Gelelektrophorese
рАК	:= polyklonale Antikörper
PBS	:= Phosphate Buffered Saline
PCR	:= Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
рН	:= potentia Hydrogenii
рІ	:= isolelektrischer Punkt, pl = pH
PNGase F	:= Peptid-N-Glykosidase F
РРР	:= Plasma Proteom Project
PSA	:= Prostata-spezifisches Antigen
Ptot	:= Gesamtprotein
P-Typ-Lektin	:= tierisches Lektin; bindet Mannose-6-Phosphat
PVDF	:= Polyvinyldifluorid
QTOF	:= Quadrupol Flugzeit-Massenspektrometer
RP	:= Reversed Phase
R-Typ-Lektin	:= tierisches Lektin; CRD mit Homologie zum Pflanzenlektin Ricin
S	:= Sekunde
SDS	:= Sodiumdodecylsulfat
SEC	:= Size-Exclusion-Chromatography (Grössen-Ausschluß-Chromatographie)
Ser	:= Serin
SLe ^x	:= Sialyl-Lewis ^x
Sialyl-T-Antigen	:= Sialylα2-6GalNAcα-Ser/Thr
Sialyl-Tn-Antigen	:= Sialylα2-6GalNAcα-Ser/Thr, Sialylα2-3(Galβ1-3)GalNAc-Ser/Thr
T-Antigen	:= Galβ1–3GalNAcα-Ser/Thr
Tn-Antigen	:= GalNAcα-Ser/Thr
TBST	:= Tris-buffered saline Tween
TEMED	:= N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	:= Threonin
TNF	:= tumor necrosis factor
TOF	:= Time of Flight (Flugzeit-Massenspektrometer)
ТРА	:= tissue plasminogen activator
TRIS	:= Trishydroxyaminomethan

Tween	:= Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat
V _H	:= variable Domäne der schweren Kette eines konventionellen Antikörpers
V _H H	:= variable Domäne der Cameliden-Schwerketten-Antikörper
VL	:= variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
WGA	:= Wheat Germ Agglutinin
Ххх	:= beliebige Aminosäure außer Prolin
z	:= Ladung eines Ions bei der Massenspektrometrie

7 Literaturverzeichnis

- [1] Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. Bichemical Sciences. 2001. Vol. 26, 4:230-234.
- [2] Buch: Ivan M, Roitt, Brostoff J, David K. Male. Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 1987.
- [3] Dissertation: Dorfmüller S. Herstellung, Expression und Charakterisierung von rekombinanten Antikörpern und Immuntoxinen gegen Phomalingam, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. Juli 2002.
- [4] GE Healthcare, CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow, Instructions 71-5000-15 AD 03/2006
- [5] Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol. 2001 Jun;74(4):277-302.
- [6] Bateman, Castro-Perez, Wrona, Shockcor, Yu, Oballa, Nicoll-Griffith. MSE with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21: 1485–1496
- [7] Swift, Posner. Gel Chromatography of human acid. European Journal of Soil Science, 1971.Vol. 22, No. 2.
- [8] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins R, Appel D, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; 2005, 571-607.
- [9] Jacobson G, Karsnäs P. Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer.
 Electrophoresis 1990, 11, 46-52
- [10] Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A Widgruber R Weiss W et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis 2000, 21, 1037-1053.
- [11] Rabillioud T. Proteome Research: Two-dimensional Electrophoresis and identification Methods, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2000.
- [12] GE Healthcare, NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, Instructions 71-5000-14 AC 03/2006
- [13] Roche, Carcinoembryonales Antigen, Elecsys 1010/2010 und Modular Analytics E170, 2006-09, V 13 Detusch
- [14] Pierce, CarboLink[™] Coupling Gel, Introduction 0069.2/2005
- [15] Berg JM, Tymocslo JL, Stryer L. Biochemie 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

- [16] Bjorck L, Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgGbinding reagent. Journal of Immunology. 1984. 133(2).
- [17] Akerstrom B. Definition of IgG- and albumin-binding regions of streptococcal protein G. J.Biol. Chem. 1987, 262(28):13388-91.
- [18] Kronvall G, Williams. Differences in antiprotein A activity among IgG subgroups. J. Immunol. 1969. 103(4): 828-33.
- [19] Surolia A, Pain D, Khan MI. Protein A: Nature's universal antibody. Trends in Biochem. Sci. 1982. 7, 74-76.
- [20] Fahnestock S. Cloned streptococcal protein G genes. Trends in Biochem. Sci. 1987. 5:79-83.
- [21] Pierce Biotechnology. Slide-A-Lyzer[®] Dialysis Cassettes, 7/2006.
- [23] Van der Linden, de Geus B, Wil Stok, Wil Bos, van Wassenaar D, Verrips T, Frenken L. Induction of immune response and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. Journal of Immunol 2000. 240:185-195.
- [24] Davies J, Riechmann L, Muyldermans S. Single antibody domain as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelised, human VH domains with improved protein stabilitiy. Protein Eng. 1996. 9: 531-537.
- [25] Daley L P, Gagliardo L F, Duffy M S, Smith M C, Appelton J A. Application of Moonclonal Antibodies in Functional and Comparative Investigations of Heavy-Chain Immunoglobulins in New Word Camelids. 2005. 3:380-386.
- [26] Nguyen V K, Muyldermans S, Hamers R. The specific variable domain of camelid heavy-chain antibodies is encoded in the germline. J. Mol. Biol. 1998. 275:413-418.
- [27] Nguyen V K, Muyldermans S, Wyns L, Hamers R. Camel heavy- chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanism enlarge the antigen-repertoire. EMBO J. 2000. 19:921-930.
- [28] Vu K B, Ghahroudi M A, Wyns L, Muyldermans S. Comparision of Ilama VH sequences from conventional and heavy-chain antibodies. Mol. Immunol. 1997. 34: 1121-1131.
- [29] Conrath K, Werenery U, Muyldermans S, Nguyen V K. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. Dev. Comp. Immunol. 2003, 27:87-103.
- [30] Desmyter A, Decanniere K, Muyldermans S, Wyns L. Antigen specifity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. J. Biol. Chem. 2001. 276: 26285-26290.
- [31] Spinelli S L, Frenken G, Hermans P, Verrips T, Brown K, Tegnoli M, Cambillau C. Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. Biochemistry. 2000 Feb 15;39(6):1217-22

- [32] Van der Linden, de Geus, Frenken, Peters, Verrips. Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution. J. Biotechnol. 2000. 80:261-270.
- [33] Cortez-Tetamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh G, Bobert M, Conrath K, Muyldermans S.
 Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camel. J. Cancer. 2002.
 98:456-462.
- [34] Orthner CL, Highsmith F A, Tharakan J, Madurawe R D, Morcol T, Velander WH. Comparison of the performance of immunosorbents prepared by site-directed or random coupling of monoclonal antibodies. J Chromatogr. 1991 Sep 27;558(1):55-70.
- [35] Yarmush M L, Weiss A M, Antonsen K P, Odde D J, Yarmush D M. Immunoaffinity purification:basic principles and operational considerations. Biotech Adv. 1992. 10:413-446.
- [36] Wimalasena R L, Wilson G S. Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments. J Chromatogr. 1991. 572:85 – 102.
- [37] Leah J M, Billett E, Palmer T. Purification of ornithine aminotransferase by immuneadsorption. Anal. Biochem. 1988. 170, 495 – 501.
- [38] Beauchemin N, Draber P, Dreksler D. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. Exp Cell Res. 1999. 252(2).
- [39] Garvey J S, Cremer N E, Sussdorf D H. Methods in Immunology; A. Benjamin, Inc.: Reading, Massachusetts. 1977.
- [40] Tanaka S. Monoclonal antibodies: application of B cell hybridomas to biochemical research. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 1981 Jul;26(8):965-76.
- [41] Kay B K, Winter J, McCafferty J. Phage Display of Peptides and Proteins; Academic Press: New York. 1996.
- [42] Joosten V, Lokman C, Van Den Hondel CA, Punt PJ. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. Microb Cell Fact. 2003 Jan 30;2(1):1.
- [43] McPherson M J, Hames B D, Taylor G R. PCR: A practical Approach. Oxford University Press, New York. 1991.
- [44] Desmyter, Spinelli, Payan, Lauwereys, Wyns, Muyldermans, Cambillau. Three Camelid VHH
 Domains in Complex with Porcine Pancreatic-Amylase. J Mol Biol. 2002. 277, No. 26, pp. 23645–23650.
- [45] Pharmakognosie Phytopharmazie, 8 überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer
 Berlin Heidelberg, 11. Dezember 2006

- [46] Bordes M, Michiels R, Martin F. Detection by immunofluorescence of carcinoembryonic antigen in colonie carcinoma, other malignant or benign tumors, and noncancerous tissues. Digestion. 1973. 9: 106-115.
- [47] Fritsche R, Mach J P. Isolation and characterization of carcinoem bryonic antigen (CEA) extracted from normal colon mucosa. Immunochemistry. 1977. 14: 119-127.
- [48] Oikawa S, Nakazato H, Kosaki G. Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA)
 deduced from cDNA sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. 142: 511-518.
- [49] Shively J E, Beatty J D. CEA-related antigens: molecular biology and clinical significance. CRCCrii. Rev. Oncol. Hematol 1985 2: 355-399.
- [50] Paxton R J, Mooser G, Pande H, Lee T D, Shively J E. Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 1987. 84: 920-924.
- [51] Yamashita K, Totani K, Kuroki M, Matsuoka Y, Ueda I, Kobata A. Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. Cancer Res 1987. 47: 3451-3459.
- [52] Baumstark J S. Guidelines for the preparative fractionation of human serum proteins on gradient-eluted columns of concanavalin A-sepharose: elution positions of fourteen wellcharacterized proteins and evidence for concanavalin A-reactive albumin-IgA and -IgG complexes. Prep. Biochem. 1983;13(4):315-45
- [53] Mehta A I, Ross S, Lowenthal M S, Fusaro V. Biomarker amplification by serum carrier protein binding. Dis. Markers. 2003, 19, 1–10.
- [54] Liotta L A, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: Written in blood. Nature 2003, 425, 905.
- [55] Lowenthal M S, Mehta A I, Frogale K, Bandle R W. Analysis of Albumin-Associated Peptides and Proteins from Ovarian Cancer Patients. Clin. Chem. 2005, 51, 1933–1945.
- [56] Gundry R L, Fu Q, Jelinek C A, Van Eyk J E, Cotter R J. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. Proteomics Clin. Appl. 2007, 1, 73–88.
- [57] Silva J C, Gorenstein M V, Li G Z, Vissers J P. Absolute Quantification of Proteins by LCMS^E.
 Mol. Cell. Proteomics 2006, 5, 144–156.
- [58] Qian W J, Jacobs J M, Camp D G II, Monroe M E. Comparative proteome analyses of human plasma following in vivo lipopolysaccharide administration using multidimensional separations coupled with tandem mass spectrometry. Proteomics 2005, 5, 572–584.

- [59] Anderson L, Anderson N G. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects, Molecular & Cellular Proteomics, 1:845–867, 2002.
- [60] Mehta A I, Ross S, Lowenthal M S, Fusaro. Biomarker amplification by serum carrier protein binding. Dis.Markers 2003–2004, 19, 1–10
- [61] Ong S E, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. Nat. Chem. Biol. 2005, 1, 252–262
- [62] Weston A D, Hood. Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. J. Proteome Res. 2004, 3, 179–196
- [63] Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics 2002, 2, 3–10
- [64] Trape J, Molina R, Sant F. Clinical evaluation of the simultaneous determination of tumor markers in fluid and serum and their ratio in the differential diagnosis of serous effusions. Tumour Biol. 2004, 25, 276–281.
- [65] Tirumalai R S, Chan K C, Prieto D A, Issaq H J. Characterization of the Low Molecular Weight
 Human Serum Proteome. Mol. Cell. Proteomics 2003, 2, 1096–1103
- [66] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 2003, 422, 198–207
- [67] Yates J R III. Mass spectral analysis in proteomics. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2004, 33, 297–316.
- [68] Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. Annu. Rev. Biochem. 2003, 72, 783–812
- [69] Omenn G S, States D J, Adamski M, Blackwell T W. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. Proteomics 2005, 5, 3226–3245.
- [70] Tammen H, Schulte I, Hess R, Menzel C. Peptidomic analysis of human blood specimens:
 Comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display.
 Proteomics 2005, 5, 3414–3422.
- [71] Misek D E, Kuick R, Wang H, Galchev V A wide range of protein isoforms in serum and plasma uncovered by a quantitative intact protein analysis system. Proteomics 2005, 5, 3343-3352
- [72] Kim J Y, Lee J H, Park G W, Cho K. Utility of electrophoretically derived protein mass estimates as additional constraints in proteome analysis of human serum based on MS/MS analysis. Proteomics 2005, 5, 3376–3385

- [73] Rai A J, Stemmer P M, Zhang Z, Adam B L. Analysis of Human Proteome Organization Plasma Proteome Project (HUPO PPP) reference specimens using surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight (SELDI-TOF) mass spectrometry: Multi-institution correlation of spectra and identification of biomarkers. Proteomics 2005, 5, 3467–3474
- [74] Thadikkaran L, Siegenthaler M A, Crettaz D, Queloz P A. Recent advances in blood-related proteomics. Proteomics 2005, 5, 3019–3034
- Shimizu K, Katoh H, Yamashita F, Tanaka M, Tanikawa K, Taketa K, Satomura S, Matsuura S.
 Comparison of carbohydrate structures of serum alphafetoprotein by sequential glycosidase digestion and lectin affinity electrophoresis. Clin. Chim. Acta. 1996. 254, 23–40.
- [76] Okuyama, N. et al. Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation.
 Int. J. Cancer. 2006. 118, 2803–2808.
- [77] Thompson, Cantwell S, Cornell B M, Turner A. Abnormally-fucosylated haptoglobin: a cancer marker for tumor burden but not gross liver metastasis. Br. J. Cancer. 1991. 64, 386–390.
- [78] van Dijk, Havenaar, Brinkman-van der Linden. Alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid):
 pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function. Glycoconj. J. 1995. 12, 227–233.
- [79] Thompson, Guthrie S, Turner G A. Fucosylated forms of alpha-1-antitrypsin that predict unresponsiveness to chemotherapy in ovarian cancer. Br. J. Cancer. 1988. 58, 589–593.
- [80] Hanisch, Hanski F G, Hasegawa A. Sialyl Lewis(x) antigen as defined by monoclonal antibody
 AM-3 is a marker of dysplasia in the colonic adenomacarcinoma sequence. Cancer Res. 1992.
 52, 3138–3144.
- [81] Bertozzi D H. Glycans in cancer and inflammation–potential for therapeutics and diagnostics.Nat. Rev. Drug Discov. 2005. 4, 477–488.
- [82] Gold P, Freedman S O: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. JExp Med. 1965, 122:467-481.
- [83] Kuespert K, Pils S, Hauck C. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. Current Opinion in Cell Biology. 2006. 18:565–571.
- [84] Anderson, Polanski N L, Pieper M, Gatlin R. A Nonredundant List Developed by Combination of Four Separate Sources. Mol. Cell. Proteomics. 2004, 3, 311-326
- [85] Rüdiger H, Gabius H J. Lectinologie- Geschichte, Konzepte und pharmazeutische Bedeutung.
 Deutsche Apotheker Zeitung Stuttgart. 1993. Ztg 133: 2371-2381
- [86] Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. Annu Rev Biochem. 1982.51: 531-54

- [87] Brand J, Haslberger T, Zolg W, Pestlin G, Palme S. Depletion efficiency and recovery of trace markers from a multiparameter immunodepletion column. Proteomics. 2006. 6, 3236–3242.
- [88] Gygi S P, Rist B, Gerber S A, Turecek F, Gelb M H, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nat. Biotechnol. 1999, 17, 994– 999.
- [89] Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006, 7, 952–958.
- [90] Goshe M B, Smith R D. Stable Isotope-coded Proteomic Mass Spectrometry. Curr. Opin. Biotechnol. 2003, 14, 101–109.
- [91] Kota U, Goshe M B. Characterizing Proteins and Proteomes Using Isotope-Coded Mass Spectrometry in Spectral Techniques in Proteomics; Daniel, S Ed.; Sem. CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2007, pp 255-285.
- [92] Ong S E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen D B, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. Mol. Cell. Proteomics 2002, 1, 376–386.
- [93] Ross R L, Huang Y N, Marchese J N, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin D J. Multiplex protein quantification in Saccharomyces cerevisiae using aminereactive isobaric tagging reagents. Mol. Cell. Proteomics 2004, 3, 1154–1169.
- [94] Chakraborty A B, Berger S J, Gebler J C. Use of an integrated MS: multiplexed MS/MS data acquisition strategy for highcoverage peptide mapping studies. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007, 21, 730–744.
- [95] Silva J, Denny R, Dorschel C, Gorenstein M, Kass I, Li G-Z, McKenna T, Nold M, Richardson K,
 Young P, Geromanos S J. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time
 pairs. Anal. Chem. 2005, 77, 2187–2200
- [96] Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D. et al. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. Proteomics 2003, 3, 1980–1987.
- [97] Bjorhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. Proteomics 2005, 5, 307–317.

- [98] Peters T. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, Academic Press, San Diego 1996.
- [99] Milburn J, Jessup I, Thomas P: Carcinoembryonic antigen: Function in metastasis by human colorectal, Carcinoma, Cancer and Metastasis Reviews 8: 26.3-280. 1989.
- [100] Diamandis E. (1998) Prostate-specific antigen: its usefulness in clinical medicine. Trends Endocrinol. Metab. 9, 310–316
- [101] Prakash S, Robbins P W. (2000) Glycotyping of prostate specific antigen. Glycobiology 10, 173–176
- [102] Ohyama C, Hosono M, Nitta K, Oh-eda M, Yoshikawa K, Habuchi T, Arai Y, Fukuda M. (2004) Carbohydrate structure and differential binding of prostate specific antigen to Maackia amurensis lectin between prostate cancer and benign prostate hypertrophy. Glycobiology 14, 671–679
- [103] Tabares G, Radcliffe C M, Barrabes S, Ramirez M, Aleixandre R N, Hoesel W, Dwek R A, Rudd P M, Peracaula R, de Llorens R. (2006) Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA. Glycobiology 16, 132–145
- [104] Goldstein IJ, Hayes CE (1978) The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35: 127-340
- [105] Brockhausen I. Mucin-type O-Glycans in human colon and breast cancer: glycodyynamics and function, EMBO. 2006. Vol7, No 6 599-604
- [106] Gallegher J T, Morris A, Dexter T M. Identification of two binding sites for wheat-germ agglutinin onpolylactosamine-type oligosaccharides, Biochem. J. 1985. 231, 115-122
- [107] Ziping Yang, William S. Hancock. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column, Journal of Chromatography. 2004. A, 1053. 79–88
- [108] Allen A K, Neuberger A, Sharon N. The Purification, Composition and Specificity of Wheat-Germ Agglutinin. Biochem. J. 1973. 131, 155-162
- [109] Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. J. Eur. J. Biochem. 1981. 117, 41-55
- [110] Bhavanandan, Katlic V P, Banks A W, Kemper J, Davidson E A. Partial characterization of sialoglycopeptides produced by cultured human melanoma cells and melanocytes. Biochemistry. 1981. 20, 5586-5594
- [111] Lundblad R L. Considerations for the Use of Blood Plasma and Serum for Proteomic Analysis.Internet J. Gastroenterol. 2005, 1, No. 2.

- [112] Huang H L, Stasyk T, Morandell S, Mogg M. Enrichment of low-abundant serum proteins by albumin/immunoglobulin G immunoaffinity depletion under partly denaturing conditions. Electrophoresis 2005, 26, 2843–2849
- [113] Julka S, Regnier F J. Quantification in Proteomics through Stable Isotope Coding: A Review.Proteome Res. 2004, 3, 350–363.
- [114] Hu S, Loo J A Wong, D. T. Human body fluid proteome analysis. Proteomics 2006, 6, 6326– 6353.
- [115] Ludwig J A, Weinstein J N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nat. Rev. Cancer 2005, 5, 845–856.
- [116] Ahn S, Simpson R, Thongbookerd V. Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods, and Applications, Humana Press, Totowa. 2007, pp. 3–30.
- [117] Golub T R, Slonim D K, Tamayo P, Huard C. Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. Science 1999, 286, 531–537.
- [118] Lilley K S, Friedman D B. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2Dgel proteomics. Expert Rev. Proteomics. 2004, 1, 401–409.
- [119] Unlu M, Morgan M E, Minden J S. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis 1997, 18, 2071–2077.
- [120] Old W M, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce K G. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. Mol. Cell. Proteomics 2005, 4, 1487– 1502.
- [121] Bateman, Castro-Perez, Wrona, Shockcor, Yu, Oballa, Deborah, Nicoll-Griffith. MS^E with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21: 1485–1496
- [122] Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels, Proteomics Clinical Applications, Vol 5 Issue 1: 4-15, 2004
- [123] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics, Nature, Vol. 422, 2003
- [124] Buch: Drickamer K, Taylor M. Introduction into Glycobiology, Oxford University Press, 2006
- [125] Köttgen E. Lectine und ihre Zuckerliganden, Med Klein. 2003; 98:717–38 (Nr. 12)
- [126] van Kooyk Y, Rabinovich G A. Proteinglycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses, Nature Immunology. 2008. Vol 9.
- [127] Haab, B. B Geierstanger, B. H Michailidis, G Vitzthum, F. et al. Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. Proteomics 2005, 5, 3278–3291

- [128] Adkins J N, Varnum S M, Auberry K J, Moore R J. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. Mol. Cell. Proteomics 2002, 1, 947–955.
- [129] Morris D L Jr, Sutton J N, Harper R G, Timperman A T J. Reversed-Phase HPLC Separation of Human Serum Employing a Novel Saw-Tooth Gradient: Toward Multidimensional Proteome Analysis. Proteome Res. 2004, 3, 1149–1154.
- [130] Fujii K, Nakano T, Kawamura T, Usui F. Multidimensional Protein Profiling Technology and Its Application to Human Plasma Proteome. J. Proteome Res. 2004, 3, 712–718.
- [131] Shen Y, Jacobs J M, Camp D G II, Fang R. Ultra-high-efficiency strong cation exchange LC/RPLC/MS/MS for high dynamic range characterization of the human plasma proteome. Anal. Chem.2004, 76, 1134–1144.
- [132] He P, He H Z, Dai J, Wang Y. The human plasma proteome: Analysis of Chinese serum using shotgun strategy. Proteomics 2005, 5, 3442–3453.
- [133] Martosella J, Zolotarjova N, Liu H, Nicol G. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic prefractionation of immunodepleted human serum proteins to enhance mass spectrometry identification of lower-abundant proteins. J. Proteome Res. 2005, 5, 1522-1537.
- [134] Horn A, Kreusch S, Bublitz R, Hoppe H. Multidimensional proteomics of human serum using parallel chromatography of native constituents and microplate technology. Proteomics 2006, 6, 559–570.
- [135] Tang H Y, Ali-Khan N, Echan L A, Levenkova N. A novel four-dimensional strategy combining protein and peptide separation methods enables detection of low-abundance proteins in human plasma and serum proteomes. Proteomics 2005, 5, 3329–3342.
- [136] Pieper R, Gatlin C L, Makusky A J, Russo P S. The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. Proteomics 2003, 3, 1345–1364.
- [137] Qin S, Ferdinand A S, Richie J P, O'Leary M P. Chromatofocusing fractionation and twodimensional difference gel electrophoresis for low abundance serum proteins. Proteomics 2005, 5, 3183-3192.
- [138] Wasinger V C, Locke V L, Raftery M J, Larance M. Two-dimensional liquid chromategraphy/tandem mass spectrometry analysis of Gradiflow fractionated native human plasma. Proteomics 2005, 5, 3397–401.
- [139] Cho S Y, Lee E Y, Lee J S, Kim H Y. et al Efficient prefractionation of low-abundance proteins in human plasma and construction of a two-dimensional map. Proteomics 2005, 5, 3386– 3396.

- [140] Sheng S, Chen D, Van Eyk J E. Multidimensional liquid chromatography separation of intact proteins by chromatographic focusing and reversed phase of the human serum proteome: optimization and protein database. Mol. Cell. Proteomics 2006, 5, 26–34.
- [141] Pierce, Seize X Protein G Immunoprecipitation Kit, Introduction 0936.4, 10/2005.
- [142] Schrattenholz A. Methoden der Proteomforschung. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. 2001. ISBN 3-8274-1153-X.
- [143] Wang Y, Wu S L, Hancock W S. Approaches to the study of N-linked glycoproteins in human plasma using lectin affinity chromatography and nano-HPLC coupled to electrospray linear ion trap-Fourier transform mass spectrometry. Glycobiology vol. 16 no. 6 pp. 514–523, 2006
- [144] Jung K, Cho W, Regnier F E. Glycoproteomics of plasma based on narrow selectivity lectin affinity chromatography. J Proteome Res. 2009 Feb;8(2):643-50.
- [145] Liu T, Qian WJ, Gritsenko M A, Camp DG 2nd, Monroe M E, Moore R J, Smith R D. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. J Proteome Res. 2005 Nov-Dec;4(6):2070-80
- [146] Kullolli M, Hancock W S, Hincapie M. Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HP-M-LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins. J Sep Sci. 2008 Aug;31(14):2733-9.
- [147] Turková J. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications Volume 722, Issues 1-2, 5 February 1999, Pages 11-31
- [148] Nisnevitch M, Firer M A. The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment. Journal of Biochemical and Biophysical Methods Volume 49, Issues 1-3, 30 October 2001, Pages 467-480.
- [149] Srivatsa V, Rao, Kimberly W, Anderson, Leonidas G, Bachas. Oriented immobilization of proteins. Microchimica Acta, Verlag Springer Wien. September 1998. Volume 128, 3-4.
- [150] Jessup JM, Thomas P. Carcinoembryonic antigen: function in metastasis by human colorectal carcinoma. Cancer Metastasis Rev. 1989 Dec;8(3):263-80
- [151] Tsumoto K, Ejima D, Senczuk AM, Kita Y, Arakawa T. Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. J Pharm Sci. 2007 Jul; 96(7):1677-90.
- [152] Ohkura T, Hada T, Higashino K, Ohue T, Kochibe N, Koide N, Yamashita K. Increase of Fucosylated Serum Cholinesterase in Relation to High Risk Groups for Hepatocellular Carcinomas. Cancer Research 54, 55-61, January 1, 19941

- [153] Cai S, Davis AE 3rd. Complement regulatory protein C1 inhibitor binds to selectins and interferes with endothelial-leukocyte adhesion. J Immunol. 2003 Nov 1;171(9):4786-91
- [154] Anderson L, Hunter CL. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. Mol Cell Proteomics. 2006 Apr;5(4):573-88. Epub 2005 Dec 6.
- [155] Tietz, N. W. 1995. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests. W. B. Saunders, Philadelphia.
- [156] Kirschfink M, Nurnberger W. 1999. C1 inhibitor in anti-inflammatory therapy: from animal experiment to clinical application. Mol. Immunol. 36:225.
- [157] Cai S, Dole V S, Bergmeier W, Scafidi J, Feng H, Wagner D D, Davis AE 3rd. A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. J Immunol. 2005 May 15;174(10):6462-6.
- [158] Yang X, Lazar I M. MRM screening/biomarker discovery with linear ion trap MS: a library of human cancer-specific peptides. BMC Cancer. 2009 Mar 27;9:96.
- [159] Hwang PK, Greer J. Interaction between hemoglobin subunits in the haemoglobinhaptoglobin complex. J Biol Chem. 1980 Apr 10;255(7):3038-41.
- [160] Lohninger H, Fröhlich J, Mizaikoff B, Rosenberg E. Teach/Me Instrumentelle Analytik. 2003,
 CD-ROM. ISBN: 978-3-540-14957-6
- [161] Liang X, Huuskonen J, Hajivandi M, Manzanedo R, Predki P, Amshey J R, Pope M. Identificitation and quantification of proteins differentially secreted by a pair of normal and malignant breast-cancer cell lines. J Proteomics. 2009, 9, 182-193.
- [162] Odening K E, Li W, Rutz R, Laufs S, Fruehauf S, Fishelson Z, Kirschfink M. Enhanced complement resistence in drug-selected P-glycoprotein expressing multi-drug-resistant ovarian carcinoma cells. Clinical & Experimental Immunology. 2008, 155: 239-248.
- [163] Vinci, G., N. J. Lynch, C. Duponchel, T. M. Lebastard, G. Milon, C. Stover, W. Schwaeble, and
 M. Tosi. In vivo biosynthesis of endogenous and of human C1 inhibitor in transgenic mice: tissue distribution and colocalization of their expression. J. Immunol. 2002, 169:5948.
- [164] Johnson AM., Alper CA, Rosen FS, Craig JM. C1 inhibitor: evidence for decreased hepatic synthesis in hereditary angioneurotic edema. Science. 1997, 173:553.
- [165] Davis A E III, Cai S, Liu D. C1 inhibitor: Biological activities that are independent of protease inhibition. J Immunology. 2007, 212: 313-323.
- [166] Sarandaku A, Protonotariou E, Rizos D. Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy. Crit Rev Clin Lab Sci. 2007;44(2):151-78.
- [167] Pieper R, Gatlin CL, Makusky AJ, Russo PS, Schatz CR, Miller SS, Su Q, McGrath AM, Estock MA, Parmar PP, Zhao M, Huang ST, Zhou J, Wang F, Esquer-Blasco R, Anderson NL, Taylor J, Steiner S. The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. Proteomics 2003;3:1345–1364.
- [168] Pieper R, Su Q, Gatlin CL, Huang ST, Anderson NL, Steiner S. Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. Proteomics. 2003 Apr;3(4):422-32.
- [169] Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, Springer DL, Pounds JG.
 Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. Mol Cell Proteomics. 2002 Dec;1(12):947-55.
- [170] Zhang H, Li XJ, Martin DB, Aebersold R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. Nat Biotechnol. 2003 Jun;21(6):660-6. Epub 2003 May 18.
- [171] Luong JH, Scouten WH. Affinity purification of natural ligands. Curr Protoc Protein Sci. 2008 May; Chapter 9:Unit 9.3.
- [172] Bonifacino JS, Dell'Angelica EC, Springer TA. Immunoprecipitation. Curr Protoc Neurosci.2006 May;Chapter 5:Unit 5.24.
- [173] Wagener C, Hain F, Födisch HJ, Breuer H. Localisation of carcinoembryonic antigen in embryonic and fetal human tissues. Histochemistry. 1983;78(1):1-9.
- [174] Leusch HG, Drzeniek Z, Hefta SA, Markos-Pusztai Z, Wagener C. The putative role of members of the CEA-gene family (CEA, NCA an BGP) as ligands for the bacterial colonization of different human epithelial tissues. Zentralbl Bakteriol. 1991 Apr;275(1):118-22.
- [175] Wagener C, Hain F, Breuer H, Olude S, Cremer H, Müller-Wallraf R. Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen in normal, transitional and inflamed colonic mucosa. Oncodev Biol Med. 1981;2(5):331-43.
- [176] Metze D, Grunert F, Neumaier M, Bhardwaj R, Amann U, Wagener C, Luger TA. Neoplasms with sweat gland differentiation express various glycoproteins of the carcinoembryonic antigen (CEA) family. J Cutan Pathol. 1996 Feb;23(1):1-11.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Referenzintervall von 70 analysierten Plasmaproteinen.	7
Abb. 1.2:	Protein-Glykosylierung und ihre Änderung bei Brust- und Kolon-Tumorzellen1	4
Abb. 1.3:	Konventionelle Antikörper versus Cameliden-Schwerketten-Antikörper1	8
Abb. 1.4:	Nachweis von diagnostisch relevanten gering-konzentrierten Glykoproteine in humanem Plasma	0
Abb. 2.1:	Trennung von Ionen über einen Quadrupol-Massenanalysator4	2
Abb. 2.2:	Trennung von Ionen über einen Flugzeit-Massenanalysator mit eingebautem Reflekton4	3
Abb. 3.1:	Chromatogramm einer WGA-Lektinfraktionierung vom humanen Plasma4	7
Abb. 3.2:	Spezifität des Con A- und des WGA-Lektins4	8
Abb. 3.3:	SDS-Gel der WGA-gebundenen Proteinfraktion4	9
Abb. 3.4:	MS/MS-Spektrum des Proteins α_2 -Macroglobulin der WGA-Lektinfraktion5	0
Abb. 3.5:	Ergebnis der Datenbanksuche für das $lpha_2$ -Macroglobulin5	0
Abb. 3.6:	Chromatogramm der mittels der LC-MS detektierbaren Peptide der WGA-Lektin-	
	gebundenen Proteinfraktion5	1
Abb. 3.7:	Vergleich der Anzahl der mittels LC-MS identifizierten Proteine im Plasma und in der WGA-gebundenen Proteinfraktion5	4
Abb. 3.8:	Lama-Antiserum-Titer5	5
Abb. 3.9:	Isolierung von verschiedenen clgG-Subklassen5	6
Abb. 3.10:	Vergleich der Antigenspezifität der clgG-Subklassen5	8
Abb. 3.11:	Zweidimensionale Proteinanalyse der WGA-gebundenen Glykoproteinfraktion6	0
Abb. 3.12:	Antikörper-Protein-Bindung in Lösung6	1
Abb. 3.13:	Bindungseffektivität der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus Normalplasma an das Immunabsorbens6	6
Abb. 3.14:	Überprüfung der Spezifität des Immunabsorbens6	7

Abb. 3.15:	Chromatogramm der WGA-Affinitäts-Chromatographie
Abb. 3.16:	Chromatogramm der Grössen-Ausschluß-Chromatographie70
Abb. 3.17:	Chromatogramm der Immun-Affinitäts-Chromatographie72
Abb. 3.18:	Aufkonzentrierung der nicht-gebundenen Antikörperfraktion der IACII und Umpufferung des Proteingemisches in einer 50 mM NH ₄ HCO ₃ -Lösung
Abb. 3.19:	Schnittmenge der mittels LC-MS identifizierten Proteine in den Proteinproben76
Abb. 3.20:	Prozentualer Verlauf der CEA-Menge und der Gesamtproteinmenge im auf- gearbeiteten Plasma
Abb. 3.21:	Abdeckung der Sequenz des CEAs durch identifizierte Peptide83
Abb. 3.22:	Abdeckung der Sequenz durch identifizierte Peptide
Abb. 3.23:	Schnittmenge der mittels LC-MS identifizierten Proteine im Durchlauf der IAC

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Sammel- und Trenngel-Zusammensetzung	23
Tab. 2.2:	Schema für die Proteinimmunisierungen und Blutprobeentnahmen	26
Tab. 2.3 :	Spannungsprofil der IEF	40
Tab. 2.4:	Spannungsprofil der SDS-PAGE.	40
Tab. 3.1:	Mittels LC-MS ^E identifizierte und quantifizierte Proteine in der WGA-gebunden- en Proteinfraktion.	52
Tab. 3.2:	Relativer prozentualer Anteil der verschiedenen clgG-Subklassen am Gesamt-	. 58
Tab. 3.3:	Immobilisierungseffizienz der eingesetzten Matrizen	62
Tab. 3.4:	Bindungskapazität der Antikörper-Matrizen	63
Tab. 3.5:	Bindungskapazität der Immun-Affinitäts-Säulen in verschiedenen Puffer- lösungen	64
Tab. 3.6:	Abhängigkeit der Proteinbindung von Inkubations-Temperatur und -Zeit	65
Tab. 3.7:	Aufarbeitung des CEA-versetzen Plasmas über die WGA-Affinitäts-Chromato- graphie	68
Tab. 3.8:	Umpufferung der WGA-gebundenen Proteinfraktion in PBS	69
Tab. 3.9:	Immun-Affinitäts-Chromatographie der WGA-gebundenen Proteinfraktion aus CEA-versetztem Normalplasma	71
Tab. 3.10:	Aufkonzentrierung und Umpufferung der Proteinprobe nach der zweiten IAC in 50 mM NH₄HCO₃	73
Tab. 3.11:	Durch die LC-MS ^E -Massenspektrometrie identifizierte und quantifizierte Proteine des aufgearbeiteten, CEA-versetzten Plasmas	75
Tab. 3.12:	Aufarbeitung von 4 690 ng CEA in 900 μ l Plasma eines Kolonkarzinompatienten	78

Tab. 3.13:	Aufarbeitung von 3 786 ng CEA in 850 μ l Plasma eines Kolonkarzinompatienten	80
Tab. 3.14:	Mittels der MS ^E -Massenspektrometrie identifizierte Proteine des aufgearbeitet-	
	en Patientenplasmas (A)	. 82
Tab. 3.15:	Mittels der MS ^E -Massenspektrometrie identifizierte Proteine des aufgearbeitet-	
	en Patientenplasmas (B)	. 85

Tab. 10.1:	Mittels LC-MS ^L identifizierte Proteine im unfraktioniertem Plasma	41

10 Anhang

Tab. 10.1: Mittels LC-MS^E identifizierte Proteine im unfraktioniertem Plasma.

Rang	Identifiziertes Protein
1	Serum Albumin
2	Serotransferrin (Transferrin)
3	Complement C3
4	Complement C4-A
5	Complement C4-B
6	lg Gamma-1 Kette C Region
7	Haptoglobin
8	Apolipoprotein A-I
9	Hemopexin (Beta-1B-Glykoprotein)
10	Fibrinogen Beta Kette
11	Fibrinogen Gamma Kette
12	Fibrinogen Alpha Kette
13	Ceruloplasmin (Ferroxidase)
14	Complement factor H
15	Pregnancy-zone Protein
16	Ig Kappa Kette C Region
17	Ig Gamma-2 Kette C Region
18	Alpha-1-saures Glykoprotein 1 (Orosomucoid-1)
19	Vitamin D-binding protein
20	Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor schwere Kette H4
21	Ig Gamma-4 Kette C Region
22	Haptoglobin-verwandtes Protein
23	Complement factor B
24	Ig Alpha-1 Kette C Region
25	Ig Lambda Kette C Regions
26	Plasminogen
27	Alpha-1-Antichymotrypsin
28	Beta-2-Glykoprotein 1 (Apolipoprotein H)
29	Alpha-1-Antitrypsin (Alpha-1 Protease Inhibitor)
30	Alpha-1B-Glykoprotein (Alpha-1-B Glykoprotein)
31	Ig Gamma-3 Kette C Region
32	Complement Komponente C6
33	Protein cTAGE-6
34	Ig Alpha-2 Kette C Region

35	Leukotriene A-4 Hydrolase
36	Clusterin (Apolipoprotein J)
37	Protein Regulator der Cytokinese 1
38	Integrin alpha-M (Zelloberflächen Glykoprotein MAC-1 Alpha Untereinheit)
39	Alpha-2-HS-Glykoprotein (Fetuin-A)
40	Prothrombin
41	lg Mu schwere Kette Kranheitsprotein
42	Ig Kappa Kette V-III Region WOL
43	Alpha-2-Macroglobulin (Alpha-2-M)
44	Caspase-4
45	Apolipoprotein C-III (Apo-CIII)
46	Ig Kappa Kette V-III Region SIE
47	Alpha-1-saures Glykoprotein 2 (Orosomucoid-2)
48	lg Mu Kette C Region
49	Apolipoprotein E (Apo-E)
50	Ig Kappa Kette V-III Region GOL (Rheumatoid Faktor)
51	lg Kappa Kette V-III Region Ti
52	Alpha-2-Antiplasmin
53	Serum Amyloid A protein
54	PRAME family member 2
55	Angiotensinogen
56	Stathmin-2
57	Ig Kappa Kette V-II Region TEW
58	Hemoglobin Untereinheit Beta
59	lg Kappa Kette V-II Region GM607

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. C. Wagener, Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Zentrallaboratorien, für die Bereitstellung und außerordentlich gute Betreuung sowie seiner unermüdlichen Diskussionsbereitschaft, die zum konstruktiven Austausch von Gedanken und Ergebnissen führte. Ich danke ihm auch herzlichst für die grenzenlose Hilfsbereitschaft in privaten Angelegenheiten. Ganz besonders möchte ich ihm dafür danken, mir eine Postdoktorandenstelle angeboten zu haben. Desweiteren möchte ich ihm für die kritische Durchsicht bei der Abfassung der vorliegenden Schrift danken.

Bei Frau Dr. S. Lüthje möchte ich mich herzlich für die Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Dissertation bedanken.

Herrn Dr. F. Buck gebührt der größte Dank für seine intensive Betreuung der praktischen Arbeiten, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge. Ich danke ihm aus tiefstem Herzen, dass er immer für mich da war. Er ist der beste Betreuer, den man sich vorstellen kann und ein ganz besonderer Mensch. Vor allem möchte ich mich bei ihm herzlichst für die kritische Durchsicht der vorliegenden Schrift bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn S. Harder für die technische Unterstützung am Massenspektrometer und die freundliche Atmosphäre bei der Arbeit richten.

Ein großer Dank sei an die Mitarbeiter des Hormonenlabors im Institut für Klinische Chemie gerichtet, die für mich die CEA-Konzentrationsmessungen durchgeführt haben. Ganz besonders möchte ich mich auch bei der Tierärztin Frau Dr. Moors für die Immunisierungen und Probeentnahmen bedanken.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. H. Schlüter für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die Verfügstellung der Äkta-Anlage. Mein Dank richtet sich auch an Frau Dr. A. Horst für ihre zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge. Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle bei allen anderen Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Ganz besonders möchte ich Alexandra Samsen für die "zuckersüssen" Diskussionen und für die schönen und lustigen Momente danken. Ein besonderer Dank gilt auch Malik Khenkhar und Christoph Maßlo für die unglaublich lustige Zeit.

Zu guter Letzt, aber mit besonderer Freude möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich mit viel Liebe und vollem Enthusiasmus begleitet haben und meinen Plänen und Wünschen gegenüber immer offen waren.