Kombination von hochauflösender Biopolymer-Massenspektrometrie und Element-Massenspektrometrie in der Molekül- und Element-Proteomanalytik

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Konstanz

vorgelegt von:

J. Susanne Becker

Konstanz 2006

Alle Rechte beim Autor
und bei Prof. Dr. M. Przybylski

Dissertation der Universität Konstanz
Datum der mündlichen Prüfung: 16.03.06

Referent: Prof. Dr. M. Przybylski
Referent: Prof. Dr. G. Müller

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2002 bis Januar 2006 im Laboratorium für Analytische Chemie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Michael Przybylski im Fachbereich für Chemie der Universität Konstanz durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders:
Herrn Professor Dr. Michael Przybylski für die Überlassung der herausfordernden Thematik mit den sich hieraus ergebenden vielfältigen Möglichkeiten sowie die stete Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit;

Herrn Professor Dr. Gerhard Müller für die Übernahme des Zweitgutachtens;

Herrn Professor Dr. Gabor Juhacz und Herrn Professor Dr. Miklos Palkovits (Labor für Neuromorphologie, Institut für Anatomie, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn) für die Überlassung von Gehirnproben;

Herrn Dr. Nick Youhnovski und Herrn Dr. Eugen Damoc für ihre große Hilfsbereitschaft und die gemeinsamen Experimente;

allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für die inspirierende und kollegiale Arbeitsatmosphäre, insbesondere danke ich Cindy, Roxana, Catalina, Raluca, Marilena und Iuliana;

Frau Dr. habil. J. Sabine Becker, Herrn Dr. Sergei. F. Boulyga, Herrn Dr. Myroslav Zoriy und Frau Dr. Carola Pickhardt für die zahlreichen gemeinsamen Entwicklungsarbeiten zur ICP-MS an kleinsten Proteinmengen und zur LA-ICP-MS an Proteinspots in den 1D- und 2D-Gelen;

Herrn Dr. U. Krause-Buchholz und Herrn Professor Dr. G. Rödel (Institut für Genetik, TU Dresden) für die Überlassung von 1D- und 2D-Gelen von Mitochondrien Proteinen aus Bäckerhefe.

Inhaltsverzeichnis I

1. EINLEITUNG 1

1.1. Methoden der Proteomanalytik 1

1.2. Struktur und Funktion von Metallionen-haltigen Proteinen 4

1.3. Massenspektrometrische Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen 5

1.4. Massenspektrometrische Methoden zur quantitativen Bestimmung von P, S und gebundenen Metallionen in Proteinen 9

1.5. Tau Protein – Ein Protein zur Untersuchung der Alzheimerschen Krankheit 12

1.6. Zielsetzungen der Arbeit 14

2. ALLGEMEINER TEIL 17
2.1. Identifizierung der Phosphorylierungsstruktur des Tau Proteins mittels ESI- und MALDI-FTICR-MS 17
2.1.1. Dephosphorylierungs- und Phosphorylierungsreaktionen am Tau Protein 28
2.1.1.1. Dephosphorylierung des Tau Proteins unter Verwendung verschiedener Phosphatasen 28
2.1.1.2. Phosphorylierung von Partial-Peptiden des Tau Proteins mittels verschiedener Kinasen 36
2.1.1.2.1. Synthese und Charakterisierung von Tau Peptide 36
2.1.1.2.2. Phosphorylierung von Tau Peptiden mittels verschiedener Kinasen 47
2.2. Strukturuntersuchungen von mitochondrialen Proteinen aus Bäckerhefe 54
2.2.1. Identifizierung und Sequenzbestimmungen von mitochondrialen Proteinen 54
2.2.2. Bestimmung von mitochondrialen Proteinen mit Metallionen aus der Bäckerhefe 60
2.2.3. Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in mitochondrialen Proteinen mittels MALDI-FTICR-MS 65
2.3. Identifizierung von phosphorylierten Proteinen mit MALDI-FTICR-MS und Quantifizierung des P- und S-Gehaltes durch ICP-MS 74
2.3.1. Bestimmung von Elementkonzentration in Gemischen von Hirnproteinen 80
2.3.2. Massenspektrometrische Untersuchungen und Identifizierungen von Proteinen in humanen Gehirnproben 86
2.3.2.1. Identifizierung von Phosphat- und Metallionen-haltigen Proteinen in humanen Gehirnproben 93
2.3.2.2. Konzentrationsbestimmung von P und Metallionen in Proteinen durch Kombination von MALDI-FTICR-MS und LA-ICP-MS 106
2.4. Untersuchungen von Metallionen-haltigen Proteinen unter Verwendung von angereicherten Metallisotopen (Isotopentracer) 110
2.4.1. Analytik von Metallionen-haltigen Proteinen mit stabilen Isotopen von Cu, Zn und Fe an Gehirnproteinproben 116

2.4.2. Verwendung stabiler Isotope von ^{65}Cu und ^{67}Zn an einem Modellprotein 126

3. EXPERMENTELLER TEIL 132
3.1. Gewinnung und Trennung von Proteinen aus Gehirnproben 132
3.1.1. Proteinpräparation der Humangehirnproben 132
3.1.2. Proteinpräparation der humanen Alzheimergehirnproben 133
3.1.3. Acetonpräzipitation 133
3.2. Trennung der Proteingemische 134
3.2.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 134
3.2.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese 136
3.2.3. Färbungsmethoden für Polyacrylamidgele 138
3.2.3.1. Kolloidale Coomassiefärbung 138
3.2.3.2. Silberfärbung 139
3.2.4. Enzymatischer Abbau von Proteinen mit Trypsin 139
3.2.4.1. Tryptischer Abbau von Proteinen in Lösung 139
3.2.4.2. Tryptischer „In-Gel-Abbau“ 140
3.3. Festphasensynthese von Peptiden 141
3.3.1. Reinigung der synthetischen Peptide mittels RP-HPLC 143
3.4. Massenspektrometrische Methoden 143
3.4.1. MALDI-TOF-MS 143
3.4.1.1. Probenpräparation zur MALDI-TOF-MS 145
3.4.2. FTICR-MS 146
3.4.2.1. MALDI-FTICR-MS 147
3.4.2.2. ESI-FTICR-MS 149
3.4.2.3. FTICR-MS/MS-Analyse 154
3.4.3. Identifizierung von Proteinen durch Datenbanksuche 155
3.5. Phosphorylierungsreaktionen von synthetischen Peptiden und Dephosphorylierungsreaktionen von Tau Protein 156
3.5.1. Phosphorylierung von synthetischen Peptiden durch Kinasen 156
3.5.2. Dephosphorylierung von Tau Protein mittels Phosphatase 156
3.6. Massenspektrometrische Methoden zur Bestimmung der Elementkonzentrationen in Proteinen und Peptidgemischen 157

3.6.1. Bestimmung von Phosphor- und Metallionenkonzentrationen in Proteinen mit ICP-MS 157
3.6.2. LA-ICP-MS zur Analyse von mit P, S, Zn, Cu, Fe, Al und Si in Gelen 159
3.7. Verwendung angereicherter stabiler Isotope von Cu, Zn und Fe an Tau Protein und an Gehirnproteinproben 161
3.8. Materialien und Reagenzien 164

4. ZUSAMMENFASSUNG 166

5. LITERATUR 170

1. EINLEITUNG

1.1. Methoden der Proteomanalytik

Für die Isolierung und Identifizierung von Proteinen steht eine große Anzahl von unterschiedlichen Techniken zur Verfügung. Dazu gehören Trennverfahren für Proteingemische (z.B. Chromatographie, Elektrophorese) und Methoden zur Charakterisierung und Identifizierung der Proteine (z.B. Massenspektrometrie, Sequenzierung, NMR).[1, 2]

Die Identifizierung von Proteinen aus komplexen Proteingemischen mittels verschiedener Analysenverfahren, wie beispielsweise der Massenspektrometrie oder NMR, erfordert zuvor deren Trennung durch 1D-/2D-Gelelektrophorese oder Flüssigkeitschromatographie. Für die Trennung komplizierter Proteingemische (z.B. Proteine von Humangehirnproben) kann die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese angewandt werden. Die 2D-Gelelektrophorese erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt, der isoelektrische Fokussierung (IEF), werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt in einem pH-Gradienten getrennt. Am isoelektrischen Punkt verlieren die Proteine ihre natürliche elektrische Ladung und damit auch ihre elektrische Beweglichkeit. Im zweiten Schritt, der SDS-PAGE („sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis“), werden die Proteine nach ihrer molekularen Masse getrennt. Die experimentelle Probleme der 2D-Gelelektrophorese, wie das Herstellen und der Umgang mit Gradientengelen zur Isolierung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt, wurden in den letzten Jahren durch die Einführung der IPG-Streifen („immobilized pH gradient strips“) [3, 4] für die isoelektrische Fokussierung und durch die Weiterentwicklung der Probenaufbereitung gelöst.[5-7] Mit Hilfe der IPG-Streifen konnte die Reproduzierbarkeit der isoelektrischen Fokussierung erhöht werden. Nach der Gelelektrophorese können die Proteine durch verschiedene Färbemethoden, zum Beispiel mit kolloidaler Coomassiefärbung [8] oder mit einer für die Massenspektrometrie modifizierten Silberfärbung [9], sichtbar gemacht werden. Obwohl die 2D-Gelelektrophorese im Vergleich zur HPLC oder Kapillarelektrophorese (CE) arbeitsintensiver und zeitaufwendiger ist, hat sie sich aufgrund der hohen Auflösung

zwischen einzelnen Proteinen zur besten Trennungsmethode für komplexe Proteingemische etabliert.[10]

Zur Identifizierung und Charakterisierung der mittels 2D-Gelelektrophorese getrennten Proteine wurden massenspektrometrische Methoden mit hoher Empfindlichkeit und Auflösung entwickelt.

In Abb. 1 ist die Standardmethode bei der Proteomanalyse zur Identifizierung eines Proteinspots aus einem 2D-Gel dargestellt. Dabei wird der zu analysierende Proteinspot ausgeschnitten, tryptisch abgebaut und die resultierenden Peptide mittels MS („peptide mass fingerprint“) bzw. MS/MS („peptide sequence tagging“) analysiert. Durch eine anschließende Datenbanksuche mit den erhaltenen massenspektrometrischen Messergebnissen kann das Protein identifiziert werden.

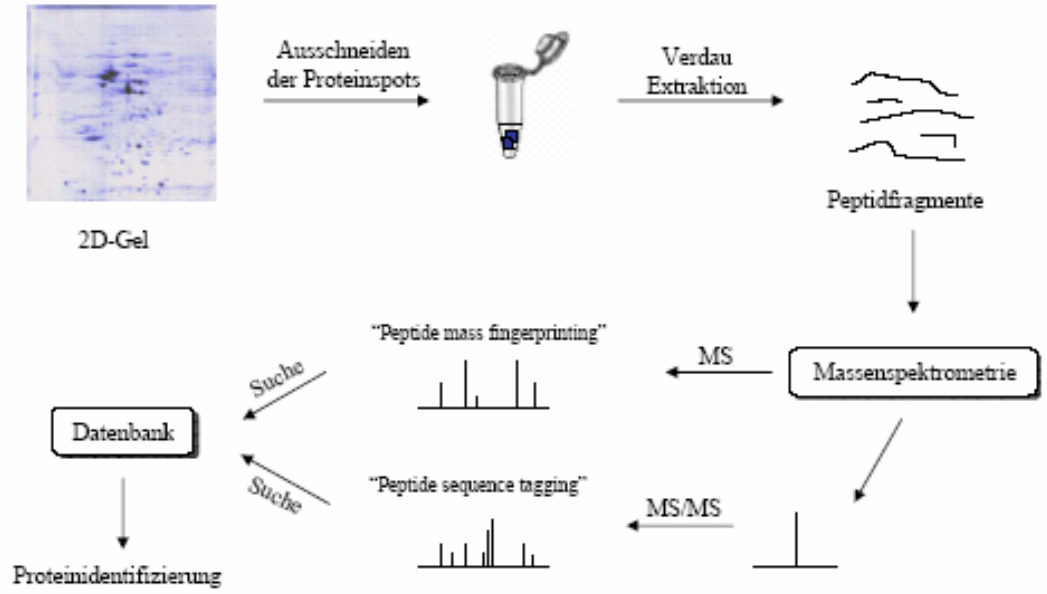


Abb. 1: Standardmethode bei der Proteomanalyse zur Identifizierung eines Proteinspots aus einem 2D-Gel; ein zu analysierender Spot wird tryptisch abgebaut und die resultierenden Peptide mittels MS („peptide mass fingerprint“) bzw. MS/MS („peptide sequence tagging“) analysiert und durch eine Datenbanksuche wird das Protein identifiziert

Für die massenspektrometrische Analyse werden die getrennten Proteine proteolytisch mittels bestimmter Enzyme (z.B. Trypsin, das die Proteine an der C-terminalen Seite von Lysin und Argenin trennen kann) abgebaut. Es gibt zwei massenspektrometrische Analysenmethoden zur Identifizierung von Proteinen: (i) das so genannte „Peptide mass fingerprinting“, bei der die molekularen Massen der im Gemisch enthaltenen Peptide analysiert werden und (ii) das so genannte „ Peptide sequence tagging“ (Aufschlüsselung der Peptidsequenz), bei dem ein bestimmtes Peptid im Massenspektrometer in eine Serie von sequenzabhängigen Produkten fragmentiert wird (Abb. 1). Ausgehend von den erstellten Massenspektren können die Proteine mit Hilfe von Datenbanken (http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe, www.expasy.org, www.matrixscience.com) identifiziert werden.[11-14]

Das „Proteom“, das prinzipiell die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder in einem Zellkompartment darstellt, steht im Gleichgewicht einer ständigen Neusynthese von Proteinen bei gleichzeitigem Abbau nicht mehr benötigter Proteine und ist deshalb nicht klar definierbar.[1, 2] Die Proteomanalytik beschäftigt sich mit der Untersuchung der Funktionen der Proteine in einer Zelle.[15] Sie umfasst aber nicht nur alle unmodifizierten Proteine in der Zelle, sondern auch alle Protein-Isoformen und Modifikationen[16, 17]. Von Interesse sind vor allem die Interaktionen der Proteine untereinander und mit Enzymen, Zuckern und anderen Modifikationen. Nach J. Klose et al. [18] kann die Proteomanalytik formal in zwei Hauptgebiete unterteilt werden: die strukturelle Proteomanalytik, die die Isolierung und Sequenzierung aller Proteine des Genoms umfasst, und die funktionale Proteomanalytik, die sich mit allen chemischen, biochemischen und biologischen Charakteristiken und den Funktionen dieser Proteine beschäftigt. Die Proteomforschung befasst sich mit der Aufklärung der molekularen Mechanismen in den zellularen Prozessen, der Charakterisierung von komplexen Proteinnetzwerken und deren Störungen, der Suche nach Biomarkerproteinen für die Detektierung und Diagnose von Krankheiten und nicht zuletzt der Identifizierung von Proteinen (Peptiden) für die Entwicklung von Heilmitteln.

1.2. Struktur und Funktion von Metallionen-haltigen Proteinen

Zur großen Gruppe der Metallionen-Proteinkomplexe gehören neben den Metallionen-haltige Enzymen (diese sind essentielle Kofaktoren der „functional expression“ vieler Proteine im lebenden Organismus), Metallionen-haltige Transportproteine (dies sind cysteinreiche Proteine, wie Albumin oder Transferrin, welche den Transport schwerer und essentieller Metalle im menschlichen Körper ermöglichen) und Metallionen-haltige Stressproteine [z.B. verschiedene Metallothioneine mit essentiellen (Zn, Cu, Fe u.a.) oder toxischen (z.B. As, Cd, Hg) Spurenelementen].[19] Jiang et al. [20] beschreiben die Wechselwirkung des trivalenten As mit Metallothionein. Die analytische Chemie von Cu-, Zn-, und Cd-enthaltenen Metallothioneinen wurde in einer Übersichtsarbeit von Prange und Schaumlöffel [21] beschrieben. Die Bindungen essentieller Elemente (Cu, Zn, Fe) an Proteine (z.B. Albumin, Transferrin) des menschlichen Blutserums wurde von Sariego Muniz et al. [22] untersucht. Von besonderer Bedeutung sind die Identifizierung und die Aufklärung der Funktionen der Selenoproteine.[23-26] Diese beugen als essentielle Verbindungen Krebserkrankungen vor und schützen den menschlichen Körper vor Alterungsprozessen.[25]

Eine Herausforderung für die Analytik ist es, neben der Identifizierung der Proteinliganden, die Wechselwirkungen mit der biologischen Umgebung zu studieren und die Stöchiometrie der Metallionen/Liganden oder Peptide zu bestimmen. So sind z.B. Metallionen der Elemente Cu, Zn, Ca, Se und Fe in biologischen Systemen essentiell und an fundamentalen Prozessen wie bei der Signalgebung, Genexpression und der Katalyse beteiligt.[27-29] Der Mangel an verschiedenen, essentiellen Metallen im Organismus kann bestimmte Krankheitsbilder wie Wachstumsbeeinträchtigung (Ca), Anämie, Störung des Immunsystems (Fe), Aterienschwäche, oder eine Leberstörung (Cu) hervorrufen[30]. Die Anwesenheit bestimmter toxischer Metallionen oder Metalloidionen besitzen z.B. Carcino- (As, Cr, Pt), Immuno- (Au, Co, Cr, Ni, Pt), Embryo-/Terato- (Hg), Spermio- (Cd, Pb, Tl), Nephro- (Cd, U) oder Neuro-Toxität (Al, Hg, Mn).[31]

Der zum Teil erhebliche Aufwand, den Organismen bei Aufnahme und Anreicherung von anorganischen Elementen betreiben [32], ist nur durch ihre offenbar notwendige und anderweitig nicht gewährleistete Funktion gerechtfertigt.[30] Dazu gehört der Aufbau fester Strukturen in Form von Innen- und Außen-Skeletten durch Biomineralien. Kleine Ionen eignen sich als Ladungsträger bei einer schnellen Informationsübertragung. Der Auf- und Abbau organischer Verbindungen im Organismus erfordert häufig eine saure oder basische Katalyse. Die Koordination der im Organismus meist ionisch vorliegenden Metalle kann durch räumliche Anhäufung der Amidfunktion zur Verringerung der ionischer Anziehungs- und Abstoßungskräfte innerhalb von Proteinen und Proteinkomplexen führen, denn die Carboxamidfunktion selbst hat nur eine schwach ausgeprägte Metallkoordination. Vor allem funktionelle Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren Histidin, Methionin, Cystein, Selenocystein, Tyrosin, Glutamat und Aspartat sind für die Bindung mit Metallionen geeignet.[30] Der Mechanismus, bei dem das Metall gespeichert oder als Kofaktoren in die Zelle eingebunden wird, ist oft unbekannt.[33] Intrazellulare Metallionen tragen zur Proteinstabilität durch ihre Anwesenheit im Zentrum von großen Molekülen, oft mit enzymatischer Aktivität (Metalloenzyme) bei.[34] Die Aktivität der intrazellularen Metallionen wird durch verschiedene Proteinfamilien kontrolliert, die entweder entgiftend, schützend oder einfach nur im Zellzyklus involviert sind.[31]

Das Wissen über die komplette Sequenz verschiedener Genome gibt ungeahnte Möglichkeiten bei der Identifizierung der Metallionen-haltigen Proteine und deren enzymatischen Metabolismen. Es ermöglicht einen umfassenden Einblick auf die Rolle essentieller und toxischer Metalle im gesunden Zustand des Organismus und bei den unterschiedlichsten Krankheiten.

1.3. Massenspektrometrische Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen

Grundprinzip der Massenspektrometrie ist es, aus verdampften, neutralen Atomen oder Molekülen Ionen zu erzeugen, diese in einem geeigneten Ionentrennsystem nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) zu trennen und mit einem ionenempfindlichen

Nachweissystem zu detektieren. Man kann prinzipiell ein Massenspektrometer in drei Funktionselemente unterteilt: die Ionenquelle zur Ionenerzeugung, den Massenanalysator zur Ionentrennung und den Ionendetektor zum Ionennachweis.

Leistungsfähige Ionenquellen, in denen Biopolymere ionisiert werden, um anschließend in Massenspektrometern analysiert zu werden, haben in den letzten Jahrzehnten entscheidende Entwicklungen erfahren. Die älteren Ionensierungsmethoden wie EI (Elektronenstoßionisation), FD (Feld-Desorption-Ionisation), CI (chemische Ionisation) und FAB (fast atomic bombardment) werden zur Analyse von organischen und metallorganischen Substanzen eingesetzt. Diese Ionenquellen wurden in Massenspektrometern mit Quadrupolanalysatoren, FTICR-Zellen, Sektorfeld- und Time-of-Flight-Analysatoren verwendet. Die Massenspektrometrie für große Biomoleküle begann mit der Entwicklung der "Softionisationsmethoden". Durch die Einführung dieser Methoden (Elektrosprayionisierung (ESI) und Matrix-unterstützter Laserdesorption/-ionisation (MALDI)) ließen sich große Biomoleküle sanft ionisieren ohne zu fragmentieren. ESI und MALDI haben die Massenspektrometrie für biologische Experimente, wie zum Beispiel bei der Identifizierung von Peptiden und Proteinen [35-39], bei Studien von nichtkovalenten Komplexen[40, 41] und immunologischen Molekülen, bei der DNA-Sequenzierung und der Analyse von intakten Viren, unentbehrlich gemacht. Für die Einführung von „Softionisierungsmethoden" speziell zur Strukturaufklärung großer Biomoleküle erhielten Fenn und Tanaka 2002 den Nobelpreis für Chemie.

Fenn konnte im Jahre 1988 als Erster die Elektrosprayionisation für die Analyse von Biomolekülen zum Einsatz bringen.[42] In der ESI-MS wird eine verdünnte Probenlösung mit einer kleinen Flussrate (1-20 µl/min) durch eine Kapillare gepumpt. Eine positive oder negative Hochspannung (1-4 kV) wird, abhängig von der Aufgabenstellung, positive oder negative Ionen zu analysieren, an der Kapillare angelegt. Die angelegte Spannung liefert einen elektrischen Feldgradienten, der benötigt wird, um eine Ladungstrennung auf der Flüssigkeitsoberfläche zu erreichen. Als Ergebnis bildet sich am Kapillarenausgang ein so genannter „Taylor cone". Erreicht die Lösung, die den „Taylor cone" bildet, das Rayleigh-Limit (der Punkt, bei dem die Coloumb-Abstoßung der Oberflächenladung

gleich der Oberflächenspannung der Lösung ist) [43, 44], können sich Tröpfchen mit einem Überschuss an positiver oder negativer Ladung vom „Taylor cone“ lösen. Diese Tröpfchen bilden meist mehrfach geladene Ionen und bewegen sich durch die Atmosphäre in Richtung zum Einlass des Massenspektrometers. Als Folge der Coloumb-Abstoßung werden durch den Ladungsanstieg während der Verdampfung des Lösungsmittels größere Tröpfchen in kleinere geteilt.[45] Die Ionen werden aus der Tröpfchenoberfläche freigesetzt und in das Massenspektrometer extrahiert.[46] Die gebildeten Ionen werden anschließend nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) im Massenanalysator getrennt und detektiert.[47]

Eine zweite wichtige Ionisierungstechnik, die Matrix assisted laser desorption/ionisation (MALDI), wurde von K. Tanaka et al. (1987) vorgestellt.[48-52] Für die MALDI-Technik wurde ein gepulster UV- (oder IR-) Laserstrahl zur Erzeugung von Analytmolekülionen eingesetzt. Der Analyt und die Matrix werden in einer Mischung aus organischen Lösungsmitteln und Wasser gelöst und nacheinander auf einen Probenträger aufgebracht. Beim Beschuss der Probenoberfläche mit Photonen wird die meiste Laserenergie von der Matrix absorbiert, was eine ungewollte Fragmentierung des Analyten verhindert und die Biomoleküle bleiben „intakt“. Bei der Wechselwirkung der Photonen mit den Molekülen von Matrix und Analyt werden diese desorbiert, in die Gasphase überführt und durch Stöße untereinander positiv oder negativ geladene Ionen erzeugt. Die gebildeten vor allem einfach geladenen Ionen werden anschließend nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) im Massenanalysator getrennt und detektiert.

Bei der Entwicklung von Massenspektrometern ging es vor allem darum, Instrumente mit genügender Messgenauigkeit und hoher Empfindlichkeit zu konstruieren und zu bauen. Um diese Anforderung zu erfüllen, wurden mehrere verschiedene Massenanalysatoren entwickelt, z.B.: Time-of-Flight-Analysator (TOF), Quadrupol-Massenspektrometer, Ionenfalle und Fourier Tranformation Ionen Zyklotronenresonanz (FT-ICR) Massenanalysator. Alle massenspektrometrischen Analysatoren zur Analyse von Biopolymeren werden mit den modernen „Softionisierungs“-Ionenquellen gekoppelt. Stephens stellte im Jahre 1946 die Wirkungsweise des TOF-Massenanalysators vor.[53]

Das Prinzip und die Funktion dieses Massenanalysators wurde von Wiley und McIaren im Jahre 1955 beschrieben[54] (siehe auch ein Review von Cotter[55]). Im Prinzip besitzt ein TOF-Massenspektrometer keine Begrenzung des Massenbereiches. Dies macht es besonders für die Anwendung der „Softionisierungsmethoden“, d. h. für die Analyse großer Biomoleküle geeignet.

Die Fouriertransformation Ionenzyklotronen Massenspektrometrie (FTICR-MS) wurde zuerst von Comisarow und Marshall beschrieben (1974).[56, 57] Diese Methode beruht auf der simultanen Anregung durch einen schnellen Scan (großer Frequenzbereich in 1 µs) der im Zyklotron enthaltenen Ionen.[58] Für die Detektion der Zyklotronenfrequenz und der Berechnung der entsprechenden Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Ionen, müssen die Ionen in eine kohärente Bewegung gebracht werden. Eine Methode, bei der die Ionen zu Kreisbewegungen mit gleichem Radius angeregt werden, wird gespeicherte funktionsumgekehrte Fouriertransformation (SWIFT – stored waveform inverse Fourier transform) genannt und wurde von Marshall *et al.* 1985 eingeführt [59, 60]. Um die Zeitdomänenanregungsfunktion zu erhalten, ist der Frequenzbereich für die Anregung nach einer umgekehrten Fouriertransformation festgelegt. Das Herz des FTICR-MS ist die ICR-Zelle, eine Penningfalle, die sich im Zentrum eines (supraleitenden) Magneten befindet. Verschiedene ICR-Zellen-Designs wurden in der Literatur beschrieben wie zum Beispiel rechteckig[61], kubisch[62, 63], zylindrisch[64] und Zellen mit offenen Enden [65-67]. In dieser Arbeit wurde ein FTICR-MS mit einer zylindrischen ICR-Zelle verwendet.

Die kohärente Bewegung der Ionen wird mittels Detektionselektroden nach der kinetischen Anregung der Ionen in der ICR-Zelle detektiert. Die zwei Detektionselektroden befinden sind auf den gegenüberliegenden Seiten neben den Anregungselektroden. Das Schema einer ICR-Zelle ist in Abb. 2 dargestellt.

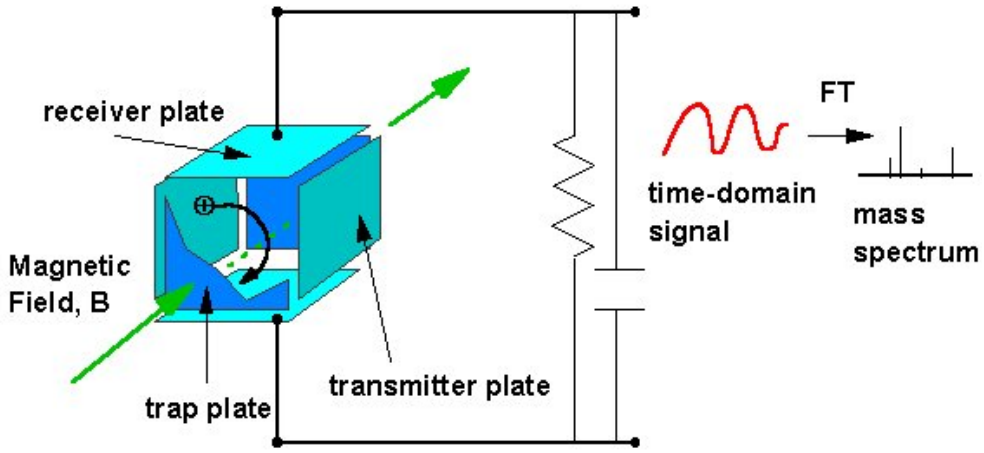


Abb. 2: Schematische Darstellung einer ICR-Zelle; eine wechselnde Stromstärke wird jedes Mal dann angelegt, wenn Ionen die Detektionselektroden passieren; die Frequenz dieser Stromstärke stimmt mit der Zyklotronenfrequenz der Ionen überein; nach der Umwandlung der wechselnden Stromstärke kann eine wechselnde Spannung der Zeitdomänen als Spannungssignal f(t) gemessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die FTICR-MS mit den verschiedenen Ionisierungsmethoden eingesetzt, um vor allem phosphorylierte und Metallionen-haltige Proteine zu identifizieren. Bei der Identifizierung der Proteine kann mit FTICR-MS eine hohe Massengenauigkeit (< 1 ppm) bei gleichzeitig hoher Massenauflösung (> 10^6) erreicht werden. Diese Eigenschaften der FTICR-MS erleichtern eine Suche in den verschiedenen Proteindatenbanken.

1.4. Massenspektrometrische Methoden zur quantitativen Bestimmung von P, S und gebundenen Metallionen in Proteinen

Metallionen-haltige Proteine spielen in biologischen Systemen oder bei vielen Krankheiten (wie die Alzheimersche, Parkinson Erkrankung oder das Hallervorden-Spatz Syndrom [68, 69]) - beim Studium der Lebenswissenschaften – oder auch in einzelnen Zellen und Zellorganellen (z.B. Mitochondrien) eine eminente Rolle. Sie sind an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt. Während einige Metallionen-haltige Proteine für

den Transport von essentiellen Nährstoffionen dienen, wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen Aufbau und Wirkungsweise der Metallothioneine [70, 71] untersucht. Cu- und Zn-Ionen wurden sowohl in normalen Gehirnproben [72] als auch in Alzheimer Gehirnproben [73] detektiert. Kürzlich gelang es, signifikant erhöhte Phosphorkonzentrationen und Spurengehalte von Metallen (Fe, Cu, Al, Zn) in Alzheimer Gehirnproben im Vergleich zu Kontrollproben nachzuweisen.[74]

Cherny *et al.*[75] berichtete über die Wechselwirkung von Cu und Zn mit dem Aβ-Protein beim Studium der Alzheimersche Krankheit an transgenen Mäusen unter Verwendung von Cu/Zn empfindlichen Chelatoren. Die Autoren schlugen eine neue Therapie zur Behandlung der Erkrankung vor. Bayer et al. [76] vermuteten einen Zusammenhang der Alzheimerschen Krankheit mit einem Kupfermangel im Amyloid-Vorläuferprotein (APP) und dem Amyloid Aβ Peptid, denen eine wichtige Rolle bei der physiologischen Regulierung des zellulären Kupferstoffwechsel zugeschrieben wird. APP hat primär N-terminale Cu-bindende Domäne (CuBD) [77], die mit nanomolarer Affinität Cu binden, und sekundäre CuBD, die in Aβ nach proteolytischer Spaltung (processing) von APP gebildet werden.[78]

Neben der Identifizierung und Sequenzierung von zellulären Proteinen mittels MALDI-MS [79] und ESI-MS ist deshalb auch die Verknüpfung dieser Techniken mit einer leistungsfähigen atomspektrometrischen Analytik bezüglich des Nachweis von Metallionen und Phosphat in Proteinen, deren quantitativen Konzentrationsbestimmung in Proteinen und deren intrazelluläre Verteilung[29] von wachsendem Interesse.

Für die Bestimmung der Elementkonzentrationen (von Phosphor und Metallen) in Proteinen hat sich die induktiv gekoppelte Massenspektrometrie (ICP-MS – inductively coupled plasma mass spectrometry) als leistungsfähiges, empfindliches und nachweisstarkes atomspektrometrisches Analysenverfahren erwiesen. Durch Kombination der ICP-MS mit Trennmethoden, wie on-line HPLC (high performance liquid chromatography, HPLC-ICP-MS) [80, 81], CE (capillary electrophoresis, CE-ICP-MS) [82], SEC (size exclusion chromatography, SEC-ICP-MS) konnten einfache

Proteingemische wie Selenoproteine[23] aufgetrennt werden. Eine direkte Analyse von Elementen in getrennten Proteinspots in 1D- und 2D-Gelen wird mit LA-ICP-MS (laser ablation ICP-MS) [83] möglich sein. Diese Methode wurde deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal in Kombination mit der Gelelektrophorese (Analyse von 1D- und 2D-Gelen) angewandt. Die LA-ICP-MS als ortsaufgelöste Methode (Auflösungsvermögen im µm-Bereich) wird zur Selektion von Proteinen, die Metallionen und Phosphat [84, 85] enthalten, eingesetzt. Zur Quantifizierung der analytischen Daten, d.h. zur Bestimmung der Phosphat- und Metallionenkonzentrationen in Proteinen, wird meist, da kein geeignetes Standardreferenzmaterial (SRM) verfügbar ist, Schwefel als Internstandardelement herangezogen. Dabei wird die Schwefelkonzentration aus der Zahl der S-enthaltenen Nukleinsäuren (z.B. Cysteinreste) im Protein – als Ergebnis der biomolekularen massenspektrometrischen Untersuchungen – abgeleitet. Neben dieser Quantifizierungsstrategie findet auch die Isotopenverdünnungsanalyse in Proteinen Anwendung.[86, 71] Zwei on-line Isotopenverdünnungsanalysentechniken werden von Schaumlöffel und Lobinski [86] zur Quantifizierung von Elementspezies [(a) die Spezies-unspezifische „Post-column“ Isotopenverdünnungsanalyse zur Quantifizierung von unbekannten Biomolekülen und die (b) Spezies-spezifische Isotopenverdünnung für bekannte Biomoleküle, wenn isotopenangereicherte Spezies verfügbar sind] vorgeschlagen.

Eine herausfordernde Analysenaufgabe der Proteinforschung ist die Proteomanalytik von phosphathaltigen Proteinen und von Metallionen-haltigen Proteinen. Die Kombination der LA-ICP-MS mit der MALDI-FTICR-MS (matrix-assisted laser desorptions/ionisation mass spectrometry unter Verwendung eines hochauflösenden Fourier Transform Ionenzyklotron-Resonanz-Massenspektrometers) erlaubt es nunmehr, neben der Strukturaufklärung der Proteine auch P-, Zn-, Cu-, Fe-, Si- und U-Konzentrationen über die Analyse der getrennten Proteine in 1D- und 2D-Gelen (z.B. Proteinen Gehirnproben von Alzheimer Patienten oder von Mitochondrien) quantitativ zu bestimmen.

Eine andere analytische Möglichkeit besteht darin, dass nach Trennung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese, dem tryptischen Abbau („in-gel digestion“ mit Trypsin),

Extraktion der Peptide und anschließender Kapillar (CE)- oder Nanoflow-HPLC-ESI-MS/MS eine Identifizierung der Proteinstrukturen erfolgen kann. ICP-MS wird dann zur quantitativen Bestimmung von Metallionen- und Phosphatkonzentrationen in Proteinen eingesetzt [19], wobei die LA-ICP-MS als direkte Methode gegenüber der zeitaufwendigeren ICP-MS enorme Vorteile mit sich bringt. Mit LA-ICP-MS können auch mögliche Kontaminationen bei der Probenvorbereitung minimiert werden.

Die LA-ICP-MS soll im Rahmen der Arbeit als schnelle Analysenmethode zur Detektion von P, S und Metallen (z.B. Fe, Zn, Cu) in getrennten phosphorylierten und Metallionen-haltige Proteinen in 2D-Gelen und zum Studium post-translationaler Modifikationen dieser Proteine angewandt werden.[87] Über die Bestimmung der Phosphorkonzentration in Proteinen lässt sich aber auch der Phosphorylierungsgrad des untersuchten Proteins bestimmen.

1.5. Tau Protein – Ein Protein zur Untersuchung der Alzheimerschen Krankheit

Im Zusammenhang mit der Alzheimerschen Krankheit [88] spielen zwei Proteine eine bedeutende Rolle. Dies sind das Amyloid Vorläuferprotein (APP)[89, 90], welches ein ubiquitinäres, zelluläres, physiologisches Protein ist, dass in vielen Zellen auftritt. Das Amyloid Vorläuferprotein, gebildet von gesunden Neuronen, kann durch drei Enzyme, α-, β- und γ-Sekretase, gespalten werden. Anstatt sich in der Flüssigkeit zu lösen, die das Neuron umgibt, bilden sich aus dem β-Amyloid unlösliche Klumpen, die so genannten Fibrillen. Die Fibrillen kleben aneinander und bilden letztendlich die Plaques auf der Oberfläche des Neurons. Die β-Amyloid-Plaques sind eins von zwei mikroskopisch nachweisbaren Charakteristika der Alzheimerschen Krankheit.

Das zweite Protein, das für die Alzheimersche Krankheit von Interesse ist, wird in den Neuronen selbst gebildet, die neurofibrillären Knäule (NFT – „neurofibrillary tangles“). Humane Tau Proteine sind Mikrotubulus-gebundene Proteine, die aus einer heterogenen Mischung von 6 verschiedenen Isoformen in einem Massenbereich von 50 bis 70 kDa bestehen. Sie setzen sich aus 352 bis 441 Aminosäuren zusammen.[91, 92] Gesunde

Neuronen sind normalerweise untereinander zu Neuriten verbunden. Diese Neurite enthalten Mikrotubuli, deren Wände durch Tau Proteine verstärkt werden. NFTs, die hauptsächlich aus hyperphosphoryliertem Tau Proteinen bestehen [93-102], sind aus zwei Typen von Tau Filamenten: 95 % PHFs („paired helical filaments“) und 5% SFs („straight filaments“) aufgebaut. Die Hyperphosphorylierung ist ein Signalmechanismus der Zelle, um die Mitose zu regulieren. Es wird vermutet, das die Hyperphosphorylierungen an einem Biomoleküls dann auftritt, wenn die multiplen Phosphorylierungsstellen des Moleküls gesättigt sind.[103]

Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen[104] zeigen jedoch neueste Studien, dass die Hyperphosphorylierung von Tau die Bildung von PHFs und SFs induziert.[105, 106] Ist Tau hyperphosphoryliert, dissoziiert es vom Mikrotubulus und konkurriert mit dem Mikrotubulus um die Bindung zum nicht hyperphosphorylierten Tau [105], MAP1 und MAP2 [107]. Als Konsequenz wird der Mikrotubulus nicht mehr stabilisiert und zerfällt. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen ist die Tatsache, dass von Alzheimerkrankem Gehirn isoliertes hyperphosphoryliertes Tau den Zusammenbau der Mikrotubuli nicht unterstützt.[108] Auch weisen Neuronen, die mit NFTs gefüllt sind, einen Mangel an Mikrotubuli auf.[109] Durch die Phosphorylierung erfolgt eine Akkumulation des Tau Proteins in den Zellen und im Alzheimerkranken Gehirn.[110, 111] Deshalb tritt im Alzheimerkranken Gehirn nicht nur eine Erhöhung der Tau-Hyperphosphorylierung, sondern auch eine Zunahme der absoluten Menge an Protein auf, was die Destabilisierung der Mikrotubuli auslöst. Eine Beschädigung des Mikrotubulus führt zur Beendigung des axonalen Transportes und dem Verlust von Synapsen. Die Akkumulation an unlöslichen Tau-Aggregaten im Innern des Neurons führt zur Sättigung an Tau-Aggregaten und hemmt damit die Reinigungsmaschinerien der Zelle: bekannt als das Ubiquitin-Proteasom-System [112], was auch zum Absterben der betroffenen Zelle führen kann.[113]

In der vorliegenden Arbeit soll die Proteomanalytik vor allem auf ein Protein, das Tau Protein, angewandt werden.[102] Die Identifizierung und strukturelle Charakterisierung des Tau Proteins soll mit Hilfe von FTICR-MS und ICP-MS (bzw. LA-ICP-MS)

untersucht werden. Dabei sollen vor allem die Phosphorylierungsstellen des Tau Proteins identifiziert werden. Durch MS/MS-Methoden sollen einzelne phosphorylierte Peptide des Tau Proteins fragmentiert und die exakte Position der Phosphorylierung bestimmt werden. Mit ICP-MS soll die Phosphatkonzentration im Tau Protein bestimmt werden, um daraus den Phosphorylierungsgrad des Proteins berechnen zu können.

1.6. Zielsetzungen der Arbeit

In jüngster Zeit haben zahlreiche analytische Entwicklungen, wie die Etablierung von sanften Ionisationsmethoden, die Massenspektrometrie zur Charakterisierung von Biopolymeren erheblich erweitert. So ermöglicht die FTICR-Massenspektrometrie Strukturaufklärungen mit hohen Massengenauigkeiten, Massenauflösungen und Empfindlichkeiten.

Die Alzheimersche Krankheit (AD) ist, wie schon diskutiert, eine Degeneration des Gehirns, die durch den Verlust der Erinnerung und der Abnahme der kognitiven Fähigkeiten charakterisiert ist. Während im gesunden Gehirn die Wände der Mikrotubuli durch Tau Protein verstärkt werden, so bindet dieses Protein in der Alzheimerschen Krankheit aufgrund von Hyperphosphorylierung nicht mehr an den Mikrotubulus und es werden neurofibrilläre Knäule gebildet.

Phosphorylierungen von Proteinen sind aber auch als wichtige Schlüsselreaktionen in vielen fundamentalen zellulären Prozessen, wie z.B. in zahlreichen pathophysiologischen Prozessen, bei der Entstehung von Krebserkrankungen oder vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen des Gehirns, wie Alzheimersche oder Parkinsonsche Erkrankung oder das Hallervorden-Spatz Syndrom von Interesse. Neben Phosphat spielen weiterhin die Metallionen in biologischen Systemen - beim Studium der Lebenswissenschaften - also auch in einzelnen Zellen und Zellorganellen (z.B. Mitochondrien) eine entscheidende Rolle, da sie an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind. Eine neue Kombination von anorganischer und organischer

Massenspektrometrie mittels LA-ICP-MS und FTICR-MS wird benötigt, um quantitativ die Konzentrationen von Phosphat und Metallionen in Proteinen zu bestimmen.

1. Die Identifizierung und strukturelle Charakterisierung des Tau Proteins soll unter Verwendung von FTICR-MS und der verschiedenen sanften Ionisierungsmethoden durchgeführt werden. Dabei sollen vor allem die Phosphorylierungstellen des Tau Proteins identifiziert werden. Durch MS/MS-Methoden sollen einzelne phosphorylierte Peptide des Tau Proteins fragmentiert und die exakte Position der Phosphorylierung bestimmt. Das Tau Protein soll durch Dephosphorylierungsreaktionen mit verschiedenen Phosphatasen vom Phosphat befreit werden.

   Mit Hilfe von synthetischen nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Tau Peptiden soll eine Charakterisierung einzelner Abschnitte des Tau Proteins unter Verwendung von MS/MS-Methoden [SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-induced Dissociation), IRMPD (Infrared Multiphoton Photodissociation)] mit FTICR-MS ermöglicht werden. Ferner sollten nicht phosphorylierte Tau Peptide für Phosphorylierungsreaktionen unter Verwendung von verschiedenen Kinasen eingesetzt werden, um aus den massenspektrometrischen Analysen der Tau Peptide Rückschlüsse auf das Phosphorylierungsverhalten des Tau Proteins zu erhalten.

2. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Kombination von FTICR-MS und ICP-MS (LA-ICP-MS) als neue Methode zur Charakterisierung von Phosphorylierungen und Bindung von Metallionen in Proteinen entwickelt werden. Zusätzlich zur Bestimmung der Konzentration von P und des Phosphorylierungsgrades sollen deshalb auch die Metallionenkonzentrationen in einzelnen Proteinen und in verschiedenen Proteingemischen nach der Trennung mittels 2D-Gelelektrophorese quantitativ bestimmt und die möglichen Modifikationen der Proteine, wie Phosphorylierung und Metallionen, mittels FTICR-MS untersucht werden. Dazu wurden mitochondriale Proteine als Modellsysteme untersucht.

3. Die Methodenkombination der LA-ICP-MS und FTICR-MS sollte zur Charakterisierung von verschiedenen Gehirnproteinproben (Alzheimergehirnproben und gesunden Gehirnproben aus unterschiedlichen Gehirnregionen), die mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt werden, angewandt werden. Zielsetzung war die Konzentrationen von P und verschiedenen Metallionen zu ermittelt und mittels dieser Ergebnisse gezielt nach Modifikationen in einzelnen Proteinen zu suchen.

4. Mit Hilfe gezielter Tracerexperimente unter Verwendung stabiler angereicherter Isotopen (^{235}U, ^{232}Th, ^{54}Fe, ^{65}Cu, ^{67}Zn) (Tracer) an mit 2D-Gelelektrophorese getrennten Alzheimergehirnproteinen sollte untersucht werden, ob die Metallionenbindungen an einzelnen Proteinen auch während der Gelelektrophorese stabil sind oder aufgebrochen werden. Vergleichbare Experimente mit stabilen Isotopenlösungen (^{65}Cu, ^{67}Zn) sollen auch an einem Modellprotein (Tau Protein), dessen Isoformen durch 1D-Gelelektrophorese getrennt werden sollten, durchgeführt werden.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Identifizierung der Phosphorylierungsstruktur des Tau Proteins mittels ESI- und MALDI-FTICR-MS

Humane Tau Proteine sind Mikrotubulus-gebundene Proteine, die aus einer heterogenen Mischung von 6 verschiedenen Isoformen in einem Massenbereich von 50 bis 70 kDa bestehen. Sie setzen sich aus 352 bis 441 Aminosäuren zusammen.[91, 92] Tau Protein hat eine sekundäre Struktur mit α-Helices und β-Faltblättern [114, 115] und ist äußerst stabil (z.B.: bei Einwirkung von Hitze und denaturierende Agenzien, Säuren, welche die biologische Funktion nicht verändert). Das Tau Protein ist sehr hydrophil, wasserlöslich und enthält N-terminal eine saure Domäne, in der Mitte eine basische und Prolin-reiche Domäne und C-terminal eine Domäne mit 3 oder 4 Mikrotubuli-Bindungsstellen. Die sechs Isoformen des Tau Proteins werden durch alternative Spaltungen eines Genes erzeugt.[116-118] Drei Mikrotubuli-Bindungsdomänen sind in allen Tau Isoformen enthalten.[119, 94, 120] Im fötalen Gehirn tritt nur die kürzeste Tau Isoform auf, während im voll entwickelten Gehirn alle sechs Isoformen enthalten sind.[121, 122] Tau Proteine sind vor allem im Zentralnervensystem (CNS – central nerve system) zu finden und werden hauptsächlich in den Axonen angereichert.[123-125] Auch wurden Tau Proteine in geringeren Mengen in den Oligodendrozyten, den Astrozyten [126, 127] und anderen neuronalen subzellularen Sektoren [128, 129] gefunden.

Im peripheren Nervensystem trägt Tau Protein zusätzlich 254 Aminosäuren von Exon 4a, wodurch es wesentlich schwerer wird und deshalb als „Big Tau“ (Abb. 3) bezeichnet wird.[116, 130] Eine Hauptfunktion von Tau ist die Stabilisierung der Mikrotubuli [102, 131], die aus Tubulin-Dimeren bestehen. Diese bilden Röhren und besitzen eine dynamische Struktur, deren Stabilität von der Polymerisations- und Depolymerisationsrate des Tubulin abhängt. Tau unterstützt die Polymerisation der Tubulin-Dimeren und die Mikrotubulus-Stabilität durch Erhöhung der Bindung von GTP (Guanosinetriphosphate-bindende Proteine) mit β-Tubulin.[132] Da die Mikrotubuli wichtige Strukturen für den axonalen Transport, Polarität und Form der Zellen und die axonale Ausdehnung und Aufrechterhaltung darstellen, können Veränderungen im funktionalen Zustand des Tau

Proteins die normale zellulare Physiologie stark beeinträchtigen. Die Stabilität und Organisation von kurzen Axonen wird im Alzheimer-kranken Zustand stark beeinflusst.[133] Dagegen sind große Axone weniger betroffen, das liegt vermutlich an der Kompensation durch andere Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP), wie z.B. MAP1A.

001 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD
041 AGLKE**S**PLQ**T** PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA
091 AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQEPESG KVVQEGFLREP
141 GPPGLSHQLM SGMPGAPLL PEGPREATRQP SGTGPEDTEG GRHAPELLKH
191 QLLGDLHQEG PPLKGAGGKE RPGSKEEVDE DRDVDESSPQ DSPPSKASPA
241 QDGRPPQTAA REATSIPGFP AEGAIPLPV DFLSKVSTEIP ASEPDGPSVG
291 RAKGQDAPLE FTFHVEITPN VQKEQAHSEE HLGRAAFPGA PGEGPEARGP
341 SLGEDTKEAD LPEPSEKQPA AAPRGKPVSR VPQLKARMVS KSKDGTGSDD
391 KKAKTSTRSS AKTLKNRPCL SPKLPTPGSS DPLIQPSSPA VCPEPPSSPK
441 HVSSVTSRTG SSGAKEMKLK GADGKTKIA**T** PRGAAPPGQK GQANATRIPA
491 K**T**PPAPK**T**PP SSGEPPKSGD RSGY**SS**PG**S**P G**T**PGSRSR**T**P **S**LP**T**PPTREP
541 KKVAVVR**T**PP K**S**PSSAKSLR QTAPVPMPDL KNVKSKIG**S**T ENLKHQPGGG
591 KVQIINKKLD LSNVQSKCG**S** KDNIKHVPGG G**S**VQIVYKPV DLSKVTSKCG
641 **S**LGNIHHKPG GGQVEVKSE KLDFKDRVQS KIG**S**LDNITHV PGGGNKKIET
691 HKLTFRENAK AKTDHGAEIV YK**S**PVV**S**GD**T** **S**PRHL**S**NV**SS** **T**G**S**IDMVD**S**P
741 QLALTADEVS ASLAKQGL

Abb. 3: Aminosäurensequenz von Tau Protein („Big Tau“) mit den in der Datenbank (www.expasy.org) bekannten phosphorylierten Aminosäuren (fett und unterstrichen)

Zusätzlich zum Mikrotubulus beeinflusst Tau einige Signalmoleküle wie z.B.: Fyn [134], Phospholipase C-γ [135], verschiedene Kinasen [136-138] und Phosphatasen [139, 140]. Daraus lässt sich für das Tau Protein eine Rolle zur Signalübertragung ableiten. Weiterhin interagiert Tau auch mit Spectrin [141], Actin-Filamenten [142-144] und Plasmamembranen [145, 146] und vermittelt vermutlich indirekt die Interaktion vom Mikrotubulus mit anderen Zytoskelett-Elementen und der Plasmamembran.

NFTs, die hauptsächlich aus hyperphosphoryliertem Tau Proteinen bestehen [93-102], sind aus zwei Typen von Tau Filamenten: 95 % PHFs („paired helical filaments“) und 5% SFs („straight filaments“) aufgebaut. Alle sechs Isoformen des Tau Proteins sind in den PHFs vorhanden. Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen [104] zeigen jedoch neueste Studien, dass die Hyperphosphorylierung von Tau die Bildung von PHFs und SFs induziert.[105,

[106] In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen können Tau Proteine mittels Proteinphosphatasen *in vitro* aus PHF herausgelöst werden.[147] Verschiedene Faktoren unterstützen möglicherweise nach der Hyperphosphorylierung die Zusammenballung von Tau Proteinen in Filamentstrukturen. Zum einen könnte die negative Ladung des Tau Moleküls, die durch die Hyperphosphorylierung erzeugt wird, die positive Ladungen am Tau Protein selbst neutralisieren und damit die Interaktion und Zusammenballung unterstützen.[105] Zum anderen kann die Dissoziation des Tau Proteins vom Mikrotubulus und die Reduktion in der Proteolysenrate [148, 149] einen Konzentrationsanstieg von löslichem Tau für die PHF-Bildung hervorrufen. Zusätzlich zu der Tau-Hyperphosphorylierung könnte Apolipoprotein E4 (apoE4), ein Hauptrisikofaktor für AD, eine Rolle in der Knäuelbildung spielen. Kürzlich wurde von Huang *et al.* [150] beschrieben, dass das resultierende apoE-Fragment im Vergleich zu apoE3 eher anfällig für die Proteolyse ist. Das apoE4 könnte damit die NFT-ähnlichen Einschlüsse von hyperphosphoryliertem Tau unterstützen. Ist Tau hyperphosphoryliert, dissoziiert es vom Mikrotubulus und konkurriert mit dem Mikrotubulus um die Bindung zum normalen Tau [105], MAP1 und MAP2 [107]. Als Konsequenz sind die Mikrotubulus-stabilisierenden Agenzien nicht mehr an den normalen Aufenthaltsorten vorhanden und führen die normalen Funktionen nicht mehr aus, was den Zerfall des Mikrotubulus zur Folge hat. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen ist die Tatsache, dass von Alzheimerkrankem Gehirn isoliertes hyperphosphoryliertes Tau den Zusammenbau der Mikrotubuli nicht unterstützt.[108] Auch weisen Neuronen, die mit NFTs gefüllt sind, einen Mangel an Mikrotubuli auf.[109] Durch die Phosphorylierung erfolgt eine Akkumulation des Tau Proteins in den Zellen und im Alzheimerkranken Gehirn.[110, 111] Deshalb tritt im Alzheimerkranken Gehirn nicht nur eine Erhöhung der Tau-Hyperphosphorylierung auf, sondern auch eine Zunahme der absoluten Menge an Protein, was die Destabilisierung der Mikrotubuli auslöst. Eine Beschädigung des Mikrotubulus führt zur Beendigung des axonalen Transportes und dem Verlust von Synapsen. Die Akkumulation an unlöslichen Tau-Aggregaten im Innern des Neurons führt zur Sättigung an Tau-Aggregaten und hemmt damit die Reinigungsmaschinerien der Zelle, bekannt als das Ubiquitin-Proteasom-System [112], was auch zum Absterben der betroffenen Zelle führen kann.[113]

Zur Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von Tau Protein aus humanen Gehirnproben, wurde in *e. coli* exprimiertes Tau Protein (Sigma) nach tryptischem Abbau in Lösung mittels FTICR-MS analysiert. Vor der MALDI-FTICR-MS Messung wurde das tryptisch abgebaute Tau Protein (siehe Kap. 3.3.4.1) mit Hilfe von ZipTip C18® (MilliPore) aufgereinigt. Von allen massenspektrometrischen Techniken, die im Bereich der Proteomics eingesetzt werden, ist die FTICR-MS die Methode mit der höchsten Massengenauigkeit (< 1 ppm) bei gleichzeitig hoher Massenauflösung (> 10^6) und hoher Empfindlichkeit. Proteolytische Peptide, bei den die Gensequenz bekannt ist, können oftmals durch genaue Massendaten identifiziert werden, was den Einsatz von MS^n-Analyse unnötig macht. Bei der massenspektrometrischen Analyse von Tau Protein kamen die beiden „Softionisationsmethoden“ ESI und MALDI in Kombination mit hochauflösender FTICR-MS zum Einsatz.

Die Datenbankergebnisse wurden durch Eingabe der aus dem MALDI-FTICR-Massenspektrum gemessenen Daten der tryptischen Peptide ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend die Mascot-Datenbank (www.matrixscience.com) zur Identifizierung der enzymatisch abgebauten Proteine und deren Modifikationen verwendet. Es wurden die Masse-zu-Ladungsverhältnisse, falls bekannt, die Herkunft der Probe [im Fall des humanen Tau Proteins wäre es Mensch (Homo sapiens)], das Enzym, das für den Abbau verwendet wurde (im vorliegenden Fall Trypsin) und mögliche partielle Modifikationen (im Fall des Tau Proteins wären es Phosphorylierungen) eingegeben. Aus einer Vielzahl möglicher Identifizierung wurde das Protein mit dem höchsten „High score“ (mindestens 60 bei Mascot) ausgewählt.

In Abb. 4 ist das MALDI-FTICR-Massenspektrum von Tau Protein dargestellt, das nach Entsalzen der Probe gemessen wurde. Durch Abgleich der experimentellen Ergebnisse mit Datenbanken (z.B. www.matrixscience.com) und den theoretisch berechneten Werten konnten direkt mehrere einfach und auch multiphosphorylierte Peptide ermittelt werden. Zur Berechnung der theoretischen Daten für die Phosphorylierungsstellen des tryptisch abgebauten Tau Proteins (Abb. 3) kam die Software GPMAW 6.2 zum Einsatz. So wurde zum Beispiel das Peptid S(512-528)R mit der molekularen Masse 1636,77 Da im

Spektrum als nicht-phosphoryliertes, als fünffach- und sechsfach-phosphoryliertes Peptid mit den Massen 2036,85 Da und 2116,93 Da nachgewiesen (Abb. 3).

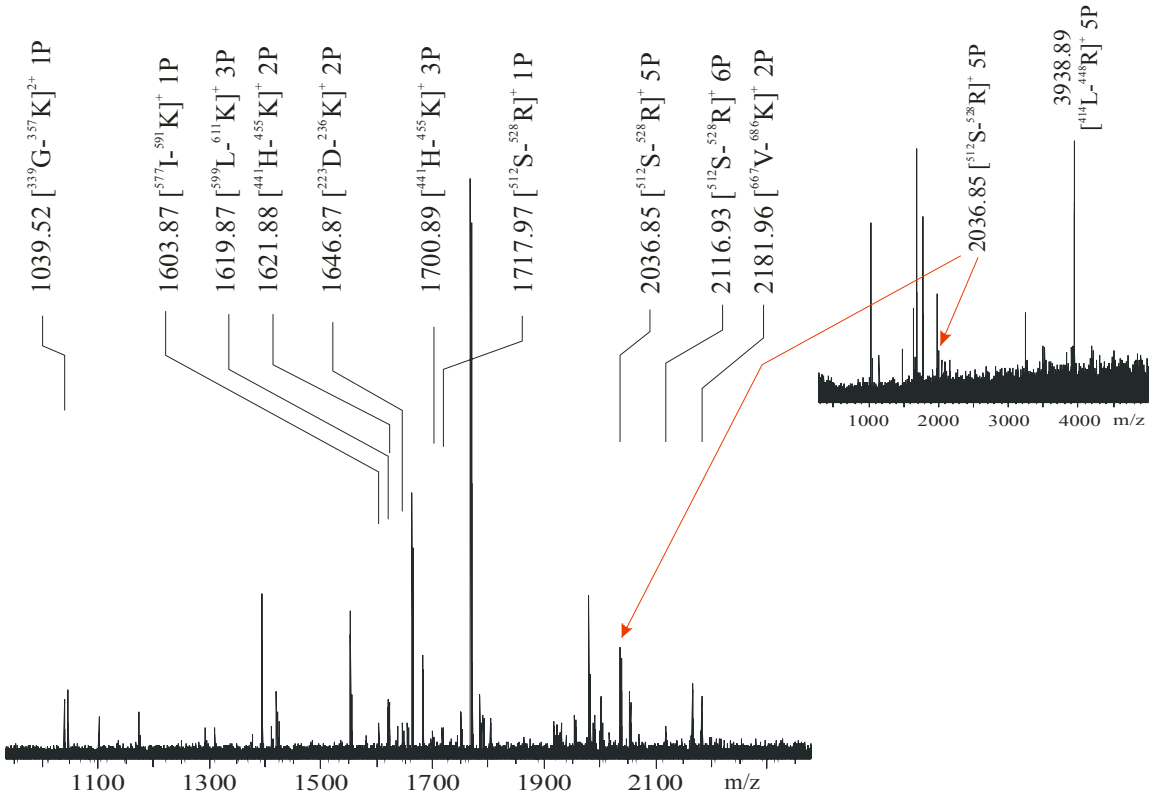


Abb. 3: Massenspektrum von tryptisch abgebautem Tau Protein (Sigma) analysiert mit MALDI-FTICR-MS, in dem alle phosphorylierten Peptide gekennzeichnet wurden; der Ausschnitt (rechts oben) zeigt zwei fünffach phosphorylierte Peptide im Massenbereich von 2 bis 4 kDa

In Tabelle 1 sind die phosphorylierten Peptide des tryptisch abgebauten Tau Proteins, die durch MALDI-FTICR-MS Messungen (Abb. 3) erhalten wurden, wiedergegeben. Es ergab sich eine Abweichung der experimentell ermittelten Werte von den theoretisch berechneten Werten in einem Bereich von 9 bis 82 ppm.

Tabelle 1: Übersicht über die phosphorylierte Peptide, die durch MALDI-FTICR-MS ermittelt wurden, mit der Anzahl an Phosphatgruppen und der Massenabweichung der experimentellen Werte von den theoretischen Werten

tryptisches Peptid	Anzahl an Phosphatgruppen	$M.W._{exp.}$ in Da	Δm in ppm
$[^{339}G\text{-}^{357}K]^{2+}$	1	1039.52	41
$[^{577}I\text{-}^{591}K]^{+}$	1	1603.87	70
$[^{599}L\text{-}^{611}K]^{+}$	3	1619.87	82
$[^{441}H\text{-}^{455}K]^{+}$	2	1621.88	76
$[^{223}D\text{-}^{256}K]^{+}$	2	1646.87	41
$[^{441}H\text{-}^{455}K]^{+}$	3	1700.89	17
$[^{512}S\text{-}^{528}R]^{+}$	1	1717.97	73
$[^{512}S\text{-}^{528}R]^{+}$	5	2036.85	16
$[^{512}S\text{-}^{528}R]^{+}$	6	2116.93	22
$[^{667}V\text{-}^{686}K]^{+}$	2	2181.96	45
$[^{414}L\text{-}^{448}R]^{+}$	5	3938.89	9

Für kleine Probenvolumina wurde die Chip-ESI-FTICR-MS (Abb. 89) entwickelt. Die Herstellung der Mikrochips für die Chip-ESI-FTICR-MS wurde bereits in der Literatur beschrieben.[151, 79] Im Wesentlichen wird eine 50 µm dünne Polyimidfolie (30 x 40 cm) von beiden Seiten mit einer 5 µm dünnen Kupferschicht bezogen und in einem Rahmen fixiert. Die Oberfläche wird mit einem Photolack beschichtet, der mit einem Standardverfahren belichtet und entwickelt wurde. Die Kupferschicht wurde mit einer wässrigen $CuCl/H_2O_2$-Lösung geätzt und das Substrat in einem Niedrigdruckplasma (O_2/CF_4-Gasgemisch mit 80% O_2) behandelt. Die Polymeroberfläche wurde isotrop bei einer Ablationsgeschwindigkeit von 1 bis 2 µm/min zu Kanälen geätzt, und auf die als Elektrode dienende Kupferschicht wurde ein Goldbezug aufgetragen. Abschließend wurden die Mikrokanäle mit einer 30 µm dünnen Polyethylen/Polyethylenterephthalat-Schicht versiegelt. Mit Hilfe eines selbstgebauten Chip-Halters konnte der Chip der nach entfernen der Standard-ESI-Ionenquellen-Einlass 1-2 mm vor dem Kapillareingang

angebracht werden. Durch dieses Chip-System war es möglich, ein konstantes ESI-Spray für kleine Probenvolumina zu erhalten. Vor der eigentlichen Chip-ESI-FTICR-MS Messung wurde das tryptisch abgebaute Tau Protein (siehe Kap. 3.3.4.1) mit Hilfe von ZipTip C18® (MilliPore) aufgereinigt.

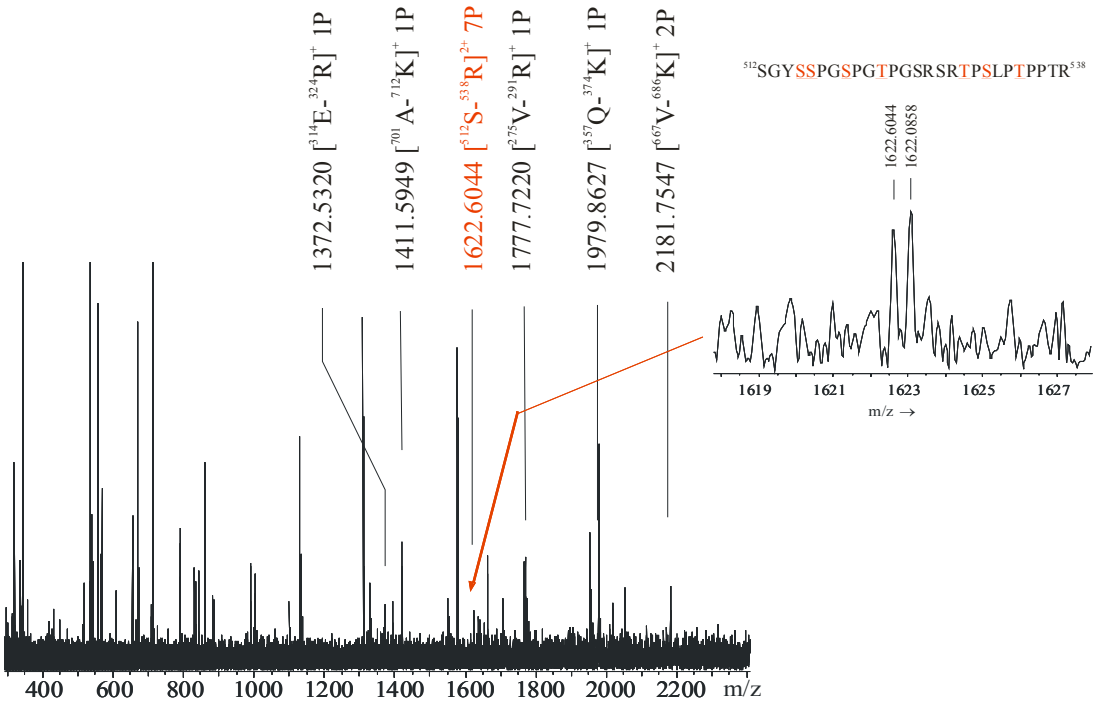


Abb. 5: Chip-ESI-FT-ICR-Massenspektrum des Trypsin-Gemischs des humanen neurofibrillaeren Tau-Proteins. Die phosphorylierten Peptide sind im m/z-Bereich 200-2500 gekennzeichnet. Der Ausschnitt des Massenspektrums (rechts oben) zeigt das heptaphosphorylierte Peptid (512-538)

Das Massenspektrum eines Peptidgemisches des humanen Tau-Proteins wird in Abb. 5 als ein Beispiel für die Anwendung von Chip-ESI-FTICR-MS[151] in der Proteomanalytik gezeigt. Mit diesem Experiment wird die hohe analytische Auflösung des Chip-Systems in Kombination mit FTICR-MS verdeutlicht. Die phosphorylierten Peptiddomänen konnten mit Massengenauigkeiten von 1 bis 40 ppm (± 0,000 005 -0,000 004 Da) bestimmt werden (Tabelle 2).[79] Die Phosphorylierungsstellen wurden mit NiceProt

View (SwissProt Datenbank, Nr. P10636) identifiziert (z.B. $C_{113}H_{191}N_{36}O_{61}P_7$, doppelt protoniert und rot gekennzeichnet; ber. 1622.55513, gef. 1622.60435, Δ=30 ppm).

Tabelle 2: Übersicht über die phosphorylierte Peptide, die durch Chip-ESI-FTICR-MS ermittelt wurden, mit der Anzahl an Phosphatgruppen und der Massenabweichung der experimentellen Werte von den theoretischen Werten

tryptisches Peptid	Anzahl an Phosphatgruppen	M.W. in Da	Δm in ppm
$[^{314}E\text{-}^{324}R]^+$	1	1372.53	1
$[^{701}A\text{-}^{712}K]^+$	1	1411.59	4
$[^{512}S\text{-}^{538}R]^{2+}$	7	1622.60	30
$[^{275}V\text{-}^{291}R]^+$	1	1777.77	1
$[^{357}Q\text{-}^{374}K]^+$	1	1979.86	39
$[^{667}V\text{-}^{686}K]^+$	2	2181.75	9

Mit dem „On-chip-desalting“-System ist eine vorherige Entsalzung der Probe nach dem tryptischen Abbau vor der Messung mit dem FTICR-MS überflüssig. Wie bereits in der Literatur beschrieben, erfolgte die Entsalzung direkt auf einer Membran.[152] Der Prozess der Entsalzung funktioniert durch Adsorption der Peptide an einer Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF). Die PVDF-Membran (Immobilon™-P von Millipore, Bedford, MA, USA) wurde in Stücke mit 5mm Durchmesser geschnitten, die in das Mikrochipreservoir passen, und dann mit MilliQ-Wasser gewaschen. Die Probenlösung wurde durch die Membran mit einer Flussrate von 0,5-5 µl/min gepumpt, wobei die Peptide an der Membran adsorbiert und die Salze mit MilliQ-Wasser bei der gleichen Flussrate wie im Adsorptionsschritt ausgewaschen werden. Die Peptide wurden dann mit einer Lösung aus Methanol/MilliQ-Wasser/Essigsäure im Verhältnis 50:48:2 (v/v/v) von der Membran eluiert und im Massenspektrometer analysiert.

Mit dem „On-chip-desalting“-Systems wurde das tryptisch abgebaute Tau Protein analysiert (Abb. 6). Es konnten direkt mehrere einfach- und mehrfach-phosphorylierte Peptide identifiziert werden. Auch das heptaphosphorylierte Peptid des Tau Proteins ^{512}S-

^{538}R konnte wie zuvor mit dem normalen Chip-System mit sehr geringer Konzentration identifiziert werden.

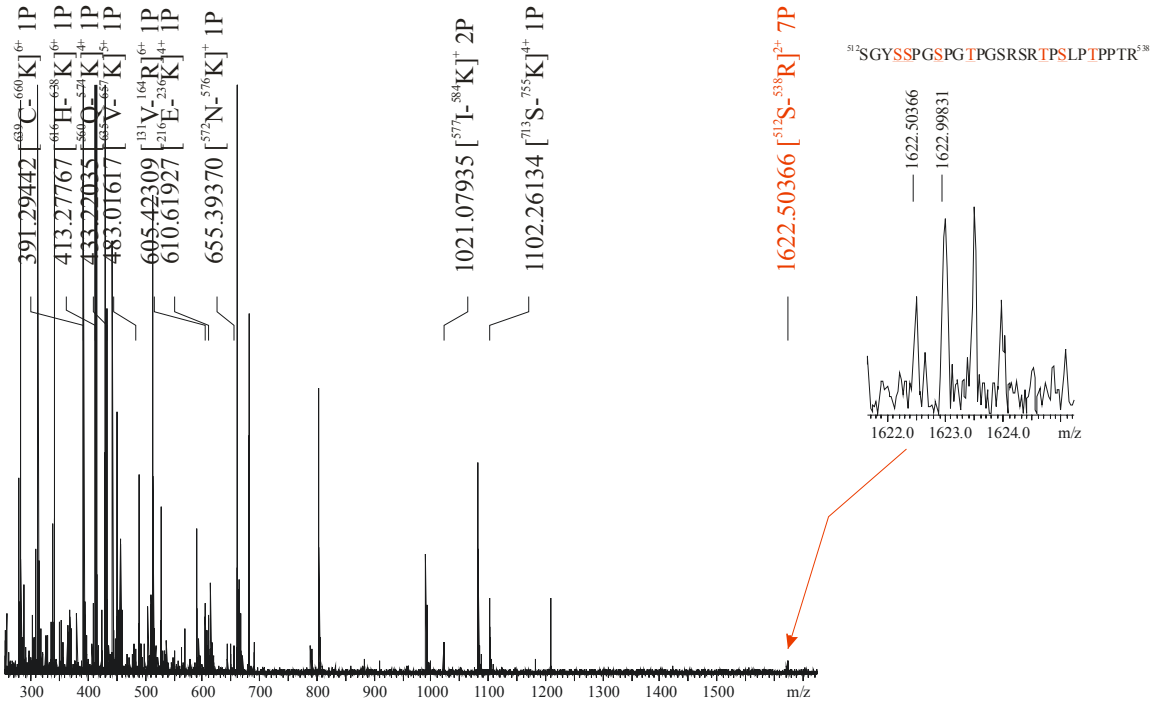


Abb. 6: Chip-ESI-FTICR Massenspektrum nach on-line Entsalzung der Probe direkt auf dem Chip; mit den identifizierten Peptiden, phosphorylierten Peptiden und dem multiphosphorylierten Peptid im vergrößerten Ausschnitt (rechts oben)

In Tabelle 3 sind die phosphorylierten Peptide des tryptisch abgebauten Tau Proteins, die durch Chip-ESI-FTICR-MS Messungen nach on-line Entsalzung der Probe direkt auf dem Chip (Abb. 6) erhalten wurden, wiedergegeben. Es ergab sich eine Massenabweichung der experimentell ermittelten Werte von den Werten der Datenbank (www.matrixscience.com) in einem Bereich von 1 bis 90 ppm.

Tabelle 3: Übersicht über die phosphorylierte Peptide, die durch Chip-ESI-FTICR-MS (unter Verwendung der „Online Desalting“-Methode) ermittelt wurden, mit der Anzahl an Phosphatgruppen und der Massenabweichung der experimentellen Werte von den theoretischen Werten

tryptisches Peptid	P	M.W. in Da	Δm in ppm
$[^{639}C\text{-}^{660}K]^{6+}$	1	391.29	70
$[^{616}H\text{-}^{638}K]^{6+}$	1	413.28	25
$[^{560}Q\text{-}^{574}K]^{4+}$	1	433.22	58
$[^{635}V\text{-}^{657}K]^{5+}$	1	483.02	44
$[^{131}V\text{-}^{164}R]^{6+}$	1	605.42	89
$[^{216}E\text{-}^{236}K]^{4+}$	1	610.62	20
$[^{572}N\text{-}^{576}K]^{+}$	1	655.39	14
$[^{577}I\text{-}^{584}K]^{+}$	2	1021.08	28
$[^{713}S\text{-}^{755}K]^{4+}$	1	1102.27	1
$[^{512}S\text{-}^{538}R]^{2+}$	7	1622.50	28

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse, die aus den FTICR-MS Messungen (Abb. 4 bis 6) zu den Phosphorylierungen des Tau Proteins erhalten wurden, zusammengefasst.

Ein Teil der mittels FTICR-MS identifizierten phosphorylierten Peptide und Phosphorylierungsstellen sind in den Datenbanken (www.expasy.org, www.ncbi.nlm.nih.gov) aufgeführt, d.h. die in Tabelle 4 hervorgehobenen Phosphorylierungsstellen sind aus der Literatur bereits bekannt. Die anderen Phosphorylierungsstellen und die entsprechenden phosphorylierten Peptide konnten mittels MALDI- und ESI-FTICR-MS identifiziert werden.

Tabelle 4: Mittels FTICR-MS identifizierte phosphorylierte, tryptische Peptide des Tau Proteins (Tabelle 1-3) mit der jeweiligen Anzahl an Phosphorylierungen und den zugeordneten Phosphorylierungsstellen aus der Datenbank (www.expasy.org) (Abb. 3); hervorgehobene Phosphorylierungsstelle sind aus der Literatur bereits bekannt

Phosphorylierten tryptische Peptide	M.W./ kDa	Anzahl an HPO_4	Phosphorylierungs-stellen
$[^{131}V\text{-}^{164}R]^{6+}$	605.42	1	
$[^{216}E\text{-}^{236}K]^{4+}$	610.62	1	
$[^{223}D\text{-}^{256}K]^{+}$	1646.87	2	
$[^{275}V\text{-}^{291}R]^{+}$	1777.77	1	
$[^{314}E\text{-}^{324}R]^{+}$	1372.53	1	S^{318}
$[^{339}G\text{-}^{357}K]^{2+}$	1039.52	1	
$[^{357}Q\text{-}^{374}K]^{+}$	1979.86	1	S^{369}
$[^{414}L\text{-}^{448}R]^{+}$	3938.89	5	
$[^{441}H\text{-}^{455}K]^{+}$	1621.88	2	
$[^{441}H\text{-}^{455}K]^{+}$	1700.89	3	
$[^{512}S\text{-}^{528}R]^{+}$	1717.97	1	
$[^{512}S\text{-}^{528}R]^{+}$	2036.85	5	
$[^{512}S\text{-}^{528}R]^{+}$	2116.93	6	
$[^{512}S\text{-}^{538}R]^{2+}$	1622.50	7	S^{515}, S^{516}, S^{519}, T^{522}, T^{529}, T^{531}, T^{534}
$[^{560}Q\text{-}^{574}K]^{4+}$	433.22	1	T^{562}
$[^{572}N\text{-}^{576}K]^{+}$	655.39	1	S^{575}
$[^{577}I\text{-}^{584}K]^{+}$	1021.08	2	S^{579}, T^{580}
$[^{577}I\text{-}^{591}K]^{+}$	1603.87	1	S^{579}
$[^{599}L\text{-}^{611}K]^{+}$	1619.87	3	S^{602}, S^{606}, S^{610}
$[^{616}H\text{-}^{638}K]^{6+}$	413.28	1	S^{622}
$[^{635}V\text{-}^{657}K]^{5+}$	483.02	1	S^{641}
$[^{639}C\text{-}^{660}K]^{6+}$	391.29	1	S^{641}
$[^{667}V\text{-}^{686}K]^{+}$	2181.75	2	S^{670}, S^{673}
$[^{701}A\text{-}^{712}K]^{+}$	1411.59	1	T^{703}
$[^{713}S\text{-}^{755}K]^{4+}$	1102.27	1	

Ein Teil der in Tabelle 4 aufgeführten Peptide wurde durch Festphasen-Peptidsynthese (siehe Tabelle 6) hergestellt und mittels FTICR-MS (siehe Kap. 2.1.2.2.1) analysiert. Nach dem Reinigen der Peptide mit RP-HPLC (Reverse Phase HPLC) wurden diese in Phosphorylierungsreaktionen unter Verwendung verschiedener Kinasen eingesetzt (siehe Kap. 2.1.2.2.2).

2.1.1. Dephosphorylierungs- und Phosphorylierungsreaktionen am Tau Protein

2.1.1.1. Dephosphorylierung des Tau Proteins unter Verwendung verschiedener Phosphatasen

Für die Dephosphorylierungsreaktionen von Tau Protein wurden zwei unterschiedliche Phosphatasen (Alkaline Phosphatase und λ-Phosphatase) eingesetzt. Tau Protein wurde für die Reaktion mit Alkaline Phosphatase und λ-Phosphatase in den entsprechenden Puffersystemen (NEBuffer für Alkaline Phosphatase:100 mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1mM DTT, pH 7.9; λ-PPase-Puffer für λ-Phosphatase: 50mM Tris-HCl, 0.1 mM Na_2EDTA, 5 mM DTT, 0.01% Brij 35, pH 7.5)), die genau auf die Phosphatasen abgestimmt waren, gelöst. Die Dephosphorylierung mit Alkaline Phosphatase wurde bei 37˚C in 60 min durchgeführt. Die Reaktion mit λ-Phosphatase erfolgte bei 30˚C für 120 min. Anschließend wurden die Reaktionsgemische unter Verwendung von 1D-Gelelektrophorese mittels SDS-PAGE getrennt. Zum Vergleich wurde das Edukt (Tau Protein) auf das gleichen 1D-Gel aufgetragen und zusammen mit den Reaktionsgemischen getrennt.

Abb. 7 zeigt das 1D-Gel mit den getrennten Isoformen des Tau Proteins vor und nach den Dephosphorylierungsreaktionen. Zur Identifizierung der einzelnen Proteine und deren Phosphorylierungen wurden die in Abb. 7 gekennzeichneten Banden (C1-C4, L1-L5, A1-A6) ausgeschnitten und mittels Trypsin abgebaut. Nach dem anschließenden Entsalzen der erhaltenen Peptidgemische wurden diese mittels MALDI-FTICR-MS analysiert und durch Datenbanksuche (www.matrixscience.com) die Proteine und deren Phosphorylierungen identifiziert.

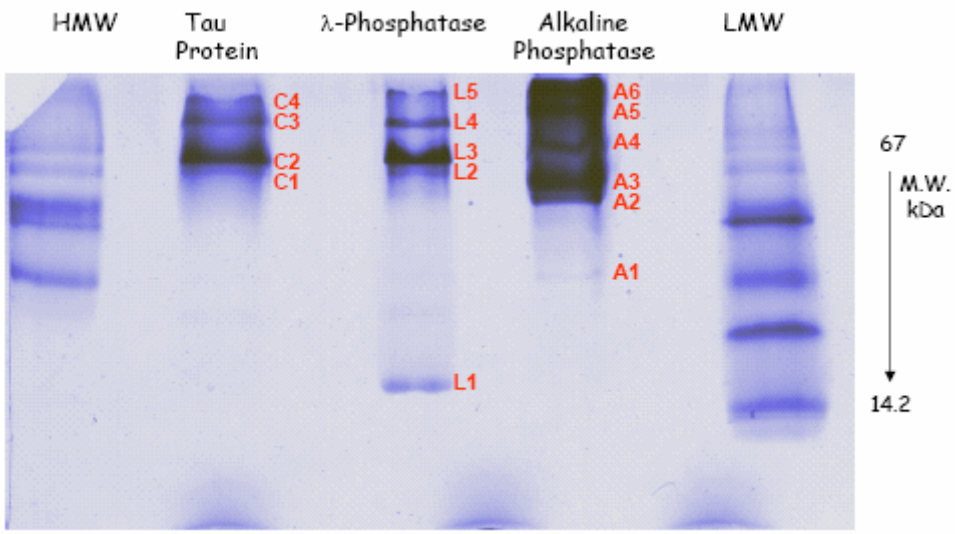


Abb. 7: 1D-Gel der Dephosphorylierungsreaktionsprodukte des Tau Proteins mit λ-PPase und Alkaline PPase: zum Vergleich wurde das Edukt Tau Protein mit aufgetragen, die gekennzeichneten Banden (C1-C4, L1-L5, A1-A6) wurden für die Identifizierung mit MALDI-FTICR-MS ausgeschnitten und tryptisch abgebaut

In Abb. 8 ist das MALDI-FTICR-Massenspektrum des tryptischen Peptidgemisches aus der 1D-Gelbande C2 (siehe Abb. 7), die durch Datenbanksuche (www.matrixscience.com) als Splice Isoform Tau-F identifiziert werden konnte, dargestellt. Bei diesem Experiment konnten drei phosphorylierte Peptide V(543-551)K mit einer Phosphorylierung und einem Molekulargewicht von 1046,51 Da, H(441-455)K mit drei Phosphorylierungen und einem Molekulargewicht von 1700,93 Da und S(512-528)R mit fünf Phosphorylierungen und einem Molekulargewicht von 2036,37 Da durch Vergleich der experimentellen mit den berechneten Werten identifiziert werden.

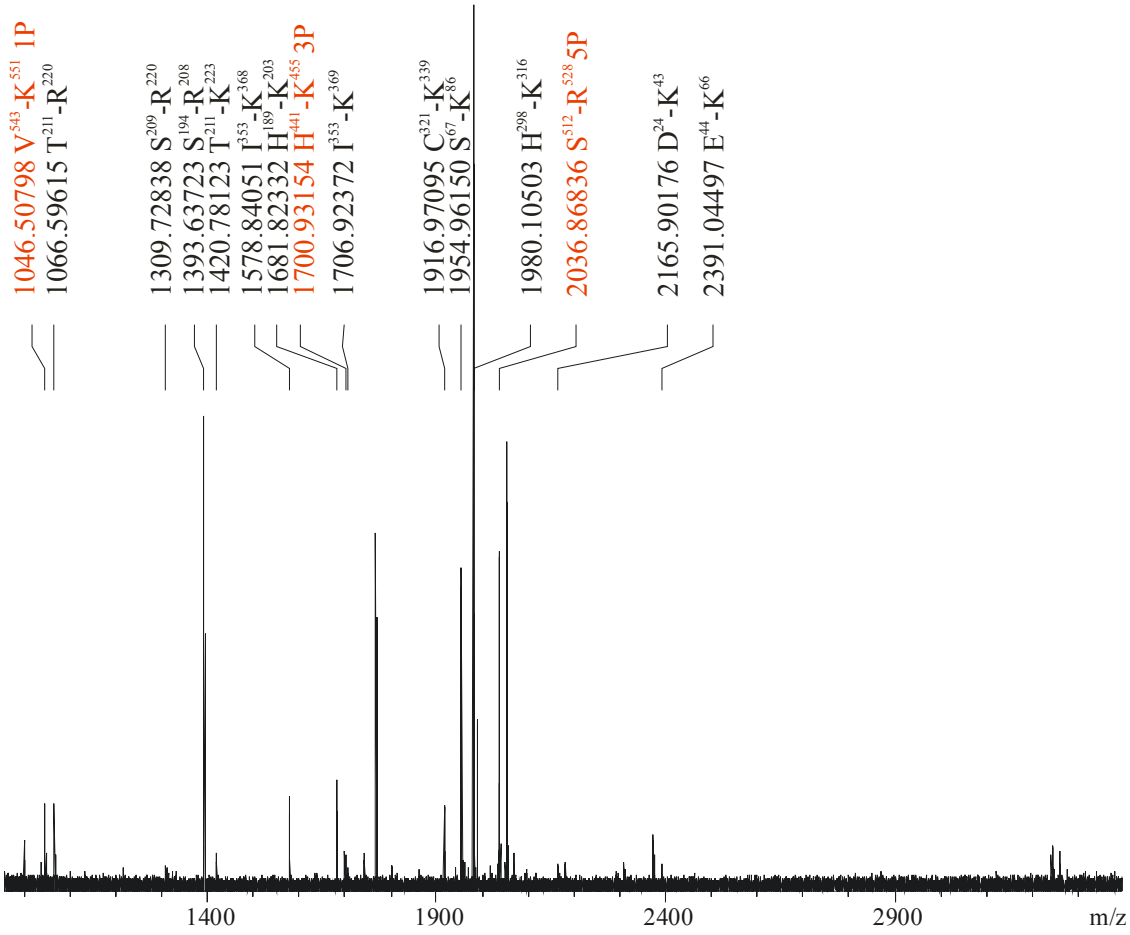


Abb. 8: MALDI-FTICR Massenspektrum des tryptischen Peptidgemisches aus der 1D-Gelbande C2 (Edukt) (siehe Abb. 7) identifiziert als Splice isoform Tau-F (www.matrixscience.com) mit drei zugeordneten phosphorylierten Peptiden: V(543-551)K mit einer Phosphorylierung, H(441-455)K mit drei Phosphorylierungen und S(512-528)R mit fünf Phosphorylierungen

Abb. 9 zeigt das MALDI-FTICR Massenspektrum der 1D-Gelbande A5 mit Alkaline PPase behandelt, die ebenfalls wie Gelbande C2 (Abb. 8) als Splice Isoform Tau-F (www.matrixscience.com) identifiziert wurde. Aus dem tryptischen Peptidgemisch konnten zwei phosphorylierte Peptide H(441-455)K mit drei Phosphorylierungen und S(512-528)R mit fünf Phosphorylierungen zugeordnet werden. Diese beiden Peptide konnten auch in dem entsprechenden Edukt aus der Gelbande C2 nachgewiesen werden.

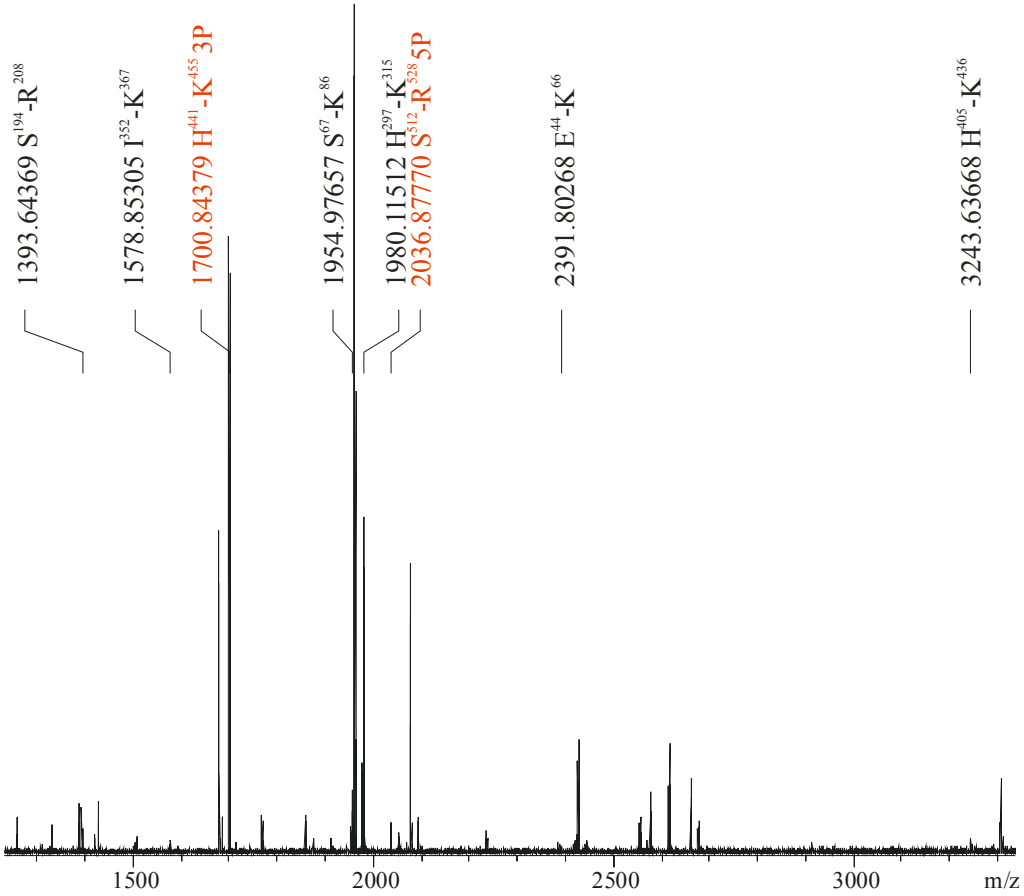


Abb. 9: MALDI-FTICR-MS des tryptischen Peptidgemisches aus der 1D-Gelbande A5 behandelt mit Alkaline PPase (siehe Abb. 7) identifiziert als Splice isoform Tau-F (www.matrixscience.com) mit zwei zugeordneten phosphorylierten Peptiden: H(441-455)K mit drei Phosphorylierungen und S(512-528)R mit fünf Phosphorylierungen

Demzufolge konnte ein Peptid V(543-551)K, das im Edukt (C2) eine Phosphorylierung trug, mittels Alkaline Phosphatase dephosphoryliert werden. Leider konnte das entsprechende dephosphorylierte Peptid im Massenspektrum von A5 (Abb. 9) nicht gefunden werden. Dies kann möglicherweise auf eine unvollständige Elution der tryptischen Peptide aus dem Gelstück zurückgeführt werden. Entsprechendes lässt sich auch für die Gelbanden A4 und A6, die beide als Spliced Isoform Tau-F identifiziert werden konnten, feststellen (siehe Tabelle 5). Auch bei diesen Proteinen konnte das Peptid V(543-551)K, das im Edukt (C2) eine Phosphorylierung trug, dephosphoryliert

werden. Auch hier war es nicht möglich, das entsprechende dephosphorylierte Peptid im MALDI-FTICR Massenspektrum nachzuweisen.

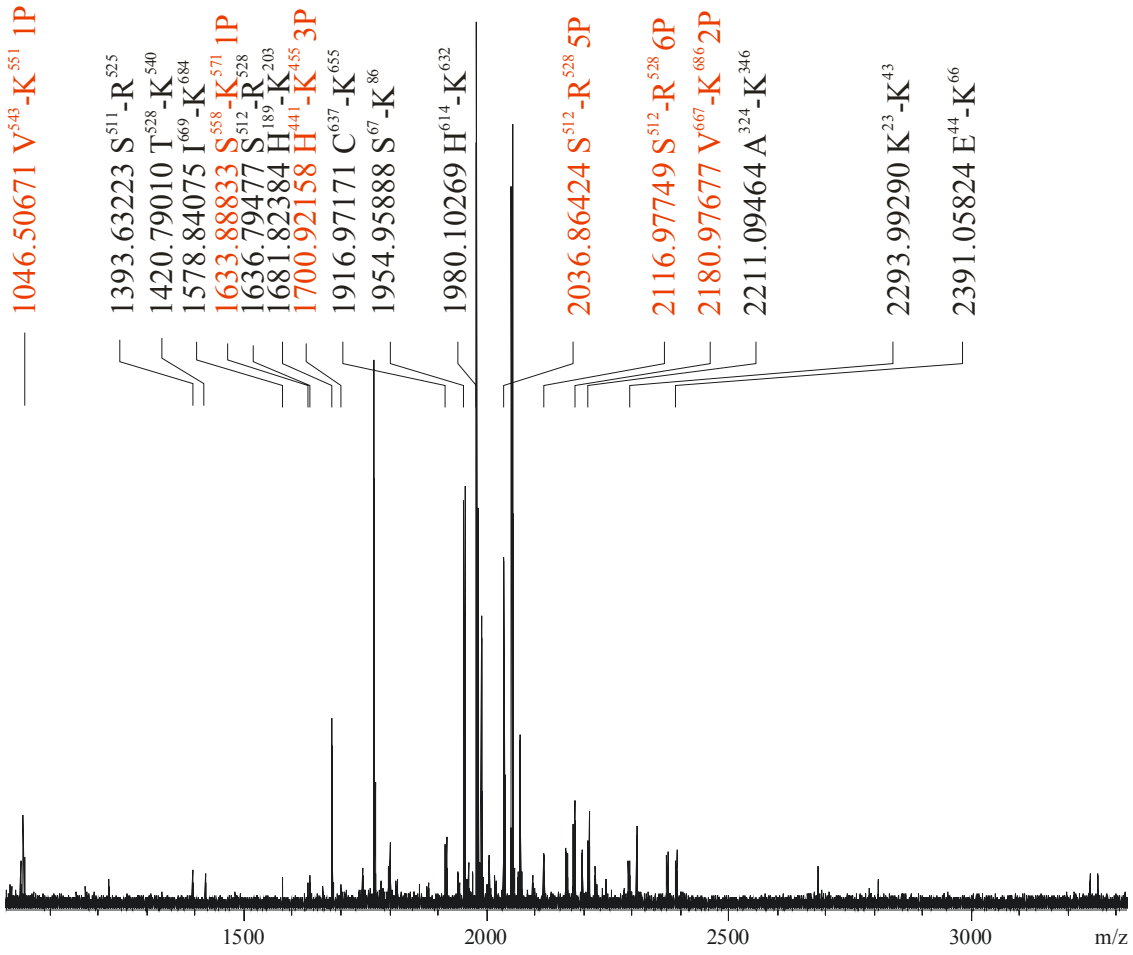


Abb. 10: MALDI-FTICR-MS des tryptischen Peptidgemisches aus der 1D-Gelbande C3 (Edukt) (siehe Abb. 7) identifiziert als Splice isoform PNS-Tau mit sechs zugeordneten phosphorylierten Peptiden: V(543-551)K mit einer Phosphorylierung, S(558-571)K mit einer Phosphorylierung, H(441-455)K mit drei Phosphorylierungen, S(512-528)R mit fünf Phosphorylierungen, S(512-528)R mit sechs Phosphorylierungen, V(667-686)K mit zwei Phosphorylierungen

In Abb. 10 ist das MALDI-FTICR Massenspektrum des tryptischen Peptidgemisches aus der Gelbande C3, die als Spliced Isoform PNS-Tau identifiziert wurde, dargestellt. In diesem Massenspektrum konnten die folgenden 6 phosphorylierten Peptide zugeordnet

werden: V(543-551)K mit einer Phosphorylierung (M.W. (molecular weight) = 1046,51 Da), S(558-571)K mit einer Phosphorylierung (M.W. = 1633,89 Da), H(441-455)K mit drei Phosphorylierungen (M.W. = 1700,93 Da), S(512-528)R mit fünf Phosphorylierungen (M.W. = 2036,86 Da) und sechs Phosphorylierungen (M.W. = 2116,98 Da) und Peptid V(667-686)K mit zwei Phosphorylierungen (M.W. = 2180,98 Da) nachgewiesen werden.

Das MALDI-FTICR-MS Spektrum des tryptischen Peptidgemisches aus der Gelbande L2 (behandelt mit λ-PPase), das als Splice Isoform PNS-Tau (www.matrixscience.com) identifiziert werden konnte, ist in Abb. 11 dargestellt. Zwei phosphorylierte Peptide (S(512-528)R mit fünf Phosphorylierungen, V(667-686)K mit zwei Phosphorylierungen) konnten direkt identifiziert und zugeordnet werden. Dieses Protein konnte auch in der Gelbande C3 des Eduktes mit sechs phosphorylierten Peptiden identifiziert werden. Demzufolge konnten vier phosphorylierte Peptide mittels λ-Phosphatase teilweise, wie z.B. S(512-528)R, das eine Phosphorylierung verlor und statt sechs nur noch fünffach phosphoryliert vorlag, dephosphoryliert werden. Dabei wurde eine vollständige Dephosphorylierung am Peptid H(441-455)K mit ursprünglich drei Phosphorylierungen im Edukt der Gelbande C3 (Abb. 10) erreicht (siehe Tabelle 5).

Die folgenden drei phosphorylierte Peptide: V(543-551)K mit einer Phosphorylierung (M.W. = 1046,51 Da), S(558-571)K mit einer Phosphorylierung (M.W. = 1633,89 Da) und H(441-455)K mit drei Phosphorylierungen (M.W. = 1700,93 Da) wurden vollständig dephosphoryliert. Die entsprechenden unphosphorylierten Peptide konnten jedoch im MALDI-FTICR Massenspektrum (Abb. 11) nicht detektiert werden. Von dem 6-fach phosphorylierte Peptid S(512-528)R mit der molekularen Masse von 2116,98 Da aus dem Edukt L2 (Abb. 10) wurde nur eine Phosphorylierungsstelle dephosphoryliert, denn das gleiche Peptid mit 5-facher Phosphorylierung und einem Molekulargewicht von 2036,88 Da konnte im Protein aus der Bande L2 identifiziert werden. Ähnliche Ergebnisse konnte auch bei der Gelbande L4, identifiziert als Splice isoform PNS-Tau, erhalten werden (siehe Tabelle 5). Auch in diesem Fall wurden die gleichen phosphorylierte Peptide, die im entsprechenden Edukt C3 gefunden wurden, dephosphoryliert. In dem tryptischen

Peptidgemisch der Gelbande L3 behandelt mit λ-PPase, auch identifiziert als Splice isoform PNS-Tau, konnte ein Grossteil der im entsprechenden Edukt C3 zugeordneten phosphorylierte Peptide mit einer geringeren Intensität wiedergefunden werden. Nur das 6-fach phosphorylierte Peptid S(512-528)R aus C3 wurde zum 5-fach phosphorylierten Peptid dephosphoryliert.

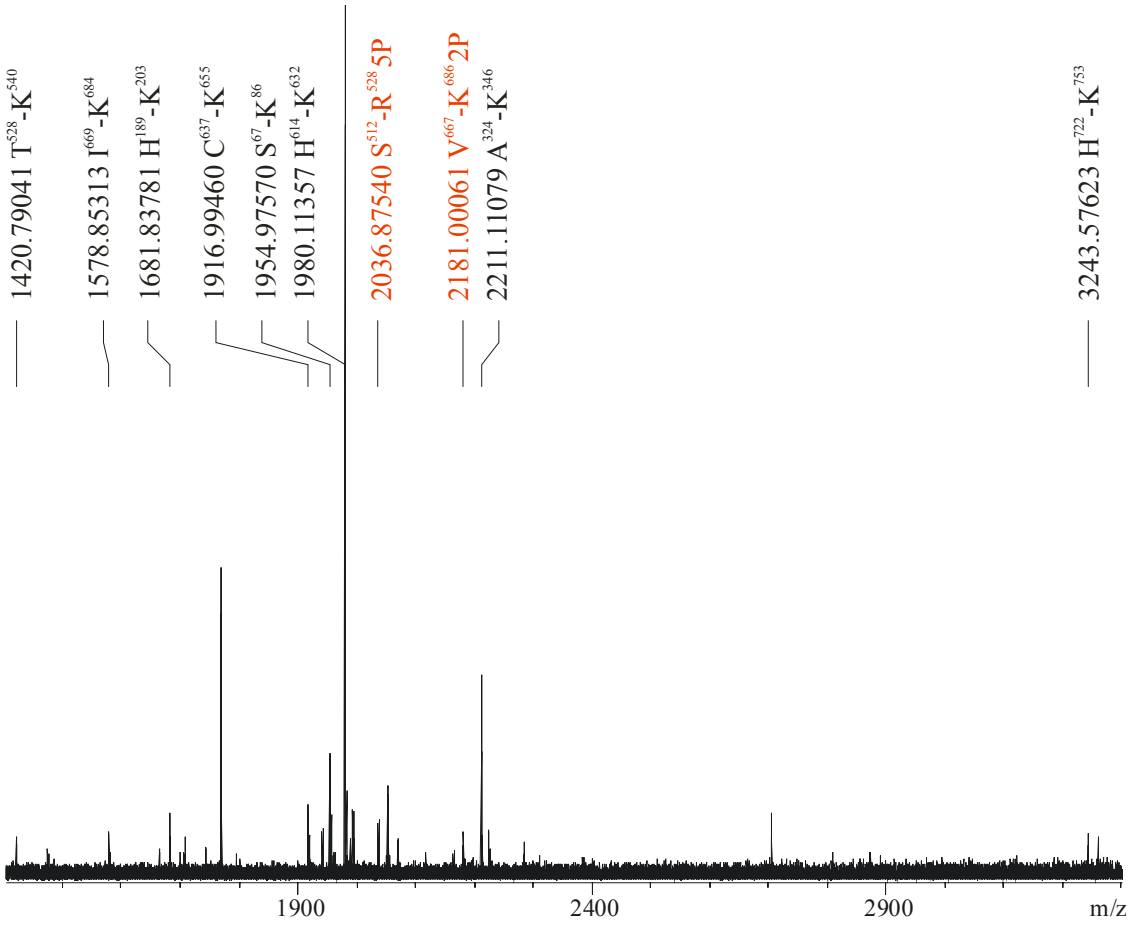


Abb. 11: MALDI-FTICR Massenspektrum der 1D-Gelbande L2 behandelt mit λ-PPase (siehe Abb. 7) identifiziert als Splice isoform PNS-Tau (www.matrixscience.com) mit zwei zugeordneten phosphorylierten Peptiden: S(512-528)R mit fünf Phosphorylierungen, V(667-686)K mit zwei Phosphorylierungen

Tabelle 5: Mittels MALDI-FTICR-MS und Datenbanksuche (www.matrixscience.com) identifizierte Proteine mit Phosphorylierungsstellen

Band	Identifizierte Proteine	Phosphorylierte Peptide
C1	Splice isoform PNS-Tau	H^{441}-K^{455} 3P
C2	Splice isoform Tau-F	V^{543}-K^{551} 1P H^{441}-K^{455} 3P S^{512}-R^{528} 5P
C3	Splice isoform PNS-Tau	V^{543}-K^{551} 1P S^{558}-K^{571} 1P H^{441}-K^{455} 3P S^{512}-R^{528} 5P S^{512}-R^{528} 6P V^{667}-K^{686} 2P
L2	Splice isoform PNS-Tau	S^{512}-R^{528} 5P V^{667}-K^{686} 2P
L3	Splice isoform PNS-Tau	V^{543}-K^{551} 1P S^{558}-K^{571} 1P H^{441}-K^{455} 3P S^{512}-R^{528} 5P V^{667}-K^{686} 2P
L3	Splice isoform PNS-Tau	V^{543}-K^{551} 1P S^{558}-K^{571} 1P H^{441}-K^{455} 3P S^{512}-R^{528} 5P V^{667}-K^{686} 2P
L4	Splice isoform PNS-Tau	S^{512}-R^{528} 5P V^{667}-K^{686} 2P
A4	Splice isoform Tau-F	H^{441}-K^{455} 3P S^{512}-R^{528} 5P
A5	Splice isoform Tau-F	H^{441}-K^{455} 3P S^{512}-R^{528} 5P
A6	Splice isoform Tau-F	H^{441}-K^{455} 3P S^{512}-R^{528} 5P V^{667}-K^{686} 2P

P - Phosphatgruppe (HPO_3)

Eine vollständige Dephosphorylierung des Proteins mit den beiden eingesetzten Phosphatasen konnte nicht erreicht werden. Mittels der durchgeführten Experimente konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil der phosphorylierten Peptide dephosphoryliert werden konnte (Tabelle 5). In Tabelle 5 sind alle mit Hilfe der Datenbank Mascot (www.matrixscience.com) identifizierten Proteine und deren Phosphorylierungsstellen in den tryptischen Peptiden zusammengefasst (Abb. 8-11). Es

war nicht möglich, alle in Abb. 7 gekennzeichneten 1D-Gelbanden zu identifizieren. Dies könnte auf aufgetretene Modifikationen der einzelnen Peptide aus den tryptischen Gemischen oder eine unvollständige Elution der Gemische aus den Gelstücken zurückzuführen sein.

2.1.1.2. Phosphorylierung von Partial-Peptiden des Tau Proteins mittels verschiedener Kinasen

2.1.1.2.1. Synthese und Charakterisierung von Tau Peptiden

Für weitere Untersuchungen wurde ein Teil der in Tabelle 4 aufgeführten phosphorylierte Peptide des Tau Proteins mittels Festphasensynthese hergestellt (Tabelle 6). Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden mittels Festphasenpeptidsynthese in einem semi-automatischen Peptidesynthesizer EPS 221 (Intavis, Deutschland) nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie [153] mit Ansätzen von 5 mM bzw. 50 mM synthetisiert. Alle Peptide wurden am C-Terminus als Amid an ein NovaSyn®TGR-Harz (Novabiochem), das als Trägermaterial verwendet wurde, synthetisiert.

Tabelle 6: Zusammenfassung der mittels Festphasensynthese hergestellten nicht-phosphorylierte und phosphorylierte Partial-Peptide des Tau Proteins (siehe Tabelle 4) mit den theoretischen und den experimentellen $[MH]^+$-Werten und den Retentionszeiten der RP-HPLC bei einer Absorptionswellenlänge von 220 nm

Partial-Peptide des Tau Proteins	**$[MH]^+_{calc}$**	**$[MH]^+_{exp}$**	**Retentionszeit [min]**
^{314}EQAHSEEHLGR^{324}	1291,35	1290,73	13,59
^{314}EQAH**S**EEHLGRA^{325}	1442,59	1442,62	-
^{701}AKTDHGAEIVYK^{712}	1329,70	1330,69	19,44
^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524}	1149,18	1152,08	16,28
^{382}SKDGTGSDDKKAKTSTR^{398}	1780,89	1780,92	-

Die synthetischen Peptide wurden nach der Synthese mittels RP-HPLC gereinigt.[154] Mittels Reverse-Phase-Liquid-Chromatography (RP-HPLC – High performance liquid

chromatography) können die Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobie getrennt werden. Die stationäre Phase in der reversen Phase besitzt eine sehr stark hydrophobe oder unpolare Oberfläche. Die mobile Phase, meistens Wasser, ist dagegen polar. Die unpolaren oder hydrophoben Moleküle binden vorzugsweise an die stationäre Phase, während die polaren Moleküle in der mobilen Phase verbleiben. Die stationäre Phase in der RP-HPLC besteht zumeist aus Silikagel mit gebundenen Hydrocarbonketten (C4, C8, C18). Anschließend wurden die Peptide unter Verwendung von MALDI-TOF-MS analysiert und deren Reinheit untersucht. Die HPLC-Chromatogramme und MALDI-TOF Massenspektren der synthetischen Peptide sind in Abb. 12,16-18 dargestellt.

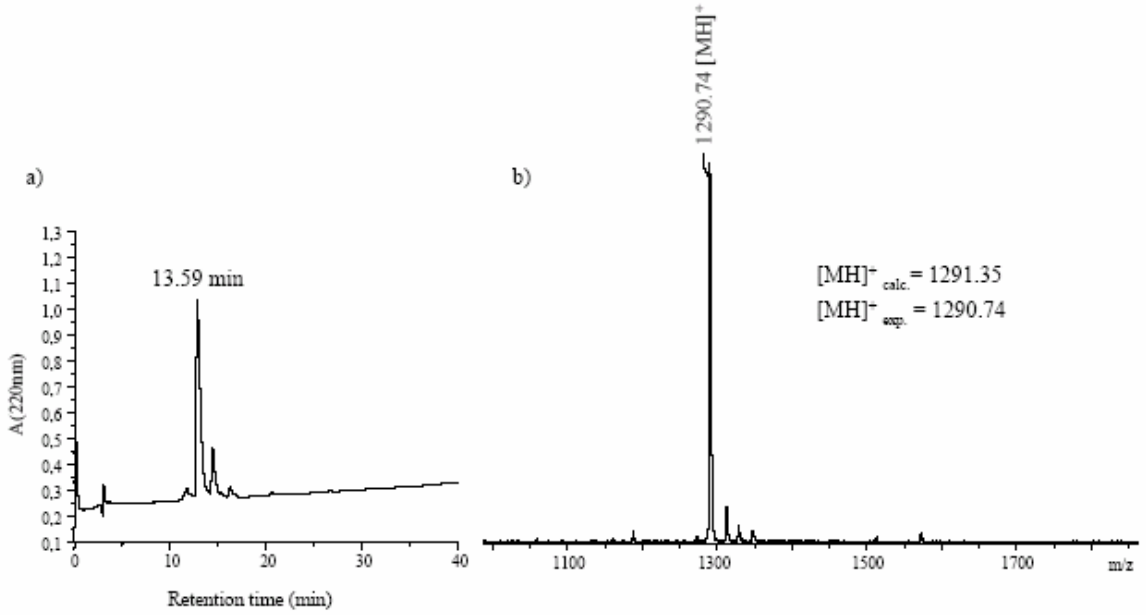


Abb. 12: a) RP-HPLC-Chromatogramm und b)MALDI-TOF-MS der Sequenz von Tau (314-324) ^{314}EQAHSEEHLGR^{324}

In Abb. 12a ist das RP-HPLC-Chromatogramm des Tau Peptides ^{314}EQAHSEEHLGR^{324} gezeigt, wobei das Peptid bei der Detektionswellenlänge von 220 nm eine Retentionszeit von 13,59 min aufwies. Das Peptid E(314-324)R mit dem Molekulargewicht von 1290,74 Da ist im MALDI-TOF Massenspektrum in Abb. 12b dargestellt. Das Peptid wurde nach der Reinigung mittels RP-HPLC lyophilisiert und für weitere

massenspektrometrische Untersuchungen, Fragmentierungen[155] und Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt.

Mittels nano-ESI-FTICR-MS wurde das Peptid analysiert und fragmentiert. Abb. 13 zeigt das isolierte zweifach positiv geladene Ion, das als „Parent ion“ für MS/MS eingesetzt wurde.

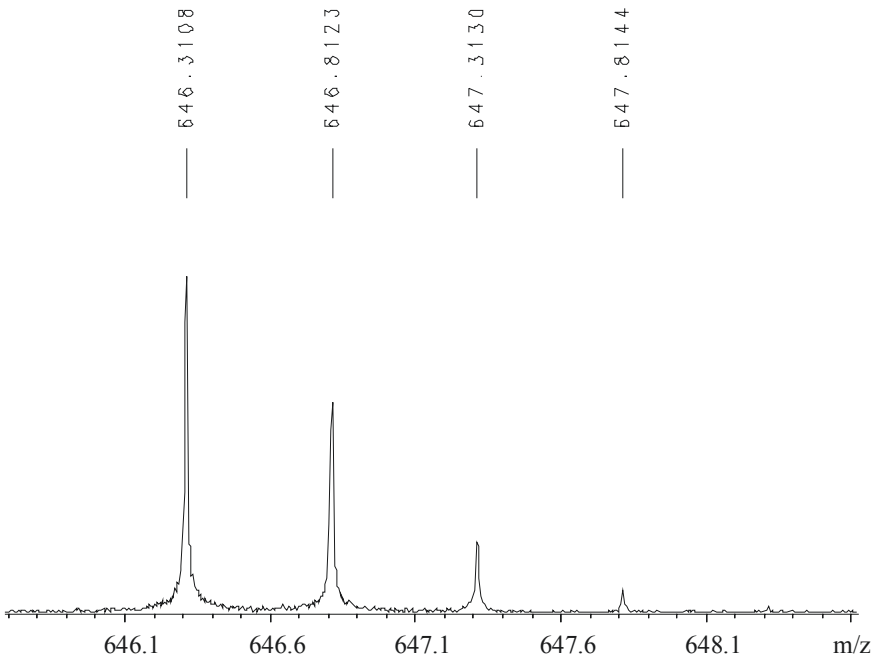


Abb. 13: $[M+H_2]^{2+}$-Ion des Tau-Peptids ^{314}EQAHSEEHLGR^{324} gemessen mittels Nano-ESI-FTICR-MS und verwendet als „Parent ion“ für MS/MS (Abb. 14)

Abb. 14 zeigt das MS/MS-Spektrum des Tau Peptids ^{314}EQAHSEEHLGR^{324}, das durch stoßinduzierte Fragmentierung des $[M+H_2]^{2+}$-Ion mit Argon (SORI-CID) erzeugt wurde.

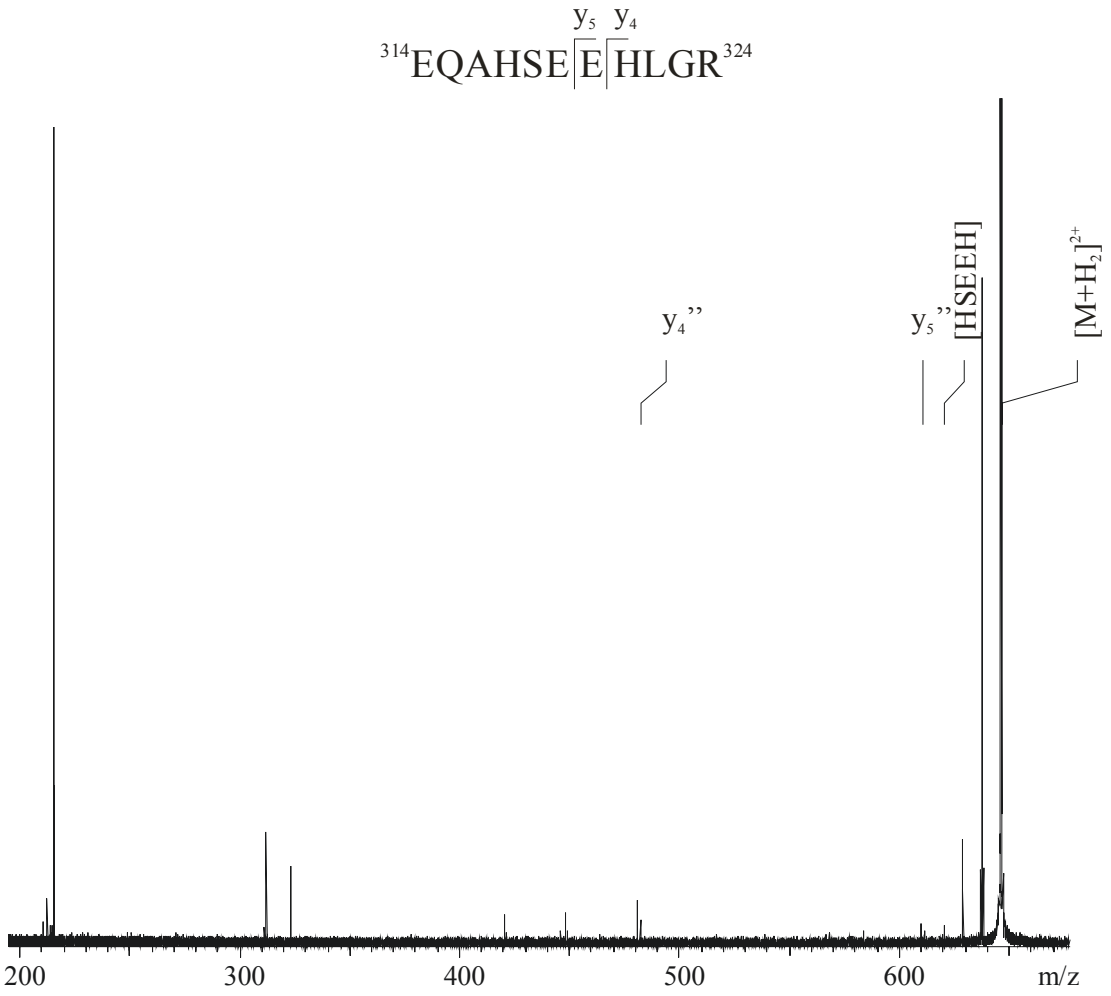


Abb. 14: ESI-FTICR-MS/MS mittels SORI-CID von Tau-Peptid ^{314}EQAHSEEHLGR^{324}

In Abb. 14 ist das mittels SORI-CID erzeugte MS/MS-Spektrum vom Tau Peptid ^{314}EQAHSEEHLGR^{324} dargestellt. Von diesem Peptid konnten zwei y-Ionen y_4^+ (^{320}HLGR^{324}) und y_5^+ (^{319}EHLGR^{324}) fragmentiert werden. Auch ein Bruchstück HSEEH aus der Mitte des Peptids wurde nachgewiesen. Die entsprechenden b-Ionen b_6 und b_7 konnten nicht identifiziert werden.

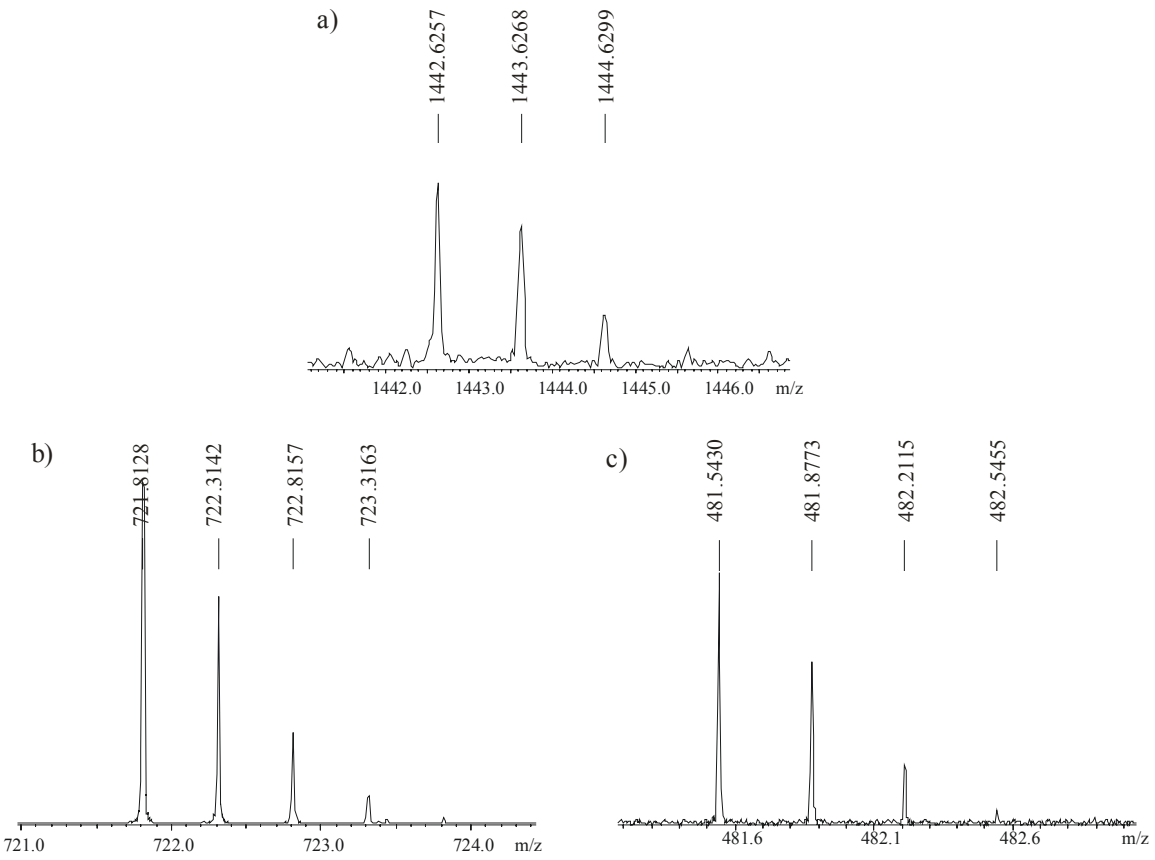


Abb. 15: ESI-FTICR Massenspektrum von dem phosphorpylierten Tau Peptid ^{314}EQAHSEEHLGRA^{325} a) $[MH]^+$, b) $[M+2H]^{2+}$, c) $[M+3H]^{3+}$

Ein Peptid wurde mit phosphoryliertem Serin synthetisiert. Das Peptid E(314-325)A, das eine Phosphorylierung am Serin ^{318}S enthält, hat eine molekulare Masse von 1442,59 Da. Dieses Peptid war mit Hilfe von Chip-ESI-FTICR-MS als einfach phosphoryliertes Peptid des Tau Proteins (Abb. 5) nachgewiesen wurden. Das synthetisierte einfach phosphorylierte Partial-Peptid E(314-325)A wurde mittels ESI-FTICR-MS analysiert. Das Ergebnis der massenspektrometrische Analyse ist in Abb. 15 dargestellt. Dabei konnte das einfach positiv geladene Ion, aber auch die mehrfach (zwei- und dreifach) geladenen Ionen des Peptids mit den Molargewichten von 721,81 Da für $[M+2H]^{2+}$ (Abb. 15b) und 481,54 Da für $[M+3H]^{3+}$ (Abb. 15c) im Massenspektrum identifiziert werden. Das $[MH]^+$-Ion des Peptids (Abb. 15a) mit der molekularen Masse 1442,43 Da wurde isoliert und mittels SORI-CID mit Argon stoßinduziert fragmentiert (siehe Abb. 16).

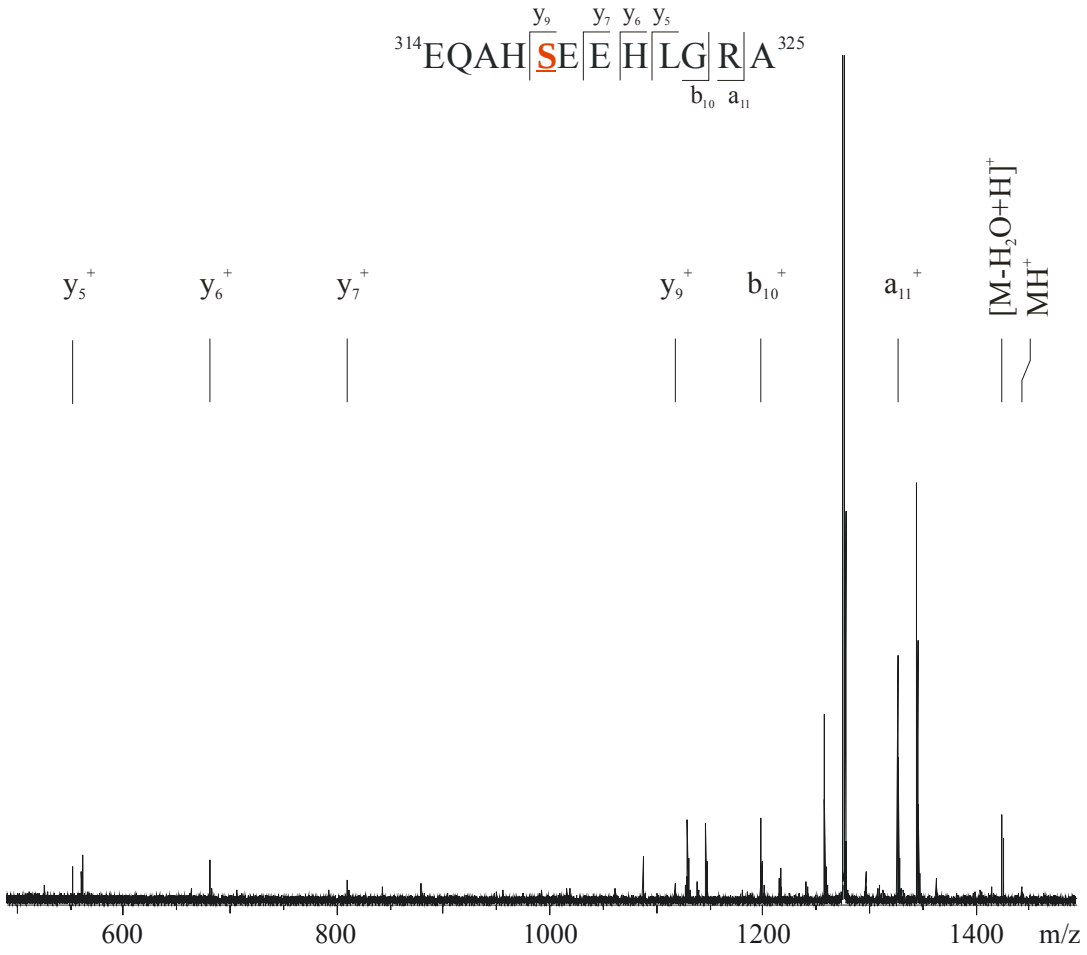


Abb. 16: ESI-FTICR-MS/MS vom einfach phosphorylierten Tau Peptid ^{314}EQAHSEEHLGRA^{325} (siehe Abb. 15a) unter Verwendung SORI-CID mit Ar als Stoßgas

Abb. 16 zeigt das ESI-FTICR-MS/MS Spektrum des phosphorylierten Tau Peptids ^{314}EQAHSEEHLGRA^{325} (siehe Abb. 15, Tabelle 6), das mittels SORI-CID erzeugt wurde. Das einfach positiv geladene Ion des Peptids (siehe Abb. 15a) wurde als „Parent ion“ für die Fragmentierung eingesetzt. Es konnten mittels SORI-CID mehrere y-Ionen erzeugt werden. Das y_9^+-Ion (^{318}SEEHLGRA^{325}), das Fragment, welches direkt am phosporylierten Serinrest ^{318}S gespalten wurde, konnte identifiziert werden. Zwei weitere Fragmentionen b_{10}^+ (^{314}EQAHSEEHLG^{323}) und a_{11}^+ (^{314}EQAHSEEHLGR^{324}) enthielten den phosphorylierten Serinrest.

Abb. 17a zeigt das Chromatogramm der RP-HPLC des Tau Peptides ^{701}AKTDHGAEIVYK^{712}. Dieses Peptid weist bei der Wellenlänge von 220 nm eine Retentionszeit von 19,44 min auf. Das Peptid wurde isoliert und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert (siehe Abb. 17b). Auch dieses Tau Peptid konnte mit großer Reinheit gewonnen und nach dem Lyophilisieren für weitere massenspektrometrische Untersuchungen und Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt werden.

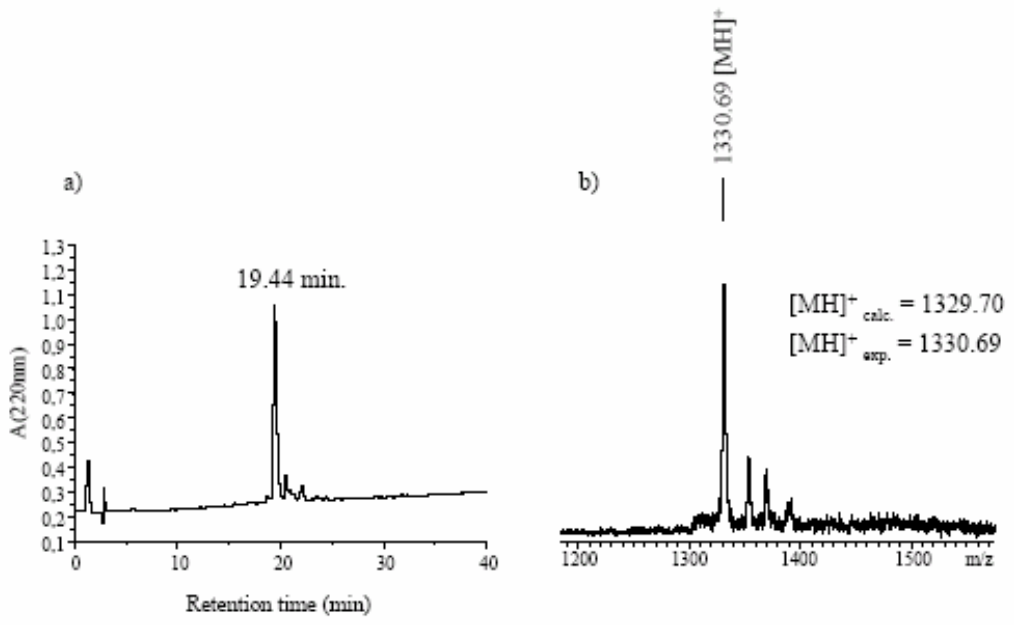


Abb. 17: (a) RP-HPLC-Chromatogramm erstellt bei der Absorptionswellenlänge von 220 nm und (b) MALDI-TOF-MS des Tau Peptids (701-712) ^{701}AKTDHGAEIVYK^{712} ($M.W._{theor.}$ = 1329,70 Da)

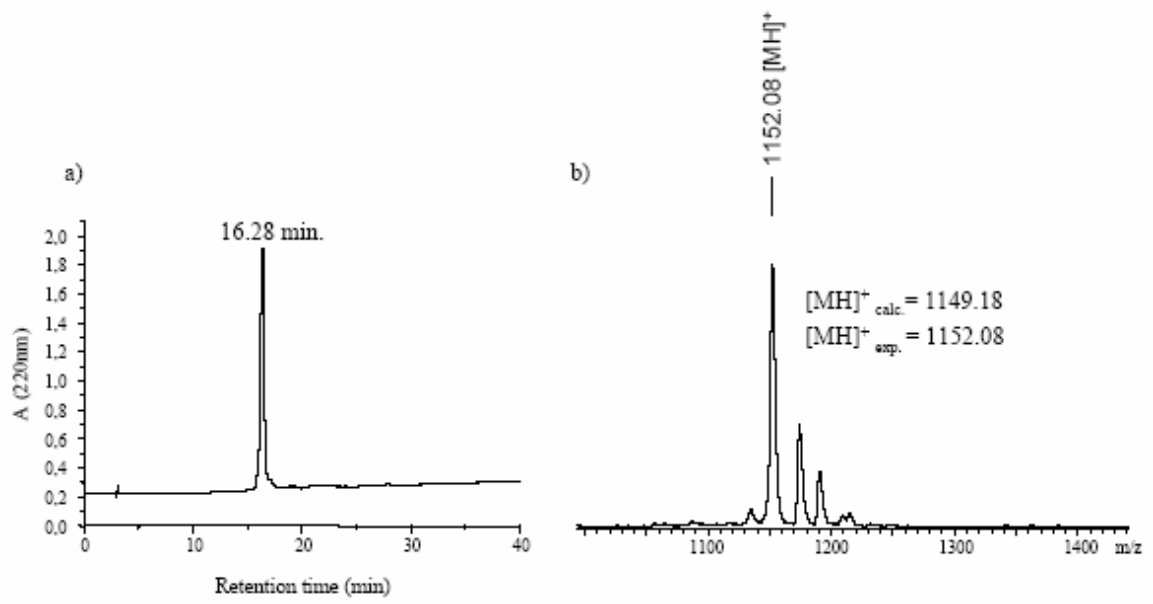


Abb. 18: (a) RP-HPLC-Profil und (b) MALDI-TOF-MS der Sequenz von Tau (512-524) ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524}

In Abb. 18a sind das RP-HPLC-Profil und in Abb. 18b das MALDI-TOF Massenspektrum des Tau Peptids ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524} dargestellt. Bei der Detektionswellenlänge von 220 nm bei der RP-HPLC hat das Peptid bei dem eingesetzten Gradienten (siehe Kap. 3.4.2) eine Retentionszeit von 16,28 min. Das Peptid konnte mit großer Reinheit gewonnen werden. Nach anschließender Lyophilisierung wurde das Peptid für weitere massenspektrometrische Untersuchungen und Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt.

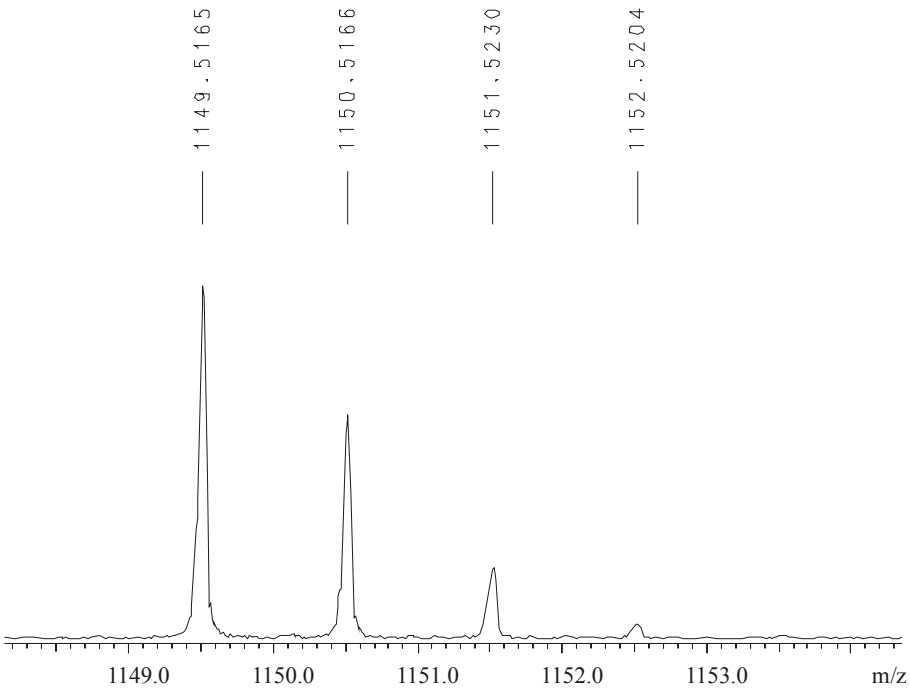


Abb. 19: $[MH]^+$-Ion des Tau-Peptids ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524} identifiziert mit Nano-ESI-FTICR-MS, dieses Ion wurde als „Parent ion“ für MS/MS (Abb. 20) unter Verwendung von SORI-CID zur Fragmentierung eingesetzt

Abb. 19 zeigt das Nano-ESI-FTICR-MS Spektrum des isolierten $[MH]^+$-Ions des synthetischen Tau Peptids ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524} (siehe Abb. 18, Tabelle 6). Dieses Peptid wurde zur Fragmentierung mit SORI-CID als „Parent ion“ eingesetzt. Der Peak des $[MH]^+$-Ions wurde für die Fragmentierung ausgewählt, weil er im Vergleich zu den Peaks der mehrfach geladenen Ionen des Peptids die größte Intensität aufwies. Das entsprechende Nano-ESI-FTICR-MS/MS Spektrum ist in Abb. 20 dargestellt.

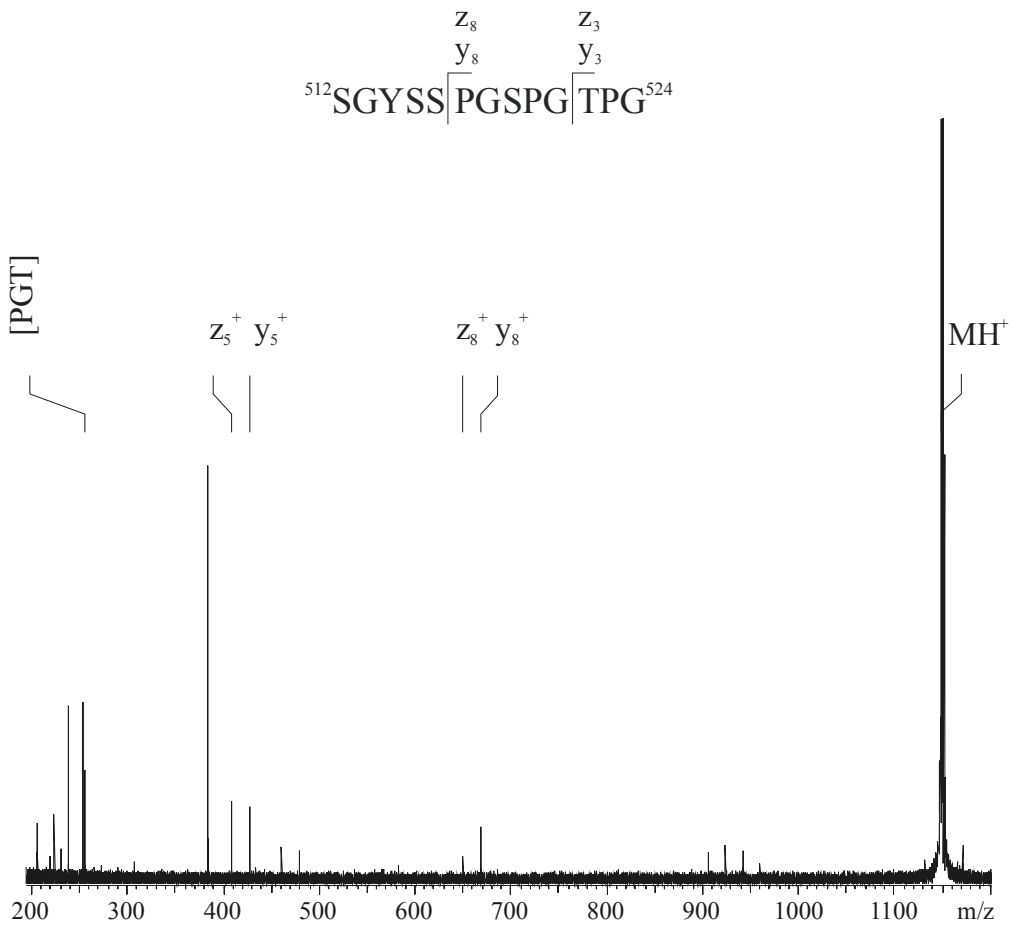


Abb. 20: Nano-ESI-FTICR-MS/MS von Tau-Peptid ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524} unter Verwendung des $[MH]^+$-Ions als „Parent ion“ (siehe Abb. 19) fragmentiert mittels SORI-CID mit Hilfe von Argon als Stoßgas

Ausgehend von dem $[MH]^+$-Ion des Tau Peptids ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524}, das für die Fragmentierung mittels SORI-CID eingesetzt wurde, konnten zwei y-Ionen y_5^+ und y_6^+ und zwei z-Ionen z_5^+ und z_6^+ und ein Peptidfragment ^{520}PGT^{522} erzeugt werden. Das mittels Nano-ESI-FTICR-MS/MS erhaltene Spektrum ist in Abb. 20 dargestellt.

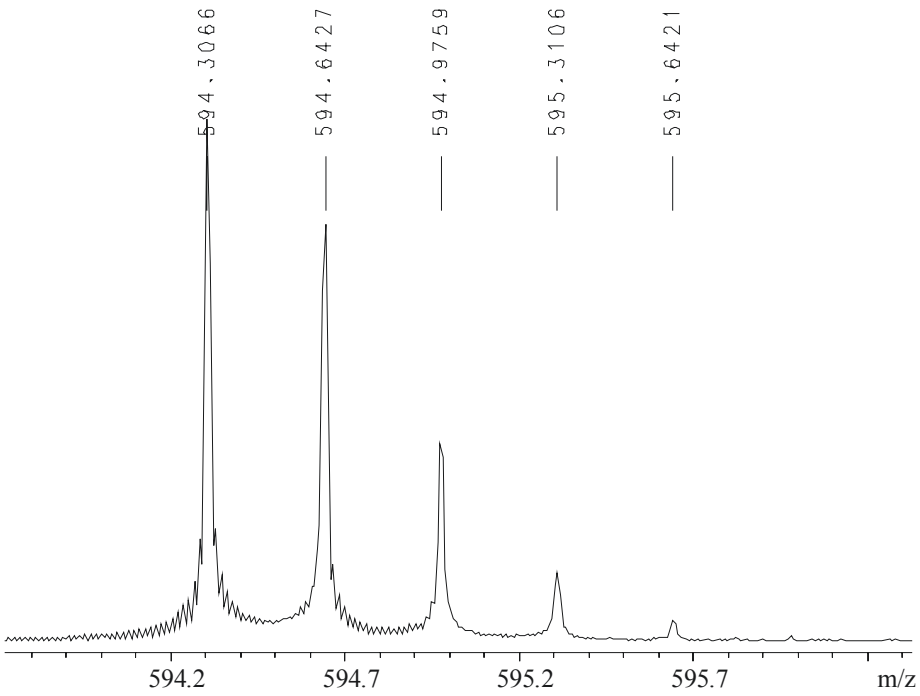


Abb. 21: $[M+H_3]^{3+}$-Ion des Tau-Peptids ^{382}SKDGTGSDDKKAKTSTR^{398} gemessen mittels Nano-ESI-FTICR-MS und verwendet als „Parent ion“ für MS/MS-Experimente (siehe Abb. 22)

Abb. 21 zeigt das $[M+H_3]^{3+}$-Ion des Tau Peptids ^{382}SKDGTGSDDKKAKTSTR^{398}, das mit Hilfe von Nano-ESI-FTICR-MS analysiert wurde. Dieses dreifach geladenen Ion hatte gegenüber den einfach und zweifach geladenen Ionen die höchste Ionenintensität und wurde deshalb als „Parent ion“ für MS/MS durch SORI-CID ausgewählt und entsprechend isoliert.

Das erhaltene MS/MS-Spektrum ist in Abb. 22 dargestellt. Mit Hilfe der SORI-CID-Methode konnte das Peptid in vier b-Ionen (b_2^+, b_3^+, b_8^+, b_9^+) und zwei y-Ionen (y_3^+, y_6^+) fragmentiert werden. Neben dem $(M+H_3)^{3+}$-Ion konnte durch Abspaltung von einem Wassermolekül noch ein $(M-H_2O+H_3)^{3+}$-Ion erzeugt werden.

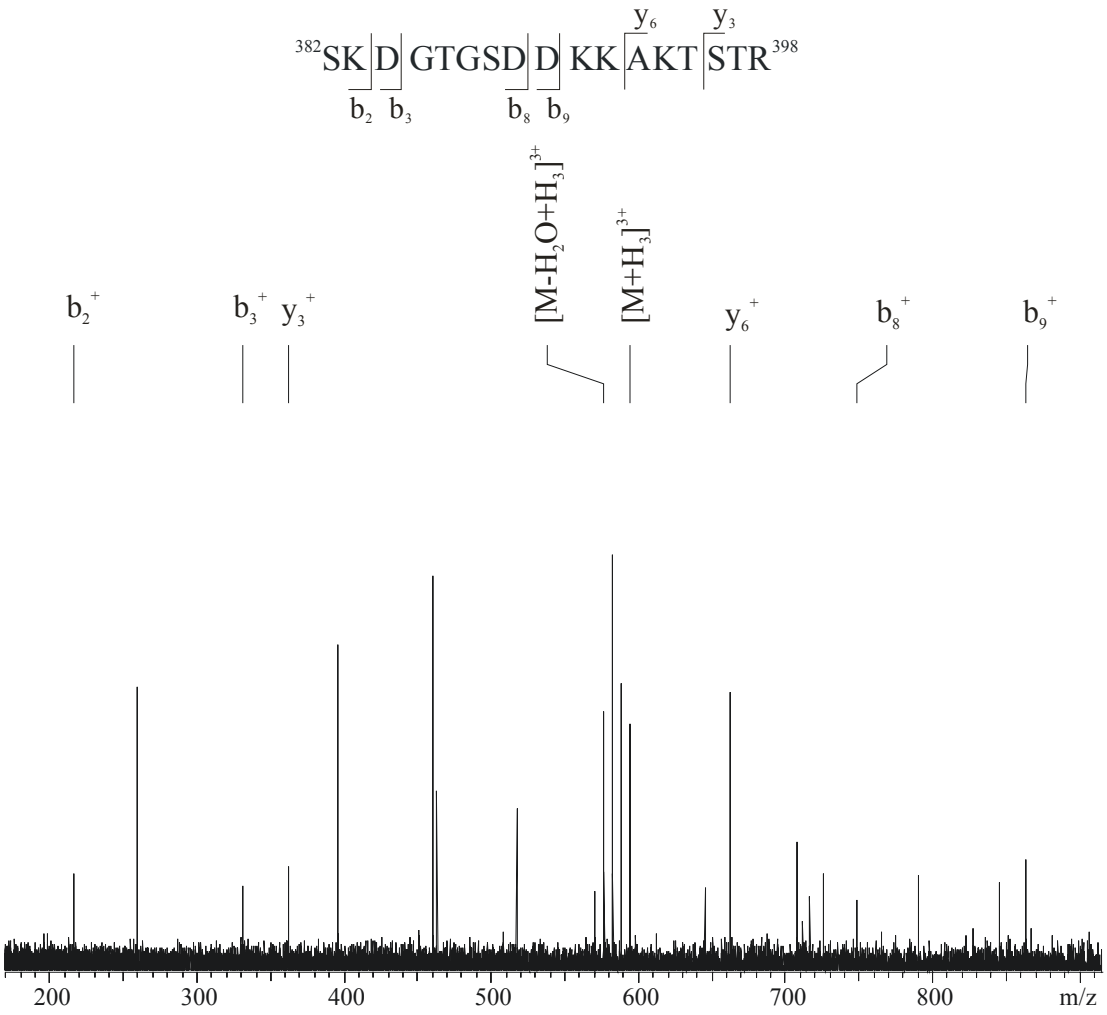


Abb. 22: Nano-ESI-FTICR-MS/MS mittels SORI-CID von Tau-Peptid ^{382}SKDGTGSDDKKAKTSTR^{398}

2.1.1.2.2. Phosphorylierung von Tau Peptiden mittels verschiedener Kinasen

Durch Phosphorylierungsreaktionen an verschiedenen synthetischen Peptiden des Tau Proteins (siehe Tabelle 2.6) wurde das Phosphorylierungsverhalten des Proteins untersucht. Bei diesen Reaktionen wurden verschiedene Phosphorkinasen, Cdc2 (cyclin-abhängige Proteinkinase), GSK3 (glycogen-synthase Kinase) und PKA (cAMP-abhänginge Proteinkinase), eingesetzt. Für die Phosphorylierungsreaktionen wurden die synthetischen Peptide des Tau Proteins in den jeweiligen Puffersystemen (Cdc2-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM EGTA, 0.01 % Brij

35, pH 7.5; GSK3-Puffer: 20 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM Dithiothreitol, pH 7.5; PKA-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.5) gelöst. Zu den in den jeweiligen Puffern gelösten Peptiden wurden eine Lösung von 200 µM ATP in MilliQ-Wasser und die entsprechende Kinase zugegeben. Dabei kann eine Einheit (Unit) der jeweiligen Kinase 1 pmol an Modellpeptid mit einer Phosphorylierungsstelle phosphorylieren. Die Reaktionen, die bei 30˚C durchgeführt wurden, wurden jeweils nach 15, 30, 60, 90 und 120 min gestoppt, indem ein Teil der Reaktionslösung (jeweils 5µl) entnommen wurde und auf 65˚C erhitzt wurde. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte massenspektrometrisch mit MALDI-TOF-MS analysiert.

Die Kinase GSK-3 ist eine Serin-/Threonin-Proteinkinase, die an Signaltransduktionskaskaden von multiplen zellularen Prozessen beteiligt ist. In verknäulten Neuronen, die phosphorylierte Tau Proteine enthalten, konnte GSK-3 in höherer Konzentration gefunden werden. GSK-3 ist in der Lage, die meisten Phosphorylierungsstellen von fötalem und gepaartem, helikalen Filament-Tau zu phosphorylieren.[156]

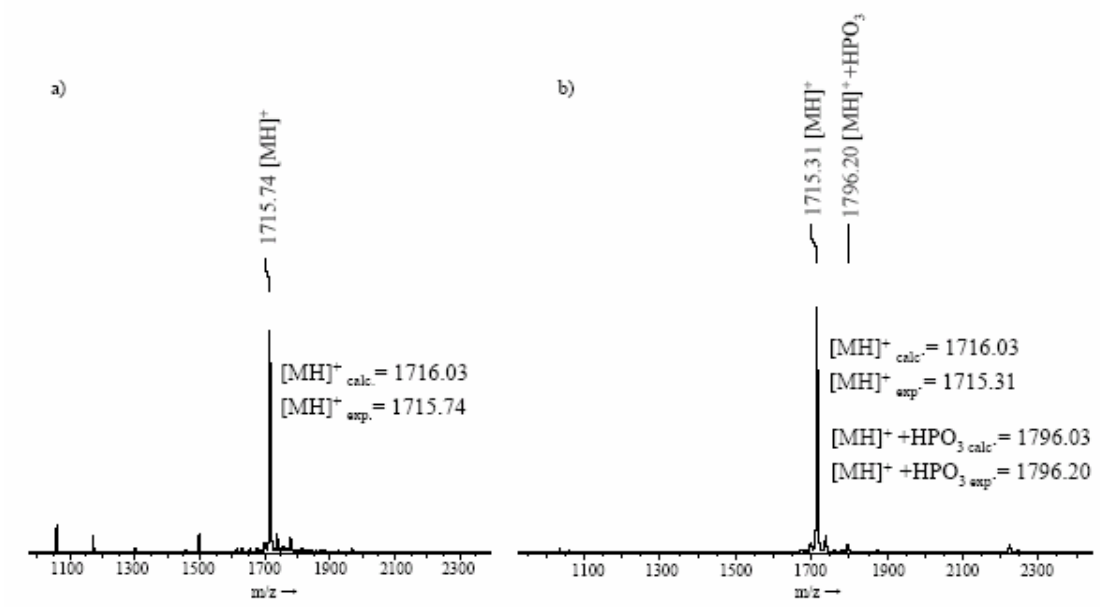


Abb. 23: MALDI-TOF-Massenspektrum des Modellpeptids KRREILSRRPSYR a) vor und b) nach 2 min. Phosphorylierung mit GSK-3 Kinase

Zuerst wurde anhand eines Modellpeptids KRREILSRRPSYR die Phosphorylierungsstudien mit GSK-3 Kinase durchgeführt. Mit Hilfe dieses Modellpeptids wurden die Reaktionsbedingungen für die Phosphorylierung mit GSK-3 Kinase festgelegt und die Reaktionsfähigkeit der Kinase überprüft. Bei einem positiven Ergebnis, der Phosphorylierung des Modellpeptids, kann die Kinase an den zu untersuchenden, synthetischen Partial-Peptiden des Tau Proteins zum Einsatz kommen.

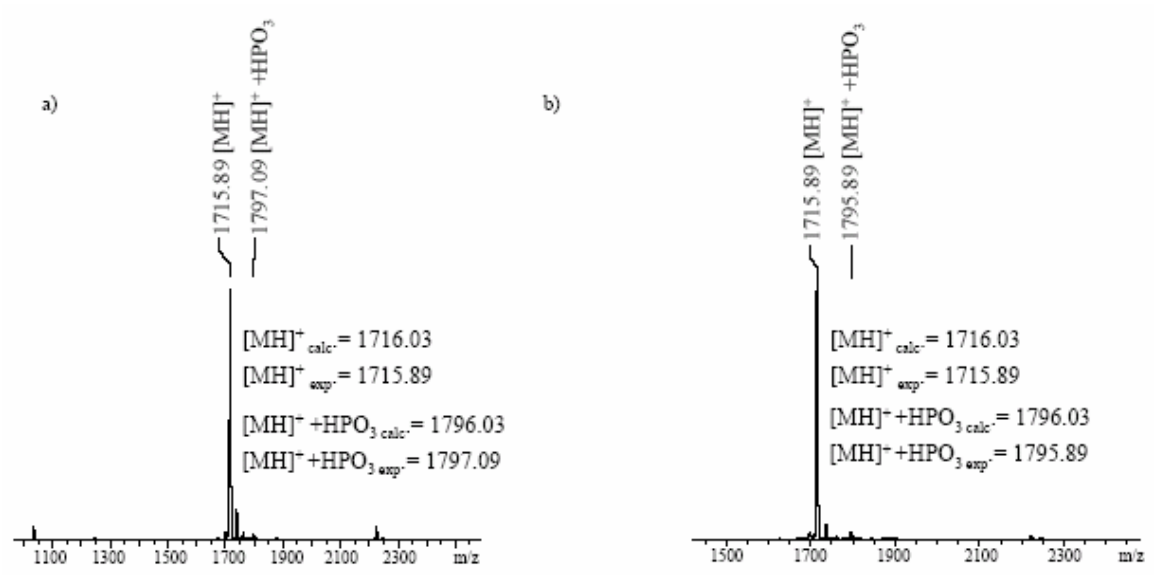


Abb. 24: MALDI-TOF MS des Modellpeptids KRREILSRRPSYR nach a) 30 min und b) 60 min Umsetzung mit GSK-3 Kinase

Aus dem Reaktionsgemisch wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Damit konnte das Fortschreiten der Phosphorylierungsreaktionen beobachtet werden. In Abb. 23 bis 25 sind die MALDI-TOF Massenspektren nach verschiedenen Entnahmezeiten für das eingesetzte Modellpeptid dargestellt. Zum Vergleich wurde auch das entsprechende Edukt analysiert (siehe Abb. 23a). Die Molekularmasse des Modellpeptids KRREILSRRPSYR betrug 1715,74 Da. Das entsprechende einfach phosphorylierte Produkt KRREILSRRPSYR würde somit ein Molekulargewicht von 1796,2 Da aufweisen. Die erste Probe wurde aus dem Reaktionsgemisch nach 2 min Reaktionszeit entnommen, das entsprechende

Massenspektrum ist in Abb. 23b gezeigt. Ein geringer Anteil des Modellpeptids konnte in diesem kurzen Zeitraum bereits phosphoryliert werden.

Entsprechende Ergebnisse zeigen auch die Massenspektren der späteren Probenentnahmen aus dem Reaktionsgemisch nach 30 min, 60 min (siehe Abb. 24a und b) und nach 120 min (siehe Abb. 25a). Auch bei einer Reaktionszeit von 12 h konnte kein größerer Anteil an Modellpeptid phosphoryliert werden, dies ist aus Abb. 25b zu ersehen.

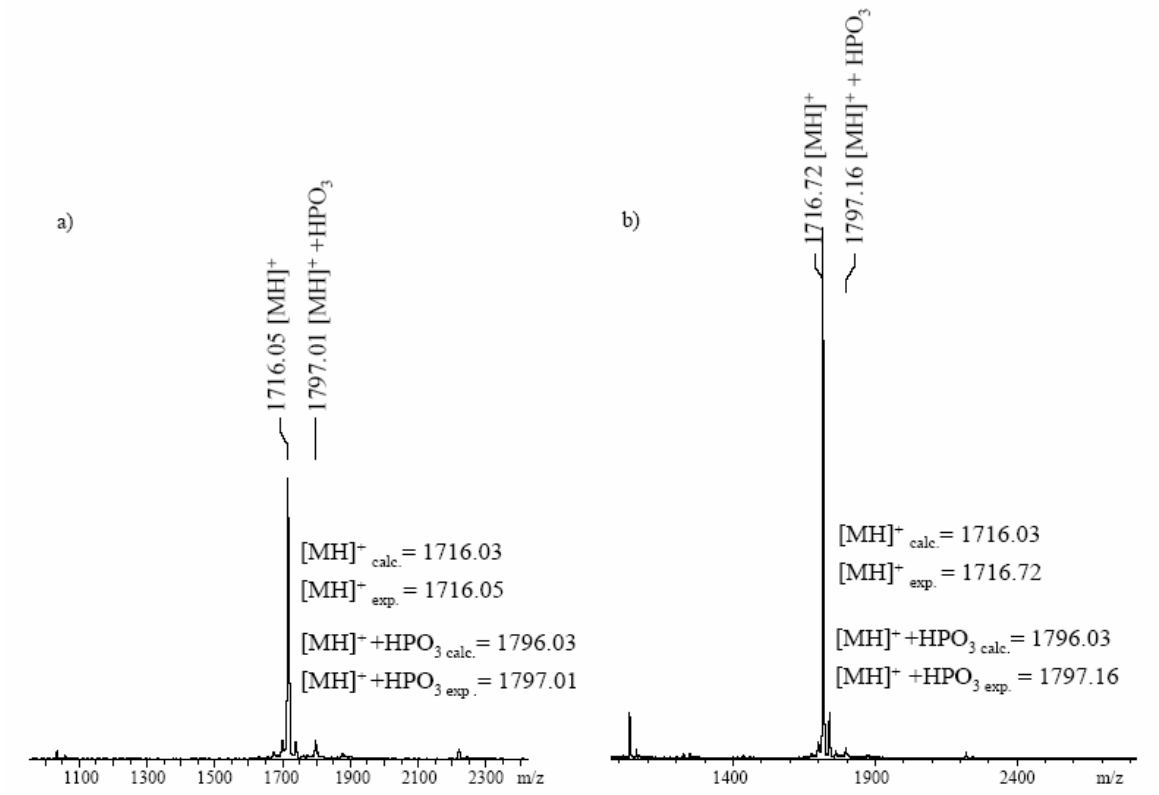


Abb. 25: MALDI-TOF-Massenspektrum des Modellpeptids KRREILSRRPSYR nach Phosphorylierung mit GSK-3 a) 120 min und b) über Nacht (nach ca. 12h)

Mit diesem Experiment konnte die Reaktionsfähigkeit der eingesetzten Kinase GSK-3 nachgewiesen werden. Somit kann diese Kinase für die Reaktionen mit den verschiedenen gereinigten Tau Peptiden eingesetzt werden. Mit der erfolgreichen

Durchführung der Reaktion am Modellpeptid konnten auch die Reaktionsbedingungen für die weiteren Kinasereaktionen mit GSK-3 festgelegt werden.

Um den Verlauf der Kinasereaktion beobachten zu können, wurden bei den Reaktionen der unterschiedlichen Tau Peptide mit GSK-3 Proben bei verschiedenen Reaktionszeiten dem Reaktionsgemisch entnommen. Zum späteren Vergleich wurden auch die Peptide vor dem Einsatz in der Reaktion mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

In Abb. 26 sind die Massenspektren von Tau Peptid ^{314}EQAHSEEHLGR^{324} mit der molekularen Masse von 1290,73 Da vor (Abb. 26a) und nach 15 min (Abb. 26b) der Reaktion mit GSK-3 Kinase dargestellt. Wie aus dem Massenspektrum Abb. 26b zu entnehmen ist, wurde dieses Peptid nicht mit Hilfe der Kinase GSK-3 phosphoryliert. Das entsprechende phosphorylierte Petid mit der molekularen Masse von 1371,35 Da konnte auch nach längerer Reaktionszeit nicht im Massenspektrum detektiert werden.

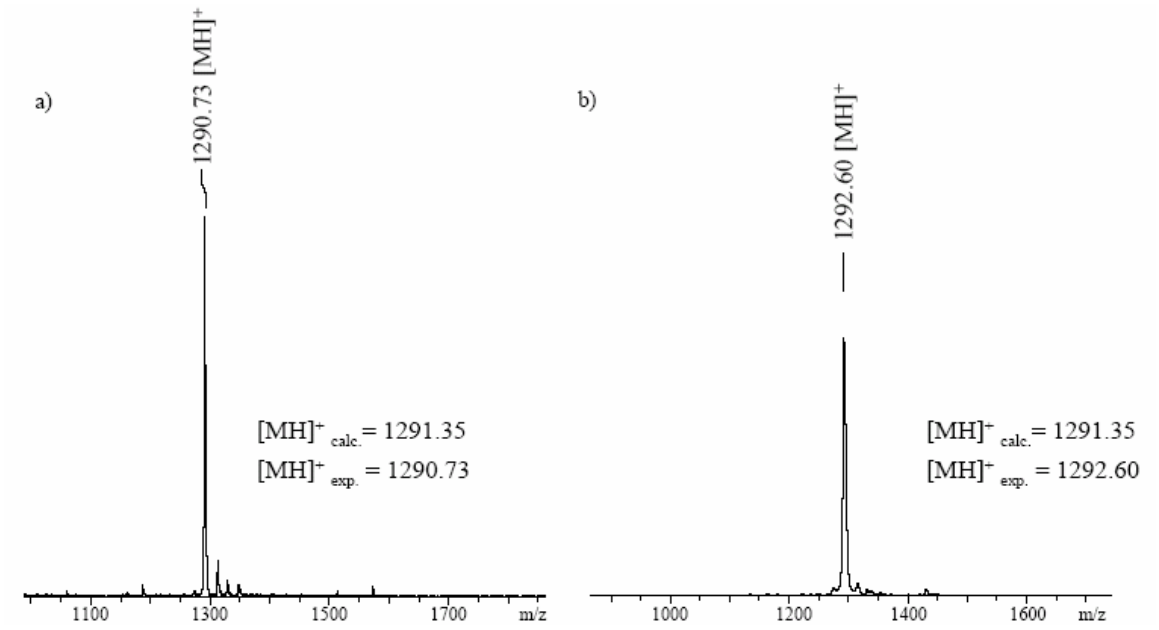


Abb. 26: MALDI-TOF-Massenspektrum der Sequenz (314-324) von Tau ^{314}EQAHSEEHLGR^{324} a) vor und b) nach 15 min Umsetzung mit GSK-3 Kinase

Weitere Kinasereaktionen mit GSK-3 wurden an dem Tau Peptid ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524} mit einem Molekulargewicht von 1148,99 Da im unphosphorylierten Zustand durchgeführt. Dieses Peptid besitzt fünf Phosphorylierungsstellen. Das MALDI-TOF Massenspektrum des unphosphorylierten Peptids wird in Abb. 27a gezeigt. In Abb. 27b ist das Massenspektrum der ersten nach 15 min Reaktionszeit aus dem Gemisch entnommen Probe dargestellt. Mit GSK-3 konnte ein Teil des Peptids phosphoryliert werden. Das entsprechende einfach phosphorylierte Peptid besitzt eine molekulare Masse von 1225,57 Da.

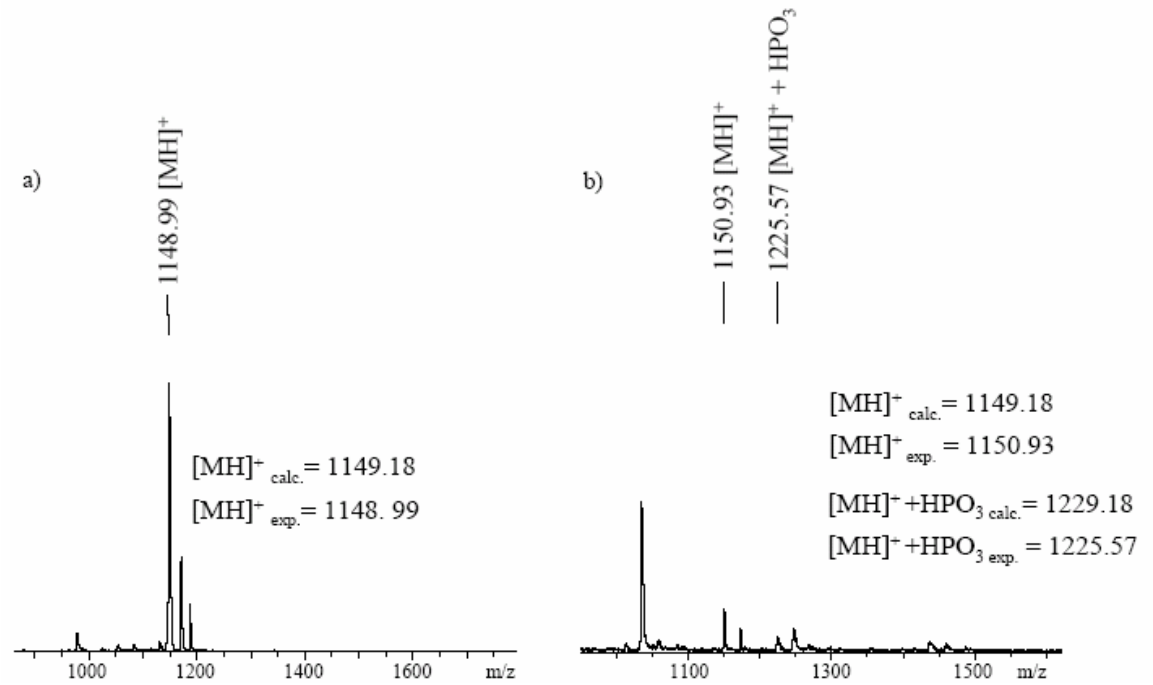


Abb. 27: MALDI-TOF-Massenspektrum der Sequenz (512-524) von Tau ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524} a) vor und b) nach 15 min Phosphorylierungsreaktion mit GSK-3 Kinase

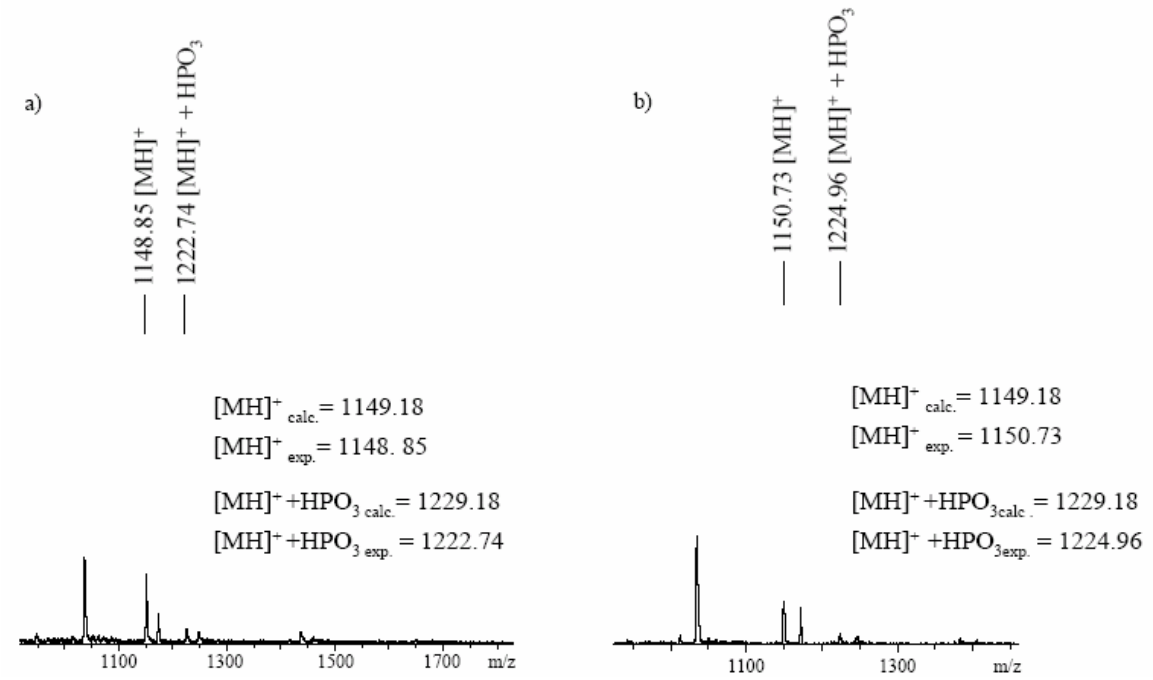


Abb. 28: MALDI-TOF-MS der Sequenz (512-524) von Tau ^{512}SGYSSPGSPGTPG^{524} nach a) 90 min und b) 120 min Umsetzung mit GSK-3 Proteinkinase

Die Massenspektren der Probengemische, die nach 90 min bzw. 120 min aus dem Reaktionsgemisch des Partial-Peptides S(512-524)G entnommen wurden, sind aus Abb. 28a bzw. 28b zu ersehen. Es konnte kein höher phosphoryliertes Produkt als das schon nach 5 min gebildete einfach phosphorylierte Peptid im Massenspektrum gefunden werden.

Aus den Phosphorylierungsreaktionen mit GSK-3 Kinase kann geschlossen werden, dass es sich bei dieser Kinase, um ein spezifisches Enzym handelt, das nur bestimmte Phosphorylierungsstellen, die der Phosphorylierungsstelle des Modellpeptides KRREILSRRP**S**YR entsprechen, phosphoryliert.

Mit den beiden anderen eingesetzten Kinasen Cdc 2 (cyclin-abhängige Proteinkinase) und PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase) gelang es nicht, phosphorylierte Peptide zu erzeugen.

2.2. Strukturuntersuchungen von mitochondrialen Proteinen aus Bäckerhefe

Die mitochondrialen Proteine der Bäckerhefe wurden als Modellsystem für die Methodenkombination aus anorganischer und organischer Massenspektrometrie eingesetzt, weil fast alle Proteine aus den Mitochondrien bekannt und in Datenbanken erfasst sind. Dies erleichtert ihre Identifizierung mittels FTICR-MS. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind jedoch nur ein paar mitochondriale phosphorylierte Proteine bekannt. Auch sind nur einige wenige Enzyme für die Phosphorylierung (Kinasen) oder Dephosphorylierung (Phosphatasen) von mitochondrialen Proteinen bis jetzt identifiziert worden. Außerdem ist bis jetzt unbekannt, wie Metallionen vor allem Kupfer, Eisen und Zink in mitochondrialen Proteinen gebunden sind. Diese Metallionen spielen als Kofaktoren von Proteinen eine wichtige Rolle und sind essentiell für deren Funktion. Das einzige bekannte Enzym, das Kupfer benötigt, um zu funktionieren, ist Cytochrom Oxidase (COX) aus der Atmungskette.

Die mitochondrialen Proteine der Bäckerhefe wurden an der TU Dresden durch BN-PAGE (blue native polyacrylamid gel electrophoresis)[157, 158] in der ersten Dimension getrennt. Anschließend wurden die Proteine noch auf einem SDS-PAGE (SDS polyacrylamid gel electrophoresis) getrennt und mittels Silber- oder Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

2.2.1. Identifizierung und Sequenzbestimmungen von mitochondrialen Proteinen

Die in Abb. 29 markierten Proteinspots in dem 2D-Gel wurden mittels LA-ICP-MS bezüglich verschiedener Elemente (P, S, Cu, Zn und Fe) analysiert.

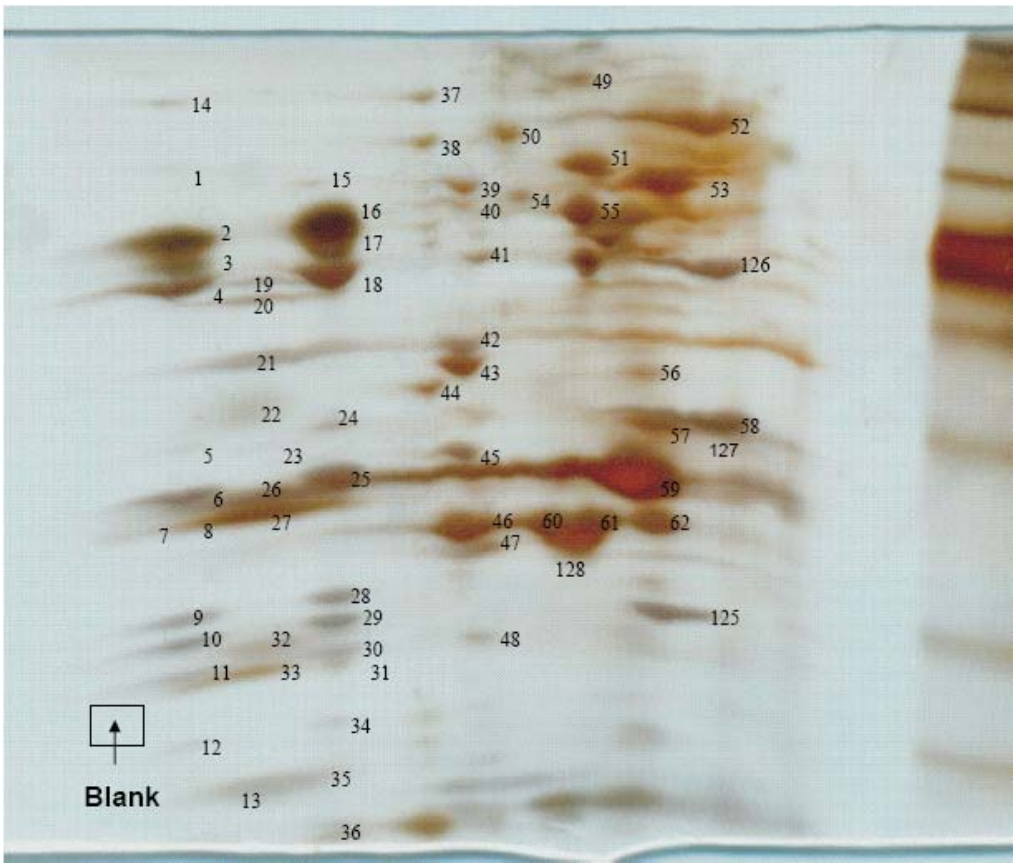


Abb. 29: 2D-Gel nach elektrophoretischer Trennung von mitochondrialen Protein aus Bäckerhefe, die Proteine wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

In Abb. 30b sind die phosphorylierten Proteine, die durch eine spezielle Phosphorfärbemethode sichtbar gemacht wurden, markiert. Dabei getrennte phosphorylierte Proteine (6, 7, 8, 20, 22, 60, 61, 62, 51, 52 und 55) konnten mittels Phosphorfärbung detektiert werden.

a) b)

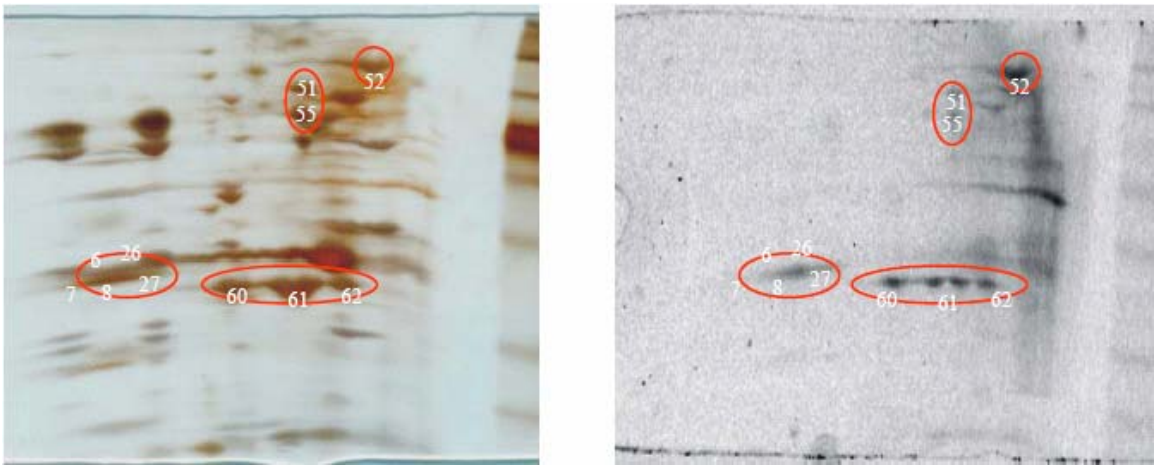


Abb. 30: Vergleich von mitochondrialen Proteinen von 2D-Gelen (a) silbergefärbtes 2D-Gel, bei dem die phosphorylierten Proteine markiert wurden (b), Western Blot von einem 2D-Gel, der mit Phosphorfärbemethode behandelt wurde

Nach einer qualitativen Analyse von verschiedenen Proteinspots von Mitochondrien aus Hefe bezüglich der Elemente P, S, Cu, Zn und Fe wurden die Proteine mittels MALDI-FTICR-MS bezüglich der Struktur und Aminosäurensequenz analysiert. Die denaturierenden und reduzierenden Bedingungen während der Trennung der Proteine in der zweiten Dimension der Gelelektrophorese können jedoch zu einem partiellen Verlust der Metallionen in den Proteinen führen. Auch kann eine Kontamination durch Metallionen während der Wasch- und Färbeschritte des Gels nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte die Detektion von mehr als einem Metallion an verschiedenen Proteinspots erklären. Andererseits gibt es einige mitochondriale Proteine (z.B.: Cox1p), von denen bekannt ist, dass sie verschiedene Metallionen (Zn und Cu) gleichzeitig binden können.

In Abb. 31 ist das MALDI-FTICR-Massenspektrum von Spot 59 gezeigt, der als major mitochondrialer ADP/ATP Translocator identifiziert werden konnte. Eine vollständige Aufklärung der Sequenz durch FTICR-MS war jedoch nicht möglich, da die Elution der tryptischen Peptide aus den Gelstücken nach dem Abbau nicht vollständig war.

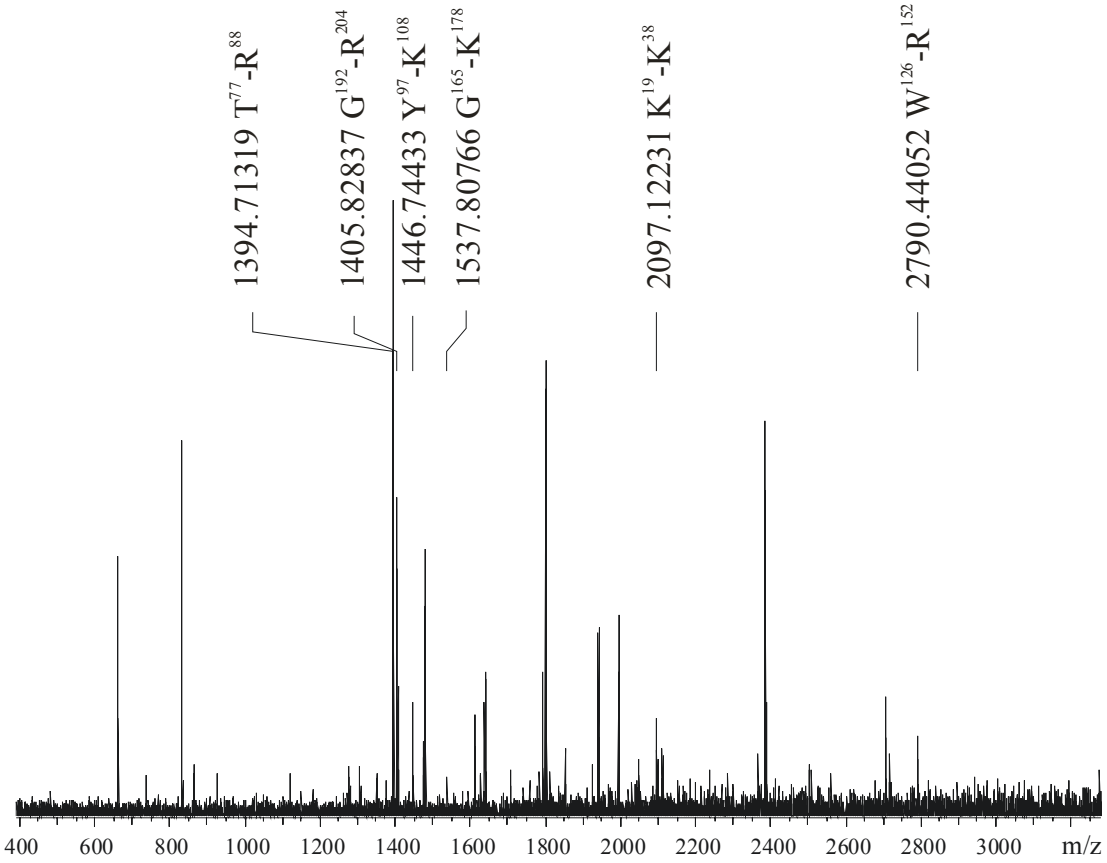


Abb. 31: MALDI-FTICR Massenspektrum von Proteinspot 59 (major mitochondrial ADP/ATP translocator) (siehe Abb. 29) mit den bei der Datenbanksuche (www.matrixscience.com) identifizierten Peptiden T(77-88)R, G(192-204)R, Y(97-108)K, G(165-178)K, K(19-38)K, W(126-152)R

Phosphat konnte beispielsweise in den mit MALDI-FTICR-MS und Datenbanksuche (www.matrixscience.com) (siehe Tabelle 2.5) Spots 49 (Ach1p - Acetyl-CoA-hydrolase), 50 (Sdh1p - Yeast Succinat-dehydrogenase), 52 (Aco1p - Acotinase, mitochondrial) und 59 (Aac2p - Major mitochondrial ATP/ADP translocator) nachgewiesen werden. Daten über die Phosphorylierungen von Ach1p und Aac2p sind nicht bekannt. Die Ergebnisse für Sdh1p und Aco1p stimmen mit denen der früheren Phosphorylierungsanalysen in Pflanzenmitochondrien überein. Bykova et. al. [159] konnten zeigen, dass beide Proteine in Mitochondrien aus Pflanzen phosphoryliert sind.

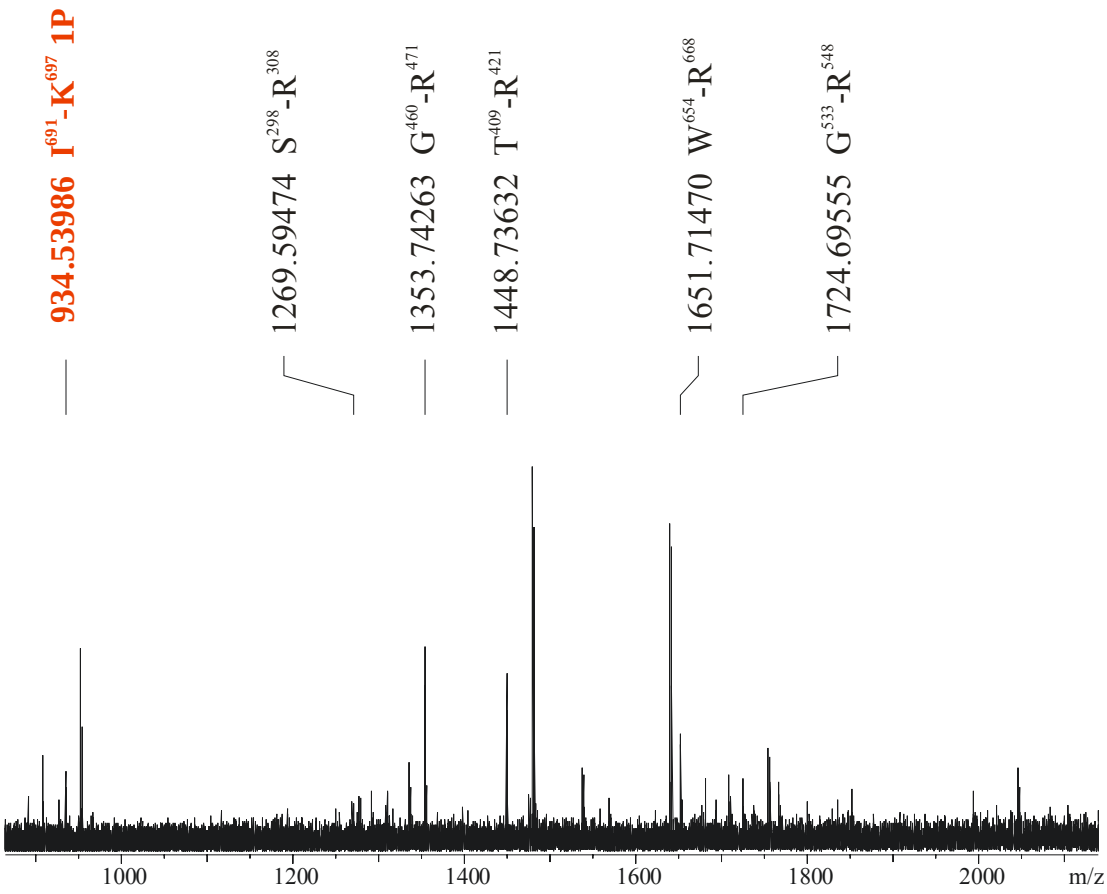


Abb. 32: MALDI-FTICR Massenspektrum des Proteinspots 52 (Acotinase, mitochondrial) (siehe Abb. 29) mit den identifizierten Peptiden S(298-308)R, G(460-471)R, T(409-421)R, W(654-668)R, G(553-548)R und dem einfach phosphorylierten Peptid I(691-697)K

Dieses Ergebnis konnte durch MALDI-FTICR-MS Messungen bestätigt werden, denn wie in Abb. 32 gezeigt ist, konnte ein phosphoryliertes Peptid direkt aus dem tryptischen Peptidgemisch des Proteins identifiziert werden. In dem phosphorylierten Peptid I(691-697)K mit der Aminosäurensequenz IHETNLK kann Phosphor entweder am Threonin Thr^{694} oder am Histidin H^{692} gebunden sein. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass die verwendete LA-ICP-MS Methode sehr gut für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen in 2D-Gelen geeignet ist.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse unter Verwendung von MALDI-FTICR-MS sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Zum Beispiel wurde Spot 49 als Ach1p (Acetyl CoA Hydrolase) mit einer molekularen Masse von 58,68 kDa identifiziert. Im 2D-Gel wurde das Protein in einem Massenbereich von 100-120 kDa lokalisiert. Dies könnte bedeuten, dass das Protein als Dimer oder Mannose-glykosyliert in den Mitochondrien vorliegt. Spot 59 repräsentiert Aac2p, dem major mitochondrialen ADP/ATP Translocator (Abb. 31).

Tabelle 7: Identifizierte Proteine unter Verwendung von MALDI-FTICR-MS und anschließender Datenbanksuche (www.matrixscience.com)

Spot	Identifiziertes Protein	$M.W._{exp}$/ kDa	M.W./ kDa	Anzahl S-Atome
49	Acetyl-CoA-hydrolase (Ach1p)	~ 100-120	58,68[a]	17
50	Yeast Succinat-dehydrogenase (Sdh1p)	~ 70-80	70,19	26
52	Acotinase, mitochondrial (Aco1p)	~ 80-90	85,31	23
59	Major mitochondrial ATP/ADP translocator (Aac2p)	~ 35-40	34,40	14

[a] Monomer oder Mannose-glykosylierte Form

Als eine Untereinheit von Komplex II der Atmungskette wurde Sdh1p in Spot 50 identifiziert. Sdh1p bindet FAD kovalent und wurde als phosphoryliertes Protein in Kartoffelmitochondrien beschrieben.[159] Acop1p (Spot 52), die mitochondriale Acotinase, enthält Eisencluster und ist in Kartoffelmitochondrien phosphoryliert.[159] Die ermittelte molekulare Masse der identifizierten Proteine in den Spots 50, 52 und 59 im 2D-Gel stimmen mit den berechneten Werten überein.

2.2.2. Bestimmung von mitochondrialen Proteinen mit Metallionen aus der Bäckerhefe

Neben Phosphat wurden ausgewählte, mitochondriale Proteinspots auch bezüglich Metallionen analysiert. Bei Untersuchungen der Proteinspots des 2D-Gels (Abb. 29) (Proteinspots von Nummer 37 bis 48) mit LA-ICP-SFMS konnten zumeist einzelne Elemente (z.B.: in Spot 38 – Zn, Spot 39 – Fe, Spot 43 – P und in Spot 44 – Cu) mit höheren Ionenintesitäten gemessen werden. Die Proteinspots (z.B. 7, 8, 24), die Cu und/oder Zn enthielten, enthielten auch Eisen (siehe Tabelle 8).

Die transienten (zeitabhängigen) Ionensignale von $^{31}P^+$, $^{32}S^+$, $^{63}Cu^+$, $^{64}Zn^+$ und $^{56}Fe^+$ in verschiedenen Proteinspots wurden mit LA-ICP-SFMS (je 500 Laserschüsse) unter Verwendung der ortsaufgelöste Methode (Auflösungsvermögen im µm-Bereich, „single point mode“) erstellt und sind in Abb. 33 gezeigt. Zum Beispiel zeigt Spot 59 identifiziert als Aac2p - Major mitochondrial ATP/ADP translocator (Tabelle 7) eine relative hohe P^+- und Cu^+-Intensität. Es wurden aber auch S, Zn und Fe in diesem Protein detektiert.

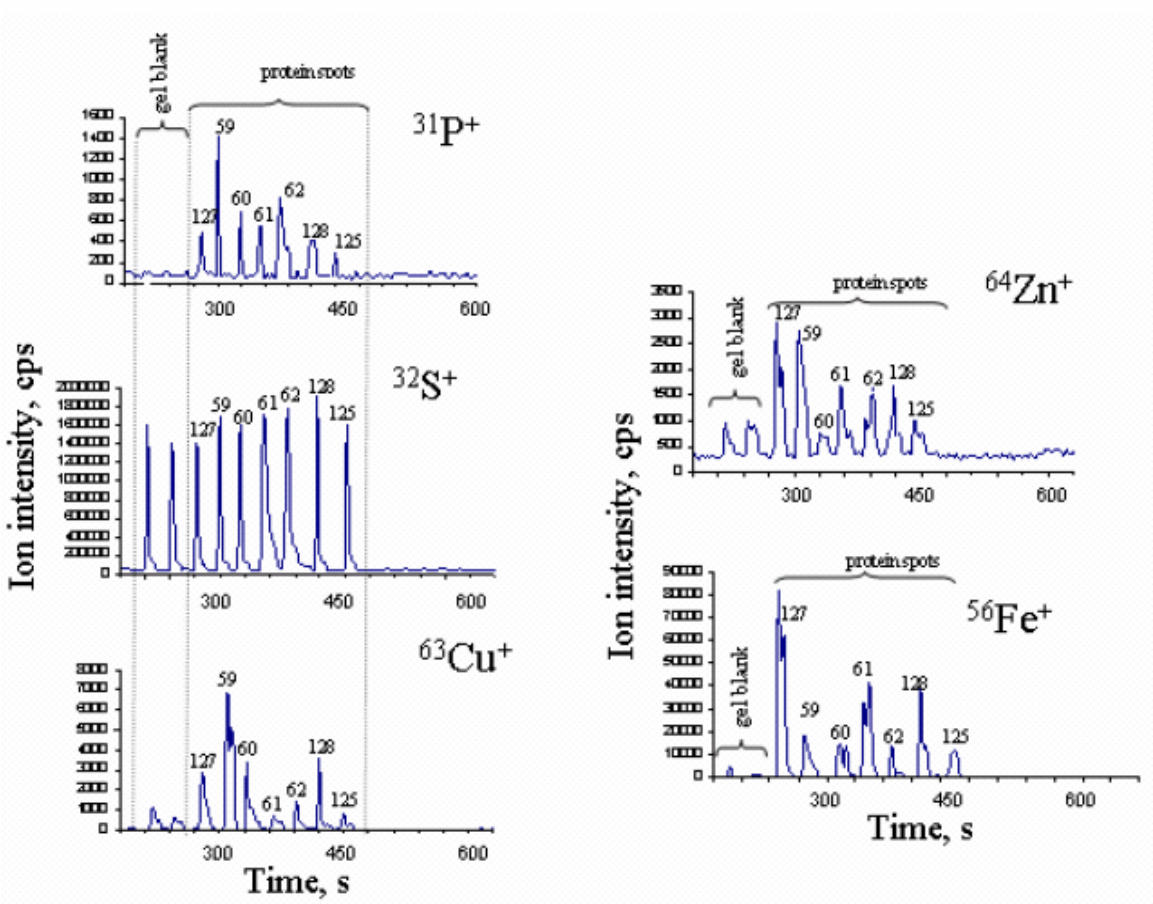


Abb. 33: Transiente Signale für $^{31}P^{+}$, $^{32}S^{+}$, $^{56}Fe^{+}$, $^{63}Cu^{+}$ and $^{64}Zn^{+}$ in Proteinspots (59, 60, 61, 62, 125, 127, 128) von Mitochondrien aus Bäckerhefe getrennt durch 2D-Gelelektrophorese (vgl. Abb. 29) und analysiert mit LA-ICP-SFMS

Die qualitativen Ergebnisse der LA-ICP-MS Messung der Proteinspot sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Durch die LA-ICP-MS-Vorselektion der Proteine, die P, S und Metalle enthalten, kann die Zeit für die Strukturaufklärung der phosphorylierten und Metallionen-haltigen Proteine erheblich verkürzt werden.

Tabelle 8: Qualitative Ergebnisse von P, S und Metallionen in Proteinspots des 2D-Gels (Abb. 29) mit LA-ICP-MS

Number of spot	Laser Ablation ICP-MS				
	P	**S**	**Cu**	**Zn**	**Fe**
1	-	< LOD	-	-	-
2	+	< LOD	-	-	-
3	-	< LOD	-	-	-
4	-	+	-	-	-
5	-	+	-	-	-
6	+	+	-	-	-
7	++	++	+	++	++
8	++	++	-	++	+
9	++	+	-	-	-
10	+	< LOD	-	-	-
11	-	++	-	-	-
12	-	++	-	-	-
13	++	< LOD	-	-	-
14	-	< LOD	(+)	+	-
15	-	< LOD	-	-	+
16	+	+	-	-	+
17	-	++	-	-	-
18	-	< LOD	-	-	-
19	-	++	-	-	-
20	-	++	-	-	-
21	++	+	+	+	-
22	-	< LOD	-	-	-
23	-	< LOD	-	-	-
24	-	+	++	++	++
25	+	++	-	-	-
26	-	+	-	-	-
27	-	< LOD	-	-	-
28	-	++	-	+	+
29	-	++	-	+	-
30	+	< LOD	+	+	-
31	+	< LOD	+	+	-
32	+	< LOD	+	+	-
33	+	< LOD	+	+	-
34	-	< LOD	+	+	-
35	+	++	+	+	-
36	+	< LOD	+	+	-
37	-	< LOD	-	-	-
38	-	+	-	++	-
39	-	+	-	-	++

40	-	+	-	-	-
41	-	+	-	+	-
42	-	+	-	-	-
43	++	< LOD	-	-	-
44	+	< LOD	++	-	+
45	-	< LOD	-	+	-
46	-	+	+		-
47	-	+	+	-	-
48	-	< LOD	+	-	-
49	++	+	++	++	n.d.
50	+	< LOD	++	+	n.d.
51	+	< LOD	-	-	n.d.
52	+	< LOD	++	+	n.d.
53	-	< LOD	-	-	n.d.
54	+	+	-	-	n.d.
55	-	< LOD	-	-	n.d.
56	-	< LOD	-	-	n.d.
57	+	< LOD	-	-	n.d.
58	-	< LOD	-	-	n.d.
59	++	+	++	+	++
60	++	+	+	+	+
61	+	+	+	+	++
62		+		++	+
125	-	+	+	+	+
126	-	< LOD	-	-	-

(n.d.) not determined; (++) Ionenintensität war 10x höher als das Backgroundsignal, LOD (limit of detection) – Nachweisgrenze (3σ-Kriterium)

In Tabelle 8 sind die qualitativen Ergebnisse von mehr als 60 Proteinspots in einem 2D-Gel von Mitochondrien aus Bäckerhefe zusammengefasst. In einigen Proteinen, wie z.B. Spot 1, 3, 18, 22, 23, 27, 37, 55, 56 und 58, ist keines der untersuchten Elemente enthalten. Dagegen konnten in einigen Proteinspots, wie z.B. 7, 49, 59, 60 und 61, hohe Ionenintensitäten der Analyten gemessen werden. In verschiedenen Proteinen (z.B.: hohe P-Intensität in Spot 13 oder 43) wurden jeweils nur eines der analysierten Elemente nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Elementverhältnisse in Bezug zum Schwefel (P/S, Cu/S, Zn/S und Fe/S) in ausgewählten Proteinspots, die in dem silbergefärbten 2D-Gel (Abb. 29) bestimmt wurden, sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die gemessenen

Elementverteilungen waren in allen Fällen kleiner als eins. Hann *et al.* [160] verwendete Metall/Schwefel-Verhältnisse, wie z.B. Fe/S und Mn/S, um Metallionen-haltige Proteine mittels Größen-Ausschluss-Chromatographie gekoppelt mit ICP-MS mit dynamischer Reaktionszellentechnologie (SEC-ICP-DRCMS) zu analysieren.

Tabelle 9: Elementverhältnisse in ausgewählten Proteinspots des 2D-Gels (Abb. 29) bezogen auf Schwefel gemessen mittels LA-ICP-MS[a]

Elementverteilung	Spot 59	Spot 60	Spot 61	Spot 62
P/S	0,005	0,003	0,001	0,002
Cu/S	0,021	0,013	-	0,002
Zn/S	0,006	-	0,002	0,002
Fe/S	0,03	0,044	0,117	0,024

[a] Relative standard deviation (RSD) der gemessenen Elemente betrug etwa 30%

Die Resultate der quantitativen Bestimmung der analysierten Elemente unter Verwendung von Schwefel als internes Standardelement für den Proteinspot 59 sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Durch Kombination von LA-ICP-MS mit FTICR-MS konnten Metallionenkonzentrationen in getrennten Proteinspots in 2D-Gelen bestimmt werden. In dieser Tabelle sind auch die Nachweisgrenzen der analysierten Elemente enthalten, die mittels ICP-MS im Gelblank (Coomassie-gefärbt) nach einem tryptischen Abbau bestimmt wurden. Relativ hohe Nachweisgrenzen mit 1,3 mg g^{-1} wurden für Schwefel bei Gelen, die mit der Coomassie-Färbemethode angefärbt wurden, gefunden. Dagegen ist die Nachweisgrenze für Gele mit Silberfärbung für Schwefel eine Größenordnung kleiner.

Tabelle 10: Elementkonzentrationen in Protein Spot 59 im 2D-Gel gemessen mit LA-ICP-MS und Nachweisgrenzen im Gelblank (ICP-SFMS)

		Nachweisgrenze/µg g^{-1} (ICP-SFMS)	
	Konzentration[a]/mg g^{-1}	Coomassie Färbung	Silberfärbung
P	0,027	0,18	0,22
S	7,17	1327	137
Cu	0,94	6,4	8,2
Zn	3,4	17,6	20
Fe	0,87	9,5	n.d.[b]

[a] Relative standard deviation (RSD) of measured element ratios is about 30%; [b] n.d.: not determined

2.2.3. Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in mitochondrialen Proteinen mittels MALDI-FTICR-MS

Der F1F0-ATPase-Komplex wurde mittels blue native BN-PAGE[157, 158] aus lysierten mitochondrialen Proteinen der Bäckerhefe isoliert.[161] Dabei lief die F1F0 ATPase als Monomer bei ca. 650 kDa und als Dimer bei 1300 kDa. Die Identität der Banden wurde mit einer In-Gel-Aktivitätsfärbung überprüft, die auf dem Nachweis der ATP-Hydrolyse der Rückreaktion beruht. Danach wurden von 10 parallelen BN-PAGES die Banden ausgeschnitten, gesammelt und eluiert. Die angereicherten Untereinheiten wurden anschließend im SDS-PAGE Gel aufgetrennt (Abb. 34a und 35). Parallel wurde ein SDS-PAGE-Gel mittels Western-Blotting auf eine Membran übertragen und mit einem entsprechenden Antikörper gegen P-Tyr konnten die Proteine, die P-Tyr enthalten, sichtbar gemacht werden (Abb. 34b).

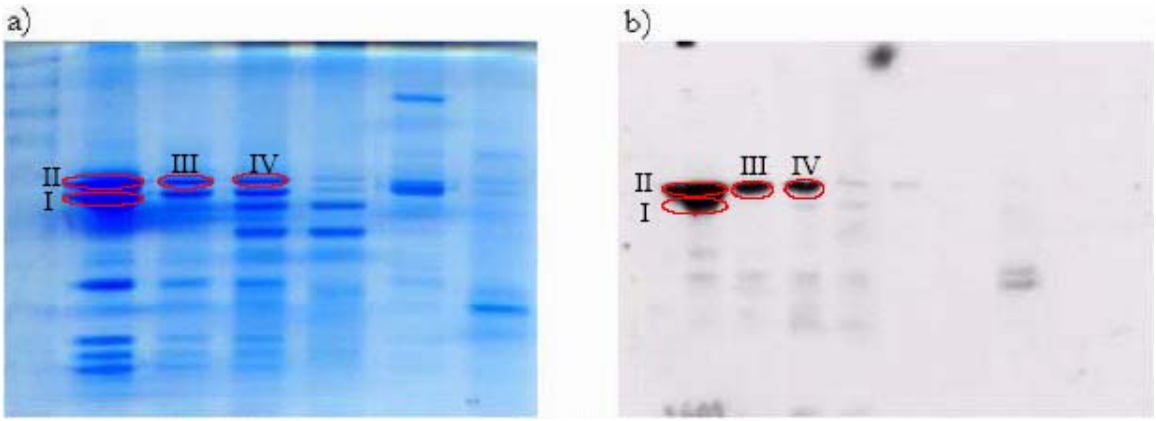


Abb. 34: F1F0-ATPase-Komplex aus Bäckerhefe: a) SDS-PAGE-Gel von in BN-PAGE angereichertem F1F0ATPase-Komplex, b) Western Blot vom parallel erstellten SDS-PAGE vom F1F0ATPase-Komplex, Reaktion mit P-Tyr-Antikörper [161]

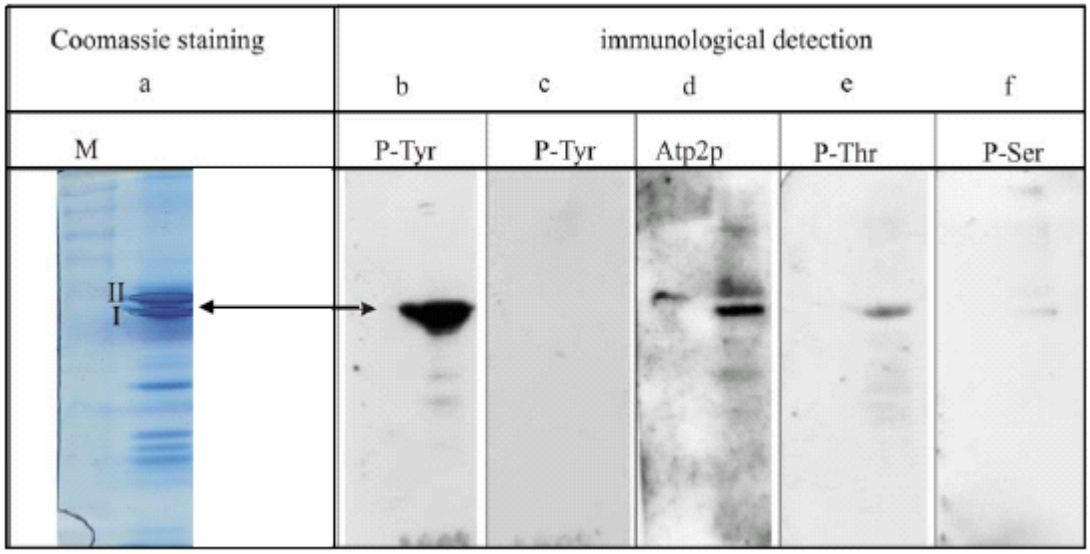


Abb. 35: Untereinheiten des ATPase Komplexes getrennt mittels präparativer BN- und anschließender SDS- PAGE, gefärbt mit Coomassie blue (a) oder transferiert auf eine PVDF-Membran für die Western Blots mit Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren (b-f). Als Kontrolle wurde die Membran von (b) mit Phosphatase versetzt (c) und dann mit Atp2p-Antikörpern detektiert (d) [161]

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurde auf PVDF-Membranen geblottet unter Verwendung der semi-dry Blottingmethode für 1h bei 25 V und 60 mA mit Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol, 0,05% (w/v) SDS).
Für die immunologische Analyse der Proteine auf den Membranen wurden Antikörper (Sigma) verwendet, die mit phosphorylierten Aminosäuren (Serin, Threonin und Tyrosin) und Atp2p (molekulare Proben) reagieren (siehe Abb. 35b, c, e, f).

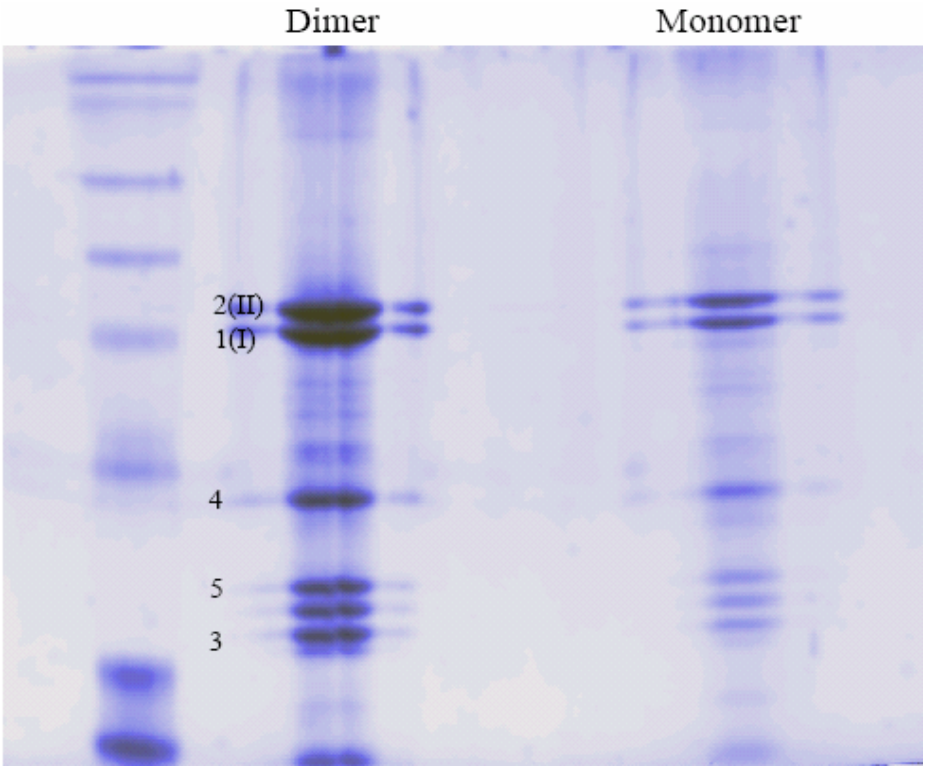


Abb. 36: SDS-PAGE Gel von einem angereicherten mitochondrialen F1F0ATPase-Komplex aus Bäckerhefe. Die gekennzeichneten Proteinbanden 1-5 wurden nach tryptischem Abbau mit MALDI-FTICR-MS analysiert und mit Datenbanksuche (www.matrixscience.com) identifiziert.

Die Bande, die Atp2p enthielt, zeigte im Vergleich mit den anderen Banden das intensivste Signal bei der Reaktion mit dem P-Tyr-Antikörper (Abb. 35b). Demzufolge ist in diesem Protein vor allem Tyrosin phosphoryliert. Zum Vergleich wurde eine Blotmembran mit einem Phosphatasenpuffer behandelt, um die Phosphorylierungen zu

entfernen und somit ein negatives Ergebnis zu erzeugen. Dieses negative Ergebnis mit dem P-Tyr-Antikörper ist in Abb. 35c dargestellt. Zusätzlich zu P-Tyr wurden schwache Signale für P-Ser und P-Thr (siehe Abb. 35e, f) gefunden, woraus man schlussfolgern kann, dass Atp2p auch an diesen Aminosäuren phosphoryliert ist. Diese Erkenntnisse wurden anschließend durch Messungen der tryptisch abgebauten Proteine mit Hilfe von MALDI-FTICR-MS bestätigt. Zu diesem Zweck wurde ein weiteres Gel (Abb. 36) erzeugt, das für diese Messungen vorgesehen war. Aus dem in Abb. 36 dargestellten SDS-PAGE-Gel wurden die markierten Banden ausgeschnitten und nach einem tryptischen In-Gel-Abbau mittels MALDI-FTICR-MS analysiert. Die mit MALDI-FTICR-MS und anschließender Datenbanksuche (www.matrixscience.com) identifizierten phosphorylierten Proteine sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Es konnten auch phosphorylierte Peptide in zwei der vier identifizierten Proteine durch die Datenbanksuche nachgewiesen werden. Die MALDI-FTICR-Massenspektren der Proteine mit den in den Peaks zugeordneten Peptiden und phosphorylierten Peptiden sind in Abb. 38 und 40 bis 42 dargestellt.

gi|6322581 **Mass:** 54760 **Score:** 246 **Expect:** 2.7e-21 **Queries matched:** 18
Atp2p [Saccharomyces cerevisiae]

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence	
128 - 139	1367.76	1366.75	1366.75	0.00	0	IINVIGEPIDER	
210 - 223	1420.70	1419.70	1419.69	0.01	0	AHGGFSVFTGVGER	
294 - 307	1435.76	1434.75	1434.75	0.01	0	FTQAGSEVSALLGR	
265 - 277	1453.81	1452.80	1452.80	0.01	0	VALTGLTIAEYFR	
197 - 209	1502.86	1501.86	1501.85	0.01	0	TVFIQELINNIAK	
248 - 262	1585.82	1584.81	1584.81	0.01	0	VALVFGQMNEPPGAR	
31 - 45	1601.82	1600.81	1600.71	0.10	1	RCMASAAQSTPITGK	Phospho (ST)
79 - 93	1677.94	1676.93	1676.92	0.01	0	LVLEVAQMLGENTVR	
2 - 16	1773.93	1772.93	1772.93	-0.01	2	VLPRLYTATSRAAFK	Phospho (Y)
390 - 406	1814.94	1813.93	1813.92	0.01	0	LLDAAVVGQEMYDVASK	
446 - 463	1908.03	1907.03	1907.02	0.01	0	FLSQPFAVAEVFTGIPGK	
278 - 293	1922.96	1921.95	1921.94	0.01	0	DEEGQDVLLFIDNIFR	
446 - 466	2276.16	2275.16	2275.27	-0.12	1	FLSQPFAVAEVFTGIPGKLVR	
123 - 143	2319.13	2318.12	2318.30	-0.18	2	ETLGRIINVIGEPIDERGPIK	
482 - 502	2367.13	2366.12	2366.13	-0.00	0	YDNIPEHAFYMVGGIEDVVAK	
148 - 172	2666.38	2665.37	2665.36	0.01	0	KPIHADPPSFAEQSTSAEILETGIK	
416 - 439	2716.41	2715.40	2715.40	-0.00	1	SLQDIIAILGMDELSEQDKLTVER	
146 - 172	2935.54	2934.53	2934.54	-0.01	1	LRKPIHADPPSFAEQSTSAEILETGIK	
46 - 73	2989.68	2988.67	2988.65	0.02	0	VTAVIGAIVDVMFEQSELPAILNALEIK	
278 - 307	3339.71	3338.71	3338.68	0.03	1	DEEGQDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGR	
265 - 293	3357.74	3356.73	3356.73	-0.00	1	VALTGLTIAEYFRDEEGQDVLLFIDNIFR	
334 - 370	3815.00	3813.99	3813.94	0.05	1	KGSVTSVQAVYVPADDLTDPAPATTFAHLDATTVLSR	

Abb. 37: Identifizierung des Proteins der Gelbande 1 (Abb. 36) mit der Liste der identifizierten Peptide und phosphorylierten Peptide R(31-45)K mit einer Serin- oder Threonin-Phosphorylierung und V(2-16)K mit einer Tyrosin-Phosphorylierung am ^{7}Y.

Das Protein der 1D-Gelbande 1 (Abb. 2.39) konnte als Atp2p identifiziert werden (Abb. 37). Es wurden zwei phosphorylierte Peptide, R(31-45)K mit der Phosphorylierung an einem Serin oder Threonin und das Peptid V(2-16)K mit einer Tyrosinphosphorylierung am ^{7}Y von Atp2p direkt detektiert. Das MALDI-FTICR-MS Spektrum ist in Abb. 38 mit den zugeordneten Peptiden und phosphorylierten Peptiden dargestellt.

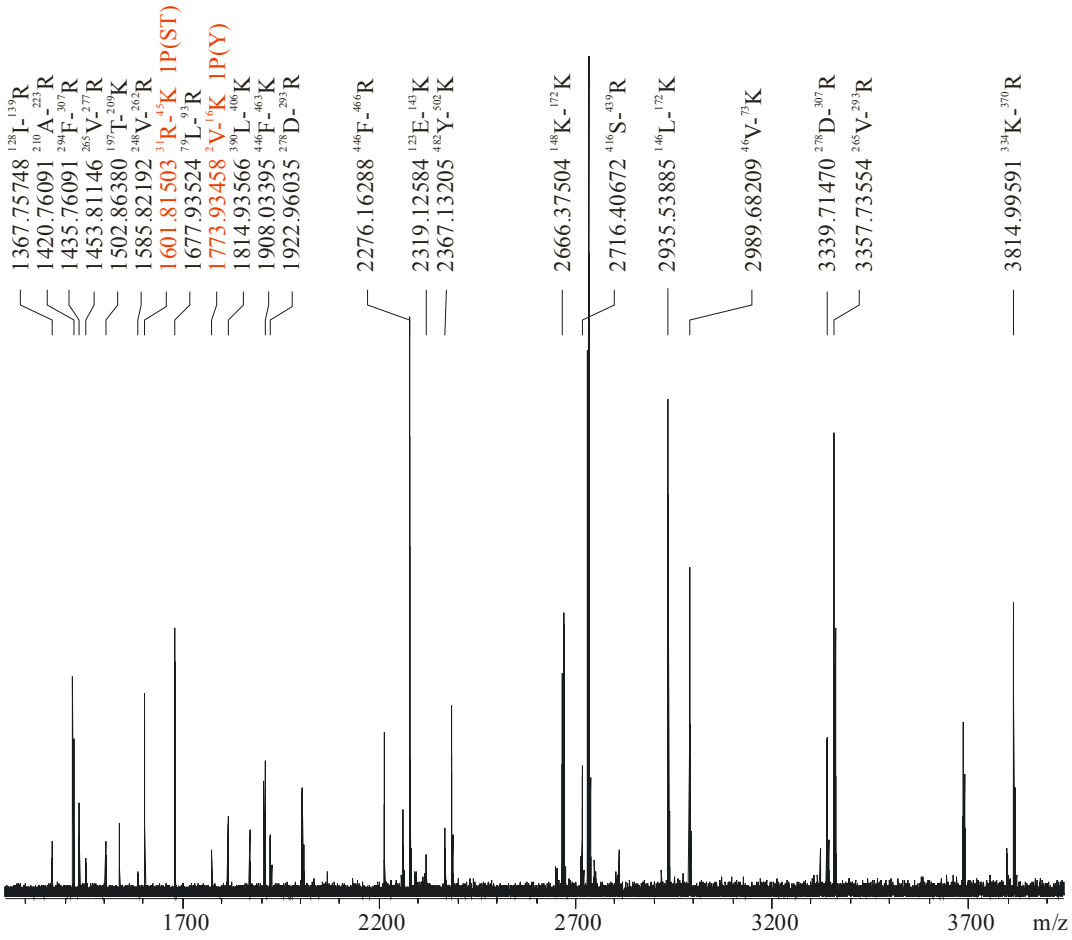


Abb. 38: MALDI-FTICR-MS Spektrum von der 1D-Gelbande 1 (Abb. 36) identifiziert mit der Datenbank (www.matrixscience.com) als Atp2p mit den zugeordneten Peptiden und phosphorylierten Peptiden (siehe Abb. 37)

Proteinbande 2 (Abb. 36) konnte als ATPase 1 alpha Untereinheit identifiziert werden (Abb. 39). Von diesem Protein konnten drei phosphorylierte Peptide, V(411-428)K mit zwei Phosphorylierungen an den Aminosäuren ^{413}S und ^{426}S, Peptid Y(265-295)R mit

einer Phosphorylierung am Tyrosin ^{265}Y oder ^{281}Y und Peptid Q(422-452)K mit einer Phosphorylierung an ^{434}Y direkt aus den massenspektrometrischen Daten durch Suche in der Datenbank (www.matrixscience.com) zugeordnet werden.

gi|171116 **Mass:** 58530 **Score:** 118 **Expect:** 1.7e-08 **Queries matched:** 10
ATPase 1 alpha subunit

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence	
510 - 520	1325.69	1324.68	1324.67	0.00	0	SNMNELLTEIR	
397 - 410	1438.85	1437.85	1437.84	0.01	0	GIRPAINVGLSVSR	
40 - 52	1458.75	1457.74	1457.74	0.00	0	AQPTEVSSILEER	
497 - 509	1519.77	1518.76	1518.76	0.00	0	IGEFESSFLSYLK	
329 - 341	1553.74	1552.73	1552.73	0.00	0	EAYPGDVFYLHSR	
128 - 143	1563.89	1562.88	1562.88	0.00	0	TGNIVDVPVGPGLLGR	
436 - 452	1756.84	1755.84	1755.83	0.00	0	EVAAFAQFGSDLDASTK	
248 - 264	1898.97	1897.96	1897.96	0.00	0	STVAQLVQTLEQHDAMK	
411 - 428	1914.96	1913.96	1913.97	-0.02	2	VGSAAQVKALKQVAGSLK	2 Phospho (ST)
78 - 97	2180.12	2179.12	2179.12	0.00	0	VFGLMNIQAEELVEFSSGVK	
265 - 295	3314.69	3313.68	3313.70	-0.02	0	YSIIVAATASEAAPLQYLAPFTAASIGEWFR	
265 - 295	3394.71	3393.70	3393.67	0.03	0	YSIIVAATASEAAPLQYLAPFTAASIGEWFR	Phospho (Y)
422 - 452	3411.74	3410.73	3410.69	0.04	2	QVAGSLKLFLAQYREVAAFAQFGSDLDASTK	Phospho (Y)

Abb. 39: Identifizierung des Proteins der Gelbande 2 (Abb. 36) mit der Liste der zugeordneten und phosphorylierten Peptide V(411-428)K mit Phosphat an ^{413}S und ^{426}S, Y(265-295)R mit Phosphat an ^{265}Y oder ^{281}Y und Q(422-452)K mit Phosphat am ^{434}Y.

In Abb. 40 ist das MALDI-FTICR-MS Spektrum von der 1D-Gelbande 2 gezeigt. Es wurden alle durch die Suche in der Mascot-Datenbank identifizierten tryptischen Peptide den entsprechenden Masse-zu-Ladungsverhältnissen zugeordnet.

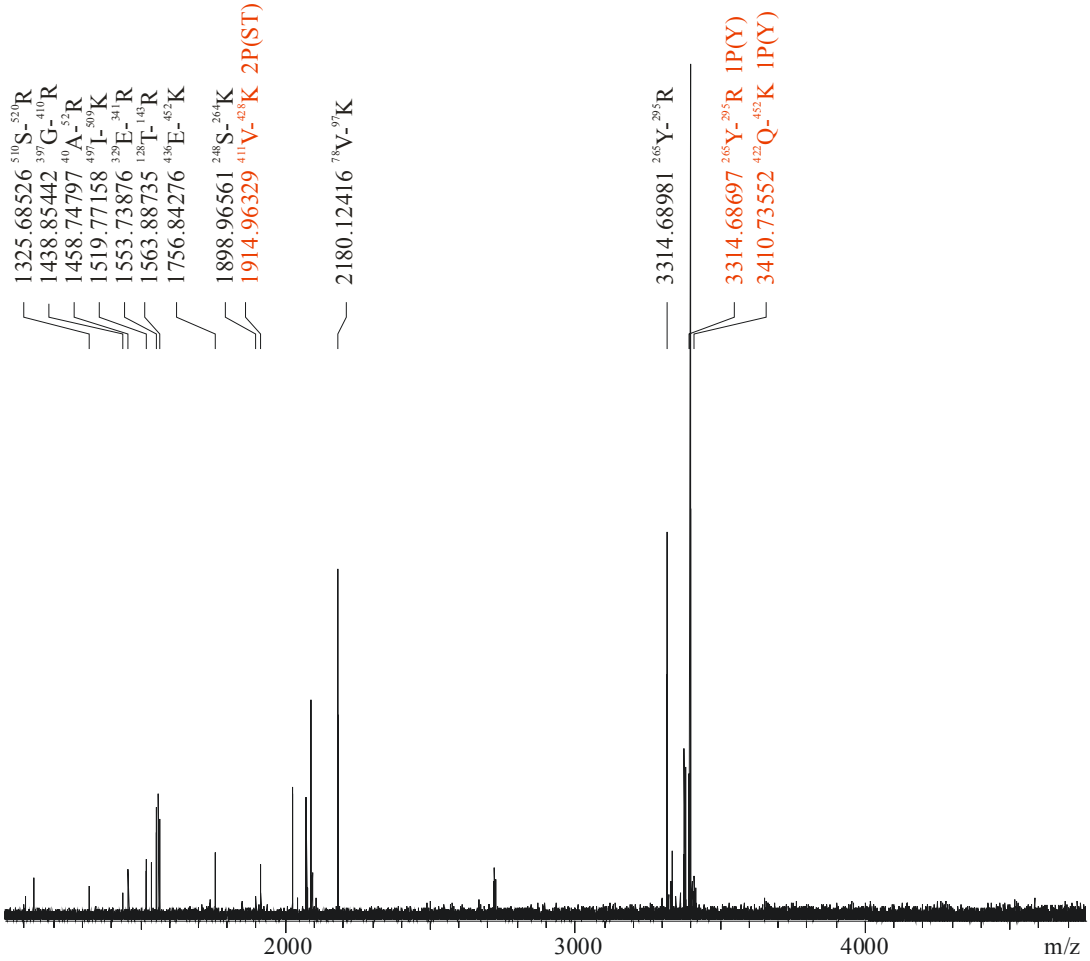


Abb. 40: MALDI-FTICR-MS Spektrum von der 1D-Gelbande 2 (Abb. 36) identifiziert mit der Datenbank (www.matrixscience.com) als Atp1p mit den zugeordneten Peptiden und phosphorylierten Peptiden (siehe Abb. 39)

In den Abb. 41 und 42 sind die MALDI-FTICR-MS Spektren der Proteinbanden 3 und 5 aus dem SDS-PAGE Gel (Abb. 36) dargestellt. Das Protein aus Bande 3 konnte als mitochondriales Porin mit nur 6 tryptischen Peptiden identifiziert werden. Bande 5 wurde als Chain B, Hdbt Inhibited Yeast Cytochrome Bc1 Complex identifiziert. Alle tryptischen Peptide (L(212-224)R, S(109-124)R, Q(249-267)K, L(85-108)K, S(133-164)R, D(175-205)K), die im Massenspektrum enthalten waren, konnten dem Protein zugeordnet werden (siehe Abb. 41).

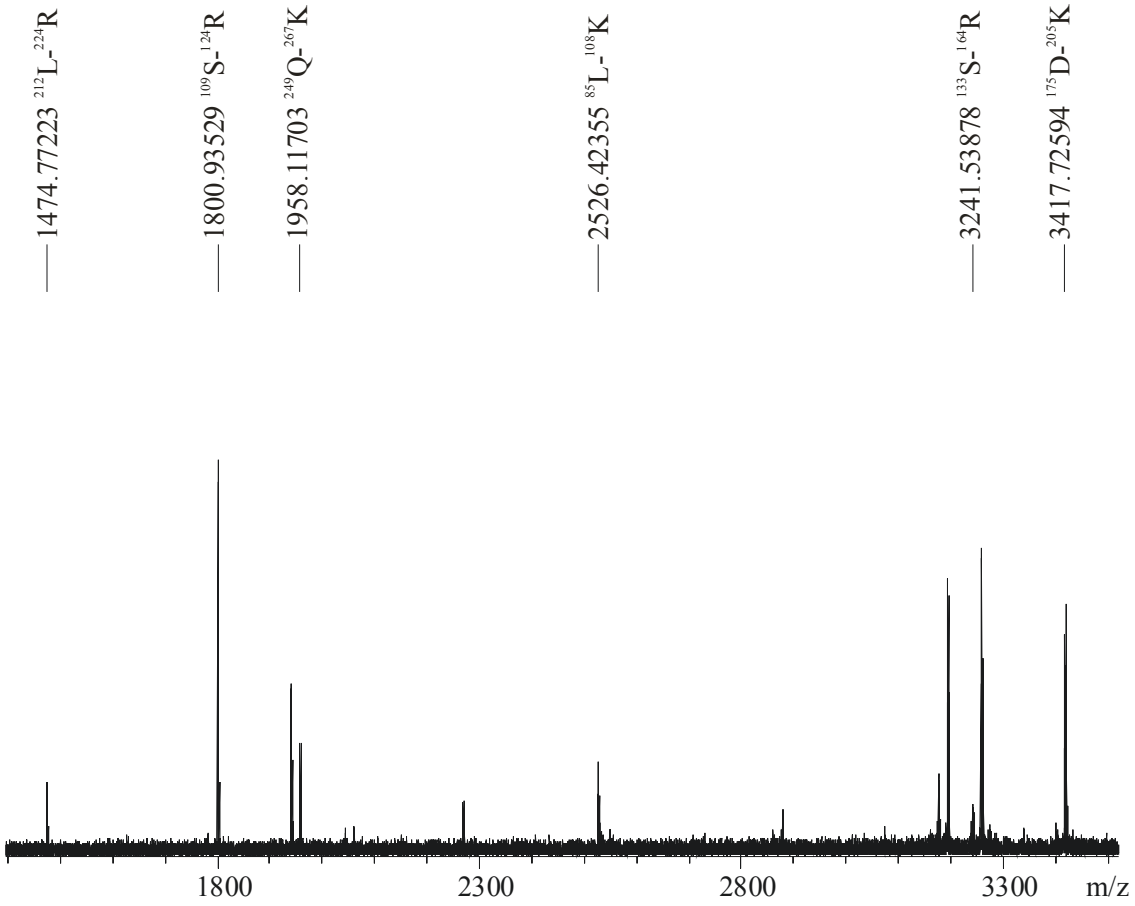


Abb. 41: MALDI-FTICR-MS Spektrum von Bande 3 mit Hilfe der Mascot-Datenbank (www.matrixscience.com) identifiziert als mitochondriales Porin mit den zugeordneten Peptiden L(212-224)R, S(109-124)R, Q(249-267)K, L(85-108)K, S(133-164)R, D(175-205)K

Die durch die Anreicherung der Proteine in der SDS-PAGE (Abb. 36) erzeugten höheren Konzentrationen ermöglichten eine direkte Identifizierung der Phosphorylierungen und teilweise auch der Phosphorylierungsstellen dieser Proteine.

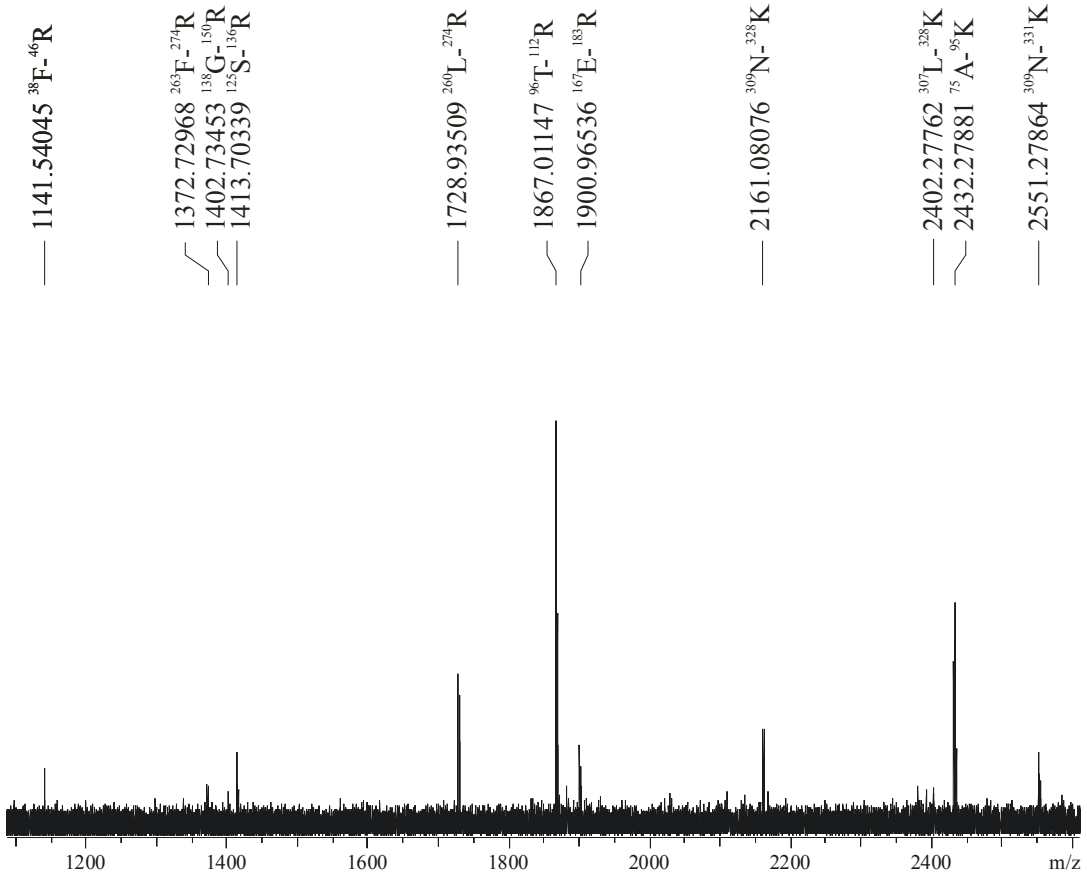


Abb. 42: MALDI-FTICR-MS Spektrum von Bande 5 identifiziert als Chain B, Hdbt Inhibited Yeast Cytochrome Bc1 Complex mit den zugeordneten Peptiden F(38-46)R, F(263-274)R, G(138-150)R, S(125-136)R, L(260-274)R, T(96-112)R, E(167-183)R, N(309-328)K, L(307-328)K, A(75-95)K, N(309-331)K

In Tabelle 11 sind alle identifizierten, phosphorylierten Proteine und die gefundenen phosphorylierten Peptide zusammengefasst. Das Protein in der Gelbande 4 (Abb. 36) konnte nicht identifiziert werden.

Tabelle 11: Mittels MALDI-FTICR-MS und anschließender Datenbanksuche (www.matrixscience.com) identifizierte Proteine mit den phosphorylierten Peptiden (siehe Abb. 37 bis 40)

Bande	Protein	Phosphorylierte Peptide
1	Atp2p	1P(^{31}R-^{45}K) RCMASAAQSTPITGK (Phospho ST) 1P(^{2}V-^{16}K) VLPRLYTATSRAAFK (Phospho Y)
2	ATPase 1 α Untereinheit	2P(^{411}V-^{428}K) VGSAAQVKALKQVAGSLK (Phospho ST) 1P(^{265}Y-^{295}R) YSIIVAATASEAAPLQYLAPFTAASIGEWFR (Phospho Y) 1P(^{422}Q-^{452}K) QVAGSLKLFLAQYREVAAFAQFGSDLDASTK (Phospho Y)

2.3. Identifizierung von Phosphorproteinen mit MALDI-FTICR-MS und Quantifizierung des P- und S-Gehaltes durch ICP-MS

Die Phosphorylierung gehört zu den wichtigsten biologischen Modifikationen von Proteinen und tritt sowohl in normalen als auch kranken menschlichen Gewebeproben (z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen oder Parkinsonschen Krankheit, bei Tumorbildungen und Alterungsprozessen) auf.[162, 163] Phosphor gebunden an Proteinen spielt in allen biologischen Systemen so wie in einzelnen Zellen und Zellorganellen eine wichtige Rolle. Neben der Identifizierung und Sequenzierung der Proteine mittels MALDI-MS und ESI-MS sind deshalb auch die Verknüpfung mit einer leistungsfähigen Analytik bezüglich der quantitativen Bestimmung von Phosphorkonzentrationen in Proteinen (Phosphoproteomics) und deren intrazelluläre Verteilung von wachsendem Interesse.

Von den elementanalytischen Verfahren haben sich in jüngster Zeit die Induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) und die Laserablations-ICP-MS (LA-ICP-MS) zu leistungsfähigen, empfindlichen und nachweisstarken Multielement-Analysenmethode insbesondere für deren Anwendungen in den Lebenswissenschaften und der Medizin (Proteinforschung) entwickelt. Während die ICP-MS zur Bestimmung von Phosphorkonzentrationen in kleinen Volumina von Proteinlösungen (z.B. nach

Trennung von Proteingemischen mittels Gelelektrophorese und anschließend ein tryptischer Abbau) erfolgreich angewandt wird [164], wurde die LA-ICP-MS zur direkten Analyse an Gelen ohne Probenvorbereitung eingesetzt. Für die Bestimmung des Phosphatgehaltes in Proteingemischen wurde vor allem ein doppelfokussierendes Sektorfeld-ICP-MS (ICP-SFMS, ELEMENT, Thermo Electron) eingesetzt. Die instrumentelle Anordnung des in dieser Arbeit verwendeten ICP-MS ist in Abb. 91 dargestellt.

Die Optimierung verschiedener instrumenteller Parameter (z.B. Torchposition, rf-Leistung des ICP, Zerstäubergasflussrate u. ä.) wurde bezüglich maximaler $^{31}P^{+}$-Ionenintensität (für ICP-SFMS) unter Verwendung von einer Phosphorstandardlösung (NIST – National Institute of Standards and Technologies) mit einer P-Konzentration von 1 µg/l durchgeführt. Ein Problem bei der P-Bestimmung in Proteingemischen mit ICP-MS ist das Erscheinen isobarer Interferenzen mit den Molekülionen $^{15}N^{16}O^{+}$, $^{14}N^{16}O^{1}H^{+}$ bei m/z = 31. Diese isobaren Interferenzen von P^{+} mit den genannten Molekülionen lassen sich mit dem verwendeten ICP-SFMS bei einem Massenauflösungsvermögen (m/Δm) von 4000 (siehe Abb. 43) auflösen.

In der Abb. 43 wird gezeigt, dass die P^{+}-Ionen eindeutig von den Molekülionen getrennt sind und damit die P-Bestimmung in den Proteinproben mit hoher Richtigkeit möglich ist. Die Nachweisgrenze der Phosphorbestimmung mit ICP-SFMS in Reinstwasser wurde nach dem 3σ-Kriterium bestimmt (die Nachweisgrenze ist gegeben durch $3\sigma_b C_P / I_P$, wobei σ_b die Standardabweichung von 6 unabhängigen Messungen des Blanks, I_P die gemessene Ionenintensität in der Standardlösung mit der bekannten Phosphorkonzentration C_P darstellt)[164] und beträgt 20 pg/ml. In Proteinproben sind die Nachweisgrenzen für Phosphor infolge der Untergrundintensitäten im Massenspektrometer, Verunreinigungen aus den Lösungsmitteln und der notwendigen Verdünnung der Probenlösung einige Größenordnungen höher als im Reinstwasser (Nachweisgrenze im ICP-SFMS: 420 ng/g).

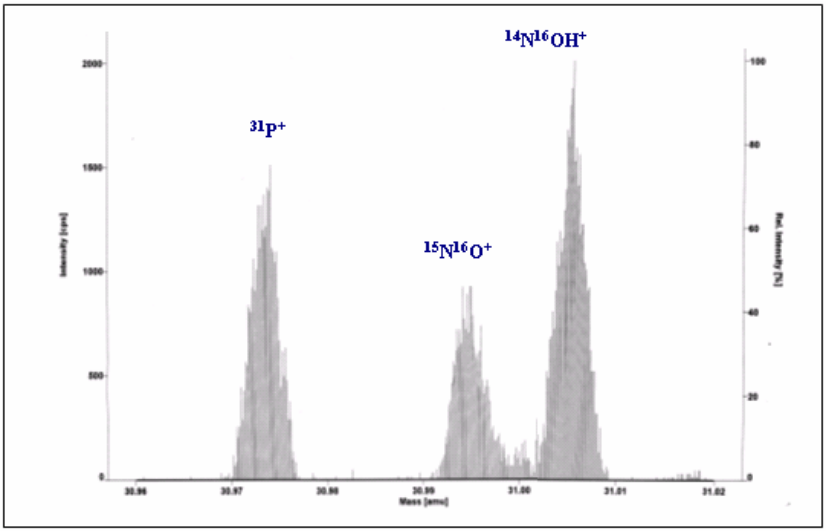


Abb. 43: ICP-Massenspektrum zur Bestimmung von Phosphor in einer 1 µg/l Phosphorlösung in 1%iger HNO_3 bei m/z = 31 gemessen unter Verwendung eines doppelfokussierenden Sektorfeld induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometers (ELEMENT, Thermo Electron, Bremen); Massenauflösungsvermögen – m/Δm = 4000

Die Ergebnisse der Phosphorbestimmung in verschiedenen Proteinen mittels ICP-MS sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Kleine Mengen fester Proteinprobe (bis zu 1-10 µg) oder 1-10 µl tryptischer Proteinabbau wurden mit einem HNO_3-H_2O_2-Gemisch (0,2 ml 30%ige H_2O_2, 0,5ml konz. HNO_3) in einem geschlossenen Aufschlussgefäß in einer Mikrowelle (Mikrowellenofen Mars 5, CEM Microwave Technology Ltd., Matthews, NC, USA) aufgeschlossen.

So enthält β-Casein (Bovine), wie aus der Datenbanken (www.expasy.org) zu entnehmen ist, 5-8 Methionin- und Cysteinreste, an denen Phosphatgruppen gebunden sein können. ICP-MS Messungen ergaben durch Kombination mit den Ergebnissen der biomolekularen Massenspektrometrie 4-5 Phosphorylierungen. Das Molekulargewicht von Tau Protein beträgt 78,83 kDa (www.expasy.org) und es konnten insgesamt 33 Phosphorylierungen mit Hilfe von FTICR-MS unter Verwendung der verschiedenen Ionisationsmethoden MALDI und ESI im Rahmen dieser Arbeit (siehe Kap. 2.1) identifiziert werden.

Tabelle 12: Ergebnisse der Phosphorbestimmung in Proteinproben nach Trennung mit Gelelektrophorese und anschließendem Mikrowellenaufschluss (0,2 ml 30%ige H_2O_2, 0,5ml $HNO_{3(konz.)}$) mit dem Mikrowellenofen Mars 5 (CEM Microwave Technology Ltd., Matthews, NC, USA) [165]

Protein	M.W./kDa	P-Konzentration, mg/g	Phosphorylation
Tau Protein	78,83	1,6	~ 33
β-Casein	25,09	8,1	~ 4-5
β-Casein Abbau		7,9	
α-Casein	24,51	6,4	-
α-Casein Abbau		6,3	
Casein (Merck)	-	13.3	-

Neben der ICP-MS wurde vor allem die LA-ICP-MS zur direkten Phosphorbestimmung in den getrennten Proteinbanden bzw. -spots der 1D- und 2D-Gelen eingesetzt. Für die Elementanalytik mit LA-ICP-MS in den 1D- und 2D-Gelen wurde ein Laserablationssystem Ablascop (Biooptic, Berlin) an ein doppelfokussierendes ICP-MS (Element, Thermo Electron, Bremen) gekoppelt. Zur Laserablation der in den SDS-PAGE-Gelen getrennten Proteine wurde ein Nd:YAG-Laser (Wellelänge: 213 nm, Durchmesser des Laserkraters: 50 µm, Laserleistungsdichte: $3 \cdot 10^9$ W/cm^2, Laserenergie: 6 mJ, Wiederholfrequenz: 20Hz) eingesetzt.

Erste Messungen mit LA-ICP-MS erfolgten an einem 2D-Gel (siehe Kap. 3.3.2) von humanem Blutplasma, das in Abb. 44 dargestellt ist. Dieses Gel wurde mit Coomassiefärbung angefärbt. In den Proteinspots 1 und 2 wurden die P- und S-Intensitäten im Vergleich zum Untergrund (Gel Blank 1 und 2 (Abb. 44)) bestimmt und weiterhin wurden Tiefenprofile von S und P gemessen, die Auskunft über die Lage der Proteinspots in den Gelen geben sollten.

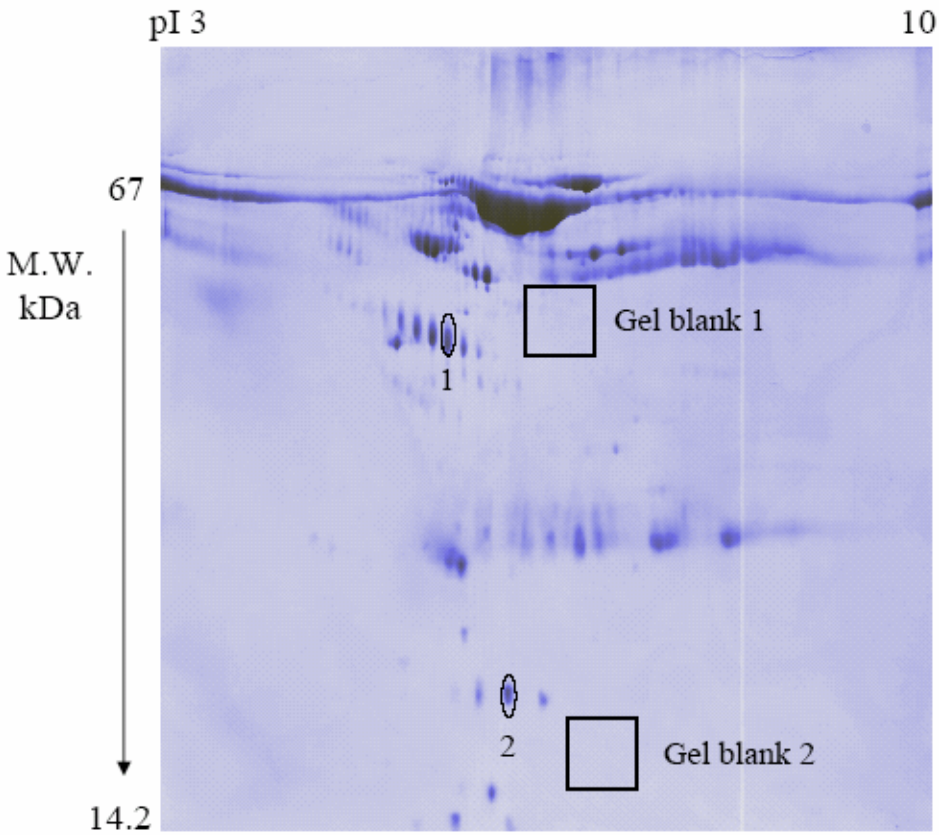


Abb. 44: 2D-Gel von einer humanen Blutplasma Probe angefärbt mit kolloidalem Coomassie. An den Spots 1 und 2 wurden die P- und S-Intensitäten im Vergleich zum Untergrund (Gel blank 1 und 2) bestimmt.

In Abb. 45 sind die transienten Signale von P, die mittels LA-ICP-SFMS in einem 2D Gel gemessen wurden, im Gelblank und in einem Proteinspot dargestellt. Während die relativ hohe P-Konzentration im Gelblank mit 0.11 mg/g bestimmt wurde, betrug die P-Konzentration im analysierten Proteinspot 2.8 mg/g. Die hohe Phosphorkonzentration im Gelblank lässt sich durch mögliche Kontaminationen in den verwendeten Lösungsmittel und Puffersysteme während des Färbevorgangs (siehe Kap. 3.3.3) und der Gelherstellung (siehe Kap. 3.3) begründen.

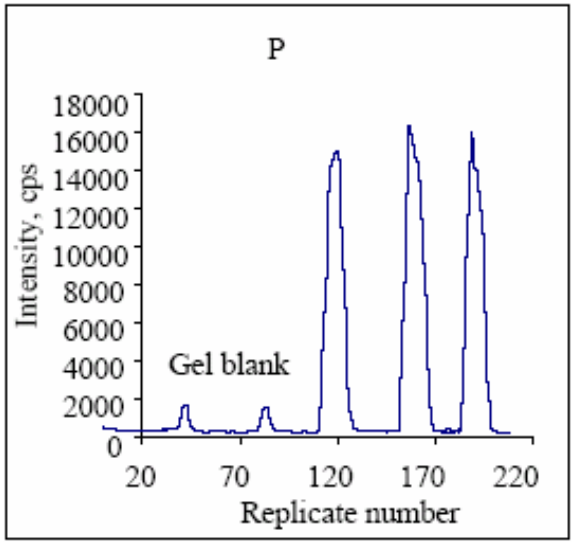


Abb. 45: Transiente Signale von P im Gelblank (2x) und in Proteinspot 1 (3x) (Abb. 44) einer Gehirnprobe gemessen mit LA-ICP-SFMS (je 200 Laserschüsse/transientes Signal)

Transiente Signale von Phosphor und Schwefel in dem ausgewählten Proteinspot 2 in dem 2D-Gel (Abb. 44), die mit LA-ICP-MS gemessen wurden, sind in Abb. 46 als Funktion der Analysentiefe dargestellt. Mit zunehmender Tiefe wurde im ausgewählten Proteinspot im 2D-Gel eine Abnahme der Ionenintensitäten von P^+ und auch S^+ nachgewiesen. In weiteren Untersuchungen wurden für die meisten Proteinspots die maximale Ionenintensität an der Geloberfläche beobachtet, d.h. in dem untersuchten Gel befinden sich die getrennten Proteine in oder auf der Geloberfläche. Interessanterweise bleibt aber das P/S Verhältnis innerhalb des Messfehlers konstant, d. h. dass Schwefel als Internstandardelement für die Phosphorbestimmung in Proteinbanden bzw. –spots von 1D- und 2D-Gelen verwendet werden kann.

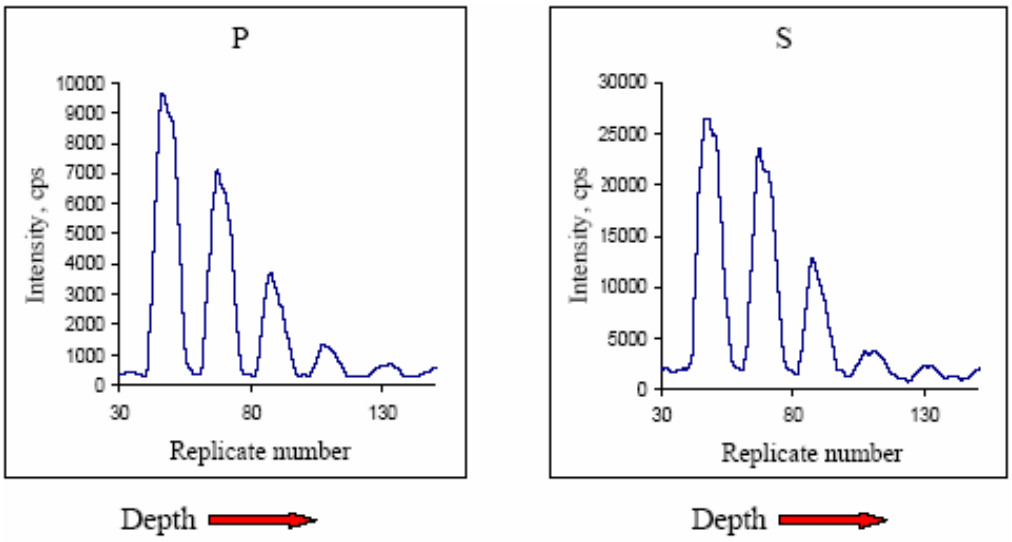


Abb. 46: Transiente Signale von P^+ und S^+ in dem Proteinspot 2 des 2D Gels (Abb. 44) gemessen mit LA-ICP-SFMS (200 Laserschüsse /transientes Signal) als Funktion der Analysentiefe, beginnend an der Geloberfläche (max. Dicke des Gels 1 mm) mit der höchsten Intensität

2.3.1. Bestimmung von Elementkonzentration in Gemischen von Hirnproteinen

Bis jetzt gibt es, wie bereits erwähnt, nur eine definierte Methode, um die Alzheimer'sche Krankheit zu diagnostizieren, indem Amyloid Plaques oder Neurofibrillenbündel in Gehirnproben nachgewiesen werden. Mit den verschiedensten pathologischen Mechanismen wurde versucht, eine Erklärung für die Alzheimer'sche Krankheit zu finden, wobei eine Theorie von der Toxizität von Spurenelementen als eine Ursache für diese Krankheit ausgeht. Die physiologischen Funktionen von Spurenelementen in humanen Gehirnen hängen von deren Bindungsmöglichkeiten an die unterschiedlichen Proteine, deren Konzentrationen und deren Verteilungen ab. Deshalb ist es nicht nur von Bedeutung, die laterale Verteilung der Elemente in Gehirnproben, sondern auch Elementkonzentrationen in der zu analysierenden Probe zu bestimmen. Auch wurden neben den essentiellen Elementen die toxischen Elemente (z.B.: Hg, Cd, Pb) näher betrachtet.

Alle Gehirnproben wurde von Herrn Professor Dr. Gabor Juhacz und Herrn Professor Dr. Miklos Palkovits (Labor für Neuromorphologie, Institut für Anatomie, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn) zur Verfügung gestellt.

Die Gehirnproben von gesundem Humangehirn wurden den Patienten 2 bzw. 6 h post mortem entnommen. Ein Teil der Proben wurde für histologische Untersuchungen präpariert, der Rest wurde bei -74˚C eingefroren und gelagert. Zur Feststellung, ob der jeweilige Patient unter der Alzheimer'schen Krankheit gelitten hatte, wurden die histologischen Proben mikroskopisch auf Amyloid-Plaques untersucht. Die in Tabelle 13 aufgeführten Gehirnproben (jeweils 0,1-0,5 g) wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Für die Gewinnung der Proteine aus Gehirngewebe wurden ein mechanischer Aufschluss und eine Zell-Lyse mittels Pufferlösung miteinander kombiniert.

Tabelle 13: Analysierte Gehirnproben

Entnahme	A 2h post mortem		B 6h post mortem		
	#101	#37	#99	#142	#125
Somatomotor cortex	B105	B486	B7	B265	BR69
Medial prefrontal cortex	B54	B477	B36	B260	BR52
Parahipocampal cortex	B91	B489	B5	B287	
Cerebral white matter		B483			V63
Cerebellar cortex	B75	B480	B39	B269	BR85
Putamen	B76	B485	B3	B278	V67

Gehirnproben (ca. 60 g) von an Alzheimer erkrankten Patienten im Alter zwischen 74 und 84 Jahren wurden 12 bis 14 h post mortem entnommen. Ein Teil der Proben wurde für histologische Untersuchungen auf Amyloid-Plaques verwendet. Diese Gehirnproben (gelagert bei -74˚C) wurden mit 200 ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer (175 mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH = 7,4), 10 mg/l PMSF, 2 mg/l Aprotinin, 2 mg/l Antipain, 2 mg/l Leupeptin, 2mg/l Pepstatin, 5 mM EDTA) versetzt und die Zellen in einem Homogenisator aufgebrochen.

Verschiedene Hirnproteinproben (siehe Tabelle 13 und Alzheimergehirnproteine) wurden bezüglich der Elementzusammensetzung mit ICP-MS analysiert. Alle Hirnproben wurden in einem Mikrowellenofen Mars 5 (CEM Microwave Technology Ltd., Matthews, NC, USA) aufgeschlossen. Die wässrigen Proteinlösungen wurden mit einer peristaltischen Pumpe (Perimax 12, Spetec GmbH, Erdingen, Deutschland) unter Verwendung eines Mikrozerstäubers (PFA-100, Elemental Scientific Inc., Ohama, NE, USA) in die ICP-Ionenquelle eingeführt. Die ICP-MS Messungen wurden im Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

In Abb. 47 ist das Konzentrationsverhältnis von ausgewählten Elementen einer an Alzheimer erkrankten Gehirnprobe und einer normalen Gehirnprobe (zwischen den Proben aus Alzheimerkrankem Gehirn und normalem Gehirn) gemessen mittels ICP-SFMS, dargestellt. Konzentrationsunterschiede wurden für Phosphor und einige Metalle (wie z. B. Al, Fe, Cu, Zn) in den gemessenen Proben beobachtet. Die Phosphatkonzentration in der Alzheimerprobe war im Vergleich zur normalen Gehirnprobe um ca. Faktor 4 höher. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit dem anderer Studien, die in der Literatur [113, 102] beschrieben wurden. Daraus lässt sich vermuten, dass sich erhöhte Konzentrationen der Elemente Al, P, Fe und Zn für die positive Analyse der Alzheimerschen Krankheit verwenden lassen.

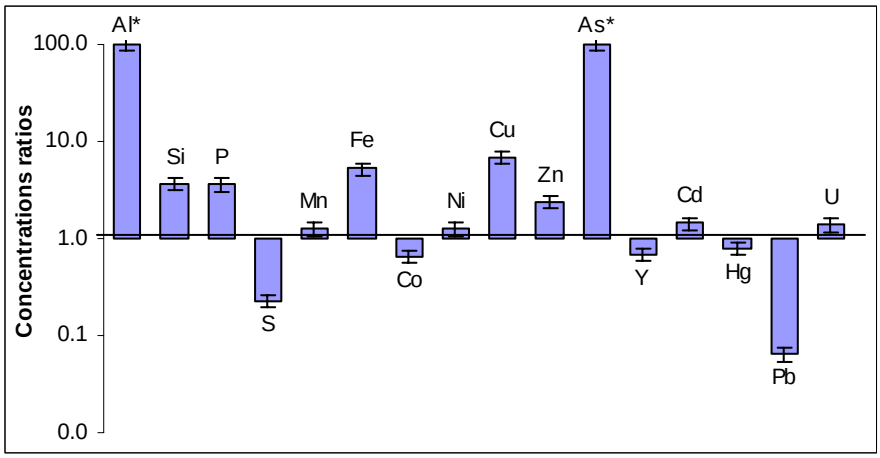


Abb. 47: Konzentrationsverhältnis von ausgewählten Elementen zwischen einer gesunden und eine Alzheimerkranken Gehirnprobe gemessen mittels ICP-SFMS

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der ICP-SFMS-Messungen der Konzentrationen der Elemente Al, Si, P, S, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Y, Cd, Hg, Pb, Th und U zusammengefasst. Es wurden relativ hohe Konzentrationen an Phosphor in den Gehirnproben von Erkrankten beobachtet. Die P-Konzentration betrug ~ 250 µg g^{-1} in der Alzheimergehirnprobe und 70 µg g^{-1} im Normalgehirn. Erhöhte Elementkonzentrationen konnten auch für die Elemente Eisen, Kupfer und Zink ermittelt werden, dies könnte in der Alzheimerforschung von Bedeutung sein. Die massenspektrometrischen Ergebnisse zeigen, dass Fe-, Zn- und Cu-Konzentrationen im Alzheimergehirn im Vergleich zum Normalgehirn sogar etwa um eine Zehnerpotenz höher liegen.

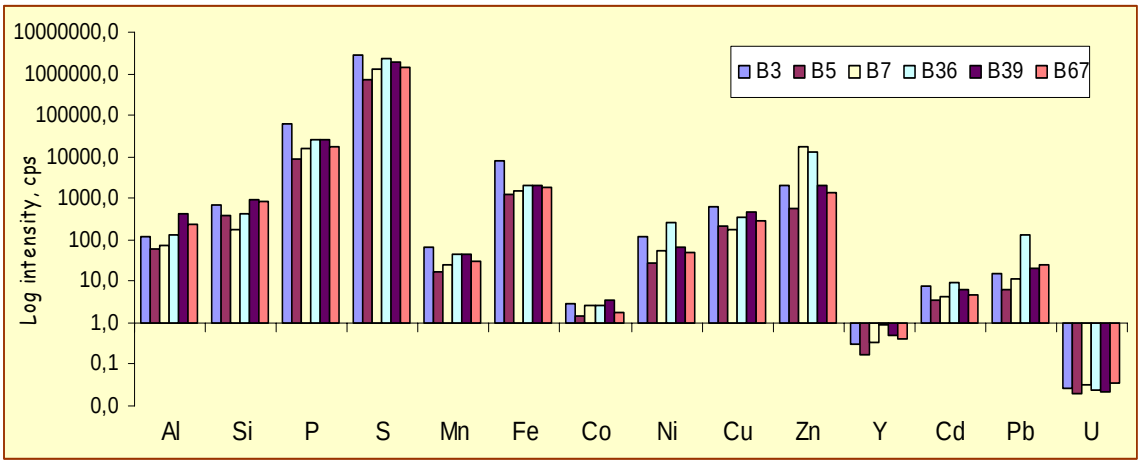


Abb. 48: Intensitäten von ausgewählten Elementen aus verschiedenen Regionen eines Humangehirns

Im Gegensatz dazu wurde für Blei eine höhere Durschnittskonzentration im Normalgehirn gemessen. Mangan, Cobalt, Nickel, Yttrium, Quecksilber und Cadmium wurden mit etwa der gleichen Konzentration in beiden Proben gefunden. Es lässt sich vermuten, dass viele der Metalle, die in der Leber und den Nieren akkumuliert sind, mit der Zeit auch im Gehirn ablagert werden.

In Abb. 48 sind die Konzentrationen einiger Elemente aus verschiedenen Proben aus unterschiedlichen Gehirnregionen dargestellt. Generell lässt sich feststellen, dass die analysierten Elemente in allen Gehirnregionen eine ähnliche Konzentration aufweisen.

Aber in einigen Fällen konnten auch Unterschiede nachgewiesen werden. Zum Beispiel in der Probe B3, die aus einer Region des Gehirns entnommen wurde, die für die motorische Kontrolle zuständig ist (Funktionen, die bei der Parkinsonschen und der Huntingtonschen Krankheit beeinträchtig sind), waren die Konzentrationen aller analysierten Elemente (bis zu einer Zehnerpotenz) höher gegenüber der zur Probe B7 (Kontrolle für voluntäre Bewegung) (siehe Tabelle 14).

Uran als radioaktives „Allgegenwartselement“ konnte im Ultraspurenbereich in allen untersuchten Proben mit den Konzentrationen im sub-ng/g im Alzheimergehirn und im Normalgehirn nachgewiesen werden. Einige Elemente wie Vanadium, Chrom und Thorium wurden in den Proben nicht gefunden, da die Konzentrationen unter der Nachweisgrenze des Analysenverfahrens lagen. Die Nachweisgrenzen (LOD – limit of detection) wurden nach dem 3σ-Kriterium (die Nachweisgrenze ist gegeben durch $3\sigma_b C_P / I_P$, wobei σ_b die Standardabweichung von 6 unabhängigen Messungen des Blanks, I_P die gemessene Ionenintensität in der Standardlösung mit der bekannten Phosphorkonzentration C_P darstellt)[164] bestimmt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Ergebnisse der ICP-SFMS Messungen von Al, Si, P, S, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Y, Cd, Hg, Pb, Th und U Konzentrationen in humanen Gehirnproben von Alzheimerpatienten (AD) und gesunden Patienten (siehe Tabelle 13)

Element	Konzentration ($\mu g\ g^{-1}$)		LOD ($\mu g\ g^{-1}$)
	AD	Normalgehirnprobe (somatomotor cotex)	
Al	0,7	< LOD	0,05
Si	1,5	0,42	0,13
P	251	70	17
S	281	1255	1,7
V	< LOD	< LOD	0,0006
Cr	< LOD	< LOD	0,0027
Mn	0,04	0,029	0,005
Fe	11	2,1	0,7
Co	0,0015	0,002	0,001
Ni	0,090	0,071	0,008
Cu	2,0	0,3	0,03
Zn	22	9,3	0,6
As	0,021	< LOD	0,007
Y	< LOD	< LOD	0,0005
Cd	0,019	0,013	0,002
Hg	< LOD	< LOD	0,21
Pb	0,093	1,4	0,005
Th	< LOD	< LOD	0,003
U	< LOD	< LOD	0,00008

LOD (limit of detection) – Nachweisgrenze (3σ-Kriterium)

2.3.2. Identifizierung von Proteinen in humanem Gehirngewebe

Zum Nachweis von Phosphat- und Metallionen-haltigen Proteinen in einer humanen Gehirnprobe wurden die Proteine mit 2D-Gelelektrophorese getrennt. Für die LA-ICP-MS-Untersuchungen wurden aus dem 2D-Gel, wie in Abb. 49 gezeigt, 14 Gelstücke ausgeschnitten. Die Größe der Gelstücke wurde durch den Innendurchmesser der Laserablationskammer bestimmt. Die Gelstücke wurden so ausgewählt, dass möglichst viele Proteinspots analysiert werden konnten. In den ausgeschnitten 2D-Gelstücken wurden 176 Proteinspots mit LA-ICP-MS analysiert.

Ein Teil der Proteinspots, in denen P und Metalle nachweisbar waren, wurden aus einem zweiten analogen Gel ausgeschnitten und nach einem tryptischen Abbau mittels MALDI-FTICR-MS analysiert. Durch Suche in Protein-Datenbanken (www.matrixscience.com (siehe Kap. 3.5.3)), in der die mit MALDI-FTICR-MS erhaltenen Daten eingegeben wurden, konnten die einzelnen Proteinspots identifiziert werden. Die mittels massenspetrometrischer Messungen erhaltenen FTICR-MS Daten wurden in diese Datenbanken zusammen mit den möglichen Modifikationen (z.B.: Phosphorylierungen, Oxidierung) und dem Ursprung (z.B.: Homo sapiens, Mus muskulus) der jeweiligen Probe eingegeben. Aus einer Vielzahl möglicher Identifizierung wurde das Protein mit dem höchsten „High score“ (mindestens 60 bei Mascot) ausgewählt.

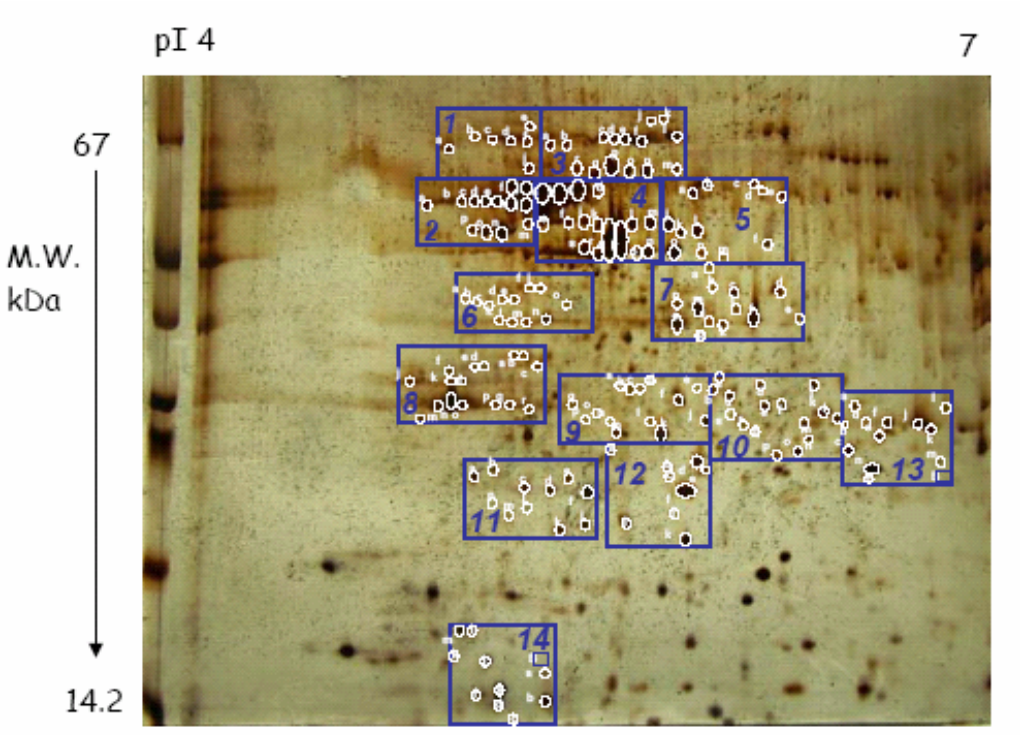


Abb. 49: 2D-Gel von humanem Gehirn (somatomotor cortex: Probe 7#99, siehe Tabelle 13) mit 176 gekennzeichneten Proteinspots, die mit LA-ICP-MS analysiert wurden

In Abb. 50 ist das MALDI-FTICR- Massenspektrum von Spot 3n (α-Internexin) mit den zugeordneten Peptiden dargestellt. Dieses Protein konnte mit einem guten „High score“ von 213 mittels der Mascot-Datenbank identifiziert werden. So konnte auch ein phosphoryliertes Peptid K^{448}-K^{461} (E^{449}-K^{462}) mit dem Molekulargewicht 1672,896 Da nachgewiesen werden. Dieses Peptid enthält eine Phosphorylierungsstelle, die sich an einem Serinrest entweder an Serin S^{460} oder am S^{456} befindet.

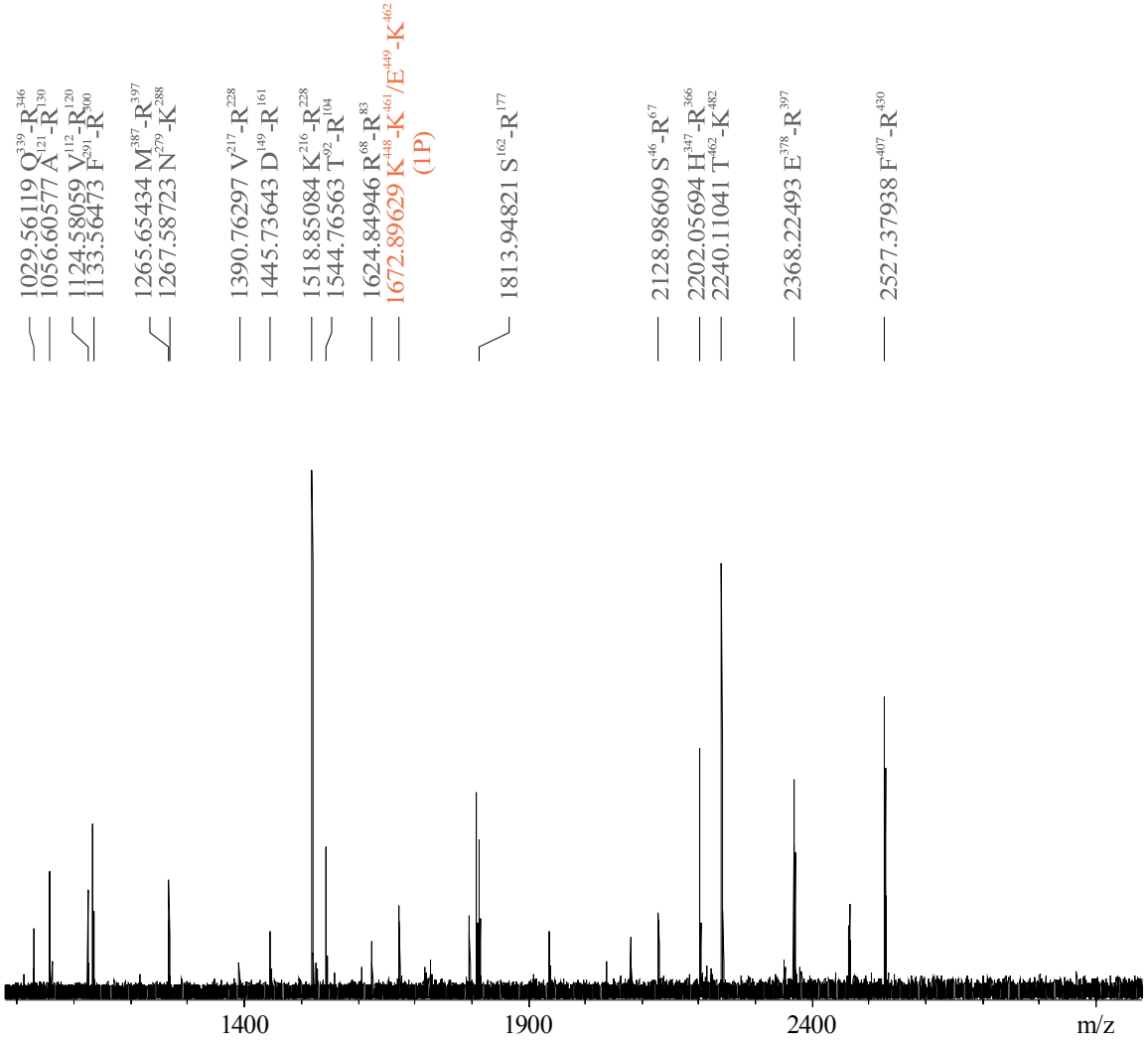


Abb. 50: MALDI-FTICR-Massenspektrum von Proteinspot 3n (siehe Abb. 49) identifiziert als α-Internexin mit den zugeordneten Peptiden und einem phosphorylierten Peptid K^{448}-K^{461} (E^{449}-K^{462})

In Abb. 51 ist das MALDI-FTICR-Massenspektrum des Proteinspots 4m (GFAP, glial fibrillary acidic protein) mit den identifizierten Peptiden K(181-197)R, L(356-366)R, H(344-355)K, I(376-389)R, L(330-343)R, S(12-28)R, L(136-151)R, K(201-216)R, T(239-257)R und L(162-182)R gezeigt. Es wurde mittels MALDI-FTICR-MS keine Phosphorylierung nachgewiesen.

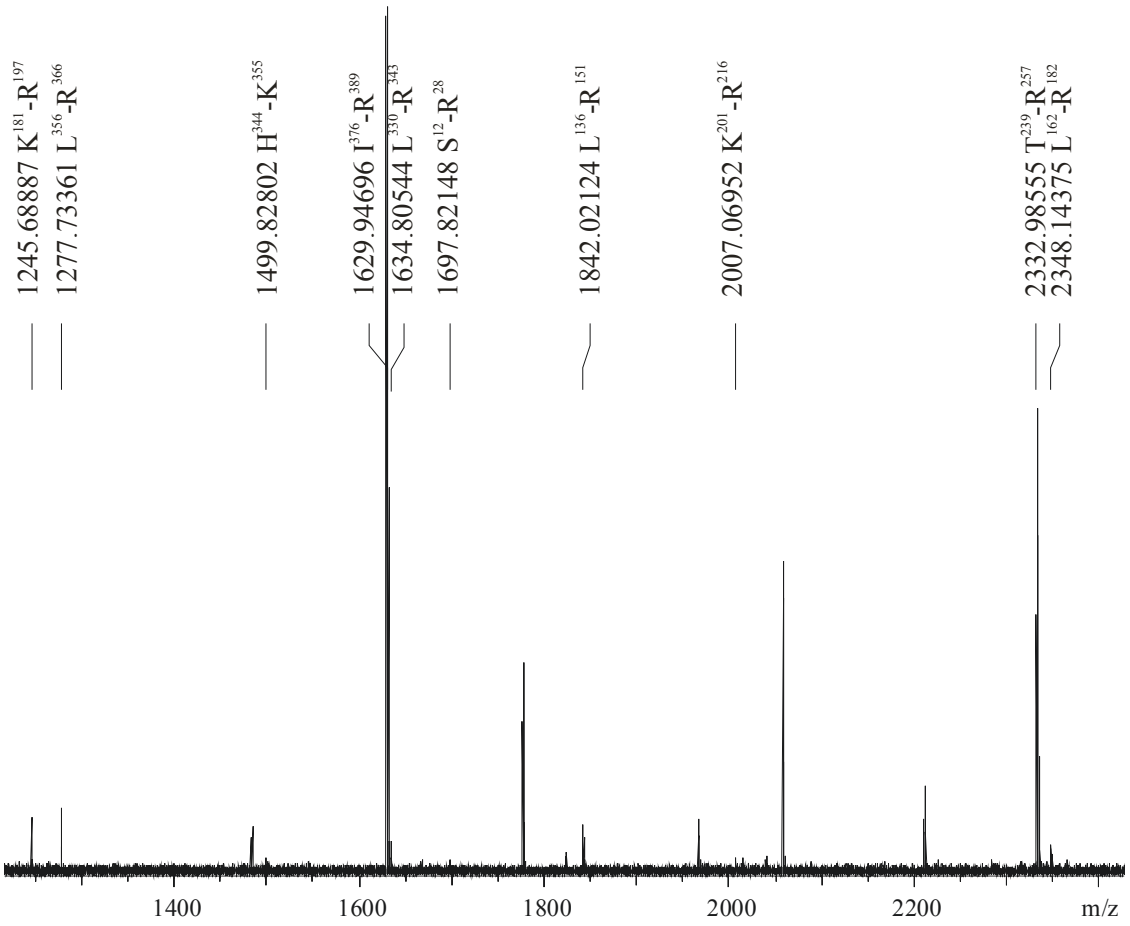


Abb. 51: MALDI-FTICR-Massenspektrum von Proteinspot 4m (siehe Abb. 49), der mit der Mascot-Datenbank (www.matrixscience.com) als GFAP (glial fibrillary acidic protein) identifiziert wurde

Die durch eine Datenbanksuche identifizierten Proteine sind in Tabelle 15 mit den molekularen Massen aus der Datenbank ($M.W._{theor.}$) und den entsprechenden molekularen Massen ($M.W._{exp.}$), bestimmt mittels eines Proteinmarkers, der dem Gel zugefügt wurde, zusammengefasst. Die Anzahl der Cysteinreste der identifizierten Proteine wurde aus den aus der Mascot-Datenbank erhaltenen Aminosäuresequenzen entnommen. Zum Beispiel wurde der Proteinspot 3n, der 6 Cysteinreste enthält, mit einer molekularen Masse von 55,4 kDa als α-Internexin identifiziert werden. Spot 4n wurde als Creatine kinase β-chain identifiziert und enthält 16 Cysteinreste. Proteinspot 3f - vacuolar ATP Synthase katalytische Untereinheit A - besitzt 29 Cysteinaminosäuren. Die

molekularen Massen der analysierten Proteine aus dem 2D-Gel (Abb. 49), die durch Vergleich mit dem Proteinmarker (Fluka, M.W. 14,2-67 kDa) erhalten wurden, stimmen gut mit den theoretischen Werten aus der Mascot-Datenbank überein.

Tabelle 15: Identifizierte Proteine von einem 2D-Gel von humanem Gehirn 7#99 (somatomotor cortex (siehe Tabelle 13) (siehe Abb. 49)

Spot	Protein	$M.W._{theor.}$ (kDa)	$M.W._{exp.}$ (kDa)	Cystein-Reste
2g	Tubulin α-4 chain	49,9	~ 50	24
2l	Tubulin β-4 chain	50,4	~ 50	27
3f	Vacuolar ATP synthase katalytische Untereinheit A, ubiquitous isoform	68,3	~ 69	29
3n	α-Internexin	55,4	~ 55	6
4m	GFAP protein	49,7	~ 50	12
4n	Creatine kinase, β chain	42,6	~ 43	16
4p	ACTB protein	40,2	~ 40	22
4q	ACTB protein	40,2	~ 40	22
4o	Creatine kinase, β chain	42,6	~ 43	16
5a	Vacuolar ATP synthase Untereinheit B, brain isoform	56,5	~ 57	22
7f	Chain B, Human Heart L-Lactate Dehydrogenase H Chain	36,5	~ 37	14
12f	Peroxiredoxin 2 isoform b	16,0	~ 16	2

In einem weiteren Experiment wurden Proteine aus einer Alzheimer Gehirnprobe nach dem Aufschluss der Zellen mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt (siehe Abb. 52). Das Gel wurde nach der Proteintrennung mittels Silberfärbung angefärbt. Neun Spots mit unterschiedlichem pI und unterschiedlicher Masse wurden ausgewählt und mittels LA-

ICP-MS analysiert. Für diese Experimente wurden Gehirnproben (ca. 60 g) von an Alzheimer erkrankten Patienten im Alter zwischen 74 und 84 Jahren verwendet, die 12 bis 14 h post mortem entnommen worden waren (siehe Kap. 2.3). Ein Teil der Proben wurde für histologische Untersuchungen auf Amyloid-Plaques verwendet.

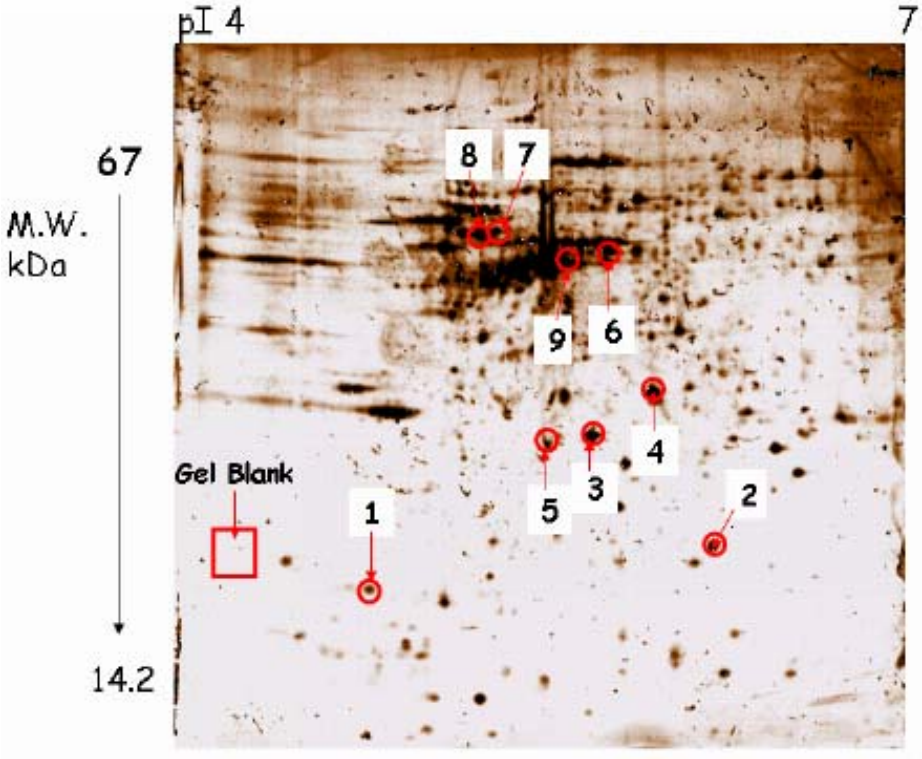


Abb. 52: 2D-Gel von einer Alzheimer Gehirnprobe

Zur Bestimmung des Geluntergrundes wurde bei allen LA-ICP-MS Untersuchungen an 2D-Gelen jeweils ein Blank (Abb. 52) mit analysiert. Aus einem zweiten parallel präparierten Gel wurden die entsprechenden Spots ausgeschnitten. Mittels MALDI-FTICR-MS und anschließender Datenbanksuche konnte ein Teil der Proteine identifiziert werden. Die Ergebnisse der Proteinidentifizierung sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Wiederum wurde eine gute Übereinstimmung der molekularen Massen der analysierten Proteine aus dem 2D-Gel (Abb. 52), die durch Vergleich mit dem Proteinmarker (Fluka, M.W. 14,2-67 kDa) erhalten wurden, mit den theoretischen Werten aus der Mascot-Datenbank gefunden.

Die Zahl der Cysteinreste in den analysierten Proteinen, die Schwefel enthalten, variiert zwischen 7 und 24. Über die Zahl der Cysteinreste lassen sich unter Verwendung der S-Konzentrationen im Protein die experimentellen Ergebnisse der LA-ICP-MS Messungen quantifizieren.

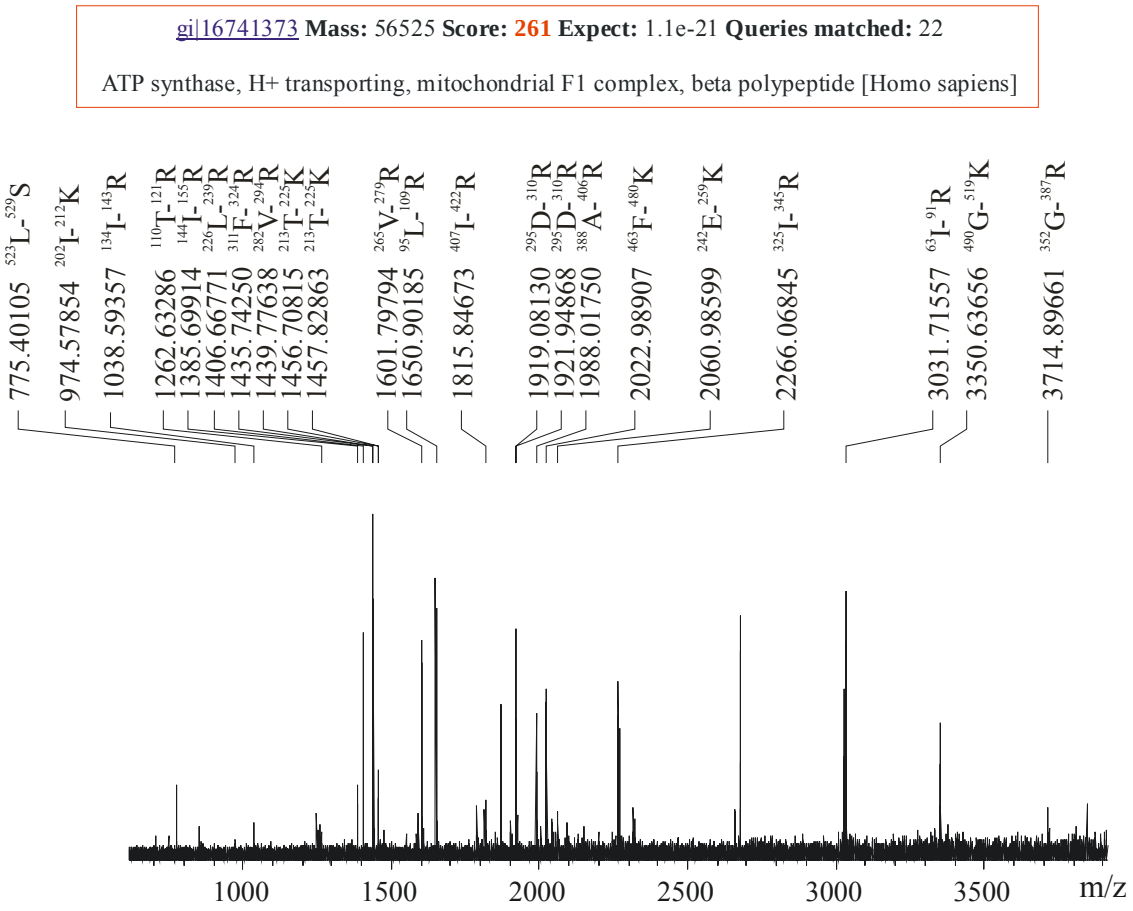


Abb. 53: MALDI-FTICR-MS und Ergebnis der Datenbanksuche (www.matrixscience.com), das zeigt, dass Spot 8 mit einem Score von 261 als ATP synthase mitochondrial F1 complex, beta polypeptide [gi|16741373 – Proteinnummerierung der Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov)] identifiziert wurde; es konnten 22 der eingegebenen tryptischen Peptide aus dem MALDI-FTICR-MS Spektrum dem Protein zugeordnet werden

Einige ausgewählte, im Gel getrennte Proteine wurden analysiert, wie z.B. Spot 8 – ATP synthase β-chain (Abb. 53) oder Spot 9 – Mutant β-Actin mit einem Molekulargewicht von 56,54 oder 42,14 kDa. Es war jedoch nicht möglich, die Proteine aus den Spots 7 und 10 trotz Anreicherung (aus 7 Gelen) und wiederholten Experimenten zu identifizieren. Dies kann auf die geringere Konzentration der Proteine in diesen Spots zurückzuführen sein. Möglich wäre weiterhin, dass diese Proteine noch nicht in der Datenbank, die für die Suche verwendet wurde, enthalten waren.

Tabelle 16: Mit MALDI-FTICR-MS identifizierte Proteine in einer Alzheimergehirnprobe (siehe Kap. 2.3) nach 2D-Gelelektrophorese (Abb. 52)

Spot	Protein	$M.W._{theor.}$ (kDa)	$M.W._{exp.}$ (kDa)	Cystein-Reste
2	Chain A, Glutathione Transferase	23,2	23	7
6	Creatine kinase, β chain	42,9	43	16
8	ATP synthase β chain, mitochondrial	56,5	56	14
9	Mutant β-Actin	42,1	42	24

2.3.2.1. Identifizierung von Phosphat- und Metallionen-haltigen Proteinen in humanen Gehirnproben

176 auf einem 2D-Gel getrennten Proteinspots in 14 Gelausschnitten (siehe Abb. 49) der humanen Gehirnprobe 7#99 (somatomotor cortex, siehe Tabelle 13) wurden mit LA-ICP-MS auf das Vorhandensein verschiedenster Elemente (P, Zn, Cu, U) untersucht.[87] Gleichzeitig wurde Schwefel analysiert, da dieses Nichtmetall für die Bestimmung der Elementkonzentrationen als Internstandardelement eingesetzt werden kann. Bei allen Analysen der getrennten Proteinspots mit LA-ICP-MS wurde der Laserstrahl auf die Probenoberfläche fokussiert (der Durchmesser des Laserstrahls betrug 50 µm, bei einer Laserleistungsdichte von $3 \cdot 10^9$ W/cm^2, einem Massenauflösungsvermögen m/Δm von 4400, einer Wellenlänge von 213 nm und einer Wiederholungsfrequenz von 20 Hz) und

der Proteinspot ablatiert (200 Laserschüsse pro Spot). Das ablatierte Material wurde mit Argon als Trägergas in die Ionenquelle des ICP-MS transportiert. In der Ionenquelle fand die Atomisierung und Ionisierung des Probenmaterials statt. Die LA-ICP-MS Messungen wurden im Forschungszentrum in Jülich durchgeführt.

43 Proteine enthielten Cu, 31 Proteine enthielten P, während 49 Proteinen Zn mit teilweise relativ hoher Ionenintensität (z.B. in den Spots 2g, 2l, 5a, 9b, 9d, 10j, 12a und 14c) enthielten. Maximale Zn-Ionenintensität wurde in Spot 9d mit 80000 cps (counts per second) ermittelt. In 20 Proteinspots konnte auch Uran detektiert werden. Die höchste Ionenintensität von $^{238}U^{+}$ mit etwa 4000 cps wurde in Proteinspot 11e gemessen, gefolgt von Spot 6g mit einer Intensität von 2200 cps. Der Nachweis von Uran korreliert mit dem Auftreten von $^{31}P^{+}$, $^{63}Cu^{+}$ und $^{64}Zn^{+}$ in beiden Proteinspots. In nur einem Protein wurde Uran allein gefunden; nämlich in Spot 10a, in dem die Ionenintensität von $^{238}U^{+}$ 300 cps signifikant über dem Untergrundsignal (Untergrundsignal <1 cps) lag. Die wichtigsten qualitativen Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst. In den meisten Proteinspots (wie z.B. 1a-d, 1f, 1j, 2a-c, 3c, 4f, 5b, 6a, 6b, 6e, 6f, 7a-c, 8e, 8f, 8j, 8k, 8l, 9j, 9k, 9l, 10a-d, 12b, 13a, 13b, 14a, 14b) konnte keines der gesuchten Elemente (P, Cu, Zn und U) nachgewiesen werden. Deshalb sind diese Proteinspots in Tabelle 17 nicht aufgeführt. Wurde Phosphor in einem Protein gefunden, so wurde teilweise Cu und Zn mit einer höheren Ionenintensität im Vergleich zum Phosphor gemessen (z.B. 5a, 9d, 10j, 14c). In einigen Proteinen waren aber nur einzelne der untersuchten Elemente enthalten. So wurde mit LA-ICP-MS P in 10e und 10f, Cu in 1j, Zn in 3c und 12c, P und Zn in 3f und U in 10a detektiert, wobei die Ionensignale von $^{31}P^{+}$, $^{64}Zn^{+}$, $^{63}Cu^{+}$ und/oder $^{238}U^{+}$ nur mit geringen Intensitäten gemessen wurden (siehe Tabelle 17). In einigen Proteinspots (z.B. Cu and Zn in 2l and 9d; P in 9b; P, Cu, Zn und U in 12a) konnten die Elemente mit einer vergleichsweise hohen Intensität gefunden werden. Mittels MALDI-FTICR-MS wurde nach der qualitativen Analyse mit LA-ICP-MS (siehe Tabelle 17), die Proteine untersucht, bei denen mit der LA-ICP-MS neben Phosphat auch Metallionen detektiert wurden. Die ausgewählten Proteinspots 2g, 2l, 3f, 3n, 4m, 4n, 4p, 4q, 4o, 5a, 7f und 12f wurden aus einem parallel erstellten 2D-Gel der Probe 99#7 ausgeschnitten, tryptisch abgebaut und mit MALDI-FTICR-MS untersucht.

Tabelle 17: Qualitative Ergebnisse von P, Cu, Zn und U in ausgewählten Proteinspots von 2D-Gel (Abb. 49) von Humangehirn 7#99 (somatomotor cortex (siehe Tabelle 13)) gemessen mittels LA-ICP-MS

Spot	P	Cu	Zn	U
1e	+	+	+	(+)
1f	-	(+)	+	-
2g	++	++	++	(+)
2l	-	++	++	-
4m	-	++	+	(+)
5a	+	+	++	+
6g	+	+	+	+
7d	-	+	++	-
7e	++	+	+	+
8c	+	+	+	-
9b	++	+	++	+
9c	-	+	++	(+)
9d	(+)	++	++	(+)
9f	+	+	+	-
10j	+	++	++	(+)
11a	+	+	+	-
11d	+	+	+	-
11e	+	+	+	+
12a	++	++	++	+
12c	-	-	+	-
13c		+	+	+
13l	+	+	+	+
14c	+	++	++	+

++ > 10000 cps; (+) Signal nahe dem Untergrund; - nicht detektiert

Die transienten Signale von $^{31}P^+$, $^{63}Cu^+$, $^{64}Zn^+$ und $^{238}U^+$ (erzeugt durch 200 Laserschüsse pro Spot) in unterschiedlichen Gelausschnitten des 2D-Gels (siehe Abb. 49) gemessen mit LA-ICP-MS sind in den Abb. 54 – 59 zusammengefasst. Abb. 54 zeigt das Massenspektrum für die Detektion von phosphorylierten Proteinen von den Gelausschnitten 3 und 5, wobei die transienten Signale von $^{31}P^+$ in den ausgewählten Proteinen in den Ausschnitten des 2D-Gels (Abb. 49) als Funktion der Messzeit der LA-ICP-MS dargestellt wurden. Aufgrund des relativ hohen Untergrundes im Gel auf der Masse 31 u (etwa 200 – 400 cps) war es teilweise schwierig, Phosphor in den Proteinspots zu detektieren. Die höchste Ionenintensität von $^{31}P^+$ in diesen Gelausschnitten wurde in den Spots 3n und 5a gefunden (siehe Abb. 54 a und b).

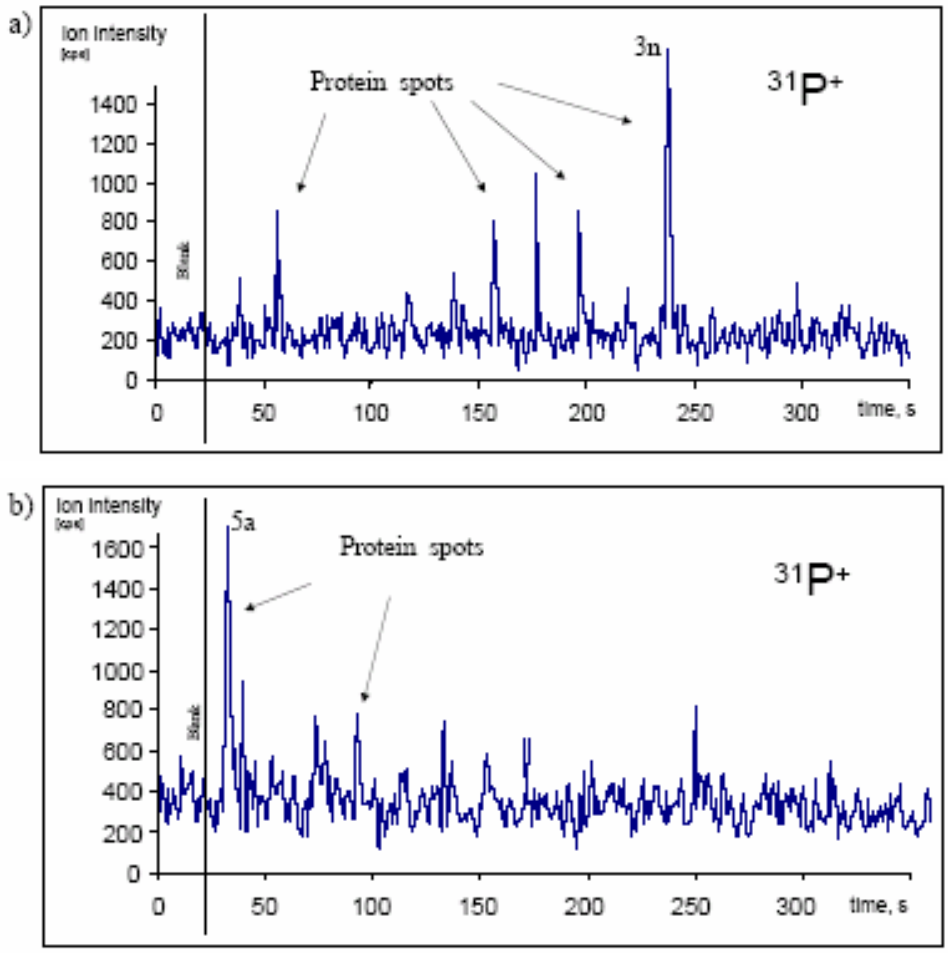


Abb. 54: Transiente Signale von $^{31}P^{+}$ der Ausschnitte a) 3 und b) 5 aus dem 2D-Gel vom Normalgehirn (somatomotor cortex) (Abb. 49)

In Abb. 55 sind die transienten Signale von $^{63}Cu^{+}$ und $^{64}Zn^{+}$ vom Gelausschnitt 5, die mittels LA-ICP-MS in verschiedenen Proteinspots gemessen wurden, als Funktion der Messzeit, dargestellt. Im Proteinspot 5a wurden alle analysierten Elemente gefunden. Auch $^{238}U^{+}$ konnte im Allgemeinen mit niedriger Ionenintensität in einzelnen Proteinspots (3b, 3f, 3k und 5a) detektiert werden. Interessanterweise war das Untergrundsignal bei der Masse 238 u das niedrigste im Vergleich zu allen anderen untersuchten Analyten.

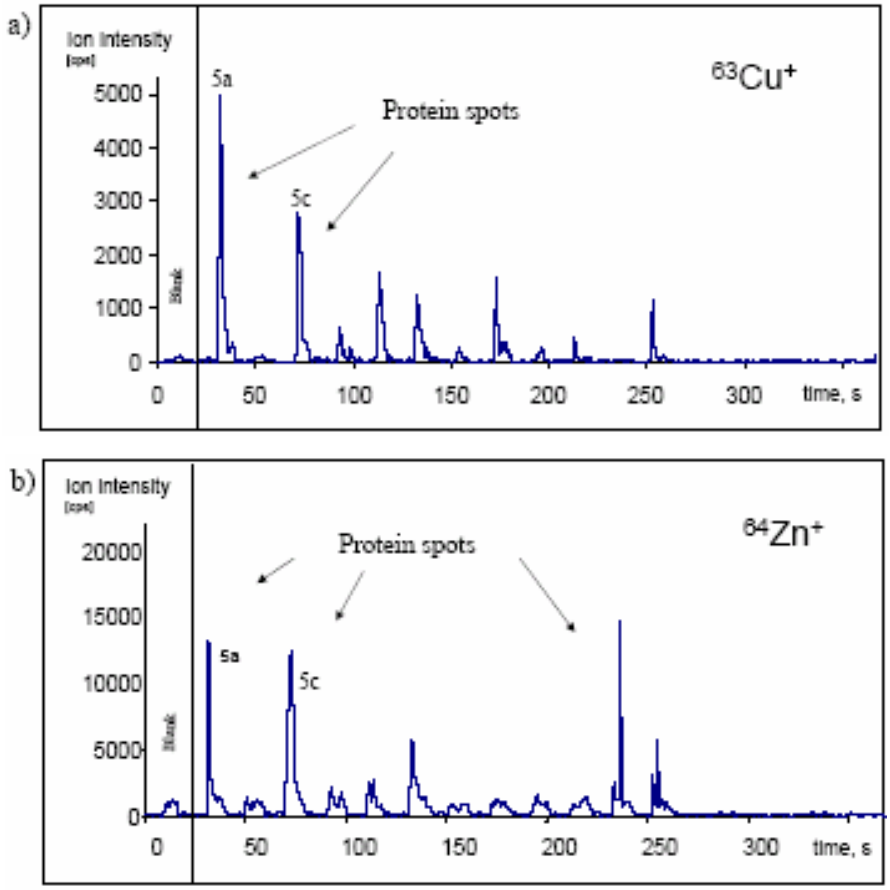
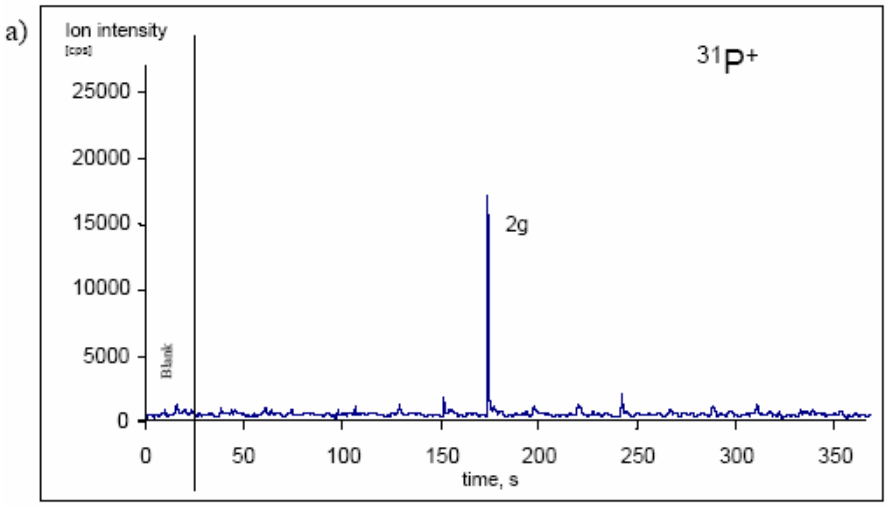


Abb. 55: Transiente Signale von a) $^{63}Cu^{+}$ und b) $^{64}Zn^{+}$ vom Ausschnitt 5 aus dem 2D-Gel einer Normalgehirnprobe (somatomotor cortex) (siehe Abb. 49)



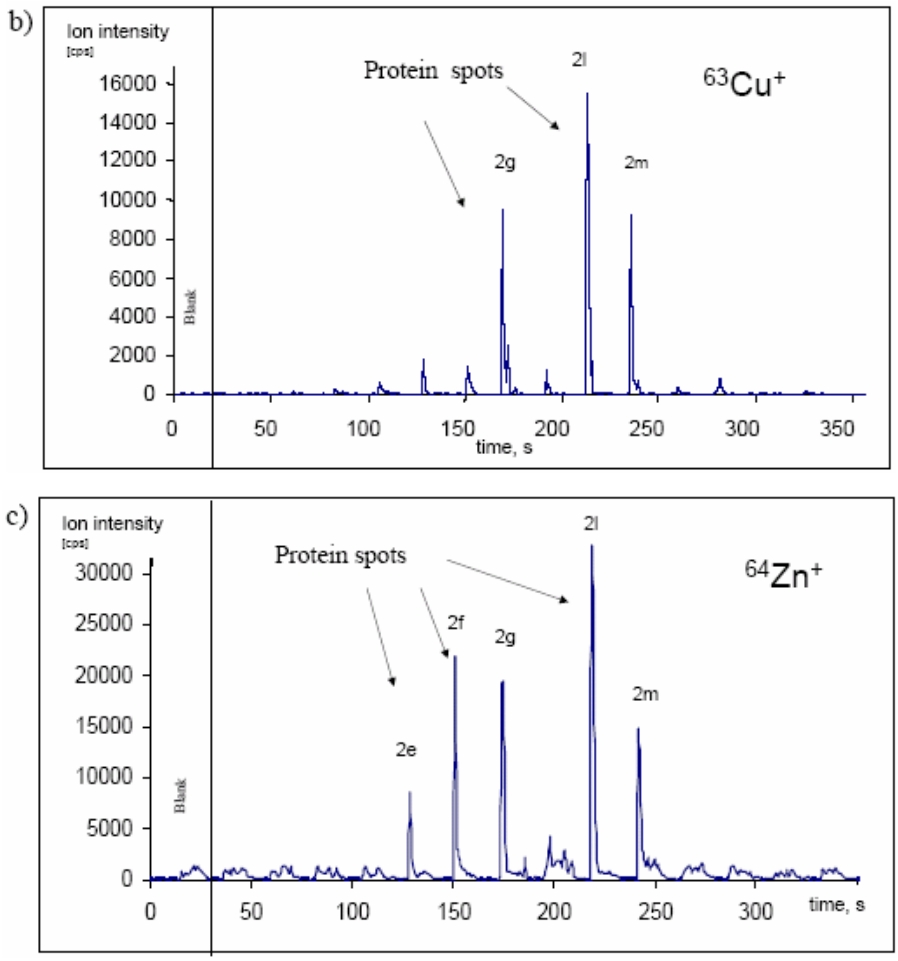
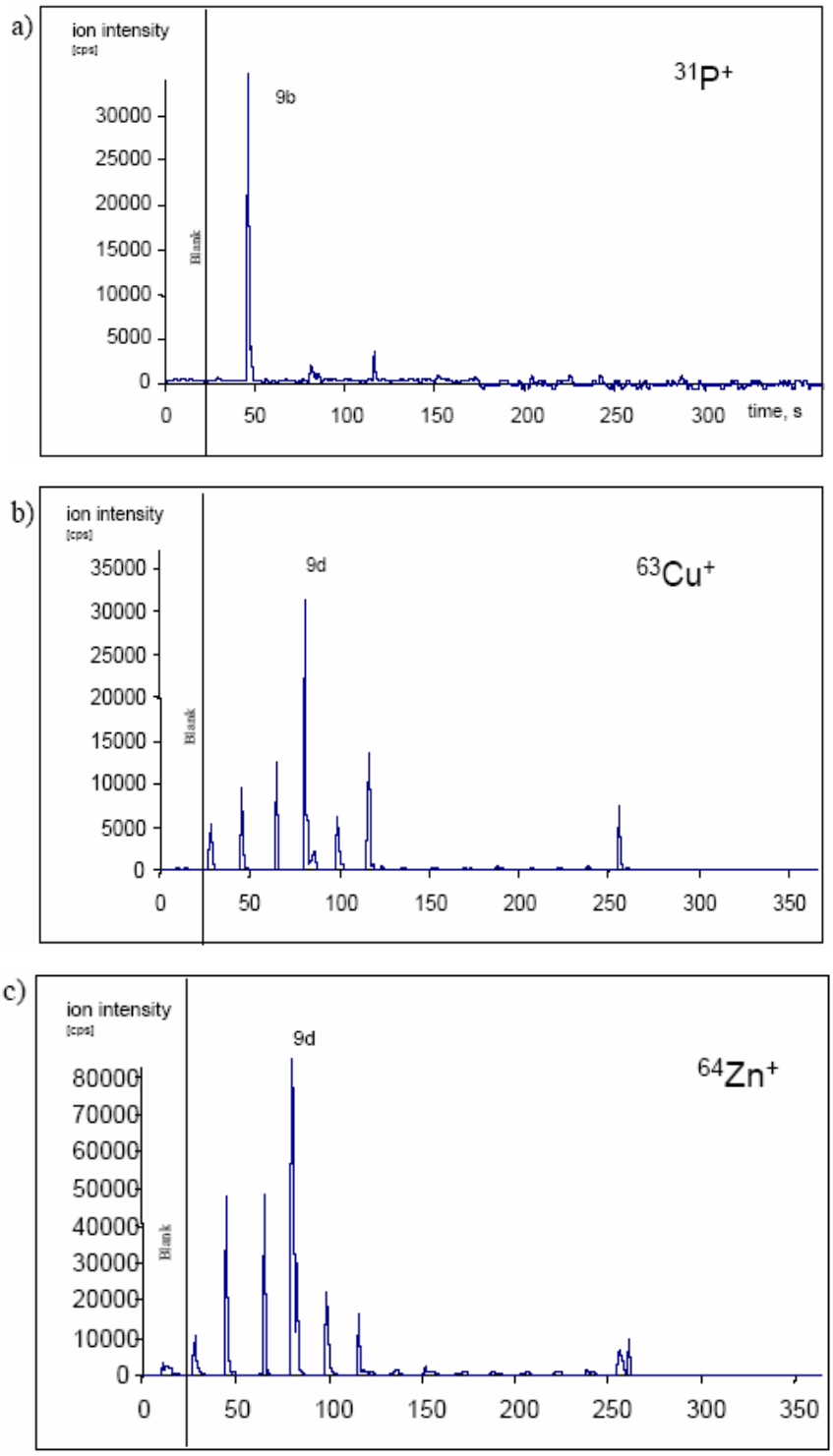


Abb. 56: Transiente Signale von a) $^{31}P^{+}$, b) $^{63}Cu^{+}$ und c) $^{64}Zn^{+}$ im Gelausschnitt 2 einer Normalgehirnprobe (somatomotor cortex) (Abb. 49)

Im Gelausschnitt 2 wurde nur in einem Protein 2g die Elemente Phosphor, Kupfer und Zink mit hohen Intensitäten (Abb. 56) gefunden. Die Ionenintensitäten der verschiedenen Elemente wurden mit LA-ICP-MS quasi simultan analysiert. Andere Proteine enthielten nur Kupfer und Zink (2l und 2m). Es wurden aber in den Proteinen dieses Gelschnittes keine signifikanten Uran-Ionenintensitäten nachgewiesen.


a)
ion intensity
[cps]
31P+
9b
Blank
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
50
100
150
200
250
300
time, s
b)
ion intensity
[cps]
63Cu+
9d
Blank
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
50
100
150
200
250
300
350
c)
ion intensity
[cps]
64Zn+
9d
Blank
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
50
100
150
200
250
300
350

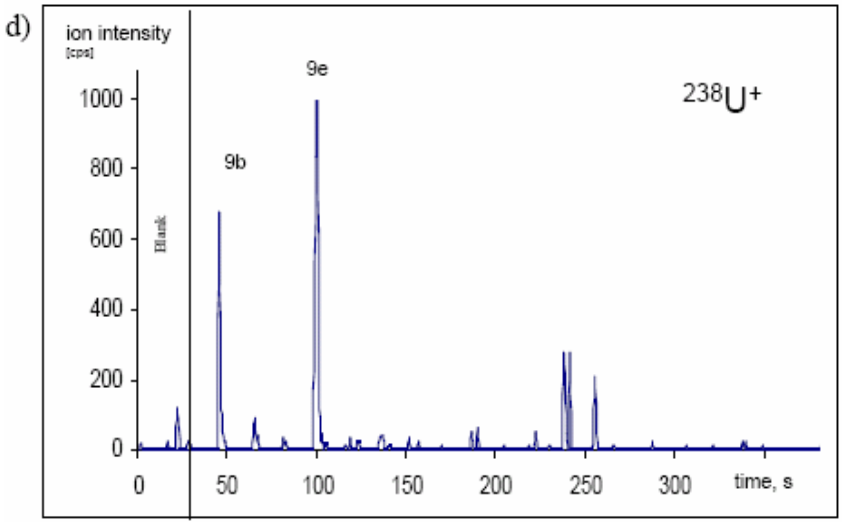
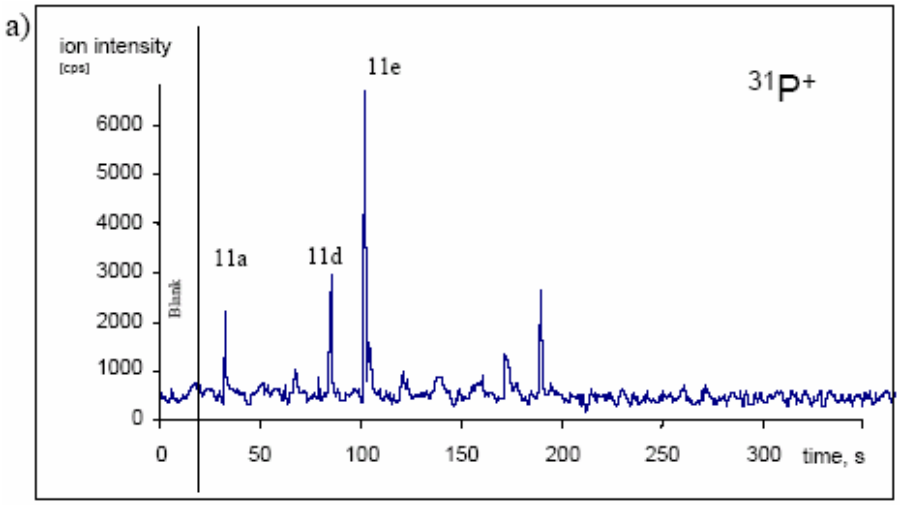


Abb. 57: Transiente Signale von $^{31}P^{+}$, $^{63}Cu^{+}$, $^{64}Zn^{+}$ und $^{238}U^{+}$ vom Ausschnitt 9 aus dem 2D-Gel einer Normalgehirnprobe (somatomotor cortex) (siehe Abb. 49)

Wie in Abb. 57 ersichtlich ist, wurde $^{238}U^{+}$ mit einer Ionenintensität von mehreren 100 cps in den Spots 9b und 9e gemessen. Die Anwesenheit von Uran in Spot 9b korreliert mit der hohen Intensität an $^{31}P^{+}$ in diesem Protein. In dem Spot 9d, wo eine wesentlich geringere Intensität an $^{31}P^{+}$ gefunden wurde, konnten $^{63}Cu^{+}$ und $^{64}Zn^{+}$ mit hohen Intensitäten nachgewiesen werden. Dieser experimentelle Befund ist der erste bisher beschriebene Nachweis von Uran in Protein.



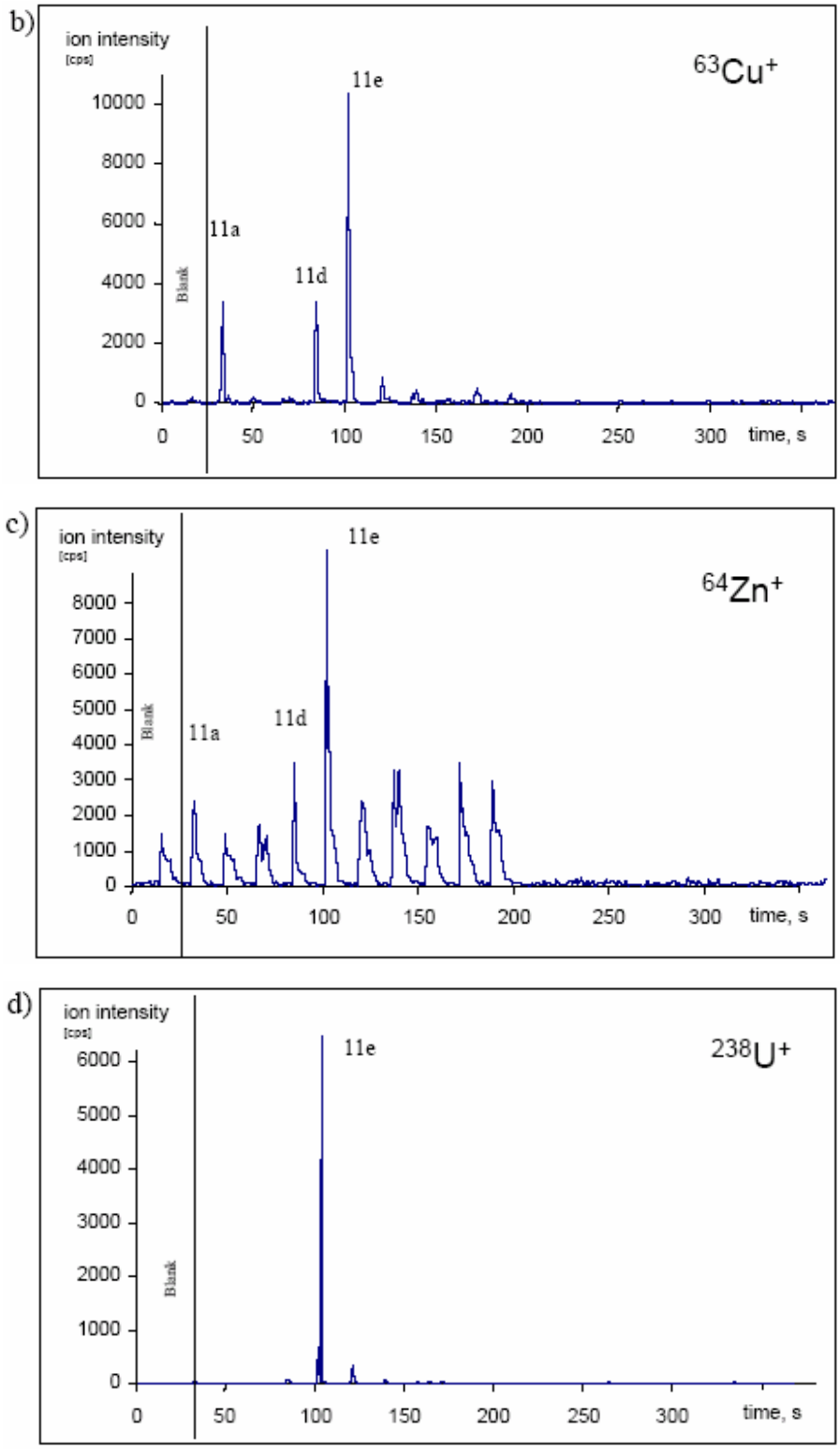
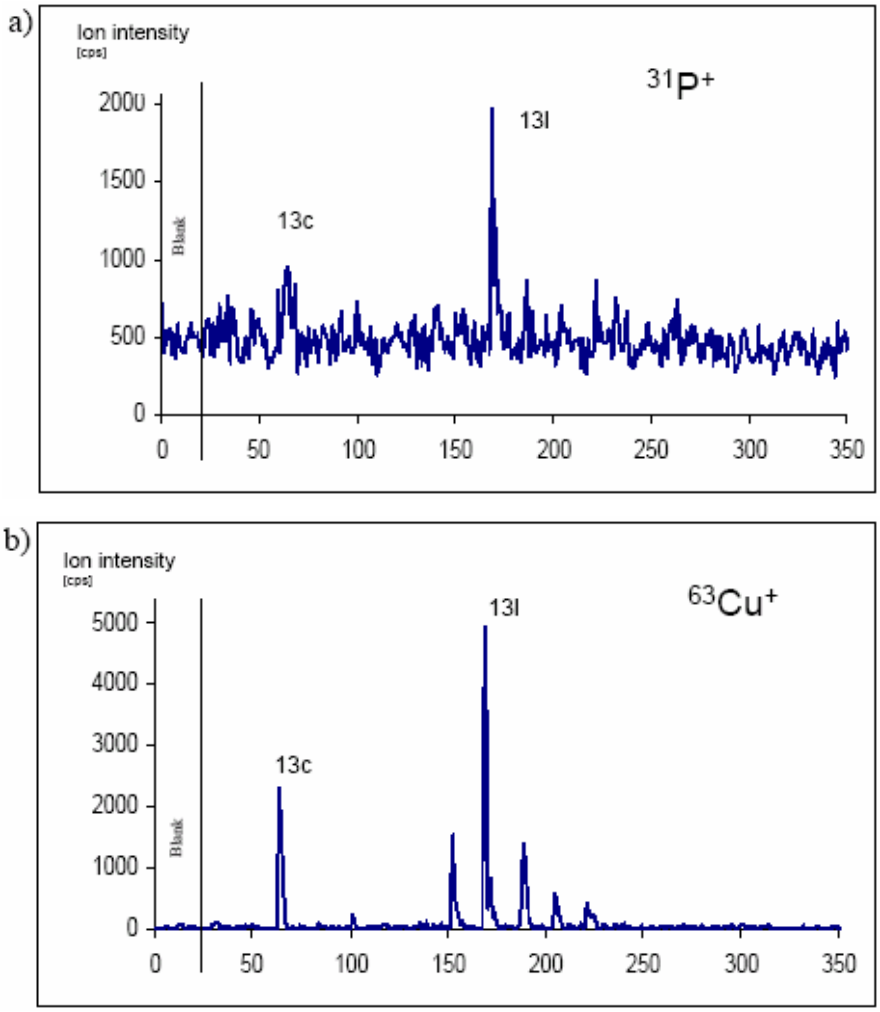


Abb. 58: Transiente Signale von a) $^{31}P^+$, b) $^{63}Cu^+$, c) $^{64}Zn^+$ und d) $^{238}U^+$ vom Ausschnitt 11 aus dem 2D-Gel einer Normalgehirnprobe (somatomotor cortex) (siehe Abb. 49)

In Abb. 58 sind die transienten Signale von $^{31}P^{+}$, $^{63}Cu^{+}$, $^{64}Zn^{+}$ and $^{238}U^{+}$ in modifizierten Proteinen im Gelschnitt 11 dargestellt. In Spot 11e wurden alle diese Elemente mit relativ hohen Ionenintensitäten nachgewiesen. Die Proteinspots 11a und 11d enthalten sowohl Phosphor und Kupfer als auch Zn.



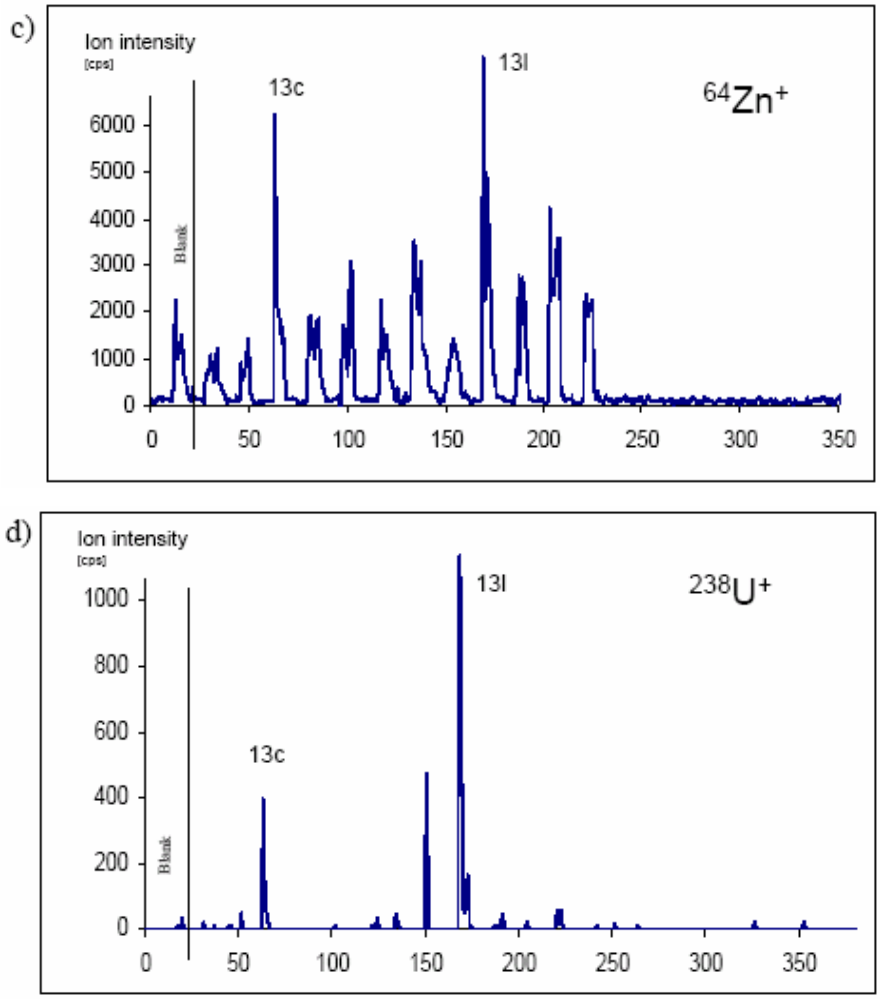


Abb. 59: Transiente Signale von a) $^{31}P^{+}$, b) $^{63}Cu^{+}$, c) $^{64}Zn^{+}$ und d) $^{238}U^{+}$ vom cut 13 aus dem 2D-Gel einer Normalgehirnprobe (somatomotor cortex) (siehe Abb. 49)

Abb. 59 zeigt die gescannten LA-ICP-Massenspektren der Element P, Cu, Zn und U im Gelausschnitt 13. In diesem Gelausschnitt wurden zwei Phosphorproteine nachgewiesen. In diesen detektierten Phosphorproteinen (Spots 13l und 13c) wurden außerdem auch $^{63}Cu^{+}$, $^{64}Zn^{+}$ und $^{238}U^{+}$ mit LA-ICP-MS nachgewiesen.

In dem zweiten Experiment bei der Analyse einer Alzheimergehirnprobe wurden in ausgesuchten Proteinspots (gekennzeichnet mit 6-9 in Abb. 52) alle analysierten Elemente (S, P, Fe, Cu, Zn) nachgewiesen. Die qualitativen Ergebnisse an den gescannten Gelspots aus dem 2D-Gel, das von einer Alzheimerprobe erstellt wurde, sind

in Tabelle 18 zusammengefasst. Durch diese qualitativen Messungen konnte auch ermittelt werden, dass sich in den Spots 1-5 nur in Spot 5 Schwefel und Phosphor befanden. In Tabelle 18 sind die Nachweisgrenzen in den 2D-Gelen für die untersuchten Elemente der LA-ICP-MS enthalten.

Tabelle 18: Qualitative Ergebnisse des Nachweises von Phosphor und einiger ausgewählter Metalle in verschiedenen Proteinspots aus dem 2D-Gel (Abb. 52) einer Alzheimergehirnprobe gemessen mit LA-ICP-MS

Spot	S	P	Fe	Cu	Zn
1	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-
3	-	-	(+)	-	-
4	-	-	+	-	-
5	+	+	+	+	+
6	+	(+)	(+)	+	(+)
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	(+)	(+)
9	(+)	+	+	+	(+)
Nachweisgrenze* (µg/g)	1840	0,7	3,5	20	236

* im Gel Blank (Abb. b+3) gemessen mittels LA-ICP-MS; (+) nahe der Nachweisgrenze

Wegen des relativ hohen Untergrundes der untersuchten Elemente im Gelblank war es schwierig, die Elementkonzentration in den einzelnen Proteinen quantitativ zu bestimmen. Die Nachweisgrenze lag z.B. für Phosphor bei 0,7 µg/g und für Eisen bei 3,5 µg/g.

In den ausgewählten Proteinspots wurde jeweils eine Multielementanalyse über die transienten Signale mittels LA-ICP-MS („single point“ Analyse mit jeweils 500 Laserschüssen) durchgeführt. In Abb. 60 werden die Ionenintensitäten von $^{31}P^{+}$, $^{32}S^{+}$, $^{63}Cu^{+}$, $^{64}Zn^{+}$ und $^{27}Al^{+}$ von ausgesuchten Proteinspots miteinander verglichen. In den Proteinspots 7-9 waren gleichzeitig alle analysierten Metalle nachweisbar.

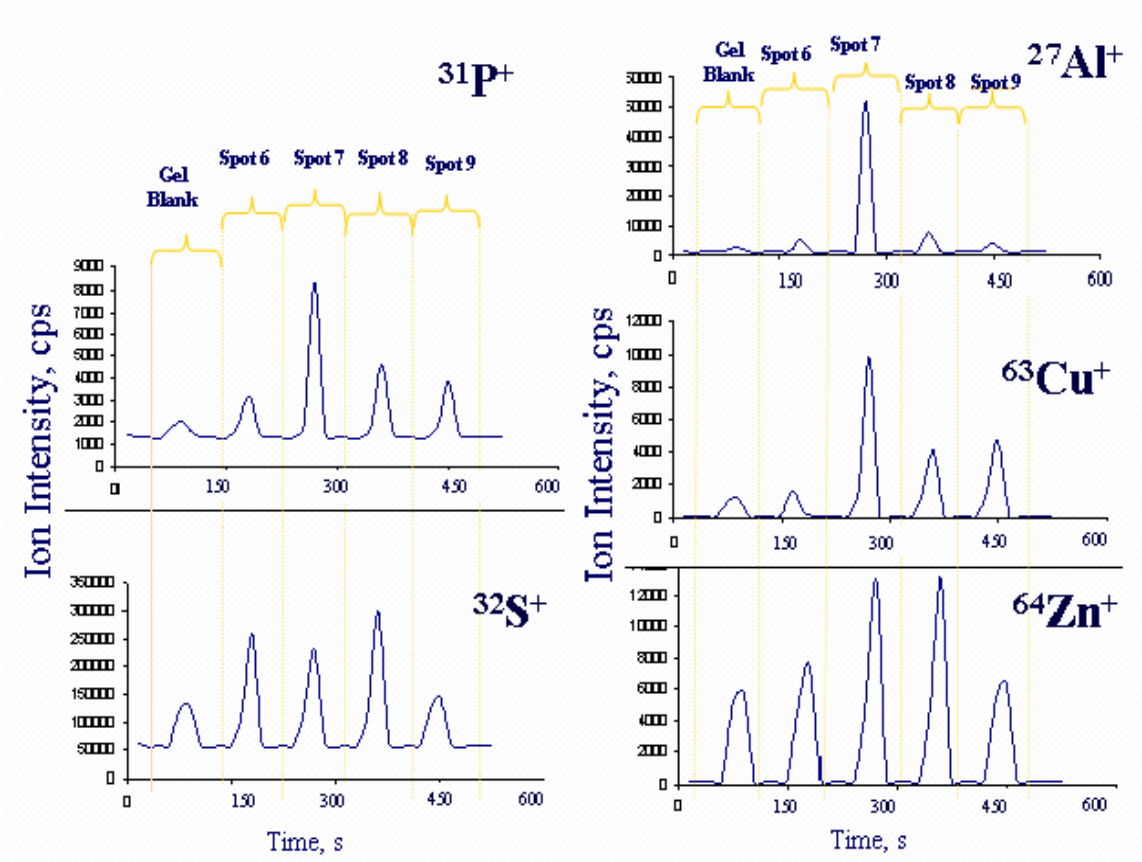


Abb. 60: Transiente Signale von $^{31}P^{+}$, $^{32}S^{+}$, $^{27}Al^{+}$, $^{63}Cu^{+}$ und $^{64}Zn^{+}$ durch LA-ICP-MS aus dem 2D-Gel (Abb. 52) einer Alzheimergehirnprobe

Die transienten Signale von Eisen für in den ausgesuchten Proteinspots sind in Abb. 61 dargestellt. Für das Protein in Spot 8 wurde eine relativ hohe Signalintensität für Schwefel, Eisen und Zink gemessen. Mittels MALDI-FTICR-MS wurde Proteinspot 8 als ATP synthase β chain identifiziert (siehe Tabelle 16).

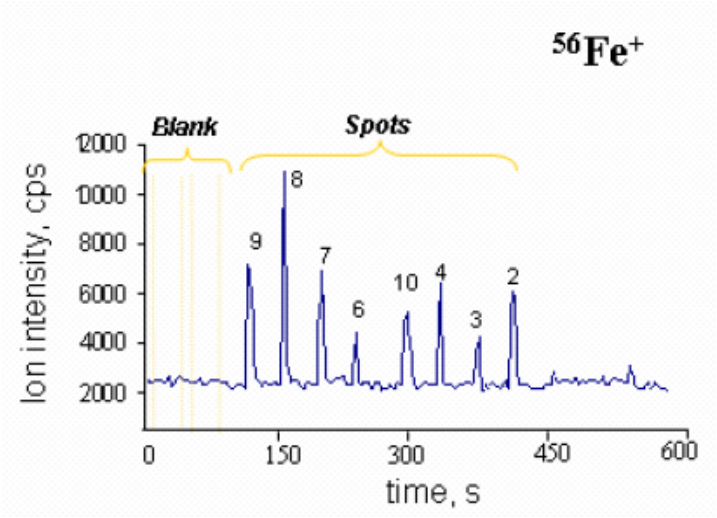


Abb. 61: Transiente Signale von $^{56}Fe^{+}$ in verschiedenen Proteinspots aus einem 2D-Gel einer Alzheimergehirnprobe (siehe Abb. 52)

2.3.2.2. Konzentrationsbestimmung von P und Metallionen in Proteinen durch Kombination von MALDI-FTICR-MS und LA-ICP-MS

Die Ionenintensitäten in den Proteinspots von $^{31}P^{+}$ wurde mittels LA-ICP-MS gemessen und die Daten in den mittels MALDI-FTICR-MS identifizierten Proteinen unter Verwendung von Schwefel als internes Standardelement quantifiziert. Zum Beispiel konnte in dem Proteinspot 2l (Tubulin β-4 chain) mit einem Molekulargewicht von 50,4 kDa eine Phosphorkonzentration von 0,12 mg/g experimentell bestimmt werden. Der Phosphorylierungsgrad von diesem Spot 2l wurde mit 6 ermittelt. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Quantifizierung für die Elemente P, Cu und Zn von ausgewählten Proteinen und der im Gelblank von einem silbergefärbten Gel (siehe Abb. 49) aufgeführt. Außerdem wurden die experimentell bestimmten Nachweisgrenzen in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von Metallionen und Phosphat von verschiedenen Proteinspots aus dem 2D-Gel (Abb. 49) von einer Humangehirnprobe 7#99 (somatomotor cortex (siehe Tabelle 13))

Spot	Protein	Konzentration (mg/g)					P
		S	P	Cu	Zn	U	state
2g	Tubulin α-4 chain	12,6	0,12	126	39	<LOD	7
2l	Tubulin β-4 chain	17,1	0,12	180	42	<LOD	6
3f	Vacuolar ATP synthase katalytische Untereinheit A	13,5	0,06	<LOD	8,8	0,00004	5
3n	α-Internexin	3,4	0,05	38,6	2,2	<LOD	3
4m	GFAP Protein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-
4n	Creatine kinase b-chain	12	0,04	<LOD	<LOD	<LOD	2
4p	ACTP Protein	11,9	0,01	34	8,4	<LOD	2
4q	ACTP Protein	12,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-
4o	Creatine kinase β-chain	7,0	0,01	41,2	9,3	<LOD	2
5a	Vacuolar ATP synthase Untereinheit B	12,4	0,09	220	43,5	0,00007	6
7f	Chain B, Human Heart L-Lactate Dehydrogenase H-Chain	113,0	0,03	103	31	0,00002	4
12f	Peroxiredoxin 2 isoform b	1,2	0,01	118	23	<LOD	1
LOD (µg/g)		1840	0,7	82	53	0,00001	

LOD (limit of detection) – Nachweisgrenze (3σ-Kriterium)

Ein Problem der quantitativen Auswertung der analytischen Daten war der hohe Untergrund von Schwefel, der auf die Kontamination der 2D-Gele während der Elektrophorese mit SDS zurückzuführen ist. Daraus resultierte eine hohe Nachweisgrenze

für von 1,84 mg/g. Die Nachweisgrenze mit ICP-MS in Reinstwasser wurde nach dem 3σ-Kriterium bestimmt (die Nachweisgrenze ist gegeben durch $3\sigma_b C_S / I_S$, wobei σ_b die Standardabweichung von 6 unabhängigen Messungen des Blanks, I_S die gemessene Ionenintensität in der Standardlösung mit der bekannten Schwefelkonzentration C_S darstellt).[164]

LA-ICP-MS kann aber auch für die Messungen von Elementverhältnissen wie z. B. von Phosphor-, Uran- und Metall-zu-Schwefel-Verhältnissen in verschiedenen Proteinen eingesetzt werden. Elementverhältnisse in einigen ausgewählten Proteinspots sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Alle mit LA-ICP-MS gemessenen Elementverhältnisse waren kleiner als eins, d. h. Schwefel ist in den untersuchten Proteinen in größerer Menge enthalten als P, Cu, Zn und U.

Tabelle 20: Elementverhältnisse bezogen auf Schwefel an einigen ausgewählten Proteinen aus dem 2D-Gel (Abb. 49) einer Humangehirnprobe (somatomotor cortex)

Proteinspots	**P/S**	**Cu/S**	**Zn/S**	**U/S**
1e	0,014	0,14	0,59	-
2f	-	0,49	0,96	-
2l	-	0,33	0,5	-
3k	0,077	0,27	0,49	-
5c	0,022	0,21	0,84	-
6j	0,14	0,11	0,51	0,37
6o	0,77	0,43	0,33	-
9f	0,14	0,16	0,51	-
11e	0,07	0,04	0,09	0,07

Einige Proteinspots aus dem untersuchten 2D-Gel, die Uran enthalten, wurden nach dem tryptischen Abbau identifiziert (z.B. α-Internexin oder Vacuolar ATP synthase Untereinheit B mit Molekulargewichten von 55,53 kDa bzw. 68,30 kDa). Das Massenspektrum von Proteinspot 3n, α-Internexin, mit den identifizierten Peptiden ist in

Abb. 50 dargestellt. Es wurde im Spot 3n auch ein phosphoryliertes Peptid identifiziert. Zusätzliche Isotopenanalysen von Uran mittels LA-ICP-MS in uranhaltigen Proteinspots ergaben, wie zu erwarten war, ein natürliches Isotopenverhältnis ($^{235}U/^{238}U = 0{,}00725$).

Auch bei der Alzheimerprobe (Abb. 52) wurde die bereits beschriebene quantitative Auswertung der Daten für die identifizierten Proteine mit Schwefel als internes Standardelement angewandt. So wurde zum Beispiel der Phosphorgehalt für den Spot 8 (α-Internexin) mit 0,041 mg/g bestimmt, was einem Phosphorylierungsgrad von 3 für dieses Protein entspricht. In dem Protein aus Spot 6, welches als Creatine Kinase β chain identifiziert werden konnte und ein Molekulargewicht von 42,91 kDa besitzt, wurde eine geringere Konzentration an Phosphor und Eisen im Vergleich mit Spot 8 gemessen. Die Phosphorkonzentration wurde mit 0,027 mg/g (Phosphorylierungsgrad von 1) bestimmt. In Spot 9, identifiziert als mutant β-Actin mit einem Molekulargewicht von 42,14 kDa, wurde eine Konzentration an Phosphor von 0,41 mg/g gemessen. Dies entspricht einem Phosphorylierungsgrad von 4. In Spot 2, der das Protein Chain A, Glutathione Transferase enthielt, konnte keines der Elemente nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse für die vier Proteine sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Quantitative Ergebnisse der Konzentration von Schwefel, Phosphor und ausgesuchten Metallen aus 2D-Gel-Proteinspots (Abb. 52) aus einer Humangehirnprobe

Spot	Protein	Elementkonzentration (mg/g)					P
		S	P	Fe	Cu	Zn	state
2	Chain A, Glutathione Transferase	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-
6	Creatine kinase, β chain	7,17	0,03	0,31	0,94	3,4	1
8	ATP synthase β chain, mitochondrial	9,17	0,04	0,62	2,64	2,7	3
9	mutant β-Actin	9,20	0,41	0,06	2,5	2,1	4

LOD (limit of detection) – Nachweisgrenze (3σ-Kriterium)

2.4. Untersuchungen von Metallionen-haltigen Proteinen unter Verwendung von angereicherten Metallisotopen (Isotopentracer)

Tracerexperimente an Proteinen mit angereicherten stabilen Isotopen wurden durchgeführt, um die Bildung und Stabilität der Metallionen-haltigen Proteine zu studieren (siehe Abb. 62). Neben der Analyse von Cu-, Fe- und Zn-enthaltenen Proteinen mit Hilfe von Tracerexperimenten in einer Humangehirnprobe (siehe Kap. 2.3, vgl. Abb. 52) wurden diese auch mit Uran und Thorium versetzt, da U- und Th-enthaltene Proteine noch nicht in der Literatur beschrieben wurden.

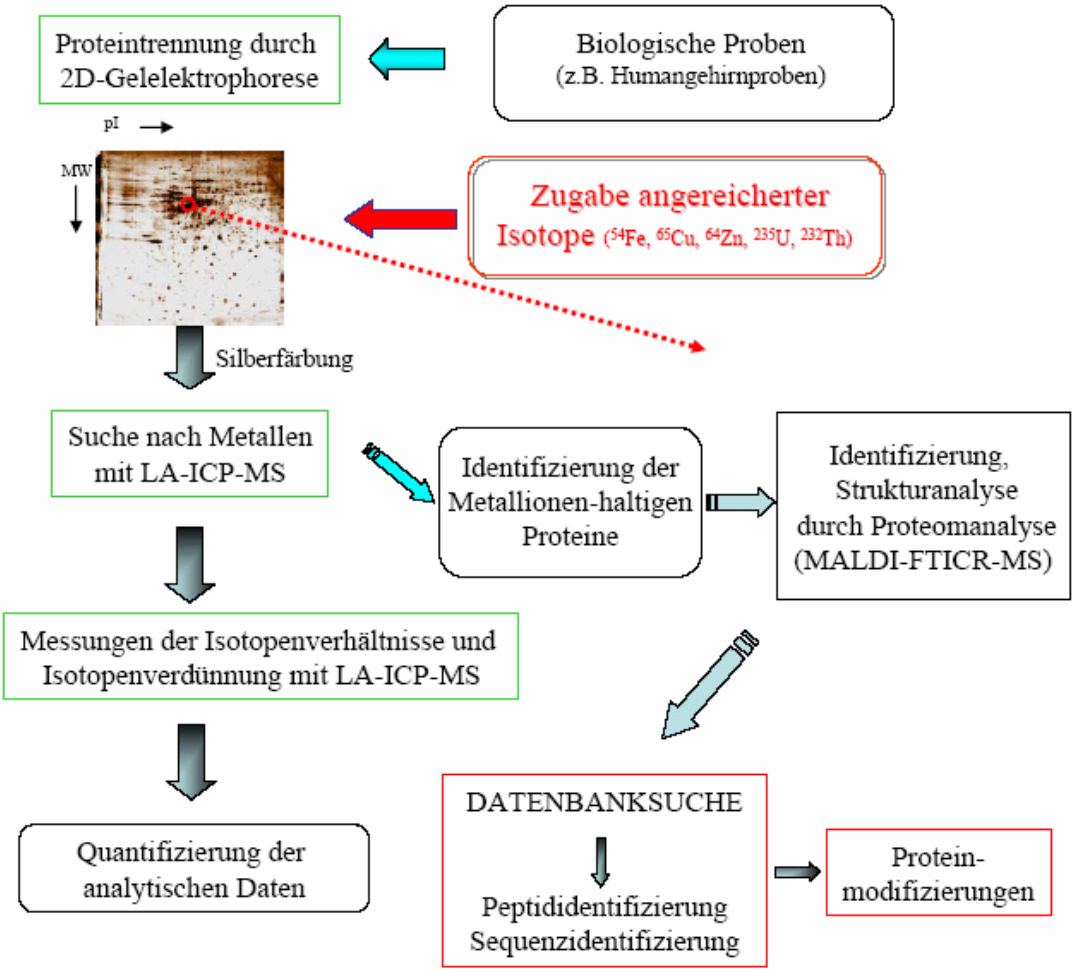


Abb. 62: Schematische Übersicht der Experimente mit angereicherten Tracern (wie ^{54}Fe, ^{65}Cu und ^{64}Zn)

Wegen der hohen Empfindlichkeit der LA-ICP-MS für die Uran- und Thoriumbestimmung in 2D-Gelen wurden die ersten Tracerexperimente mit isotopenangereicherten ^{235}U-Tracer (50% Isotopenhäufigkeit) und mit natürlichem Thorium (^{232}Th) durchgeführt.

Die Gele einer Humangehirnprobe wurden nach der 2D-Gelelektrophorese über Nacht in einer Lösung von ^{235}U, Th_{nat} geschüttelt. Anschließend wurden die Gele mittels Silberfärbung angefärbt. In Abb. 63 ist das silbergefärbte 2D-Gel dargestellt. Aus dem Gel wurden drei Gelstücke ausgeschnitten und die Proteinspots mit LA-ICP-MS bezüglich ^{235}U und ^{232}Th untersucht (siehe Abb. 63).

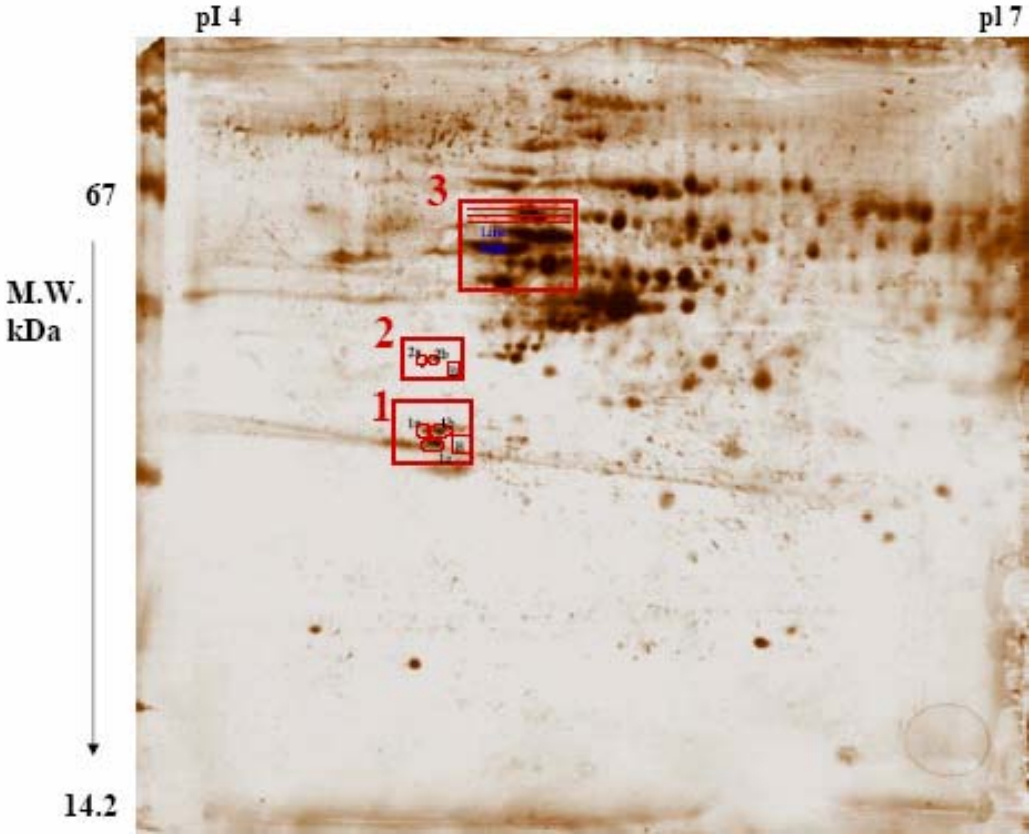


Abb. 63: 2D-Gel einer Gehirnprobe, das nach der Gelelektrophorese mit einer Tracerlösung (^{235}U, Th_{nat}) versetzt wurde

Aus dem Gelausschnitt 1 wurden die drei intensivsten Spots bezüglich Th und U analysiert. Die qualitativen Ergebnisse in Form der transienten Signale von $^{232}Th^{+}$, $^{235}U^{+}$ und $^{238}U^{+}$ dieser Messungen sind in Abb. 64 und 65 dargestellt.

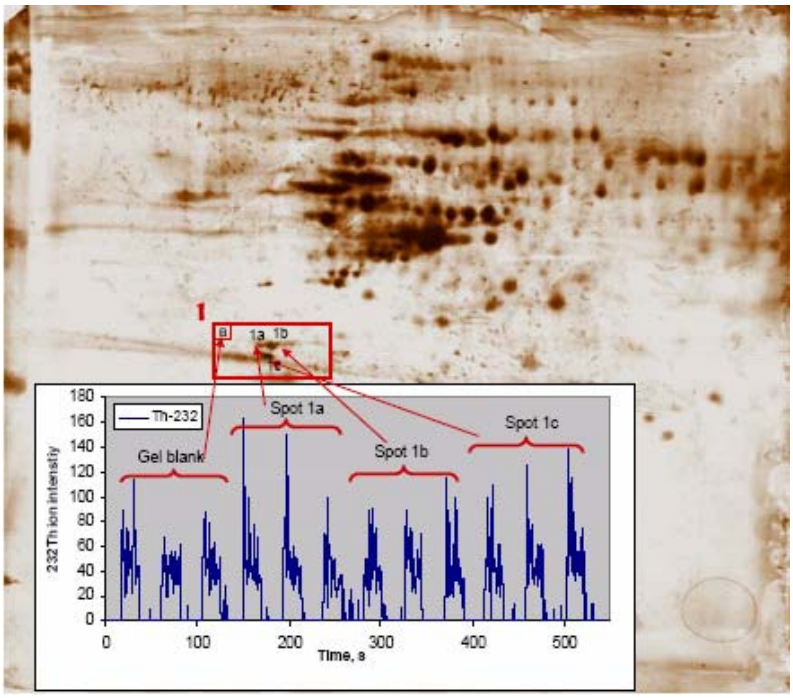


Abb. 64: Transiente Signale von $^{232}Th^{+}$ für den Gelausschnitt 1 einer Alzheimergehirnprobe (Abb. 63)

Zum Vergleich wurde auch noch ein Gelblank analysiert. Wie aus Abb. 65 zu entnehmen ist, weisen die transienten Signale von $^{232}Th^{+}$ der drei Spots 1a, 1b und 1c keine höhere Intensität auf als die Untergrundsignale, die im Blank gemessen wurden. Thorium konnte in diesen Proteinspots nicht nachgewiesen werden. Auch Uran konnte in diesen Proteinen aus dem Gelausschnitt 1 nur im Spot 1c mit ein wenig höherer Intensität gegenüber dem Gelblank gemessen werden (siehe Abb. 65). In diesem Protein sind demzufolge Spuren von Uran enthalten.

In dem Gelausschnitt 2 wurden nur zwei Proteinspots näher untersucht. Die qualitativen Ergebnisse dieser Messungen, die mittels LA-ICP-MS durchgeführt wurden, sind in den

Abb. 66 und 67 gezeigt. In den Proteinspots 2a und 2b konnte weder Uran noch Thorium gefunden werden. Die Intensität der transienten Signale von $^{232}Th^{+}$, $^{235}U^{+}$ und $^{238}U^{+}$ lag bei beiden Proteinen nicht über dem Signal des Gelblanks, der zum Vergleich mit vermessen wurde. Das die Intensitäten bei den Proteinspots der Gelausschnitte 1 und 2 für die untersuchten Elemente U und Th nicht über dem Untergrundsignal lagen, kann möglicherweise auf die niedrige Konzentration der beiden Elemente (0,075 ng/g ^{235}U, 0,25 ng/g ^{232}Th) in der Tracerlösung zurückgeführt werden. Die Konzentrationen der radioaktiven Isotope wurden bewusst niedrig gehalten, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden.

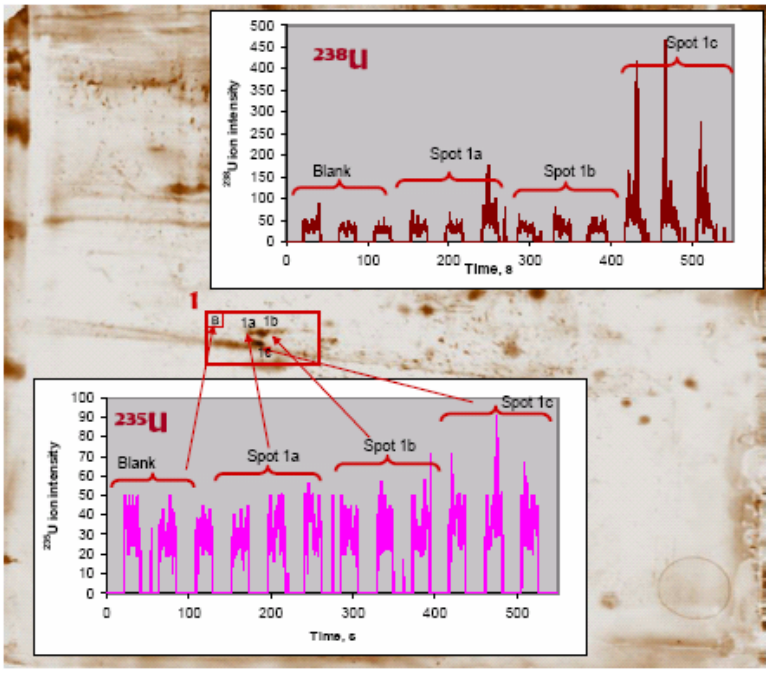


Abb. 65: Transiente Signale von $^{235}U^{+}$ und $^{238}U^{+}$ für den Gelausschnitt 1 einer Alzheimergehirnprobe (Abb. 63)

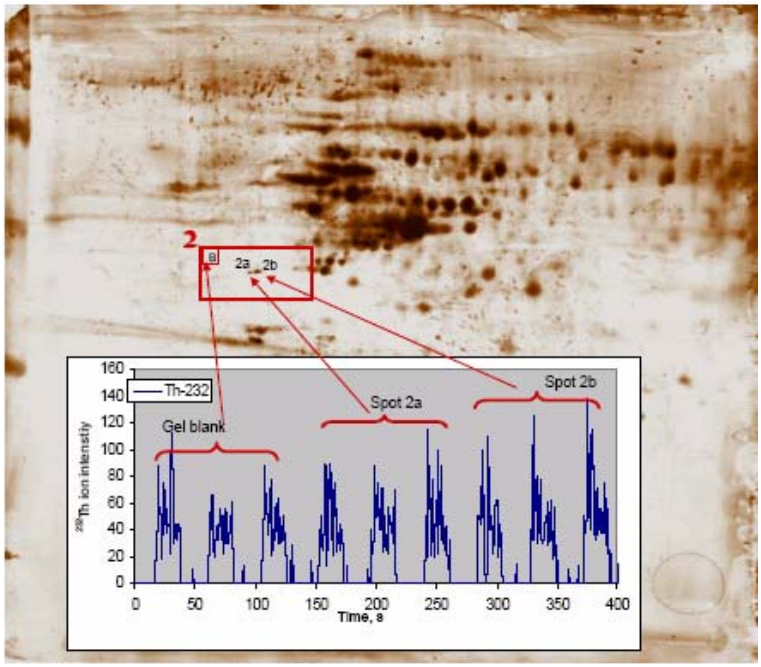


Abb. 66: Transiente Signale von $^{232}Th^{+}$ für den Gelausschnitt 2 einer Alzheimergehirnprobe (Abb. 63)

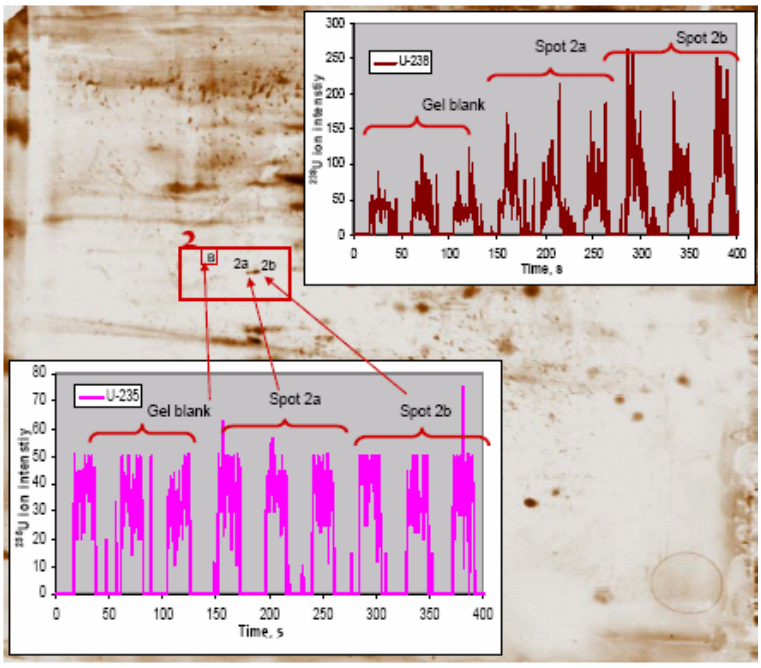


Abb. 67: Transiente Signale von $^{235}U^{+}$ und $^{238}U^{+}$ für den Gelausschnitt 2 einer Alzheimergehirnprobe (Abb. 63)

Es wurden weitere Experimente mit angereicherten Isotopentracern (siehe Kap. 3.8 und Tabelle 32) durchgeführt. Dabei wurden die Tracer entweder zum Zell-Lysat vor der Trennung der Proteine durch 2D-Gelelektrophorese oder nach der Proteintrennung vor der Färbung der Gele zur Waschlösung zugegeben. In beiden Fällen wurden die Proben mit der Tracerlösung über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt, bevor die Proben bzw. Gele weiter bearbeitet wurden.

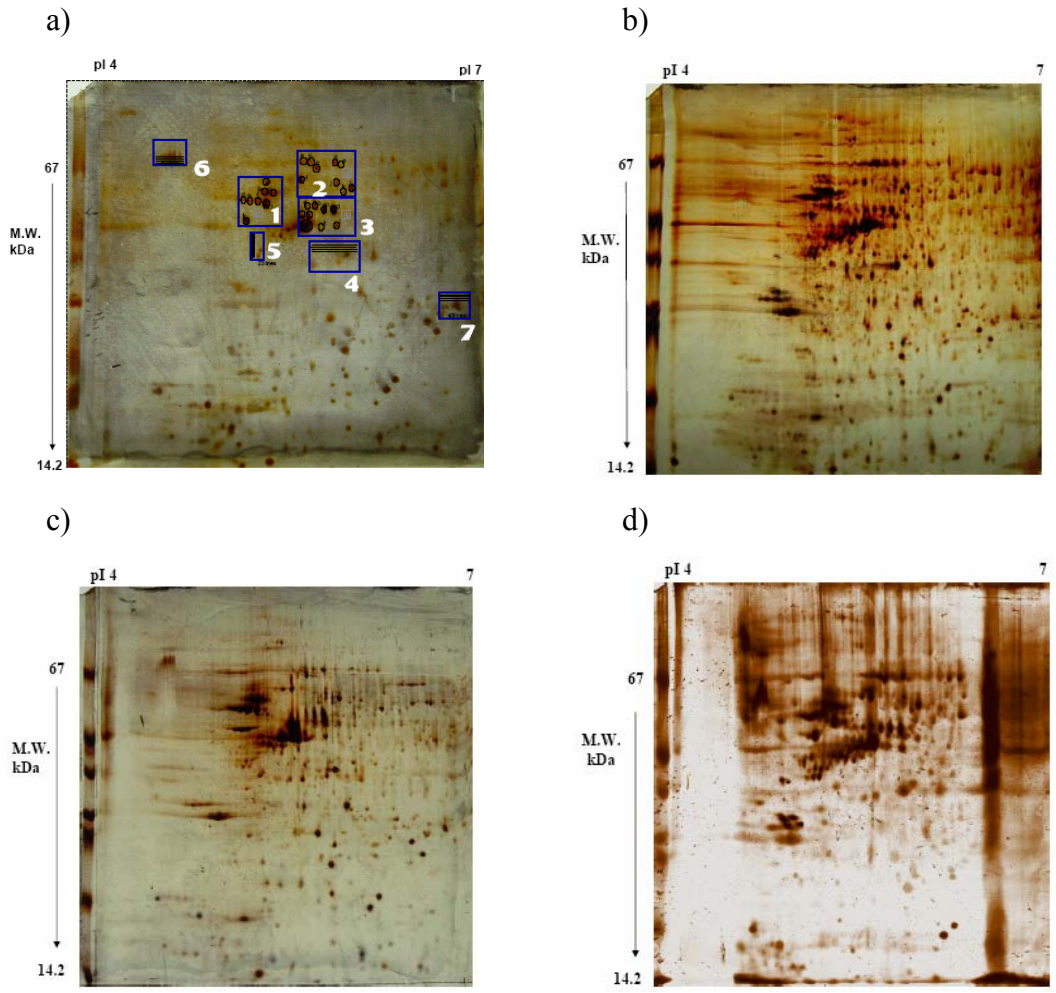


Abb. 68: 2D-Gele von einer Alzheimergehirnprobe a) versetzt mit einer Tracerlösung an angereicherten Tracern ($^{54}Fe_2O_3$, ^{67}ZnO, ^{65}Cu) nach der Gelelektrophorese; b) Zell-Lysat versetzt mit angereicherten Tracern (^{204}Pb, ^{285}U, ^{65}Cu, ^{58}Ni); c) Tracerlösung (^{235}U, Th_{nat}) zugegeben zum Zell-Lysat; d) Tracerlösung (^{235}U, Th_{nat}) zugegeben nach der Gelelektrophorese

Die entsprechenden Gele sind in Abb. 68 dargestellt. Auch diese Gele wurden durch LA-ICP-MS analysiert. In diesen Fällen konnten keine Signale gemessen werden, deren Intensität über der Intensität des Gelblanks lag. Die Konzentrationen der eingesetzten Tracerlösungen waren zu niedrig, so dass mit LA-ICP-MS keine Metallionen in den Proteinspots nachweisbar waren.

Erst bei dem sechsten Versuch mit stabilen angereicherten Isotopentracern von ^{65}Cu, ^{67}Zn und ^{54}Fe, die als Lösung nach der Trennung der Proteine durch 2D-Gelelektrophorese vor der Silberfärbung den Gelen zugesetzt wurden, konnten Ergebnisse erzielt werden. Diese Ergebnisse werden im nächsten Kapitel (Kap. 2.4.1.) genau beschrieben.

2.4.1. Analytik von Metallionen-haltigen Proteinen mit stabilen Isotopen von Cu, Zn und Fe an Gehirnproteinproben

Die verschiedenen Tracerexperimente unter Verwendung von isotopen-angereicherten stabilen Tracern (^{54}Fe, ^{65}Cu und ^{67}Zn) an zweidimensionalen Gelen von getrennten Gehirnproteinen (siehe Kap. 2.3, vgl. Abb. 52) dienten dem Studium der Bildung von Metallionen-haltigen Proteinen.

Abb. 69 zeigt ein zweidimensionales Gel mit getrennten Proteinspots einer Gehirnprobe eines Alzheimer-Patienten nach Tracerexperimenten mit den angereicherten stabilen Isotopen ^{54}Fe, ^{65}Cu und ^{67}Zn [Tracerlösung 6 (siehe Tabelle 32)]. Nachdem die Gele, wie bereits beschrieben, mit den Tracerlösungen behandelt wurden, erfolgte mit LA-ICP-MS in den Proteinspots der Gele, unterteilt in 3 Gelausschnitten (siehe Abb. 69), eine systematische Suche nach Metallionen-haltigen Proteinen. In diesen Proteinen wurden die $^{54}Fe/^{56}Fe$, $^{65}Cu/^{63}Cu$ und $^{67}Zn/^{64}Zn$ Isotopenverhältnisse gemessen. Die qualitativen Ergebnisse der LA-ICP-MS Messungen im Rahmen der durchgeführten Tracerexperimente sind in der Tabelle 22 zusammengefasst.

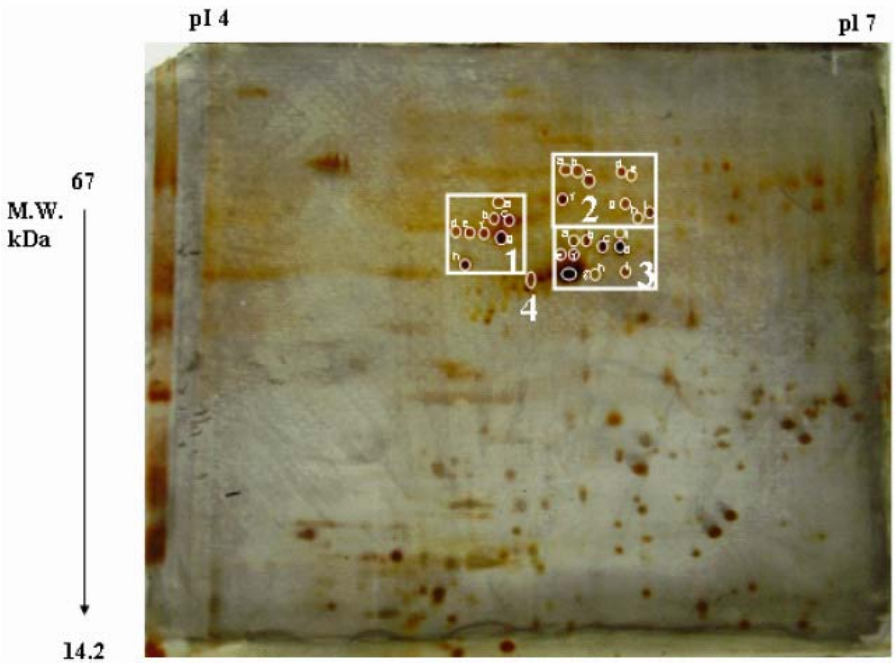


Abb. 69: 2D-Gel von Humangehirnproteinen (siehe Kap. 2.3, vgl. Abb. 52) gefärbt mit Silber nach dem Experiment mit den angereicherten stabilen Isotopen ^{54}Fe, ^{65}Cu und ^{67}Zn (Tracerlösung 6 (siehe Tabelle 32)) über Nacht, die gekennzeichneten Gelauschnitte 1-3 wurden für die LA-ICP-MS verwendet.

Tabelle 22: Qualitative Ergebnisse der Elementanalyse an Proteinspots aus dem 2D-Gel (Abb. 69) mit LA-ICP-MS Messungen

Proteinspot	Fe	Cu	Zn
1a	$+_{nat}$	$++_{nat}$	$++_{nat}$
1d	$+_{enr}$	$++_{nat}$	$+_{nat}$
1f	$+_{enr}$	-	$+_{enr}$
2a	$+_{enr}$	$++_{nat}$	$+_{nat}$
2b	$+_{enr}$	$+_{nat}$	$++_{nat}$
2e	$+_{enr}$	-	$+_{enr}$
2f	$+_{enr}$	$++_{nat}$	$++_{nat}$
2j	$+_{enr}$	-	$+_{nat}$
3a	-	$+_{nat}$	$++_{nat}$
3f	$+_{enr}$	-	-

($+_{nat}$) Protein enthält Metall mit natürlicher Isotopenverteilung; ($+_{enr}$) Protein enthält Metall mit angereichertem Tracer; (-) es konnte kein Metall detektiert werden; (++) relativ hohe Ionenintensität

Mittels LA-ICP-MS gelang es, Metallionen-haltige Proteine zu detektieren und Isotopenanreicherungen (1a, 1d, 1f, 2a, 2b, 2e, 2f, 2j, 3a und 3f, siehe Tabelle 2.18) nachzuweisen.

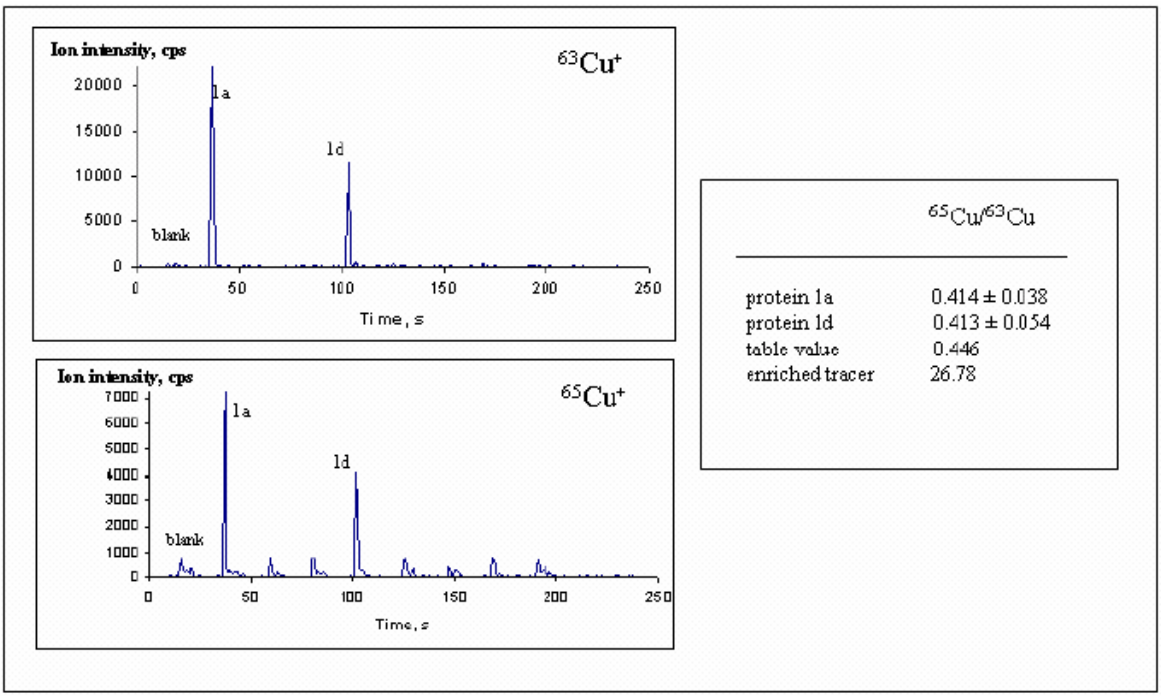
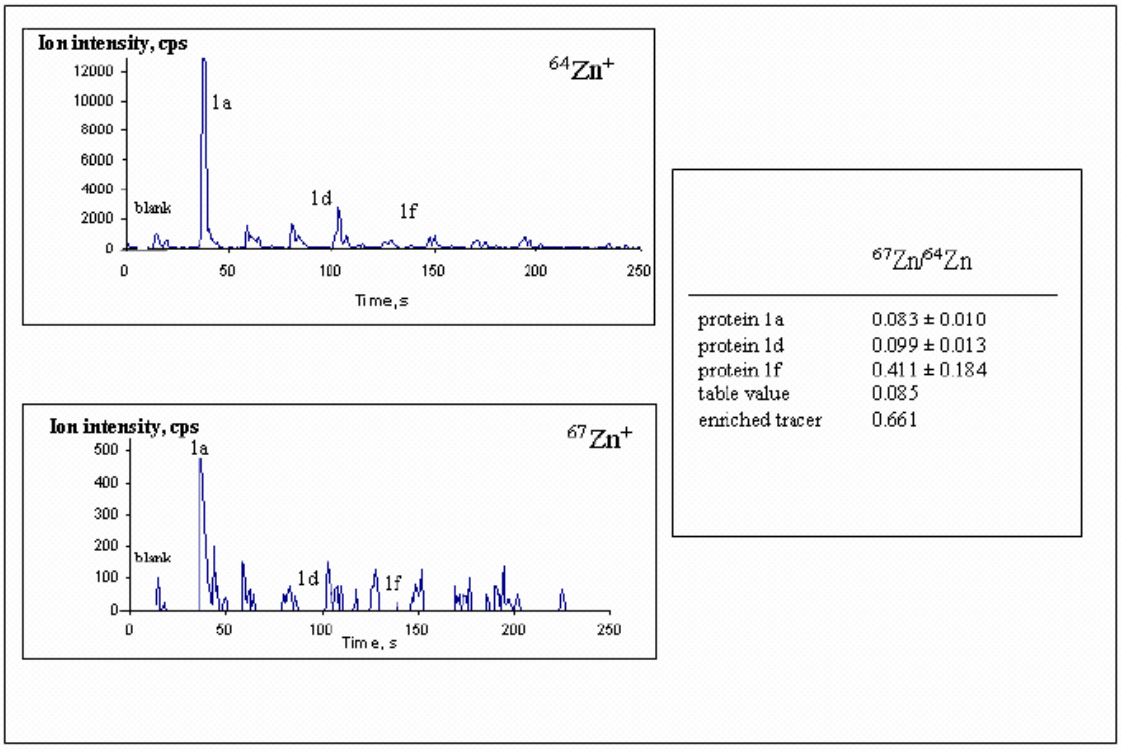


Abb. 70: Ionenintensitäten von $^{65}Cu^+$ und $^{63}Cu^+$ für die Proteinspots im Gelausschnitt 1 (siehe Abb. 69), in der Tabelle sind die $^{65}Cu/^{63}Cu$-Isotopenverhältnisse für die Spots 1a und 1d im Vergleich zur angereicherten Tracerlösung und dem natürlichen Verhältnis (IUPAC Tabellenwert[166]) zusammengefasst

In Abb. 70 sind die transienten Signale von $^{65}Cu^+$ und $^{63}Cu^+$ für den Gelausschnitt 1, der mit LA-ICP-MS analysiert wurde, als Funktion der Messzeit dargestellt. Nur in den Proteinspots 1a und 1d konnte Kupfer nachgewiesen werden. Über die Cu-Isotopenanalyse wurde in beiden Proteinen keine signifikante Abweichung vom natürliche $^{65}Cu/^{63}Cu$-Isotopenverhältnis (IUPAC-Tabellenwert[166]: 0.446) gefunden. Dieser experimentelle Befund deutet darauf hin, dass kein Isotopenaustausch des Kupfers in den Proteinen mit den angereicherten stabilen Tracern stattgefunden hat.



	$^{67}Zn/^{64}Zn$
protein 1a	0.083 ± 0.010
protein 1d	0.099 ± 0.013
protein 1f	0.411 ± 0.184
table value	0.085
enriched tracer	0.661

Abb. 71: Ionenintensitäten von $^{64}Zn^{+}$ und $^{67}Zn^{+}$ für den Gelausschnitt 1 (siehe Abb. 69) einer Humangehirnprobe, in der Tabelle sind die $^{67}Zn/^{64}Zn$-Isotopenverhältnisse für die Spots 1a, 1d und 1f im Vergleich zur angereicherten Tracerlösung und dem natürlichen Verhältnis (IUPAC Tabellenwert[166]) zusammengefasst

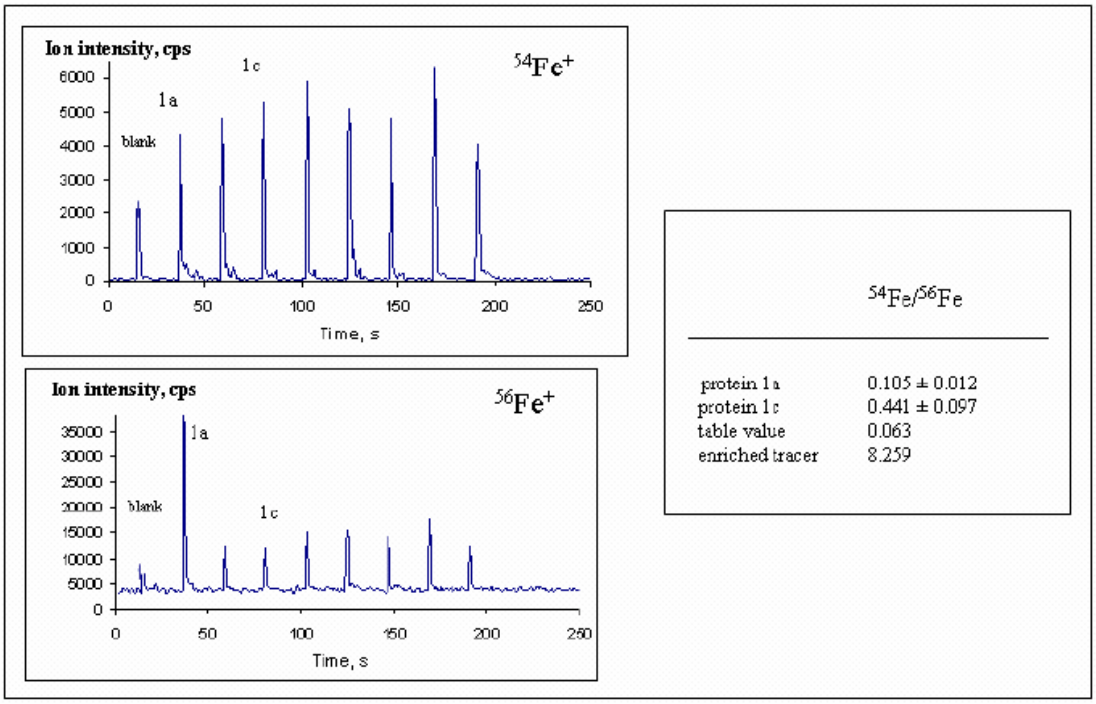


Abb. 72: Ionenintensitäten von $^{54}Fe^{+}$ und $^{56}Fe^{+}$ für den Gelausschnitt 1 (siehe Abb. 69) einer Humangehirnprobe, in der Tabelle sind die $^{54}Fe/^{56}Fe$-Isotopenverhältnisse für die Spots 1a und 1c im Vergleich zur angereicherten Tracerlösung und dem natürlichen Verhältnis (IUPAC Tabellenwert[166]) zusammengefasst

In den Spots 1a und 1d konnte weiterhin eine Bindung (bzw. Akkumulation) von Zn und Fe an beide Proteine nachgewiesen werden (siehe Abb. 71 und 72). Die Isotopenverhältnismessungen ergaben für Zn eine natürliche Isotopenverteilung, während für Fe in Spots 1a und 1d eine Erhöhung des $^{54}Fe/^{56}Fe$-Isotopenverhältnisses um den Faktor 1,7 bzw. 7 mit LA-ICP-MS gemessen wurde. In Abb. 73 sind die transienten Signale von $^{54}Fe^{+}$ und $^{56}Fe^{+}$ für den Gelausschnitt 3 gezeigt. Für die Proteinspots 3f und 3d wurde eine Erhöhung des $^{54}Fe/^{56}Fe$-Isotopenverhältnisses um den Faktor 3,1 bzw. 2,7 gefunden. Die Tracerstudien an anderen Gelausschnitten ergaben weiterhin, dass für alle kupferenthaltenen Proteine (siehe Abb. 74) keine signifikante Änderung der $^{65}Cu/^{63}Cu$-Isotopenverhältnisse im Vergleich zu dem Tabellenwert (Isotopenverhältnis in der Natur)[166] nachweisbar war.

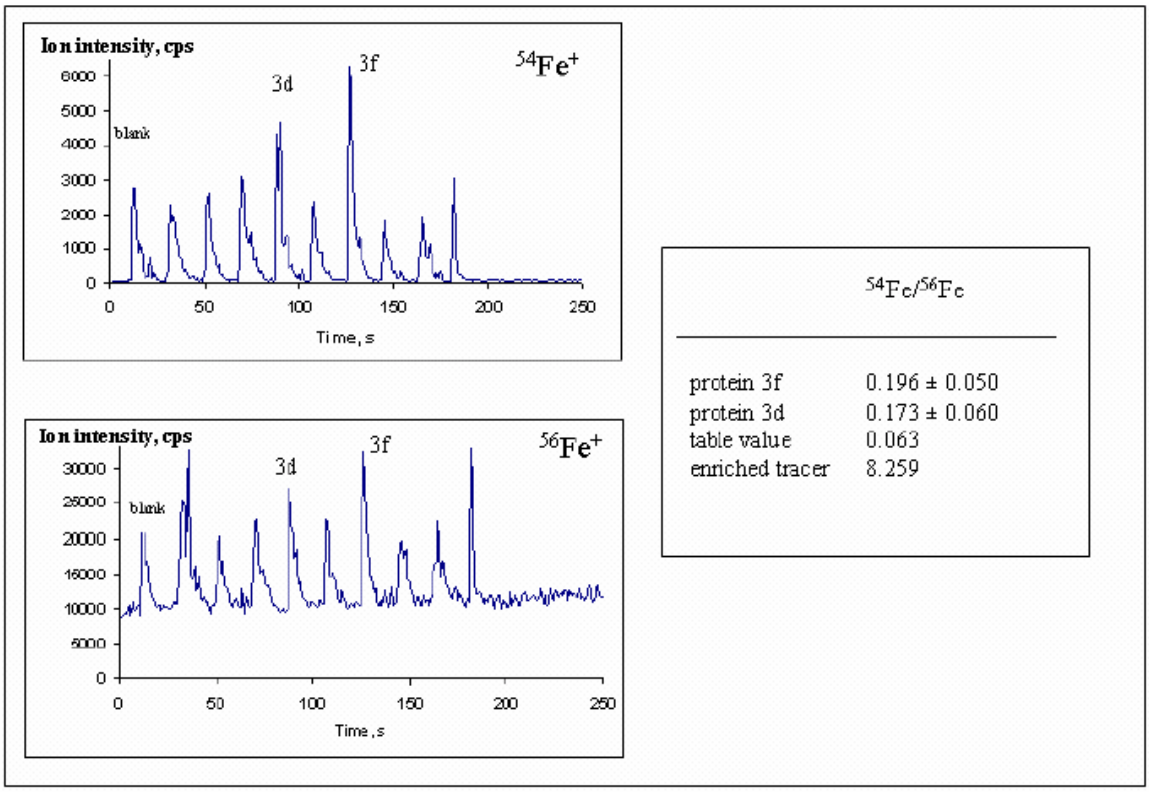


Abb. 73: Ionenintensitäten von $^{54}Fe^{+}$ und $^{56}Fe^{+}$ für den Gelausschnitt 3 (siehe Abb. 69) einer Humangehirnprobe, in der Tabelle sind die $^{54}Fe/^{56}Fe$-Isotopenverhältnisse für die Spots 3f und 3d im Vergleich zur angereicherten Tracerlösung und dem natürlichen Verhältnis (IUPAC Tabellenwert[166]) zusammengefasst

Während für die Cu-enthaltenen Proteine immer die natürliche Isotopenzusammensetzung gefunden wurde, zeigten insbesondere die Fe-enthaltenen Proteine Veränderungen in den Isotopenhäufigkeiten im Vergleich zum IUPAC-Tabellenwert [166] für die Isotopenzusammensetzung in der Natur ($^{54}Fe/^{56}Fe$: 0,063).

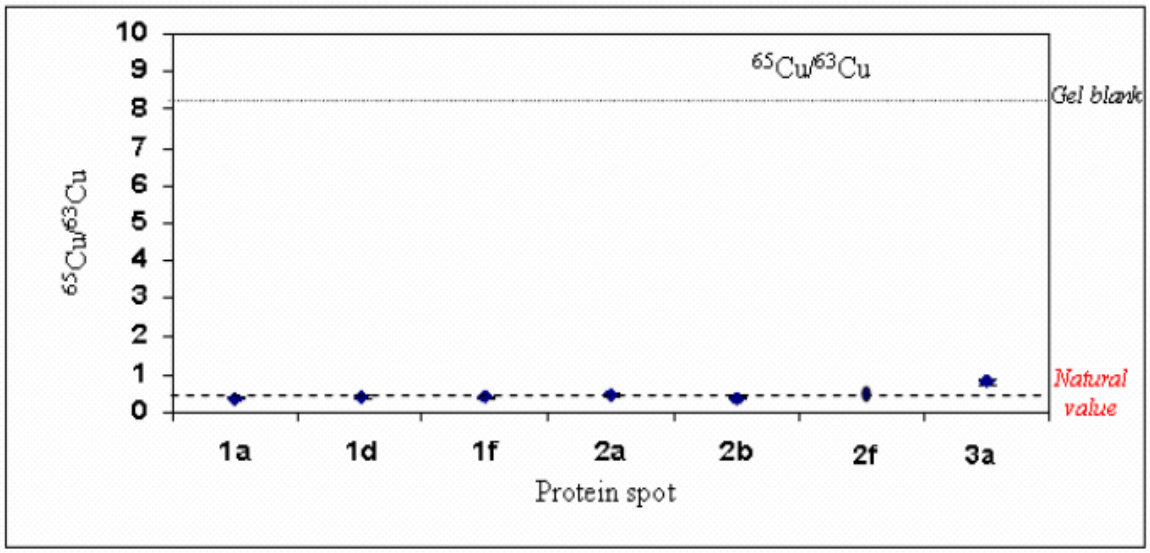


Abb. 74: $^{65}Cu/^{63}Cu$-Isotopenverhältnisse in ausgewählten Proteinspots einer humanen Gehirnprobe getrennt durch 2D-Gelelektrophorese (Abb. 69) gemessen mittels LA-ICP-MS ($^{65}Cu/^{63}Cu$ in der Natur: 0.446)

Aus diesem experimentellen Befund lässt sich schlussfolgern, dass zum einen die Cu-Proteine stabil genug gegenüber den reduzierenden Bedingungen der 2D-Gelelektrophorese sind und keine Austauschreaktionen mit den angereicherten stabilen Isotopen eingehen. Dagegen wurden für Zn in den Zinkionen-haltigen Proteinspots 1f und 2e Anreicherungen mit ^{67}Zn nachgewiesen. In Abb. 75 sind die gemessenen $^{67}Zn/^{64}Zn$ Isotopenverhältnisse von den Zn-haltigen Proteinen zusammengefasst. Für fast alle Fe-enthaltene Proteine wurden Anreicherungen mit den stabilen ^{54}Fe-Isotop nachgewiesen (s. Abb. 76), d.h. in diesen Proteine fanden Austauschreaktionen oder Akkumulation mit dem angereicherten stabilen Isotopentracer statt.

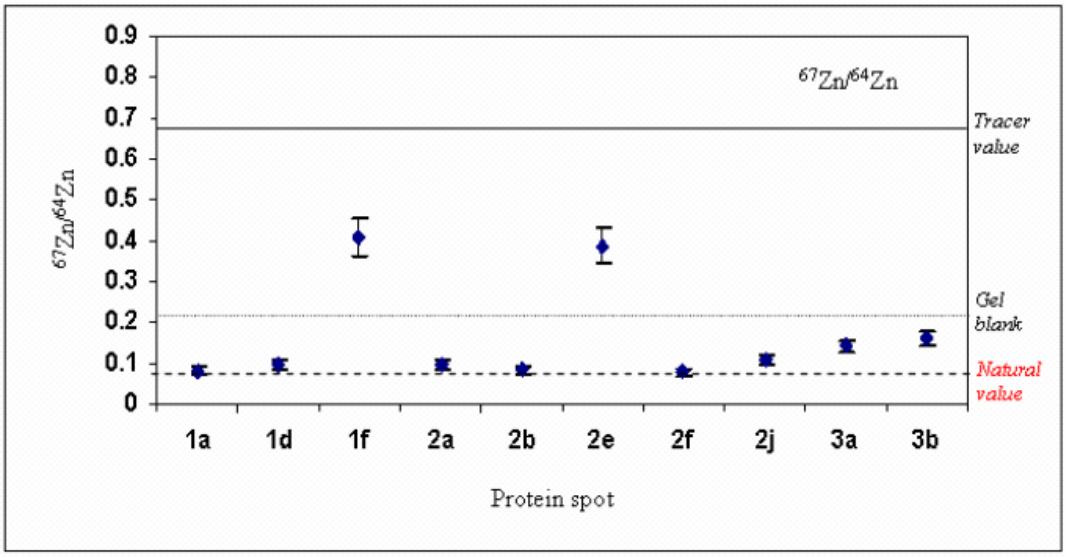


Abb. 75: $^{67}Zn/^{64}Zn$-Isotopenverhältnisse in ausgewählten Proteinspots eines 2D-Gels einer Gehirnproben (siehe Abb. 69) gemessen mittels LA-ICP-MS ($^{67}Zn/^{64}Zn$ in der Natur: 0,085)

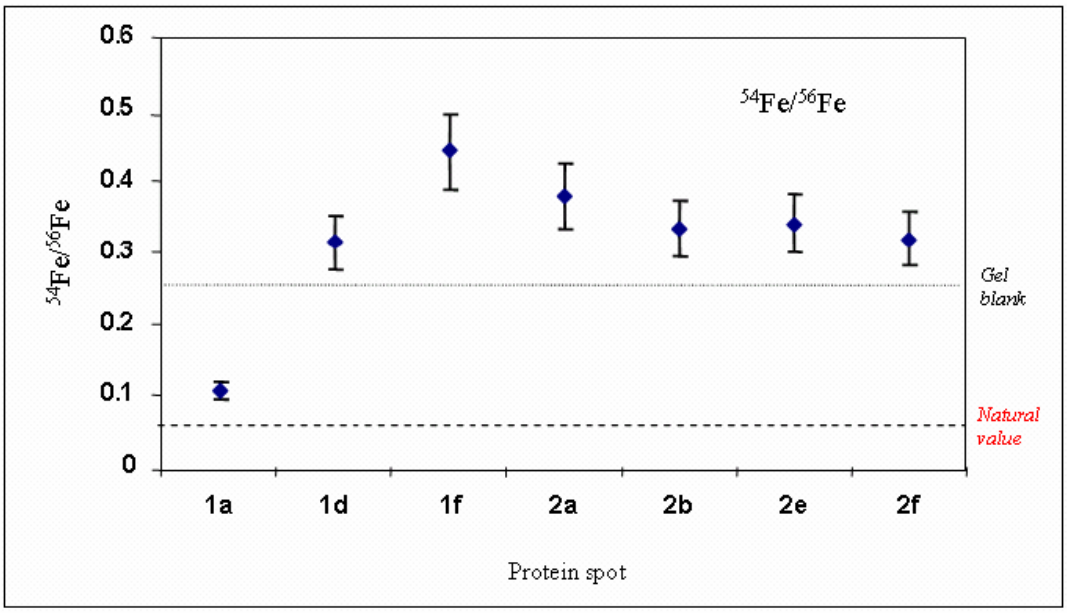


Abb. 76: $^{54}Fe/^{56}Fe$-Isotopenverhältnisse in ausgewählten Proteinspots eines 2D-Gels einer Gehirnproben (siehe Abb. 69)gemessen mittels LA-ICP-MS ($^{54}Fe/^{56}Fe$ in der Natur: 0,063)

In verschiedene Proteine, in denen natürliche Isotopenhäufigkeitsverteilung von Cu, Zn und/oder Fe nach den Tracerexperimenten nachgewiesen wurden, sind die Metallionenbindungen demzufolge stabil genug, um die reduzierenden Bedingungen während der Gelelektrophorese zu überstehen. Andererseits wird über Proteine mit geänderten Isotopenverhältnissen von Metallen im Vergleich zu den Isotopenverhältnissen in der Natur eine Akkumulation der angereicherten Isotope in Metallionen-haltigen Proteinen nachgewiesen. Dies wird z.B. durch Isotopenaustausch oder die Bildung von neuen Metallionen-haltigen Proteinkomplexen während der Tracerexperimente an 2D Gelen verursacht.

Mittels MALDI-FTICR-MS wurde nach der qualitativen Analyse durch LA-ICP-MS (siehe Tabelle 22), von einem zweiten unter gleichen Bedingungen erstellten Gel, einige Proteine identifiziert. Die identifizierten Proteine mit den molekularen Massen sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Mit MALDI-FTICR-MS und anschließender Datenbanksuche (www.matrixscience.com) identifizierte Proteine in einem 2D-Gel einer Alzheimergehirnprobe (Abb. 69)

Spot	**Identifizierte Proteine**	**M.W.$_{exp}$/kDa**	**M.W./kDa**
1e	ATP synthase β Untereinheit	56	56,5
1k	γ-Enolase	44	44,2
3d	Glial fibrillary acidic protein	50	49,8
3e	Actin, cytoplasmic 2 (γ-Actin)	41	41,8
3f	Actin, cytoplasmic 1 (β-Actin)	41	41,7
3j	Glial fibrillary acidic protein astrocyte (GFAP)	50	49,4
4	Actin, cytoplasmic 2 (γ-Actin)	40	41,8

Von den Metallionen-haltigen Proteinen wurde der Proteinspot 3f als β-Actin mit einer molekularen Masse von 41,7 kDa identifiziert. In Abb. 77 ist das MALDI-FTICR

Massenspektrum des Spots 3f mit den aus der Datenbank identifizierten Peptiden dargestellt. Auch konnte ein eisenhaltiges Peptid mit sehr geringer Häufigkeit und der molekularen Masse 2351,19 Da, das ein $^{56}Fe^{+}$-Ion an sich gebunden hat, durch Vergleich mit theoretischen Daten identifiziert werden. Zur Berechnung der theoretischen Werte für den tryptischen Abbau von β-Actin (Spot 3f) wurde die Software GPMAW 6.2 eingesetzt. Anschließend wurden die möglichen Metallionen (im Fall von Spot 3f $^{54}Fe^{+}$ und $^{56}Fe^{+}$) an die Peptide, die Cystein- und Histidinreste enthielten und damit in der Lage sind, Metallionen zu binden, dazu addiert

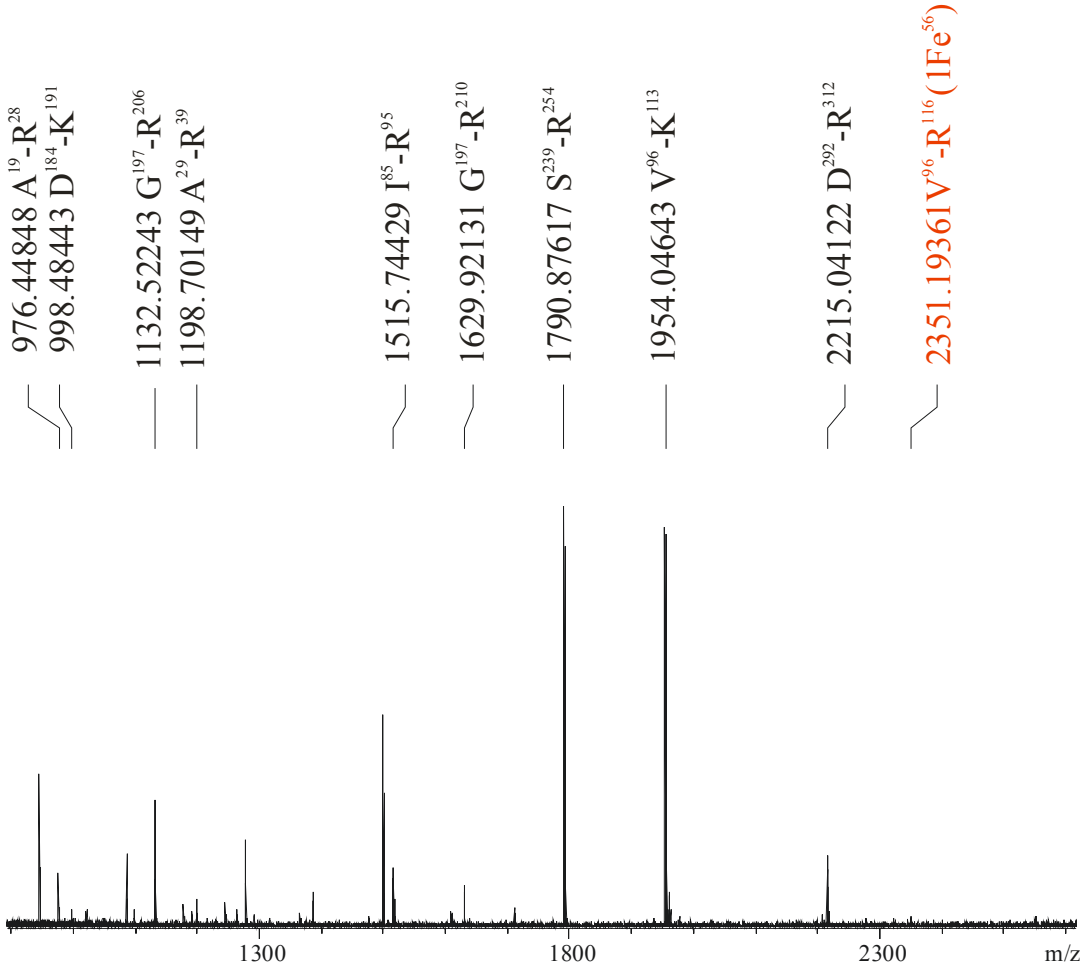


Abb. 77: MALDI-FTICR-MS von Proteinspot 3f (siehe Abb. 69) mit Datenbanksuche (www.matrixscience.com) identifiziert als β-Actin mit den zugeordneten Peptiden und einem $^{56}Fe^{+}$-haltigen Peptid V(96-116)R

2.4.2. Verwendung stabiler Isotopetracer von ^{65}Cu und ^{67}Zn an einem Modellprotein

Weitere gezielte Tracerstudien (Tracerlösung 7, siehe Tabelle 32) wurden an einem Modellprotein durchgeführt. Für diese Experimente wurde in *e. coli* exprimiertes Tau Protein (Sigma) ausgewählt. Die Trennung des Proteins in seine Isoformen erfolgte durch SDS-PAGE (Abb. 78). Anschließend wurde, wie auch bei den vorherigen Tracerexperimenten, das Gel über Nacht in der Tracerlösung geschüttelt und die Banden dann durch anschließende Silberfärbung sichtbar gemacht. Es wurden zwei identische Gele präpariert, das eine wurde für die Messungen mittels LA-ICP-MS zur Bestimmung der Elementkonzentrationen und das zweite für die Identifizierung der Isoformen des Tau Proteins mittels MALDI-FTICR-MS verwendet.

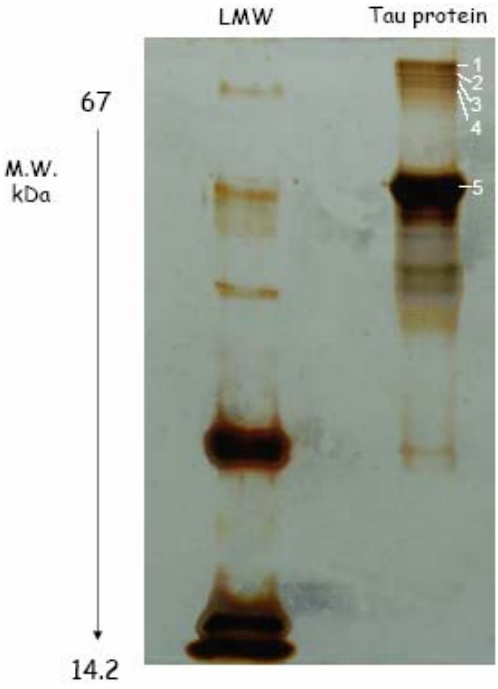


Abb. 78: 1D-Gel von Tau Protein durch Reaktion (über Nacht) mit der stabilen Tracerlösung 7 (siehe Tabelle 32: $1{,}17 \cdot 10^4$ ng/g ^{67}ZnO und $9{,}3 \cdot 10^3$ ng/g ^{65}Cu), anschließend angefärbt mittels der Silberfärbemethode; die gekennzeichneten Banden 1-5 wurden analysiert

Die in Abb. 78 markierten Banden 1-5 konnten mittels MALDI-FTICR-MS identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 24 zusammengefasst. Bande 1 konnte als Splice isoform PNS-Tau mit einer molekularen Masse von 78,8 kDa durch Datenbanksuche identifiziert werden. In Abb. 79 ist das MALDI-FTICR Massenspektrum von Bande 1 mit den zugeordneten Peptiden dargestellt. Auch hier war eine Identifizierung mit einer nur geringen Anzahl an Peptiden und einer geringen Konzentration an Protein in der Bande durch die hohe Auflösung und die hohe Massengenauigkeit des FTICR-MS möglich. In den Banden 2, 3 und 4 wurde auch Splice isoform PNS-Tau identifiziert.

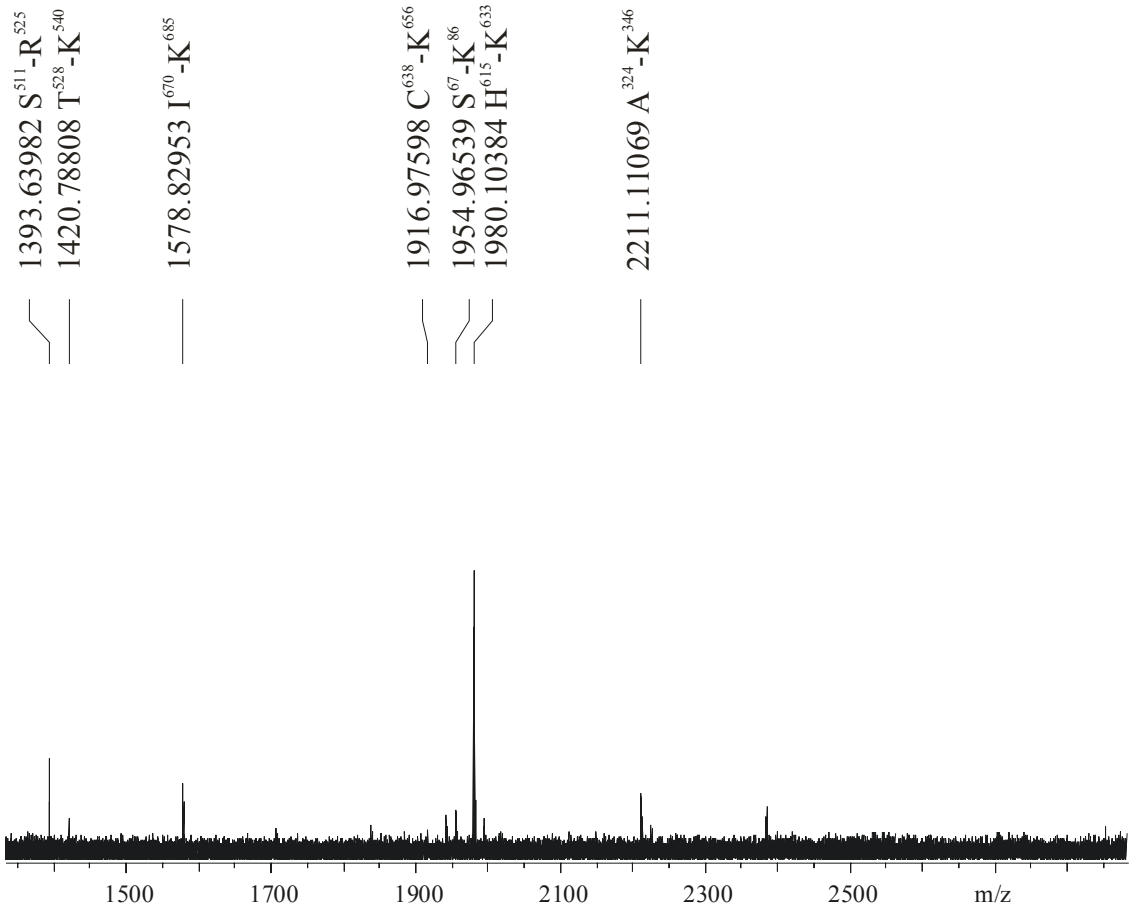


Abb. 79: MALDI-FTICR-MS der 1D-Gelbande 1 (Abb. 78) identifiziert als Splice isoform PNS-Tau

In der Bande 5, die eine höhere Konzentration an Protein enthielt (s. Abb. 78), konnte nach Messungen mit MALDI-FTICR-MS und anschließender Zuordnung durch die Datenbank Splice isoform Tau-F identifiziert werden.

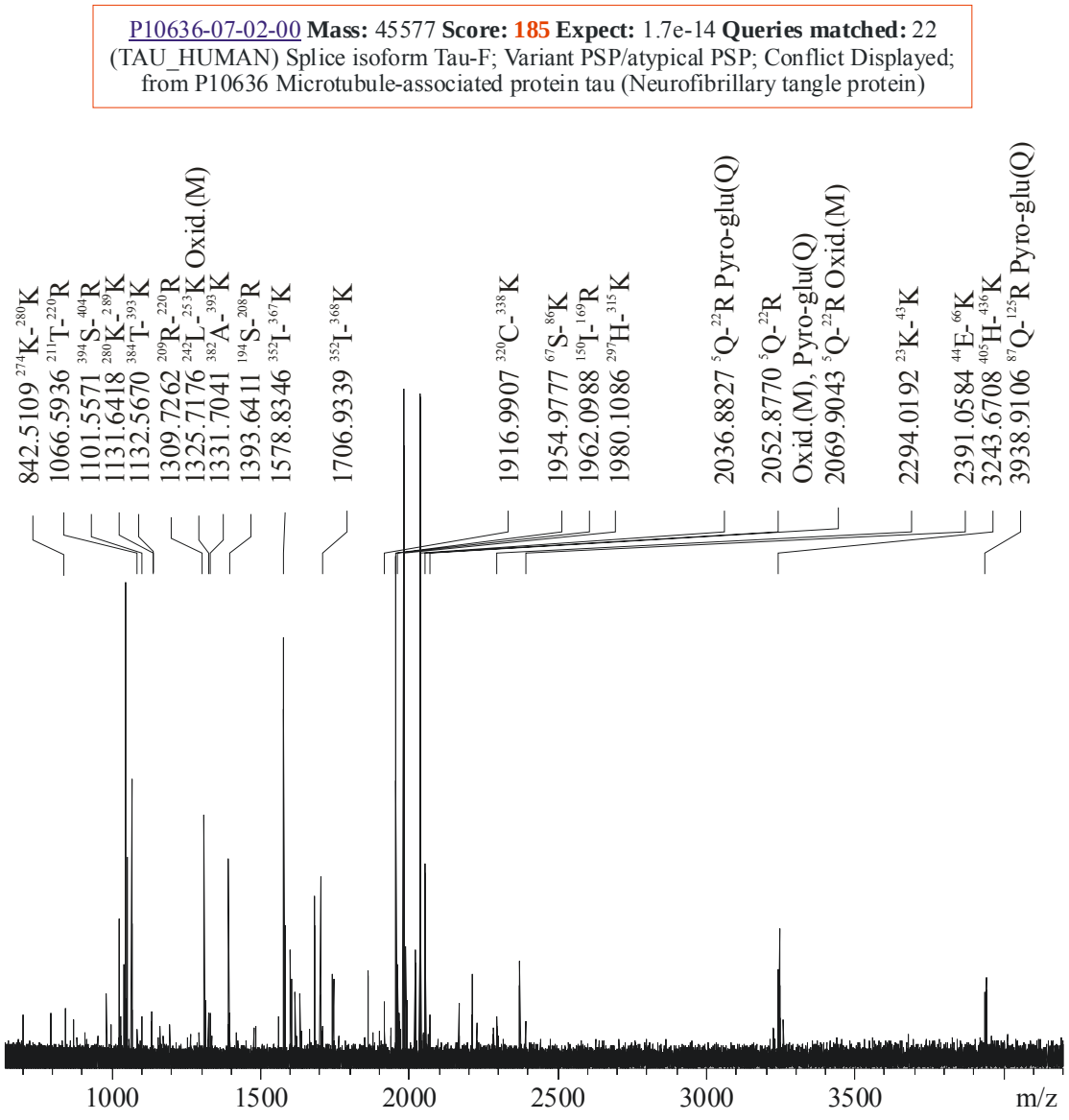


Abb. 2.70: MALDI-FTICR-MS der 1D-Gelbande 5 (Abb. 78) identifiziert als Splice isoform Tau-F

Hier waren auch mehr Peptide als bei Splice isoform PNS-Tau für eine Identifizierung des Proteins vorhanden. Dies ist aus Abb. 80, in der das Massenspektrum von Bande 5

mit den identifizierten Peptiden dargestellt ist, zu ersehen. Das Protein Splice isoform Tau-F hat ein Molekulargewicht von 45,8 kDa. Auch in diesem Fall stimmen die gefundenen Molekulargewichte der Proteine mit denen in der Datenbank gut überein, was die Richtigkeit der Identifizierung der Banden bestätigt.

In Tabelle 25 sind die Isotopenverhältnisse von $^{65}Cu/^{63}Cu$ und $^{67}Zn/^{64}Zn$ der 1D-Gelbanden des Tau Proteins (Abb. 78) zusammengefasst. Für die Tracerlösung wurden auch in diesem Experiment angereicherte, stabile Isotopentracer von ^{65}Cu und ^{67}Zn verwendet. Im Fall von Cu ist in allen Banden des Tau-Proteins eine nahezu 5fache Anreicherung an ^{65}Cu gegenüber der natürlichen Verteilung zu verzeichnen. Daraus ergibt sich eine wichtige Schlussfolgerung, dass das Tau Protein in der Lage ist, Kupfer zu binden.

Tabelle 24: Identifizierte Proteine aus dem 1D-Gel (Abb. 78) nach dem Einsatz von Tracerlösung 7 (siehe Tabelle 32: $1{,}17 \cdot 10^4$ ng/g ^{67}ZnO und $9{,}3 \cdot 10^3$ ng/g ^{65}Cu)

Bande	Protein	M.W.$_{theor.}$ (kDa)	M.W.$_{exp.}$ (kDa)	Anzahl der Cysteine
1	Splice isoform PNS-Tau	78,8	80	12
2	Splice isoform PNS-Tau	78,8	80	12
3	Splice isoform PNS-Tau	78,8	80	12
4	Splice isoform PNS-Tau	78,8	80	12
5	Splice isoform Tau-F	45,8	45	7

Tabelle 25: Isotopenverhältnisse von der Banden 1-5 des durch 1D-Gelelektrophorese getrennten Tau Proteins nach Behandlung mit angereicherten stabilen Isotopen von ^{65}Cu und ^{67}Zn (Abb. 78)

Bande	**^{65}Cu/^{63}Cu**		**^{67}Zn/^{64}Zn**	
	gemessen	**natürlich**[166]	**gemessen**	**natürlich**[166]
1	-	0,4457	0,0900	0,0844
2	0,5635		-	
3	1,4412		-	
4	2,1908		-	
5	1,1899		-	

Ein Isotopenaustausch oder eine Anreicherung von Kupferionen im Tau Protein konnte durch die höheren Isotopenverhältnisse von ^{65}Cu/^{63}Cu gegenüber der natürlichen Verteilung beobachtet werden. Dies wird in der graphischen Darstellung der Ergebnisse in Abb. 81 verdeutlicht.

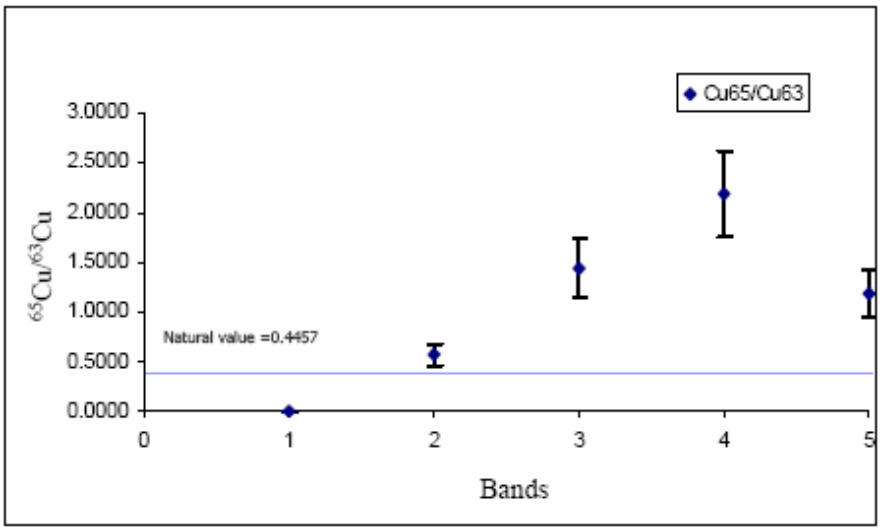


Abb. 81: ^{65}Cu/^{63}Cu-Isotopenverhältnisse in den 5 Banden (Isoformen) des durch 1D-Gelelektrophorese getrennten Tau Proteins (Abb. 78) gemessen mittels LA-ICP-MS (^{65}Cu/^{63}Cu in der Natur: 0.446)

Zink wurde nur in Gelbande 1 nachgewiesen, die als Spliced isoform PNS-Tau identifiziert wurde. Auch hier wurde ein höheres Isotopenverhältnis von $^{67}Zn/^{64}Zn$ im Vergleich zur natürlichen Verteilung ($^{67}Zn/^{64}Zn$: 0,0844) beobachten. Mit diesem Tracerexperiment konnte gezeigt werden, dass Tau Protein in der Lage ist, neben Phosphat auch Metallionen wie Cu und Zn zu binden.

3. Experimenteller Teil

3.1. Gewinnung und Trennung von Proteinen aus Gehirnproben

3.1.1. Proteinpräparation der Humangehirnproben

Alle Gehirnproben wurde von Herrn Professor Dr. Gabor Juhacz und Herrn Professor Dr. Miklos Palkovits (Labor für Neuromorphologie, Institut für Anatomie, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn) nach mikroskopischer Untersuchung der histologischen Proben zur auf Amyloid-Plaques Verfügung gestellt.

Die Gehirnproben von gesundem Humangehirn wurden den Patienten 2 bzw. 6 h post mortem entnommen. Ein Teil der Proben wurde für histologische Untersuchungen präpariert, der Rest wurde bei -74˚C eingefroren und gelagert. Zur Feststellung, ob der jeweilige Patient unter der Alzheimer'schen Krankheit gelitten hatte, wurden die histologischen Proben mikroskopisch auf Amyloid-Plaques untersucht. Die in Tabelle 26 aufgeführten Gehirnproben (jeweils 0,1-0,5 g) wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Tabelle 26: Analysierte Gehirnproben

Entnahme	A 2h post mortem		B 6h post mortem		
	#101	#37	#99	#142	#125
Somatomotor cortex	B105	B486	B7	B265	BR69
Medial prefrontal cortex	B54	B477	B36	B260	BR52
Parahipocampal cortex	B91	B489	B5	B287	
Cerebral white matter		B483			V63
Cerebellar cortex	B75	B480	B39	B269	BR85
Putamen	B76	B485	B3	B278	V67

Für die Gewinnung der Proteine aus Gehirngewebe wurden ein mechanischer Aufschluss und eine Zell-Lyse mittels Pufferlösung miteinander kombiniert. Die 100-250 mg Gehirnprobe wurden in 0,5 ml Aufschlusspufferlösung (40mM Tris, 7M Harnstoff, 2M

Thioharnstoff, 4% CHAPS wurde bei -20˚C gelagert) suspendiert. Vor dem Gebrauch des Aufschlusspuffers wurden noch 10mm DTT, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 0,5 mg Pepstatin A, 0,5 mg Chymostatin, 0,5 mg Leupeptin und 0,5 mg Antipain zugegeben. Der Aufbruch des Gewebes wurde unter Eiskühlung im Ultraschallbad 30 s bis 5 min durchgeführt. Die Trennung der unlöslichen Bestandteile erfolgte durch mehrmalige Ultrazentrifugation (10 min bei 10000 RMP/g, 75 min bei 65000 RMP/g). Der proteinhaltige Überstand wurde durch Dekantieren von den unlöslichen Bestandteilen getrennt, aliquotiert und bei -74˚C gelagert bzw. nach Acetonpräzipitation wurden die Proteine mittels 1D- bzw. 2D-Gelelektrophorese getrennt.

3.1.2. Proteinpräparation der humanen Alzheimergehirnproben

Die Gehirnproben wurde von Herrn Professor Dr. Gabor Juhacz und Herrn Professor Dr. Miklos Palkovits (Labor für Neuromorphologie, Institut für Anatomie, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn) nach mikroskopischer Untersuchung der histologischen Proben zur auf Amyloid-Plaques Verfügung gestellt.

Gehirnproben (ca. 60 g) von an Alzheimer erkrankten Patienten im Alter zwischen 74 und 84 Jahren wurden 12 bis 14 h post mortem entnommen. Ein Teil der Proben wurde für histologische Untersuchungen auf Amyloid-Plaques verwendet. Diese Gehirnproben (gelagert bei -74˚C) wurden mit 200 ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer (175 mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH = 7,4), 10 mg/l PMSF, 2 mg/l Aprotinin, 2 mg/l Antipain, 2 mg/l Leupeptin, 2mg/l Pepstatin, 5 mM EDTA) versetzt und die Zellen in einem Homogenisator aufgebrochen. Das Homogenat wurde bei 0 - 4˚C für 20 min (20000 RMP/g) zentrifugiert, der Überstand mit den gelösten Proteinen abdekantiert und bei -74˚C gelagert. Der Rückstand (Pellet) wurde dreimal mit jeweils 200 ml Homogenisierungspuffer durch Resuspendieren und erneute Ultrazentrifugation (bei 0 - 4˚C, 20000 RMP/g für 20 min) gewaschen. Weiterhin wurde der Rückstand in 200 ml Homogenisierungspuffer-T (Homogenisierungspuffer mit 1% Triton X-100) resuspendiert und für 30 min geschüttelt. Durch erneute Ultrazentrifugation (bei 0 - 4˚C, 20000 RMP/g für 20 min) konnten nichtlösliche Zellbestandteile als Pellet abgetrennt

und verworfen werden. Die Membranproteine, die im Überstand enthalten waren, wurden bei -74˚C gelagert bzw. nach Acetonpräzipitation mittels 2D Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.1.3. Acetonpräzipitation

Zum Entfernen der störenden Pufferlösungen und Salze wird das Zell-Lysat mit dem 4- bis 5-fache Volumen an Aceton überschichtet und für 5 h bei -28˚C gelagert. Anschließend wird das Gemisch zur Abtrennung des Acetons und der Pufferlösungen von den Proteinen für 10 min zentrifugiert (13000 RMP/g). Die überstehende Lösung wird entfernt und das Pellet mit Ethanol gewaschen. Nach erneuter Abtrennung des Ethanols durch 10 min Zentrifugation (13000 RMP/g) wird das Pellet des Proteingemisch unter N_2 getrocknet. Anschließend wurden die Proteine mittels 1D- bzw. 2D-Gelelektrophorese getrennt.

3.2. Trennung der Proteingemische

3.2.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der eindimensionalen Gelektrophorese wurden die Proteine nach ihrer molekularen Masse getrennt. Als Matrix für die Trennung wurde ein Polyacrylamidgel verwendet. Die Zusammensetzung des zu verwendeten Gels ist in Tabelle 27 dargestellt. Das Gel, das aus einem so genannten Trenngel und einem Sammelgel bestand, wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen.[167] Für die 1D-Gelelektrophorese wurde die Minigelapparatur MiniProtean von BioRad (München, Deutschland) verwendet.

Tabelle 27: Zusammensetzung der Polymerisationslösung für die SDS-PAGE

	Sammelgel 5%	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Trenngel 15%
4x Sammelgelpuffer	2,5 ml	-	-	-
4x Trenngelpuffer	-	6 ml	6 ml	6 ml
MilliQ-Wasser	5,8 ml	10 ml	8,4 ml	6 ml
Acrylamid-BIS	1,7 ml	8 ml	9,6 ml	12 ml
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
APS	85 µl	125 µl	125 µl	125 µl

In Tabelle 28 sind die Zusammensetzungen der Polymerisationslösungen aufgeführt. Das Trenngel wurde zuerst zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 1-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels (ca. 30 min) erfolgte das Überschichten mit dem Sammelgel. Für eine bessere Visualisierung der Probentaschen und der Lauflinie wurde der 4x Sammelgelpuffer mit Bromphenolblau angefärbt.

Tabelle 28: Zusammensetzung der im Polymerisationsgemisch enthaltenen Lösungen

Verwendete Lösungen	Bestandteile
Acrylamid-BIS	30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Methylenbisacrylamid
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, 0,4% (w/v) SDS, pH = 6,8
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,4% (w/v) SDS, pH = 8,8
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
APS	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in MilliQ-Wasser
1x Laufpuffer	0,25 M Tris, 2 M Glycin, 1% (w/v) SDS

Die in der Aufschlusspufferlösung (0,2 M Tris-HCl (pH = 6,8), 20% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) reduzierten und denaturierten Proteine (10 min 60˚C) wurden in die Probentaschen gefüllt. Vor Gebrauch wurde der Puffer mit 100 mM DTT versetzt. Bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA wanderten die Proteine innerhalb von 30 min von den Probentaschen durch das Sammelgel zum Trenngel. Die Trennung der Proteine nach der Molekularmasse im Trenngel erfolgte für

ca. 1½ h bei einer Stromstärke von 120 mA. Anschließend wurden die Proteine mittels Commassie- oder Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.2.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Für die Trennung komplizierter Proteingemische wurde die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese eingesetzt (siehe Abb. 82). Die 2D Gelektrophorese erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt, der isoelektrische Fokussierung, wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. Im zweiten Schritt, der SDS-PAGE, wurden die Proteine nach ihrer molekularen Masse getrennt.

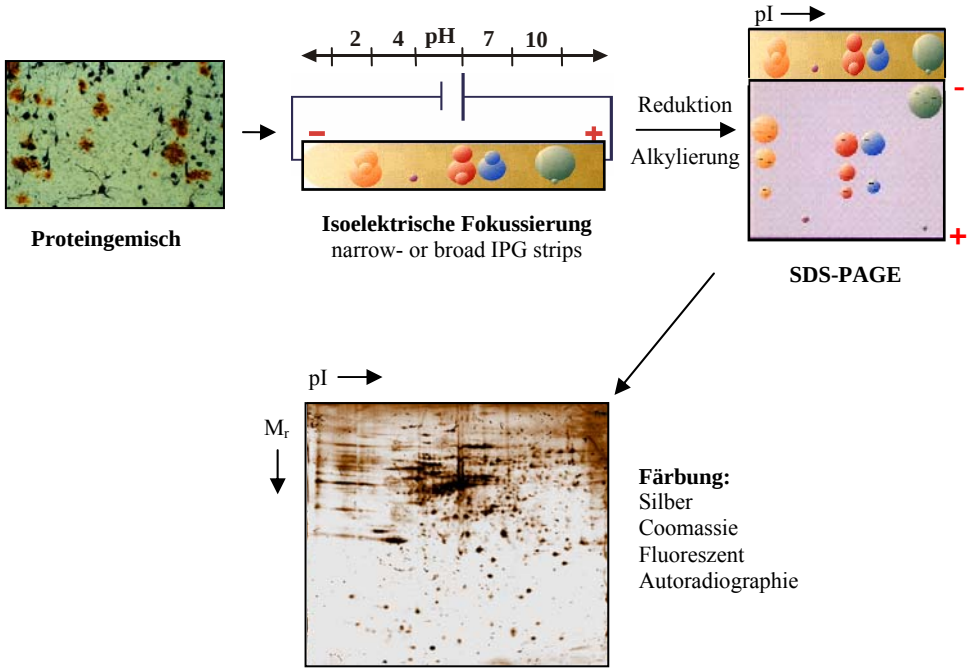


Abb. 82: Schematische Darstellung der 2D Gelelektrophorese

Die Rehydrierung des IPG-Streifens (immobilized pH gradient strip) dauerte 15 h. Zu 500 µl Rehydrierungslösung (8M Harnstoff, 2% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) IPG Puffer (3-10, 4-7), Bromphenolblau, MilliQ-Wasser) wurden 1,4 mg DTT zugegeben. Die Proteinprobe wurde in 300µl (IPG-Streifen 3-10 (17cm lang)) bzw. 315µl (IPG-Streifen

4-7 (18 cm lang)) im Ultraschallbad gelöst. Die Rehydrierung erfolgt im „Reswelling tray“ (BioRad, München, Deutschland). Um eine Austrocknung des IPG-Streifens zu verhindern, wurde dieser mit Silikonöl überschichtet.

Die erste Dimension (IEF – isoelektrische Fokussierung) erfolgte im Multiphor II (BioRad) bei konstanten 20˚C (Thermostat Julabo F25). Der IPG-Streifen wurde mit MilliQ-Wasser gewaschen, die Plastikrückwand und die Enden getrocknet. Anschließend wurde der IPG-Streifen in das Multiphor II getan. Die mit Wasser angefeuchteten Elektrodenstreifen wurden auf die Gelenden gelegt und die Elektroden darauf befestigt. Um ein Austrocknen des IPG-Streifens zu verhindern, wurde dieser mit Silikonöl überschichtet. Das Multiphor II wurde zur Kühlung des IPG-Streifens mit einem Thermostaten (20˚C) verbunden. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte unter einem linearen Spannungsgradienten (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Programm für die isoelektrische Fokussierung mit linearem Spannungsgradienten

Zeit	Spannung	Stromstärke	elektr. Leistung
1min	0V – 150V	2mA	5W
30min	150V	2mA	5W
15min	150V – 300V	2mA	5W
30min	300V	2mA	5W
2h30min	300V – 3500V	2mA	5W
8h	3500V	2mA	5W

Die zweite Dimension (SDS-PAGE) erfolgte nach Reduzierung and Alkylierung der S-S-Brücken in zwei Äquilibrierungsschritten. Zu der Äqulibrierungslösung (50mM Tris-HCl (pH = 8,8), 6M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, Bromphenolblau) wurden für die Reduktion 1% (w/v) DTT und für die Alkylierung 2,5% (w/v) Iodacetamid zugegeben und der IPG-Streifen jeweils 15-30 min darin geschüttelt. Anschließend wurde der IPG-Streifen in 1x Laufpuffer (siehe Tabelle 27) gewaschen und auf das Polyacrylamidgel, welches zuvor zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde, aufgebracht. Die

Zusammensetzung des Gels ist aus Tabelle 26 zu entnehmen; zum Trennen der Proteine wurden größtenteils 12% Trenngele verwendet. Daraufhin wurde der IPG-Streifen mit 0,5% Agarose (0,5% Agar in 1x Laufpuffer, Bromphenolblau) überschichtet.

Die Gel-Kassette wurde in die entsprechende Halterung einer Protean xi II Zelle (BioRad, München, Deutschland) eingesetzt. Bei diesem Experiment wurde der 1x Laufpuffer (2 l für eine Zelle mit zwei Gelen) soweit eingefüllt, um einen Stromfluss zu gewährleisten. Die zweite Dimension der Elektrophorese wurde in allen Experimenten unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 15-30 min 25mA pro Gel, bis die Proteine in das Polyacrylamidgel gewandert waren und dann 40mA pro Gel bis die Proteine (blaue Lauffront) gerade den unteren Rand der Glasplatten erreicht hatten. Zur Visualisierung der Proteine wurden die Gele anschließend mit kolloidalem Coomassie Brilliant-Blau G 250 oder mit Silber angefärbt.

3.2.3. Färbungsmethoden für Polyacrylamidgele

3.2.3.1. Kolloidale Coomassiefärbung

Die Färbung der Polyacrylamidgele mit kolloidalem Coomassie Brilliant-blau G 250 erfolgte nach der Methode von Neuhoff et. al.[8] Das Gel wurde für 1h in 12% (w/v) TCA vorfixiert. Anschließend wurde das Gel mit der kolloidalen Coomassie-Lösung versetzt und über Nacht gefärbt. Zum Färben eines 2D-Gels mit kolloidal Commassie wurden 200 ml einer Lösung von 10% (w/v) Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$ und 2% (w/v) Phosphorsäure H_3PO_4 zuerst mit 5 ml einer Lösung bestehend aus 5% (w/v) Coomassie Brilliant-Blau G 250 in MilliQ-Wasser versetzt und für 30 min gerührt. Danach wurden noch 50 ml Methanol dazugegeben und es wurde erneut 30 min gerührt. Nach Entfernen der Färbelösung wurde das Gel für einige Minuten in 25% Methanol in MilliQ-Wasser gewaschen und nachfolgend in MilliQ-Wasser gelagert.

3.2.3.2. Silberfärbung

Die empfindlichere Silberfärbung der Proteine wurde bei den Gelen angewendet, die eine geringere Konzentration an Proteinen aufwiesen. Für Gele mit höheren Konzentrationen wurde die kolloidale Coomassie-Färbung verwendet. Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernick.[168] Das Gel wurde dabei in einer Lösung bestehend aus 30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure in MilliQ-Wasser für mindestens 30 min fixiert. Die Inkubierung des Gels erfolgte danach in 30% (v/v) Ethanol, 6,8% (w/v) Natriumacetat-Trihydrat und 0,2% (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat in MilliQ-Wasser für mindestens 30 min oder über Nacht. Das Gel wurde dann dreimal für 15 min in MilliQ-Wasser gewaschen. Die Versilberung des Gels erfolgte für 20 min in einer Lösung aus 0,2% (w/v) Silbernitrat $AgNO_3$ in MilliQ-Wasser, wobei noch 20µl 37% Formaldehyd pro 100 ml Silbernitratlösung zugegeben wurden. Die Gelentwicklung wurde in einer wässrigen 2,5% (w/v) Natriumcarbonatlösung durchgeführt, wobei pro 100 ml Lösung 10 µl 37% Formaldehyd zugegeben wurden. Zuerst wurde das Gel in einer 100 ml Entwicklungslösung für ca. 1 min geschüttelt. Anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Farbintensität der Proteinspots in 200 ml Entwicklungslösung geschüttelt. Das Gel wurde dreimal für jeweils 15 min mit MilliQ-Wasser gewaschen. Schließlich wurde das Gel in einer 10% (v/v) Glycerinlösung für 30min konserviert und in MilliQ-Wasser gelagert.

3.2.4. Enzymatischer Abbau von Proteinen mit Trypsin

3.2.4.1. Tryptischer Abbau von Proteinen in Lösung

Der Abbau der Peptide und Proteine mittels Trypsin wurde bei einem Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:100 durchgeführt. Hierzu wurden die Substrate in 5 mM bzw. 50 mM NH_4HCO_3 mit frisch angesetzter Trypsin-Lösung versetzt. Trypsin wurde in Aliquots von 1 mg/ml bei -28°C in 1 mM HCL Lösung aufbewahrt. Der Abbau wurde dann bei 37°C über einen Zeitraum von 30 min bis 4 h durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 bis 2 µl 1 mM HCl-Lösung und anschließendes Aufbewahren des Reaktionsgemisches für ca. 1-2 h bei -28˚C gestoppt.

3.2.4.2. Tryptischer „In-Gel-Abbau“

Für den tryptischen „In-Gel-Abbau“ von 1D-Gelbanden bzw. 2D-Gelspots sind aufgrund der beiden unterschiedlichen Färbemethoden (Silber- bzw. Coomassie-Färbung) verschiedene Entfärbungsmethoden anzuwenden. Die Gelspots bzw. -banden wurden mittels Skalpell ausgeschnitten, in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und anschließend für 15 min in MilliQ-Wasser gewaschen.

Für die mit Coomassie gefärbten Gelstücke wurde die folgende Methode verwendet: Nach dem Waschen wurden die Gelstücke für 30 min in 3/2 Acetonitril/MilliQ-Wasser geschüttelt, wobei die Gelstücke durch das Acetonitril (ACN) schrumpften. Nach Entfernen des Lösungsgemisches wurden die Stücke für 30 min in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Die Gelstücke wurden mit 50 mM NH_4HCO_3 versetzt, 15 min inkubiert und anschließend für 30 min in 3/2 Acetonitril/MilliQ-Wasser dehydriert. Dieser Schritt wurde wiederholt und nach anschließender Trocknung der Gelstücke in der Vakuumzentrifuge wurden die eisgekühlten Gelstücke (4˚C) für 45 min in 12 ng/ml Trypsin gelöst in 50 mM NH_4HCO_3 inkubiert. Dann wurde die Enzymlösung entfernt und durch 50 mM NH_4HCO_3-Puffer ersetzt. Der Abbau erfolgte über Nacht bei 37˚C. Der Supernatant wurde in einem neuen 0,5 ml Eppendorf-Gefäß für spätere massenspektrometrische Messungen nach Verdampfen des Lösungsmittels in der Vakuumzentrifuge aufbewahrt. Die Elution der Peptidgemische aus den Gelstücken wurde durch dreimaliges Schütteln bei RT für jeweils 1h mit 3/2 Acetonitril/0.1% TFA in MilliQ-Wasser erreicht. Die Elutionsfraktionen wurden gesammelt, in der Vakuumzentrifuge eingeengt und massenspektrometrisch untersucht.

Bei den mittels Silberfärbung angefärbten Gelstücken wurden diese nach dem Waschen in MilliQ-Wasser für 30 min in Acetonitril inkubiert und dann in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Entfärbung erfolgte für 10 min in einem frisch hergestellten 1:1-Gemisch aus 30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ / 100 mM $Na_2S_2O_3$. Nach mehrmaligem Waschen in MilliQ-Wasser für jeweils 15 min wurden die Gelstücke 30 min in Acetonitril dehydriert und in

der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die eisgekühlten Gelstücke (4˚C) wurden für 45 min in 12 ng/ml Trypsin, gelöst in 50 mM NH_4HCO_3, inkubiert. Dann wurde die Enzymlösung entfernt und durch 50 mM NH_4HCO_3-Puffer ersetzt. Der Abbau erfolgte über Nacht bei 37˚C. Der Supernatant wurde in einem neuen 0,5 ml Eppendorf-Gefäß für spätere massenspektrometrische Messungen nach Verdampfen des Lösungsmittels in der Vakuumzentrifuge aufbewahrt. Die Elution der Peptidgemische aus den Gelstücken wurde mittels Schütteln bei RT (5 h) mit der Elutionslösung 1/3 20mM NH_4HCO_3, 2/3 Acetonitril erreicht. Die Elutionsfraktionen wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und für massenspektrometrische Messungen verwendet.

3.3. Festphasensynthese von Peptiden

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden mittels Festphasenpeptidsynthese in einem semi-automatischen Peptidesynthesizer EPS 221 (Intavis, Deutschland) nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie [153] mit Ansätzen von 5 mM bzw. 50 mM synthetisiert. Alle Peptide wurden am C-Terminus als Amid an ein NovaSyn®TGR-Harz (Novabiochem) (Abb. 83), das als Trägermaterial verwendet wurde, synthetisiert.

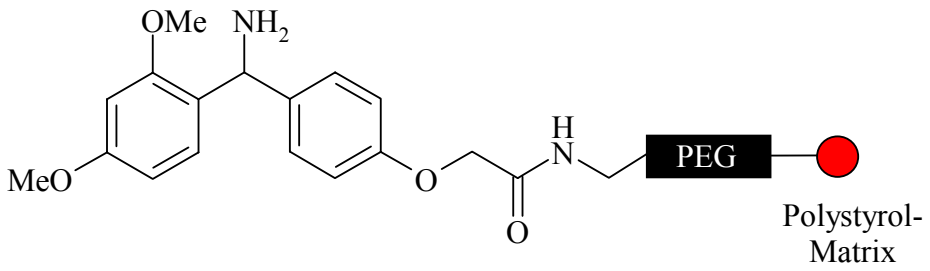


Abb. 83: NovaSyn®TGR-Harz (Novabiochem) für Festphasensynthese, PEG (Polyethylenglycol) fungiert als Spacer zwischen der Polystyrol-Matrix und dem Linker

In Abb. 84 ist der allgemeine Reaktionszyklus der Festphasensynthese dargestellt. Das Harz wurde vor Beginn der Synthese mehrmals mit DMF (Dimethylformamid) gewaschen und inkubiert. Bei diesem Präparationsschritt quoll das Harz auf.

Im ersten Schritt der Festphasensynthese wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 2% Piperidin und 2% DBU in DMF abgespalten. Die dabei entstehenden Nebenprodukte Dibenzofulven und CO_2 wurden abgespalten und mittels DMF von der Probe gewaschen. Die Reaktionszeit für das Entfernen der Schutzgruppe betrug 5 min. Anschließend erfolgte nach dem Waschen mit DMF die Kupplung der nächsten Aminosäure nach der Aktivierung mittels einer Lösung aus 0,9M PyBOP (Benzo-trialzol-1-yl-N-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium-hexafluoro-phosphat) und einer zweiten Lösung 1,3 M NMM (N-Methylmorpholin), jeweils in DMF gelöst. Die Kupplungszeit lag bei 30 - 60 min. Nach erneutem Waschen mit DMF wurde die nächste Aminosäure an die vorherige gekoppelt. Nach dem letzten Zyklus wurde innerhalb von 5 min der N-Terminus des Peptids durch 2% Piperidin und 2% DBU in DMF von der Schutzgruppe befreit. Das Harz wurde mit DMF und danach Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

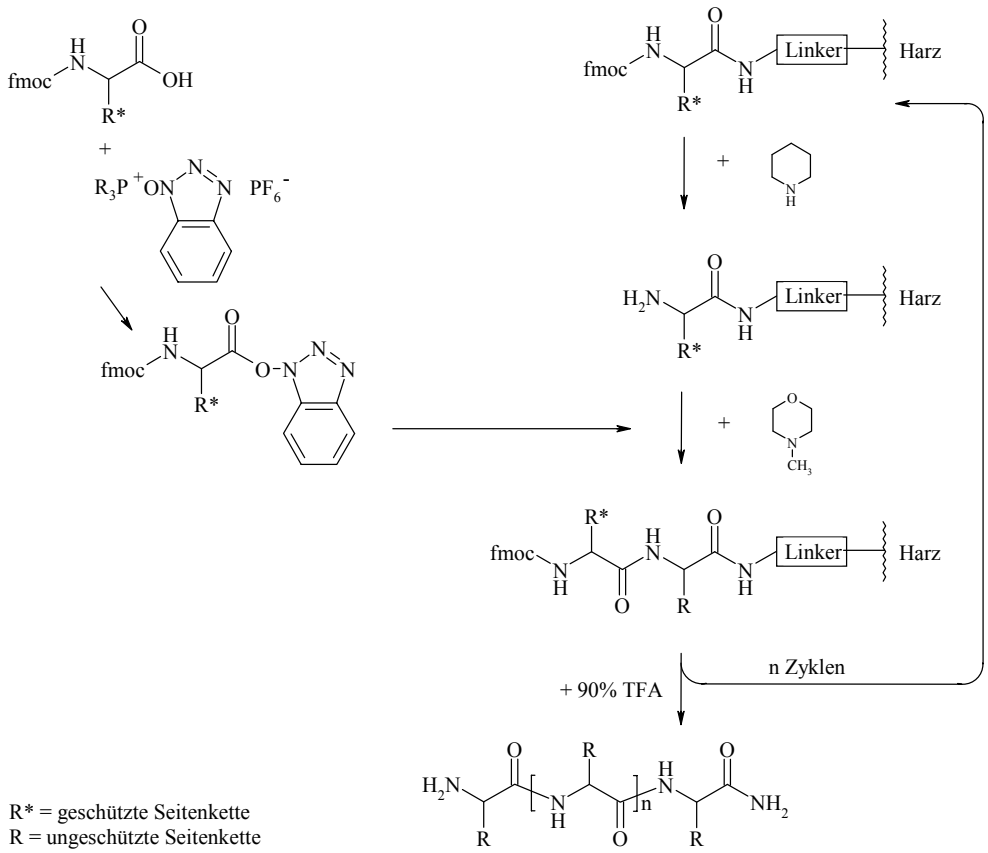


Abb. 84: Reaktionszyklus der Festphasensynthese

Die Abspaltung vom Harz zusammen mit dem vollständigen Entschützen der Seitenketten wurde mit einer Mischung aus TFA / Triethylsilan / MilliQ-Wasser (90:5:5 (v/v/v)) für 2 - 4 h bei RT erreicht. Das Peptid wurde dann in kaltem tert-Butylmethylether über Nacht präzipitiert. Das Harz und das Rohpeptid wurden durch Filtration mittels 10% Essigsäure nach Waschen mit Diethylether getrennt. Das abgetrennte Rohpeptid wurde dann lyophilisiert und mittels RP-HPLC gereinigt.

3.3.1. Reinigung der synthetischen Peptide mittels RP-HPLC

Für die Aufreinigung der synthetischen Partial-Peptide des Tau Proteins wurde ein RP-HPLC[154] mit einer Gradienten-HPLC (Pumpen M600A und M45, U6K-Injektor, Multiwellenlängen-Detektor 490E und Datensystem MAXIMA 820, MilliQ-Wasser) verwendet. Eine 2700-HPLC (BioRad HPLC-System) wurde für die analytische Separation der Peptide eingesetzt. Die Trennung der Peptide erfolgte auf einer Vydac-C18-Säule mittels einer Flussrate von 1 ml/min. Als Gradientensystem wurde 0,1% TFA (Lösung A) in MilliQ-Wasser und 0,1% TFA in 80% ACN (Lösung B) angewendet. Es wurde ein Gradient von 5-10% von Lösung B bis zu 60% Lösung B in 60 min gefahren. Die Lösungen wurden unter Vakuum vorher 15 min in einem Ultraschallbad (Transsonic 570, Elma) entgast. Die Peptide wurden nach chromatographischer Trennung mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert.

3.4. Massenspektrometrische Methoden

3.4.1. MALDI-TOF-MS

Die Spektrenaufnahme erfolgte mit einem linearen Biflex MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker-Daltonik/Bremen mit gepulster Ionenextraktion (Abb. 85). Das Analyseninstrument war mit einer SCOUT-Quelle und einer Videokamera zur Beobachtung des Probentargets ausgestattet. Die Desorption des Probenmaterials und die Bildung von Ionen erfolgte durch Beschuss der mit einer Matrix cokristallisierten Probe mit einem OEM VSL 337 Stickstofflaser mit der Wellenlänge 337 nm, einer Bandbreite von 0,1 nm und einer Pulsdauer von 3 ns.

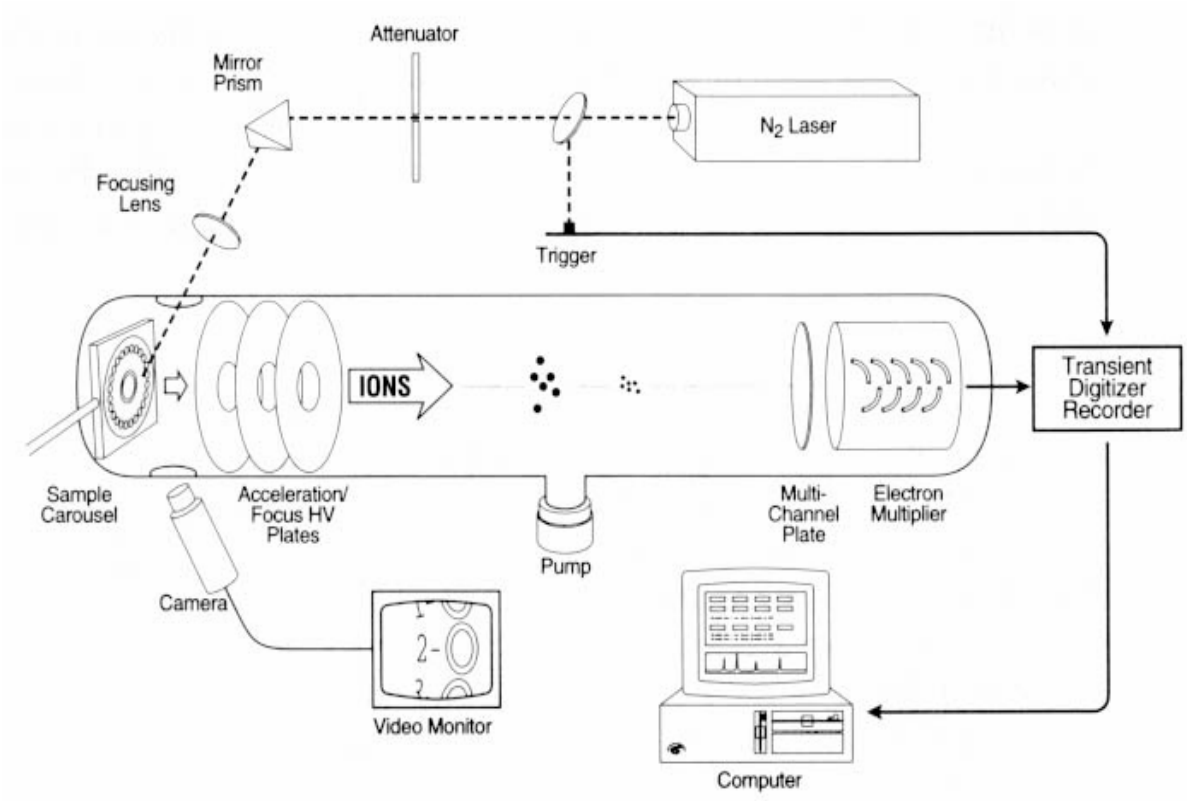


Abb. 85: Schematische Darstellung des Bruker Biflex MALDI Flugzeit Massenspektrometers

Die Intensität eines Laserpulses war über einen Absorptionsfilter stufenlos regelbar. In der Regel erfolgte die Ionenbeschleunigung bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Am Detektor (Micro-Channel-Plate) betrug die Spannung 1,5 – 1,6 kV. Die Aufnahme und Auswertung der Massenspektren wurde mit Hilfe des Datenauswertesystems Xmass (Bruker-Daltonik, Bremen) durchgeführt.

Für die MALDI-Technik wurde ein gepulster UV- (oder IR-) Laserstrahl zur Erzeugung von Analytmolekülionen eingesetzt, wobei eine UV- (oder IR-) Licht absorbierende Matrix Verwendung findet und die Biomoleküle „intakt“ bleiben. Der Analyt und die Matrix wurden in einer Mischung aus organischen Lösungsmitteln und Wasser gelöst und entweder nacheinander auf einen Probenträger aufgebracht oder vorher vermischt und anschließend auf den Metallprobenträger gegeben. Das molare Verhältnis von Analyt zu Matrix auf dem Probenträger beträgt normalerweise etwa 1:100.[169, 170] Nach der

Kristallisation des Proben-Matrixgemisches wurde der Probenträger ins Vakuumsystem des Massenspektrometers eingeführt und mit einer HV-Pumpe die Ionenquelle auf ein Vakuum auf 10^{-8} torr gepumpt. Beim Beschuss der Probenoberfläche mit Photonen wird die meiste Laserenergie von der Matrix absorbiert, was eine ungewollte Fragmentierung des Analyten verhindert. Bei der Wechselwirkung der Photonen mit den Molekülen von Matrix und Analyt werden diese desorbiert, in die Gasphase überführt und durch Stöße untereinander positiv- oder negativ-geladene Ionen erzeugt.

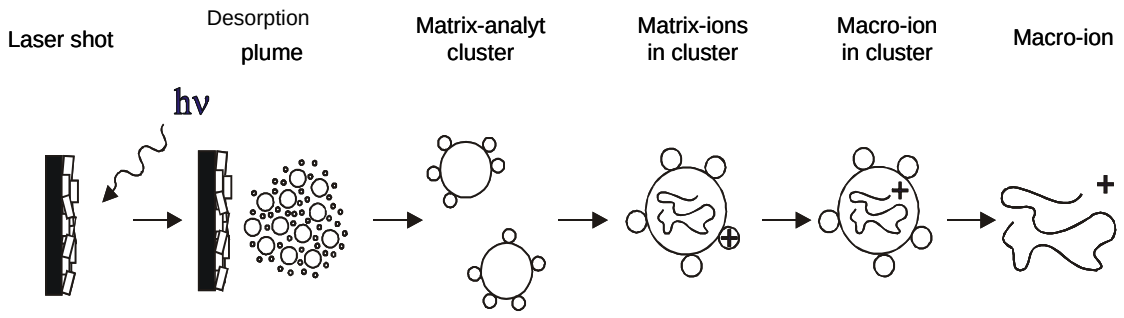


Abb. 86: Schematische Darstellung der Ionenbildung in der Matrix assisted laser desorption/ionisation (MALDI)

Die einfach positiv- oder negativ-geladenen Ionen sind die dominanten Ionen im MALDI-Massenspektrum und werden für die Analytik verwendet. Je nach Einstellung des Massenspektrometers können positive und negative Ionen analysiert werden. Das Prinzip der Ionenbildung in einer MALDI-Quelle ist in Abb. 86 dargestellt.

3.4.1.1. Probenpräparation zur MALDI-TOF-MS

Für alle MALDI-TOF-MS Messungen wurde α-Cyano-p-hydroxyzimtsäure (HCCA) als Matrix verwendet. Zum Einsatz kam eine jeweils frisch hergestellte gesättigte Matrixlösung, wobei ein Lösungsgemisch aus ACN / 0,1% TFA in MilliQ-Wasser im Verhältnis 2/1 eingesetzt wurde. Von dieser Lösung wurden 0,7 µl auf einem Probenträger aufgebracht und getrocknet. Dann wurden 0,7 ml Probe, gelöst in dem gleichen Lösungsmittelgemisch (2/1 ACN / 0,1% TFA in MilliQ-Wasser), auf die

getrocknete Matrix aufgetragen und durch Trocknen auskristallisiert. Falls nötig, wurden die Spots mittels 0,7 ml 2/1 ACN / 0,1% TFA in MilliQ-Wasser umkristallisiert. Stark salzhaltige Proben wurde mittel ZipTip C18® (MilliPore, www.millipore.com) für Peptidgemische aufgereinigt.

3.4.2. FTICR-MS

Von allen massenspektrometrischen Techniken, die im Bereich der Proteomics eingesetzt werden, ist die FTICR-MS die Methode mit der höchsten Massengenauigkeit (< 1 ppm) bei gleichzeitig hoher Massenauflösung (> 10^6) und hoher Empfindlichkeit. Proteolytische Peptide, bei den die Gensequenz bekannt ist, können oftmals durch genaue Massendaten identifiziert werden, was den Einsatz von MS^n-Analyse unnötig macht. In den meisten Fällen erlaubt die hohe Massengenauigkeit eine geringere Toleranzgrenze für die Datenbanksuche und erleichtert somit die Identifizierung der Proteine mit einer minimalen Anzahl an Peptiden.

Von großem Interesse für Proteomstudien ist die Vielseitigkeit der FTICR-MS^n-Techniken für Strukturaufklärung unter Verwendung von Fragmentierungen durch stoßinduzierte Dissoziation (CID) und Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (IRMPD), wobei an das Massenspektrometer eine leistungsfähige Ionisationsmethode wie die ESI oder Nano-ESI gekoppelt wird.

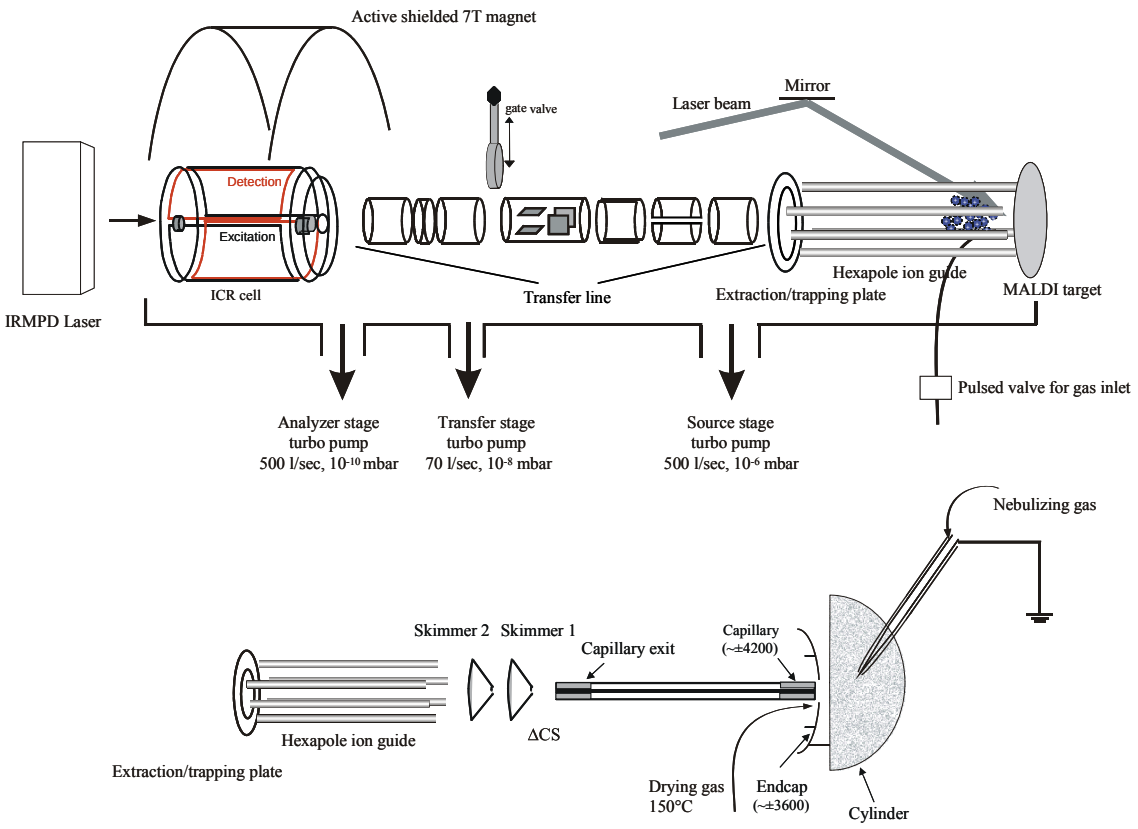


Abb. 87: (a) Schematische Darstellung des Bruker APEX II FT-ICR-Massenspektrometers mit einer externen Scout 100 MALDI-Quelle. (b) Schematische Darstellung der Bruker APOLLO-ESI-Quelle.

3.4.2.1. MALDI-FTICR-MS

MALDI-FTICR-Massenspektren wurden mit einem Bruker APEX II FTICR-Instrument (Abb. 87a) mit einem 7T supraleitenden Magneten (Magnex, Oxford, UK), einer zylindrischen unendlichen ICR-Analysatorzelle und einer externen Scout 100 MALDI-Quelle mit vollautomatischen X-Y Probenträger und gepulstem Kollisionsgas aufgenommen. Der gepulste Stickstofflaser arbeitet bei einer Wellelänge von 337 nm und die Ionen wurden direkt in das Hexapol, das sich 1 mm vom Probenträger entfernt befindet, extrahiert.

Das Gerät zum Pulsen des Kollisionsgases in unmittelbarer Nähe zum Probenträger unterstützt damit die Kühlung der beim MALDI-Prozess (siehe Abb. 86) gebildeten Ionen, was zu einer Verbreiterung der kinetischen Energie der Ionen um einige eV führt. Die Ionen wurden im Hexapol, an dem ein positives Potential am Eingang und an der Extraktionsplatte anlag, entlang der Longitudinalachse gefangen. Nach einer vorgegebenen Fangzeit wurde die Spannung an der Extraktionsplatte umgekehrt und die gefangenen Ionen wurden zur Analysenzelle extrahiert. Die Akkumulierung der Ionen von multiplen Laserschüssen im Hexapol vor der massenspektrometrischen Analyse hatte eine Steigerung der Empfindlichkeit zur Folge. Die Ionen, die bei 20-30 Laserschüssen erzeugt wurden, wurden im Hexapol für 0,5-1 s bei 30V akkumuliert und dann mit einer Spannung von -15 V (für positive Ionen) extrahiert. Das Fangen der Ionen in der Analysenzelle konnte durch eine kleine, symmetrische, positive Spannung (1-1,2 V für positive Ionen) angelegt an die Fangplatten erreicht werden. Um die gefangenen Ionen zu detektieren, wurden diese mit einem oszillierenden elektrischen Feld angeregt. Der „Imagestrom“, der durch die kohärente Bewegung der Ionen in der ICR-Zelle erzeugt wurde, wurde detektiert, verstärkt und mit einem Zeitdomänensignal oder einem transienten Signal digitalisiert. Nach der Erfassung des Signals wurde die Zeitdomäne gespeichert und nachträglich durch Fouriertransformation verändert und in ein Massenspektrum umgewandelt.

Als Matrixlösung wurde eine Lösung aus 100 mg/ml von 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in Acetonitril / 0,1% TFA in MilliQ-Wasser (2:1) verwendet. 0,5 µl der Matrixlösung und 0,5 µl Probenlösung wurden auf einem rostfreien MALDI-Stahlprobenträger gemischt und an der Luft getrocknet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf dem Probenträger wie in Kap. 3.5.1.1 beschrieben von Salzen befreit. Die Massenspektren während der Messungen wurden durch Erfassung von normalerweise 32-64 Scans aufgenommen. Das FTICR-MS wurde mit einer Mischung aus bekannten Proteinen unter Verwendung der monoisotopischen Massen der einfach protonierten Ionensignale der Proteine Bovine-Insulin (5730.609 Da), Bovine-Insulin B-chain, oxidiert (3494.651), humanes Neurotensin (1672.917 Da), humanes Angiotensin I (1296.685 Da), humanes Bradykinin (1060.569) und humanes Angiotensin II (1046.542

Da) extern kalibriert. Die Aufnahme und Auswertung der Massenspektren erfolgte mit Hilfe des Datenauswertesystems Xmass (Bruker-Daltonik, Bremen).

3.4.2.2. ESI-FTICR-MS

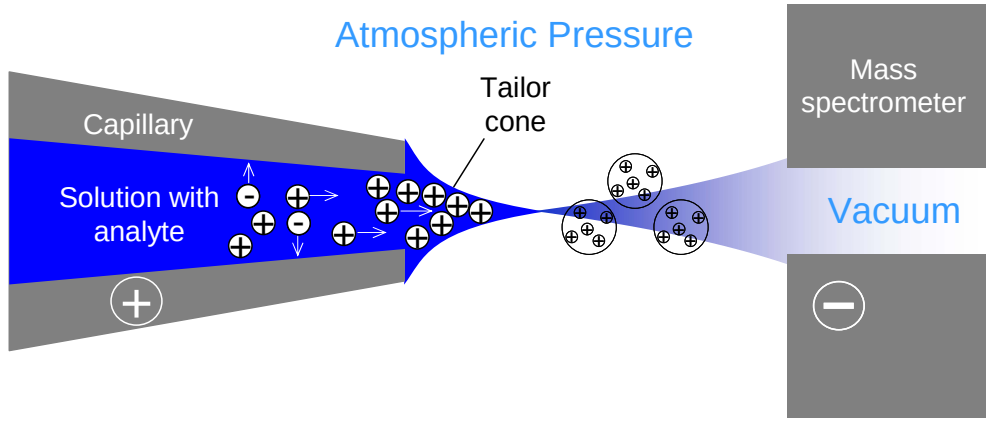
In der ESI-MS wird eine verdünnte Probenlösung mit einer kleinen Flussrate (1-20 µl/min) durch eine Kapillare gepumpt. Eine positive oder negative Hochspannung (1-4 kV) wird abhängig von der Analysenaufgabe an der Kapillare angelegt. Die angelegte Spannung liefert einen elektrischen Feldgradienten, der benötigt wird, um eine Ladungstrennung auf der Flüssigkeitsoberfläche zu erreichen. Als Ergebnis bildet sich am Kapillarenausgang ein so genannter „Taylor cone“. Erreicht die Lösung, die den „Taylor cone“ bildet, das Rayleigh-Limit (hierbei ist die Coloumb-Abstoßung der Oberflächenladung gleich der Oberflächenspannung der Lösung) [43, 44], können sich Tröpfchen mit einem Überschuss an positiver oder negativer Ladung vom „Taylor cone“ lösen. Diese Tröpfchen bilden meist mehrfach geladenen Analytmolekülionen und werden durch die Atmosphäre in Richtung zum Einlass des Massenspektrometers extrahiert.

Der Spaltungsmechanismus der Molekülionen infolge der Coloumb-Abstoßung lässt vermuten, dass durch den Ladungsanstieg während der Lösungsverdampfung größere Tröpfchen in kleinere geteilt werden, die auch aus nur einem Ion bestehen können.[45] Die Zunahme der Ladungsdichte lässt sich im Verdampfungsmechanismus möglicherweise durch die Verdampfung der Lösung erklären, wobei die Coulomb-Abstoßung die Oberflächenspannung der Flüssigkeit überwinden muss. Dadurch werden die Ionen aus der Tröpfchenoberfläche freigesetzt, die in das Massenspektrometer extrahiert werden.[46] Die gebildeten vor allem mehrfach geladenen Ionen werden anschließend nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) im Massenanalysator getrennt und detektiert.[47] In Abb. 88 ist der Elektrospray-Prozess schematisch dargestellt.

Die ESI-FTICR-MS Messungen wurden an einem Bruker APEX II FTICR-Massenspektrometer (Abb. 87b) ausgestattet mit einem 7T supraleitenden Magneten

(Magnex, Oxford, UK), einer zylindrischen unendlichen ICR-Analysatorzelle, einer APOLLO-Elektrosprayionenquelle und einer API1600 ESI-Kontrolleinheit durchgeführt. Die Proben wurden in einer Lösung aus 50% Methanol, 48% MilliQ-Wasser und 2% Essigsäure gelöst.

a)



b)

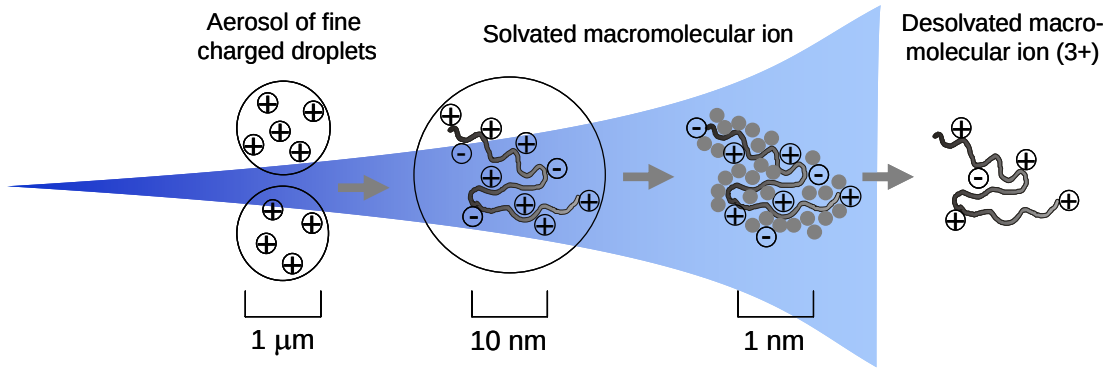


Abb. 88: Schematische Darstellung des Elektrospray-Prozesses: **(a)** Eine hoch positives (oder negatives) Potential ist an der Kapillare (Anode) angelegt, wodurch die sich positive Ionen in der Lösung zum Meniskus bewegen. Der Meniskus wird destabilisiert, ein Konus gebildet ("Taylor cone"), wobei ein feines Spray bestehend aus Tröpfchen mit positiver Ladung entsteht. **(b)** Gasphasen-Ionen werden von den geladenen Tröpfchen durch eine Serie von Lösungsverdampfungen gebildet – Coulomb-Spaltungszyklen

Die Probenlösung wurde durch eine PEEK-Kapillare zur Spraynadel unter Verwendung einer Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 2 µl/min gepresst. Eine Spannung von -4200 V (für positive Ionen) wurde zwischen dem metallüberzogenen Auslass der Glaskapillare und der geerdeten Spraynadel angelegt. Die Spannung, die an die Endkappe angelegt wurde, betrug -3800 V (für positive Ionen). Das dabei entstehende Spray wurde mittels eines Nebulizer-Gases (N_2) stabilisiert. Die Desolvatisierung der Probe wurde durch Verwendung eines Trocknungsgases (N_2), das auf 150˚C erhitzt wurde, erreicht. Vor jedem Messzyklus wurden die Quelle und die Analysenzelle für 50 ms gequencht. Die durch den ESI-Prozess gebildeten Ionen passieren die Glasskapillare und vom Ausgang der Glaskapillaren strömen die Ionen durch den ersten und zweiten Skimmer und gelangen dann in den Hexapolionenguide.

Das Declustering-Potential (ΔCS) als kleine Potentialdifferenz zwischen dem Kapillarausgang und dem ersten Skimmer betrug 60-70 V. Nach vorgegebener Akkumulationszeit im Hexapol (0.1-2 s) wurde die Spannung an der Extraktionsplatte umgekehrt und die Ionen für die Transmission in die ICR extrahiert. Einfangen, Anregen und Detektieren der Ionen in der Analysenzelle wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie bei MALDI-FTICR-MS. Die externe Massenkalibration wurde unter Verwendung der monoisotopischen Massen von Angiotensin I-Fragmentionen bei Fragmentierung in der Quelle (ΔCS = 150 V) erreicht.

NanoESI-FTICR-MS

Die Nanospray-Kapillaren wurden aus Borsilikatglaskapillaren des Typs GC120F-12 (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK) hergestellt, wobei die Kapillaren mit einem Microcapillary Puller P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) in zwei Schritten gezogen wurden. Die Parameter für den ersten Schritt waren: Heizen: 315, Zugkraft: 100, Zuggeschwindigkeit: 10, Abkühlzeit: 200; und für den zweiten Schritt: Heizen: 295, Zugkraft: 200, Geschwindigkeit: 30 und Abkühlzeit: 225. Die Nanospraykapillaren wurden mit einem Goldüberzug versehen, der mittels eines Polaron SC7610 Sputter-Coater (VG Microtech, Uckfield, UK) aufgetragen wurde.

Die Nanospraykapillare wurde mit 0,5-5 µl Probenlösung unter Verwendung einer GELoader-Spitze gefüllt. Die gefüllte Kapillare wurde in der Metallhalterung des x,y,z-Nanospraysystems befestigt und vor dem Glaskapillareneinlass des 7T Bruker Daltronik APEX II FTICR-Massenspektrometers platziert. Die Spannung, die an der Kapillarenspitze anlag, wurde manuell zwischen 700-1200 V eingestellt. Die Massenspektren wurden durch Aufnahme von 32-128 Einzelscans erhalten. Die experimentellen Parameter für die massenspektrometrischen Messungen waren: Spannung am Kapillarausgang (ΔCS): 45-70 V, Skimmer 1: 10, Skimmer 2: 7, RF-Amplitude: 500, Ionisierungspulszeit: 2500 ms, Ionisierungsverzögerungszeit: 0,001 s, Anregungspuls: 1,2 ms, Anregungsverminderung 1: 2,16dB.

Chip-ESI-FTICR-MS

Zur Minimierung des Probenvolumens wurde die Chip-ESI-FTICR-MS entwickelt. Die Herstellung der Mikrochips für die Chip-ESI-FTICR-MS (Abb. 89) wurde bereits in der Literatur beschrieben.[151, 79]

Im Wesentlichen wird eine 50 µm dünne Polyimidfolie (30 x 40 cm) von beiden Seiten mit einer 5 µm dünnen Kupferschicht bezogen und in einem Rahmen fixiert. Die Oberfläche wird mit einem Photolack beschichtet, der mit Standardverfahren belichtet und entwickelt wird. Die Kupferschicht wurde mit einer wässrigen $CuCl/H_2O_2$-Lösung geätzt und das Substrat in einem Niedrigdruckplasma (O_2/CF_4-Gasgemisch mit 80% O_2) behandelt. Die Polymeroberfläche wird isotrop bei einer Ablationsgeschwindigkeit von 1 bis 2 µm/min zu Kanälen geätzt, und auf die als Elektrode dienende Kupferschicht wird ein Goldbezug aufgetragen. Abschließend werden die Mikrokanäle mit einer 30 µm dünnen Polyethylen/Polyethylenterephthalat-Schicht versiegelt.

Das Chip-FTICR-Kopplungsinterface wurde in einem selbstgebauten Chip-Halter befestigt, der die Fixierung von bis zu fünf Chips ermöglicht und mit einer x, y, z-Feinjustierung zur Positionierung des Chips vor dem Kapillareingang der Ionenquelle ausgestattet ist. Dazu wurde der Standard-ESI-Ionenquellen-Einlass (Bruker Apex II, APOLLO) entfernt und die Chip-Halterung 1-2 mm vor dem Kapillareingang angebracht.

Die ESI-Spannung wird an den Chipkontakten oder mit einer Elektrode am Chip-Reservoir angelegt. Die FTICR-Massenspektren wurden mit einem 7T-Bruker-Daltronik-Apex-II-FTICR-Massenspektrometer mit einer APOLLO-Elektrospray/Nano-ESI-Quelle aufgenommen. Die Probenlösungen (0,5-5 µl, 0,0005-0.01 µg/ml) wurden in das Chip-Reservoir gegeben, der Chip auf dem Probenhalter fixiert und die Sprayspannung langsam auf die Arbeitsspannung (1000-2300 V) erhöht. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen in 4-32 Einzelscans aufgenommen: Ausgangsspannung der Kapillare 45-70 V, Skimmer 1 9,14 V, Skimmer 2 8,82 V, Ionisierungspuls 2500 ms, Ionisierungsverzögerung 1 ms, Anregungspuls 1,2 ms.

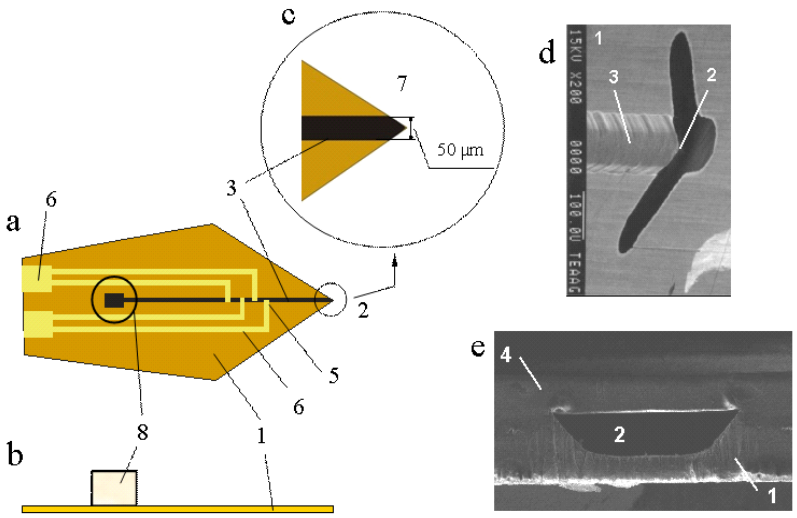


Abb. 89: Aufbau des Mikrochips: a) Aufsicht, b) Seitenansicht, c) vergrößerte Darstellung der Sprayöffnung, d, e) rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Mikrokanalstruktur (Seitenansicht und Aufsicht):1) Trägermaterial Polyimid, 2) ESI-Sprayöffnung, 3) Mikrokanal, 5) Goldelektrode, 6) Elektrodenkontakte, 7) Dimension der Sprayöffnung, 8) Flüssigkeitsreservoir für die Probenlösung

Entsalzung auf dem Chip

Der Prozess der Entsalzung funktioniert durch Adsorption der Peptide an einer Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF).[152] Die PVDF-Membran (Immobilon™-P von

Millipore, Bedford, MA, USA) wurde in Stücke mit 5mm Durchmesser geschnitten, die in das Mikrochipreservoir passen, und dann mit MilliQ-Wasser gewaschen. Die Probenlösung wurde durch die Membran mit einer Flussrate von 0,5-5 µl/min gepumpt, wobei die Peptide an der Membran adsorbiert und die Salze mit MilliQ-Wasser bei der gleichen Flussrate wie im Adsorptionsschritt ausgewaschen werden. Die Peptide wurden dann mit einer Lösung aus Methanol/MilliQ-Wasser/Essigsäure im Verhältnis 50:48:2 (v/v/v) von der Membran eluiert und im Massenspektrometer analysiert.

3.4.2.3. FTICR-MS/MS-Analyse

Die durch Ionisierung gebildete Ionen (mit MALDI- oder ESI-Ionisierungsmethoden), die nach der Isolation des Precursor-Ions durch Entfernen aller anderen Ionen mit größerer oder kleiner Masse in der Analysatorzelle gefangen werden, können durch verschiedene Methoden fragmentiert werden. Die Isolation des Precursor-Ions erfolgt mittels geeigneter Anregungspulse mit entsprechenden Frequenzen und Amplituden.

Für SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-induced Dissociation) wurde eine niedrige Amplitude der rf-Anregung für 250 ms an das Precursor-Ion bei einer Frequenz, die leicht außerhalb der Resonanz der Zyklotronenfrequenz lag (500-1000 Hz), angelegt. Die Amplitudenanregung wurde so niedrig gehalten, dass das Ion sich nicht weit vom Zentrum der Zelle entfernen konnte. Während der Anregung wurde der Druck in der Analysenzelle (10^8 mbar) durch Zugabe eines Kollisionsgases (Argon) durch ein gepulstes Ventil für 20-80 ms erhöht. Unter diesen Bedingungen erfährt das Precursor-Ion viele Niedrigenergiezusammenstöße, welche das Ion langsam anregen bis es die Dissoziationsschwelle erreicht.

Für IRMPD-Experimente (IRMPD - Infrared Multiphoton Photodissociation) wurden die massenselektierten Ionen unter Verwendung eines 25 W CO_2-Lasers mit kontinuierlicher Wellenlänge (10,6 mm, Synard, Mukilteo, WA, USA) photodissoziiert

3.4.3. Identifizierung von Proteinen durch Datenbanksuche

Zur Identifizierung der Proteine bzw. Peptidgemische wurden verschiedene Datenbanken, wie z.B. Mascot (http://www.matrixscience.com) von Matrix Science Ltd., London (Abb. 90) oder ProFound von den Rockefeller und New York Universitäten (http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe), verwendet.

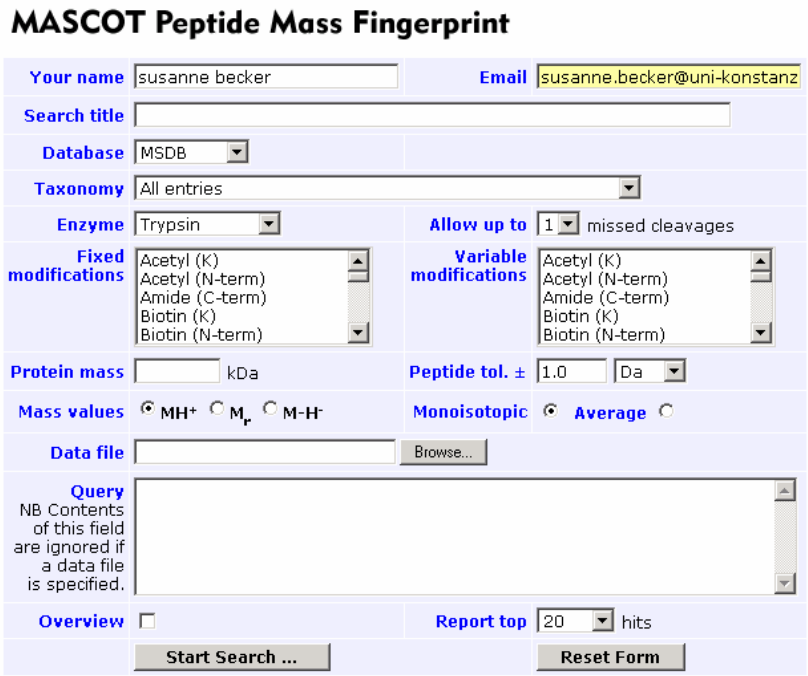


Abb. 90: Mascot-Datenbank für die Identifizierung von Peptidgemischen, Proteinen und posttranslationalen Modifikationen

Die Daten, erhalten mittels FTICR-MS, wurden in diese Datenbanken zusammen mit den möglichen Modifikation (z.B.: Phosphorylierungen, Oxidierung) und dem Ursprung (z.B.: Homo sapiens, Mus muskulus) der jeweiligen Probe eingegeben. Aus einer Vielzahl möglicher Identifizierung wurde das Protein mit dem höchsten „High score“ (mindestens 60 bei Mascot) ausgewählt.

Zur Berechnung der theoretischen Werte für den tryptischen Abbau von Proteinen und der MS/MS-Fragmente der tryptischen Peptide des Tau Proteins wurde die Software GPMAW 6.2 eingesetzt.

3.5. Phosphorylierungsreaktionen von synthetischen Peptiden und Dephosphorylierungsreaktionen von Tau Protein

3.5.1. Phosphorylierung von synthetischen Peptiden durch Kinasen

Die Phosphorylierungsreaktionen der synthetischen Peptide des Tau Proteins wurden drei verschiedene Kinasen, Cdc2 (cyclin-abhängige Proteinkinase), GSK3 (glycogen-synthase Kinase) und PKA (cAMP-abhänginge Proteinkinase) eingesetzt. Für die Phosphorylierungsreaktionen wurden die synthetischen Peptide des Tau Proteins in den jeweiligen Puffersystemen (Cdc2-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM EGTA, 0.01 % Brij 35, pH 7.5; GSK3-Puffer: 20 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM Dithiothreitol, pH 7.5; PKA-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.5) gelöst. Zu den in den jeweiligen Puffern gelösten Peptiden wurden eine Lösung von 200 µM ATP in MilliQ-Wasser und die entsprechende Kinase (1 Unit von der jeweiligen Kinase kann 1 pmol an Modellpeptid mit einer Phosphorylierungsstelle phosphorylieren) zugegeben. Die Reaktionen, die bei 30˚C durchgeführt wurden, wurden jeweils nach 15, 30, 60, 90 und 120 min gestoppt, indem ein Teil der Reaktionslösung entnommen wurde und auf 65˚C erhitzt wurde. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte massenspektrometrisch analysiert und die Messergebnisse ausgewertet. Die massenspektrometrischen Charakterisierungen der Reaktionsprodukte sind in Kap. 2.1.2.2.2. dargestellt.

3.5.2. Dephosphorylierung von Tau Protein mittels Phosphatasen

Für die Dephosphorylierung von Tau Protein wurden zwei verschiedenen Phosphatasen: Alkaline Phosphatase und λ-Phosphatase verwendet. Jeweils 5-10 µg Tau Protein wurde für die Reaktion mit Alkaline Phosphatase in NEBuffer (100 mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1mM DTT, pH 7.9) und für die Reaktion mit λ-Phosphatase in λ-PPase-

Puffer (50mM Tris-HCl, 0.1 mM Na_2EDTA, 5 mM DTT, 0.01% Brij 35, pH 7.5) gelöst. Die Dephosphorylierung mit Alkaline Phosphatase wurde bei 37˚C in 60 min durchgeführt. Die Reaktion mit λ-Phosphatase erfolgte bei 30˚C für 120 min. Anschließend wurden die Reaktionsgemische auf ein 1D-Gel aufgetragen (siehe Kap. 3.3.1). Als Vergleich wurde in eine weitere Sammelgelkammer 5-10 µg des Eduktes (Tau Protein) aufgetragen. Das Gel wurde unter den Bedingungen, wie in Kap. 3.3.1 beschrieben, laufen gelassen. Die massenspektrometrischen Charakterisierungen der Reaktionsprodukte im Vergleich zum phosphorylierten Tau Protein ist in Kap. 2.1.2. dargestellt.

3.6. Massenspektrometrische Methoden zur Bestimmung der Element-konzentrationen in Proteinen und Peptidgemischen

3.6.1. Bestimmung von Phosphor- und Metallionenkonzentrationen in Proteinen mit ICP-MS

Die Messungen mit ICP-MS und LA-ICP-MS wurden von Herrn Dr. Myroslav Zoriy und Frau Dr. Carola Pickhardt in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. habil. J. Sabine Becker in der Zentralabteilung für chemische Analysen am FZ Jülich durchgeführt.

Die Bestimmung der Phosphor-, Schwefel- und Metallionenkonzentrationen in kleinen Volumina von Proteinlösungen wurden nach einem tryptischen Abbau, der mittels 2D-Gelelektrophorese getrennten und selektierten Proteinspots, mit einem doppelfokussierendem Sektorfeld-ICP-Massenspektrometer (ICP-SFMS, ELEMENT, Thermo Electron, Bremen) durchgeführt.[164] Die experimentelle Anordnung des in Arbeit verwendeten eines Sektorfeld- ICP-MS ist in Abb. 91 dargestellt

Bei allen massenspektrometrischen Analysen mit ICP-MS wurden die verdünnten Proteinlösungen, über ein geeignetes Probeneinlasssystem unter Verwendung eines MicroMist Zerstäubers mit einer Minizyklon-Sprühkammer zerstäubt. Das gebildete Aerosol wurde mit Argon in die induktiv gekoppelte Plasmaionenquelle transportiert, in

der eine Desolvatisierung, Atomisierung und Ionisierung (bei einer Plasmatemperatur von ca. 8000 K) stattfand.

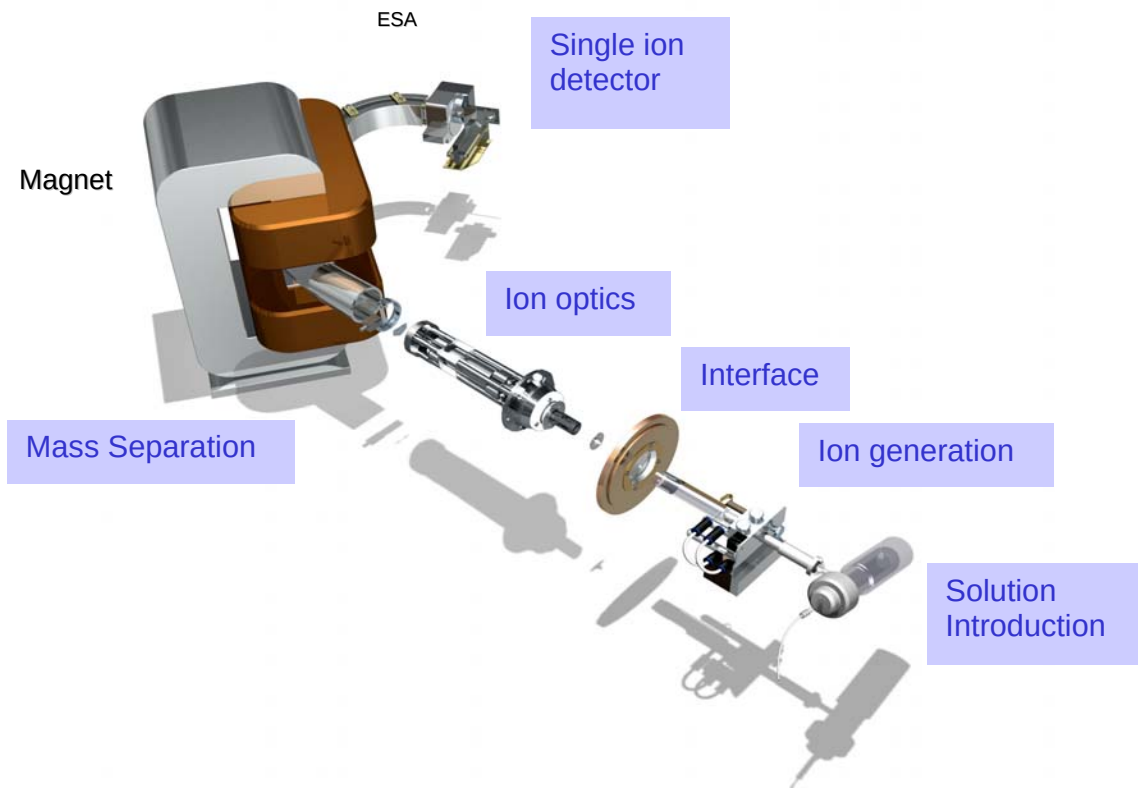


Abb. 91: Instrumenteller Aufbau eines induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometers (ELEMENT, Thermo Electron, Bremen)[171]

Die im induktiv gekoppelten Plasma erzeugten Ionen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 8 kV in das doppelfokussierenden Massenspektrometer mit umgekehrter Nier-Johnson-Geometrie extrahiert, in dem die Ionen nach dem Masse-/Ladungsverhältnis und dem Energie-/Ladungsverhältnis getrennt wurden. Die getrennten Ionenströme wurden mit einem Einfachauffänger (SEM-Sekundärelektronenvervielfacher) registriert. Um störende Interferenzen der Analytionen ($^{31}P^+$, $^{63}Cu^+$, $^{56}Fe^+$ und $^{64}Zn^+$) mit den isobaren Molekülionen (z.B. $^{15}N^{16}O^+$,$^{14}N^{16}OH^+$ bei m/z = 31 oder $^{40}Ar^{16}O^+$ bei m/z = 56) aufzulösen, wurden alle massenspektrometrischen Messungen bei einem Massenauflösungsvermögen $m/\Delta m = 4400$ durchgeführt. Die optimierten experimentellen Parameter der P-, S- und Metallionen-

Konzentrationsbestimmung mittels ICP-MS wurden in der Tabelle 30 zusammengefasst. Ergänzende ICP-MS-Messungen wurden mit Quadrupol-Massenspektrometer mit Stoßzelle (ICP-CC-QMS) durchgeführt. Dabei wurde die P-Bestimmung in Proteinlösungen über das in der Stosszelle gebildeten Oxidion $^{31}P^{16}O^{+}$ bei m/z = 47 durchgeführt.[172] Die Nachweisgrenze für die Phosphorbestimmung mit ICP-CC-QMS in einer wässrigen Proteinlösung betrugt 1300 pg/ml und war damit um den Faktor 65 schlechter wenn als mit ICP-SFMS (20 pg/ml) gemessen wurde. Deshalb wurden alle Messungen mit ICP-SFMS durchgeführt.

Tabelle 30: Optimierte experimentellen Parameter [164]

ICP-MS	ICP-SFMS
Zerstäuber	Mikrokonzentrischer Zerstäuber
RF Leistung, W	1150
Kühlgasflussrate, $l \cdot min^{-1}$	18.0
Hilfsgasflussrate, $l \cdot min^{-1}$	1.07
Zerstäubergasflussrate, $l \cdot min^{-1}$	0.98
Flussrate der Analytlösung, $ml \cdot min^{-1}$	0.1
Potential der Extraktionslinse, V	2000
Mass resolution, ($m/\Delta m$)	4000

* H_2 wurde als Stossgas für die Fe- und Zn-Bestimmung, während O_2 für die P und S Analysen verwendet wurde.

3.6.2. LA-ICP-MS zur Analyse von Proteinen mit P, S, Zn, Cu, Fe, Al und Si in Gelen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen an den 1D- und 2D-Gelen mittels LA-ICP-MS erfolgten unter Verwendung von zwei kommerziell erhältlichen Laserablationssystemen (CETAC LSX 200, Cetac Technologies, Omaha, NE, USA bzw. Ablascop, Bioptic, Berlin) in Kombination mit dem ICP-SFMS ELEMENT (Thermo Electron, Bremen) mit induktiv gekoppelter Plasmaionisation. Der experimentelle Aufbau der LA-ICP-MS unter Verwendung des Laserablationssystems Ablascop (Biooptic GmbH, Berlin, Deutschland) ist in Abb. 92 dargestellt.

Die laserinduzierte Verdampfung des Probenmaterials erfolgte mit einer Laserstrahlung der UV-Wellenlänge (λ = 266 nm bzw. 213 nm) eines frequenzvervier- oder verfünffachten Nd-YAG-Lasers. Die Gelproben wurden vor dem Experiment getrocknet und anschließend die ausgeschnittenen Bereiche auf einen Probenhalter aus Aluminium aufgebracht und in einer gekühlten Laserablationskammer direkt ablatiert.[173] Die Temperatur der Laserablationskammer betrug während der Messungen -10˚C.

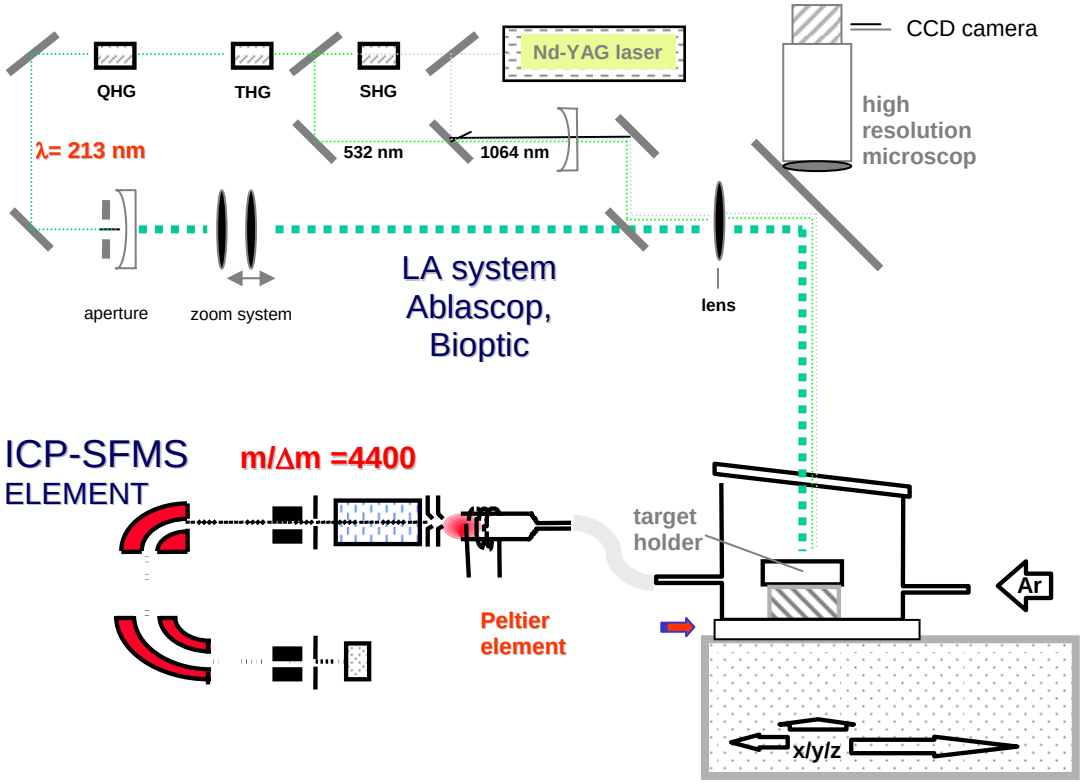


Abb. 92: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus des in dieser Arbeit verwendeten Laserablations-ICP-MS unter Verwendung eines Sektorfeld-Massenspektrometers (ELEMENT, Thermo Electron) in Kombination mit dem Laserablationssytems Ablascop (Bioptic)

Bei der LA-ICP-MS wird in der Laserablationskammer das mit Hilfe des fokussierten Laserstrahles abgetragene Probenmaterial mit einem Transportgas (meist hochreines Argon) in die induktiv gekoppelte Plasmaionenquelle eines ICP-MS transportiert. Für die Bestimmung von P, S und Metallionenkonzentrationen in Proteinspots ist insbesondere

die Verwendung des Sektorfeld-Massenspektrometers vorteilhaft, da die meisten auftretenden isobare Interferenzen der Analytionen mit störenden Molekülionen bei einem Massenauflösungsvermögen von m/Δm ~ 4000 aufgelöst werden können. Während die Laserablation der Proteinspots und Ionisation des ablatierten Materials unter Normaldruck stattfindet, erfolgen die Trennung und der Nachweis der Ionenströme im Vakuum des Massenspektrometers. Die im Massenspektrometer nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennten Ionenbündel werden darauf folgend mit einem ionenempfindlichen Nachweissystem registriert. Die optimierten experimentellen Bedingungen der LA-ICP-MS unter Verwendung des Ablascops sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tabelle 31: Optimierte experimentelle Parameter der LA-ICP-MS

ICP-MS		Laser Ablation	
RF power	1200	Laser ablation system	Ablascope
Cooling gas flow rate	18 l/min	Wavelength	213 nm
Auxiliary gas flow rate	1 l/min	Laser power density	$3 \cdot 10^9$ W/cm^2
Nebulizer (carrier) gas flow rate	1,2 l/min	Laser energy per pulse	6 mJ
Mass resolution (m/Δm)	4400	Repetition frequency	20 Hz
Number of runs (pass)	150 (1)	Spot diameter	50 µm
Analysis time per shot	90s		

3.7. Verwendung angereicherter stabiler Isotope von Cu, Zn und Fe an Tau Protein und an Gehirnproteinproben

Um die Bildung von Cu-, Zn- und Fe-enthaltenen Proteinen in Gehirnproben zu studieren, wurden hoch angereicherte stabile Isotope zu den 1D- oder 2D-Gelen zudotiert. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden bei den Tracerstudien in allen Experimenten die gleiche Probe (Alzheimergehirnproteine) und die gleiche Menge an Probe verwendet.

Es wurden jeweils zwei identische Gele erstellt, eins für die Bestimmung der Elementkonzentrationen mittels LA-ICP-MS und das zweite Gel zur Proteinidentifizierung mittels MALDI-FTICR-MS. Die Zugabe der Tracer erfolgte entweder zum Zell-Lysat vor der Acetonpräzipitation oder zum 2D-Gel vor der Silberfärbung.

In Tabelle 32 sind die Zusammensetzungen der 6 verwendeten Tracerlösungen zusammengefasst. Die Tracerlösungen 3 und 4 wurden zu je 400 µl Zell-Lysat zugegeben und 12h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte die in Kap. 3.2.2 beschriebene Acetonpräzipitation und die in Kap. 3.3.2 gezeigte 2D-Gelelektrophorese. Die Zugabe der Tracerlösungen 1, 2, 5 und 6 erfolgte nach der 2D-Gelelektrophorese nach kurzem Waschen des Gels mit MilliQ-Wasser für ca. 5 min. Die beiden identischen Gele wurden bei Raumtemperatur für 12h in der in MilliQ-Wasser verdünnten Tracerlösung geschüttelt. Die Gele wurden dann mittels Silberfärbung angefärbt.

Die Experimente 1 bis 5 mit angereicherten stabilen Isotopen (Tabelle 32), die eine zu geringe oder zu hohe Konzentration an Isotopen aufwiesen, wurden nur einmal durchgeführt. Die Experimente 5 und 6 (Tabelle 32) wurden zweimal wiederholt. Während eine Serie von 1D-/2D-Gelen für LA-ICP-MS Messungen an Phosphat- und Metallionen-haltigen Proteinen eingesetzt wurde, wurden analoge Gele für die Identifizierung getrennter Proteinspots mittels MALDI-FTICR-MS verwendet.

Tabelle 32: Zusammensetzung der Tracerlösung, Zugabe zum Zellysat mit anschließender 2D-Gelelektrophorese bzw. Zugabe zum 2D-Gel nach der Gelelektrophorese vor der Färbung

Lösungen	Eingesetzte Isotope	Isotopenhäufigkeit der angereicherten Tracer [%]	Konzentration der Tracer [ng/g]	Isotopenhäufigkeit in der Natur [%]
1	^{235}U	50	0,075	0,72
	Th_{nat}	-	0,25	100
2	$^{54}Fe_2O_3$	89,2	105	5,8
	^{67}ZnO	39,8	112,5	4,1
	^{65}Cu	96,4	112,5	30,8
3	^{204}Pb	51	$1{,}53 \cdot 10^4$	1,4
	^{235}U	50	$3{,}4 \cdot 10^3$	0,72
	^{65}Cu	89,2	570	30,8
	^{58}Ni	99,87	$1{,}83 \cdot 10^4$	67,8
4	^{235}U	50	20	0,72
	Th_{nat}	-	200	100
5	^{235}U	50	4,3	0,72
	Th_{nat}	-	43	100
6	$^{54}Fe_2O_3$	89,2	$1{,}4 \cdot 10^3$	5,8
	^{67}ZnO	39,8	$1{,}17 \cdot 10^4$	4,1
	^{65}Cu	96,4	$9{,}3 \cdot 10^3$	30,8
7	^{67}ZnO	39,8	$1{,}17 \cdot 10^4$	4,1
	^{65}Cu	96,4	$9{,}3 \cdot 10^3$	30,8

3.8. Materialien und Reagenzien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Materialien und Reagenzien eingesetzt:

Aceton p.a., Ethanol p.a., Acetonitril (ACN), Agar, Glycin, Glycerin, Harnstoff, Thioharnstoff, Trizma Base, Natriumlaurylsulfat (SDS), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ammoniumhydrogencarbonat, Trichloressigsäure (TCA), Trifluoressigsäure (TFA), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Tweed-20 (Fluka, München, Deutschland)

Adenosintriphosphat (ATP), Bromphenolblau, Commassie Brilliant Blau G250, DHB, HCCA, EDTA, PMSF, Pepstatin, Chymostatin, Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Tau Protein (Sigma, München, Deutschland)

Acrylamid-BIS, CHAPS, Dithiothreitol (DTT) (Genaxxon Bioscience, Stuttgart, Deutschland)

IPG Strips 3-10 / 4-7 (BioRad, München, Deutschland)

Kinasen (GSK3, GSK3-Buffer, CDC2, PKA), Phosphatasen (Alkaline Phosphatase, NEBuffer, λ-Phosphatase, λ-PPaseBuffer) (New England BioLabs, Beverly, Massachusetts, USA)

NovaSyn®TGR-Harz, PyBOP, Aminosäuren (Novabiochem, Darmstadt, Deutschland)

Servalyt 3-10 / 4-7 (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Trypsin (Progema Cooperation, Madison, USA)

Humane Gehirnproben (Professor Dr. Gabor Juhacz, Professor Dr. Miklos Palkovits (Labor für Neuromorphologie, Institut für Anatomie, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn))

1D-, 2D-Gele und Westernblotts von Mitochondrien Proteinen aus Bäckerhefe (Dr. U. Krause-Buchholz, Professor Dr. G. Rödel (Institut für Genetik, TU Dresden)). Alle 1D- und 2D-Gele und Westernblotts wurden im Institut für Genetik an der TU-Dresden von Herrn Dr. U. Krause-Buchholz im Arbeitskreis Herrn Professor Dr. G. Rödel hergestellt.

Die Messungen mit ICP-MS und LA-ICP-MS wurden von Herrn Dr. Myroslav Zoriy und Frau Dr. Carola Pickhardt in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. habil. J. Sabine Becker in der Zentralabteilung für chemische Analysen am FZ Jülich durchgeführt.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit hochauflösender Biopolymer-Massenspektrometrie das Tau Protein und dessen Modifikationen, vor allem Phosphorylierungen, primär untersucht. Die Identifizierung und Charakterisierung des Tau Proteins wurde unter Verwendung der FTICR-MS in Kombination mit beiden „Softionisationsmethoden“ MALDI und ESI durchgeführt. Es konnten mittels MALDI-, Chip-ESI-FTICR-MS und Chip-ESI-FTICR-MS mit der direkten Entsalzung der Probe auf dem Chip 33 Phosphorylierungsstellen im normalen Tau Protein identifiziert werden. Nur ein Teil der Phosphorylierungsstellen war bis dahin in der Literatur bekannt. Ohne weitere Aufbereitung der Probe konnten phosphorylierte Peptide dem Tau Protein zugeordnet werden. Unter den phosphorylierten Peptiden wurden nicht nur einfach phosphorylierte sondern auch multiphosphorylierte Domäne nachgewiesen. Das Verhalten des Tau Proteins gegenüber unterschiedlichen Phosphatasen wurde über verschiedene Dephosphorylierungsreaktionen systematisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine vollständige Dephosphorylierung des Tau Proteins mit den beiden eingesetzten Phosphatasen nicht erreicht werden konnte. Über die durchgeführten Experimente wurde jedoch nachgewiesen, dass ein Teil der phosphorylierten Peptide dephosphoryliert wurde. Durch MS/MS-Fragmentierung der synthetischen Partial-Peptide des Tau Proteins gelang eine detailliertere Aufklärung des Tau Proteins. Die synthetisierten, nicht-phosphorylierten Tau Peptide wurden in Phosphorylierungsreaktionen unter Verwendung von verschiedenen Kinasen eingesetzt. Über eine massenspektrometrische Analyse der Tau Peptide mittels MALDI-TOF-MS konnten Rückschlüsse auf das Phosphorylierungsverhalten des Tau Proteins gezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuartige Kombination von biomolekularer und anorganischer Massenspektrometrie mittels FTICR-MS und LA-ICP-MS bzw. ICP-MS entwickelt, die eine Charakterisierung von Modifikationen, die z. B. Untersuchungen zur Phosphorylierung und Bindung von Metallen in Proteinen erlaubt. Zusätzlich zur Bestimmung der Konzentration von Phosphor und des Phosphorylierungsgrades wurden deshalb auch die Metallionenkonzentrationen in einzelnen Proteinen und in

verschiedenen Proteingemischen nach deren Trennung mittels 2D-Gelelektrophorese quantitativ bestimmt und die möglichen Modifikationen der Proteine mittels FTICR-MS untersucht. Neben der Phosphorbestimmung in Proteinlösungen lassen sich mit ICP-MS auch die Konzentrationen von Metallionen schnell und mit hoher Richtigkeit und niedrigen Nachweisgrenzen erhalten. Von besonderer Bedeutung ist das entwickelte Analysenverfahren zur Bestimmung von Nichtmetallen und Metallen in getrennten Proteinspots in 2D-Gelen mittels LA-ICP-MS. Tiefenprofile von Phosphor und Schwefel in ausgewählten Proteinspots in einem 2D-Gel mit LA-ICP-MS ergaben eine Abnahme der Ionenintensitäten von P^+ und auch von S^+ mit zunehmender Tiefe, wobei das P^+/S^+-Ionenintensitätsverhältnis konstant war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die sich getrennten Proteinspots in den untersuchten Gelen auf der Geloberfläche befanden.

Durch Kombination von Molekül- und Element-Proteomanalytik wurden mitochondriale Proteine aus der Bäckerhefe bezüglich der P und Metallionen-haltigen Proteinen untersucht. Eine Identizierung der einzelnen Proteine mittels FTICR-MS wurde dadurch erleichtert, dass alle Proteine dieses Systems bekannt und in den verwendeten Datenbanken bereits enthalten sind. Auch hier sollen die Konzentrationen von P und Metallen in mitochondrialen Proteinen von Bäckerhefe bestimmt und posttranslationale Modifikationen identifiziert werden. Bei den Experimenten wurde gefunden, dass die LA-ICP-MS im Vergleich mit den bekannten Nachweismethoden für phosphorylierte Proteinen eine wesentlich höhere Empfindlichkeit besitzt und eine zuverlässige quantitative Bestimmung von Phosphor und zusätzlich von Metallionen quasi-simultan erlaubt. Somit gelang es erstmalig, in ausgewählten, mitochondrialen Proteinspots neben Phosphor auch Metallenkonzentrationen quantitativ zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil der LA-ICP-MS ist es, zahlreiche Proteinspots in einem 2D-Gel bezüglich der Existenz von Phosphat und Metallionen zu untersuchen: die Analyse von ca. 100 Proteinspots wurde in relativ kurzer Zeit (in wenigen Stunden) durchgeführt.

Nach der Methodenentwicklung der LA-ICP-MS und FTICR-MS am mitochondrialen Modellsystem wurde diese Methodenkombination auch bei 2D-Gelen, die aus verschiedenen Gehirnproben (Alzheimergehirnproben und normalen Humangehirnproben

aus unterschiedlichen Regionen des Gehirns) erstellt wurden, angewandt. Wiederum sollte hierbei an getrennten Proteinspots in 2D-Gelen dieser Gehirnproben die Konzentrationen von Phosphor und verschiedenen Metallen ermittelt werden und gezielt nach Modifikationen in den einzelnen Proteinen gesucht werden. Es lässt sich vermuten, dass viele der Metalle, die in der Leber und den Nieren akkumuliert sind, mit der Zeit auch im Gehirn ablagert werden. Zum Nachweis von Phosphat- und Metallionen-haltigen Proteinen in einer humanen Gehirnprobe wurden Proteingemische mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt. 14 ausgeschnittene Gelstücke wurden mit LA-ICP-MS untersucht. In diesen ausgewählten Bereichen des 2D-Gels wurden 176 Proteinspots mittels LA-ICP-MS analysiert. Ein Teil der Proteinspots, in denen Phosphor und Metalle nachgewiesen wurden, wurden aus einem zweiten analogen Gel ausgeschnitten und nach einem tryptischem Abbau mittels MALDI-FTICR-MS analysiert und durch Suche in Protein-Datenbanken identifiziert. In einem weiteren, vergleichbaren Experiment wurden Proteine in einer Alzheimer Gehirnprobe nach dem Aufschluss der Zellen mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt. Es wurden simultan mit LA-ICP-MS in den untersuchten Proteinspots P, Al, Si, Cu und Zn analysiert und einzelne Proteine identifiziert. Mittels der neuartigen Methodenkombination von FTICR-MS und LA-ICP-MS ließ sich nachweisen, dass einige Metallbindungen stabil genug sind, die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE zu überstehen. Um diese Annahme zu untermauern, wurden gezielter Tracerexperimente an Alzheimergehirnproben durchgeführt. Aus den Experimenten konnte geschlossen werden, dass die LA-ICP-MS als element-massenspektrometrische Methode sich hervorragend für neuartige Aufgabenstellungen in der Proteinforschung eignet.

Mit Hilfe gezielter Tracerexperimente an Alzheimergehirnproteinen wurde durch Zugabe stabiler angereicherter Isotopentracer (^{65}Cu, ^{67}Zn und ^{54}Fe) vor und nach der Trennung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht, ob die Metallionenbindungen an einzelnen Proteinen auch während der Gelelektrophorese stabil sind, aufgebrochen werden oder neuartige Metallionen-haltige Proteine gebildet werden. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Proteine, in denen natürliche Isotopenhäufigkeitsverteilungen von Cu, Zn und/oder Fe nach den Tracerexperimenten nachgewiesen wurden, stabil

genug sind, um die reduzierenden Bedingungen während der Gelelektrophorese zu überleben. Andererseits wurde über Proteine mit geänderten Isotopenverhältnissen von Metallen ($^{54}Fe/^{56}Fe$) im Vergleich zu den Isotopenverhältnissen in der Natur eine Akkumulation der angereicherten Isotopentracer in Metallionen-haltigen Proteinen nachgewiesen. Dies könnte z.B. durch Isotopenaustauschreaktionen oder die Bildung von neuen Metallionen-haltigen Proteinen während der Tracerexperimente in den 2D-Gelen verursacht werden. Tracerexperimente mit stabilen angereicherten Isotopen-Tracerlösungen wurden auch an dem ausgewählten Modellprotein (Tau Protein), das durch 1D-Gelelektrophorese getrennt wurde, durchgeführt. Damit konnten die Proteine in den Banden 1-4 als Splice isoform PNS-Tau und das Protein in Bande 5 als Splice isoform Tau-F identifiziert werden. Durch LA-ICP-MS konnte in den Banden 2-5 eine Anreicherung an ^{65}Cu gegenüber der natürlichen Verteilung nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass das Tau Protein in der Lage ist, Kupferionen zu binden.

Mit der entwickelten neuartigen Kombination von biomolekularer und anorganischer Massenspektrometrie von FTICR-MS und LA-ICP-MS ist es nunmehr möglich, nicht nur Phosphat und Metallionen in Proteinen zu detektieren, sondern es können neben der Elementkonzentrationsbestimmung und Proteinidentifizierung posttranslationale Modifikationen der Proteine studiert werden.

5. LITERATUR

1. http://de.wikipedia.org/wiki/Proteom.
2. A. Schrattenholz, *Methoden der Proteomforschung: Molekulare Analyse der Proteinexpression*. **2001**, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin.
3. B. Bjellqvist, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1982**, *6*, 317.
4. A. Goerg, W. Postel, S. Gunther, *Electrophoresis* **1988**, *9*, 531.
5. B. Bjellqvist, J. C. Sanchez, C. Pasquali, F. Ravier, N. Paquet, S. Frutiger, G. J. Hughes, D. F. Hochstrasser, *Electrophoresis* **1993**, *14*, 1375.
6. T. Rabilloud, C. Valette, J. J. Lawrence, *Electrophoresis* **1994**, *15*, 1552.
7. J. C. Sanchez, V. Rouge, M. Pisteur, F. Ravier, L. Tonella, M. Moosmayer, M. R. Wilkins, D. F. Hochstrasser, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 324.
8. V. Neuhoff, N. Arnold, D. Taube, W. Ehrhardt, *Electrophoresis* **1988**, *9*, 255.
9. A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850.
10. R. Cornelis, *In Search of Accuracy in Elemental Speciation Analysis*, in *Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*, **2004**, Ft. Lauderdale, Florida, USA.
11. A. Bairoch, *Proteom Research: New Frontiers in Functional Genomics (ed. M. R. Wilkins, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser)*. **1997**, Springer: Berlin, Germany.
12. A. Bairoch, R. Apweiler, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 45.
13. J. R. Yates, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 893.
14. W. Zhang, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2482.
15. H. Zhu, M. Bilgin, M. Snyder, *Ann. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 783.
16. B. Kuster, M. Mann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *8*, 393.
17. M. Mann, O. N. Jensen, *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 255.
18. J. Klose, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 643.
19. J. Szpunar, *Analyst* **2005**, *130 (4)*, 442.
20. G. Jiang, Z. Gong, X.-F. Li, W. R. Cullen, X. C. Le, *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 873.
21. A. Prange, D. Schaumloeffel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 441.
22. C. S. Muniz, J. M. Marchante-Gayon, J. I. G. Alonso, M. R. F. d. l. Campa, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, *16*, 587.

23. P. Giusti, D. Schaumloeffel, H. Preud'homme, J. Szpunar, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, *21 (1)*, 26.
24. M. Kotrebai, J. F. Tyson, E. Block, P. C. Uden, *J. Chromatogr.* **2000**, *A 866*, 51.
25. A. Polatajko, M. Sliwka-Kaszynska, M. Dernovics, R. Ruzik, J. R. Encinar, J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 114.
26. J. Ruiz Encinar, D. Schaumloeffel, Y. Ogra, R. Lobinski, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6635.
27. S. J. Lippard, J. M. Berg, *Bioanorganische Chemie*. **1995**, Elsevier - Spektrum Akademischer Verlag.
28. A. L. Phinney, B. Drisaldi, S. D. Schmidt, S. Lugowski, V. Coronado, Y. Liang, P. Horne, J. Yang, J. Sekoulidis, J. Coomaraswamy, M. A. Chishti, D. W. Cox, P. M. Mathews, R. A. Nixon, G. A. Carlson, P. S. George-Hyslop, D. Westaway, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100 (24)*, 14193–14198.
29. J. Szpunar, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 54.
30. W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*. Vol. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. **1995**, B. G. Teubner: Stuttgart.
31. L. A. Finney, T. V. Halloran, *Science* **2003**, *300*, 931.
32. R. J. P. Williams, *J. Chem. Soc.* **1991**, *Dalton Trans.*, 539.
33. R. J. P. Williams, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216–217*, 583–595.
34. C. E. Outten, T. V. O'Halloran, *Science* **2001**, *292*, 2488.
35. Y. Bai, D. Galetskiy, E. Damoc, C. Paschen, Z. Liu, M. Griese, S. Liu, M. Przybylski, *Proteomics* **2004**, *4*, 2300.
36. E. Damoc, N. Youhnovski, D. Crettaz, J. D. Tissot, M. Przybylski, *Proteomics* **2003**, *3*, 1425.
37. F. Lottspeich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2476.
38. M. Macht, A. Marquardt, S. O. Deininger, E. Damoc, M. Kohlmann, M. Przybylski, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1102.
39. M. Przybylski, W. Weinmann, T. Fligge, *Mass Spectrometry, In: Handbook of Spectroscopy*, ed. G. Gauglitz. **2003**, Wiley-VCH: Weinheim.
40. M. O. Glocker, S. H. Bauer, J. Kast, J. Volz, M. Przybylski, *J Mass Spectrom.* **1996**, *31 (11)*, 1221.

41. M. Przybylski, M. O. Glocker, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 878.
42. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, *Science* **1989**, *246*, 46.
43. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. F. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 37.
44. D. C. Taflin, T. L. Ward, E. J. Davis, *Langmuir* **1989**, *5*, 376.
45. M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240.
46. J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287.
47. N. B. Cech, C. G. Enke, *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 362.
48. F. Hillenkamp, M. Karas, *Method. Enzymol.* **1990**, *193*, 280.
49. F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1193A.
50. M. Karas, *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 897.
51. M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299.
52. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yashida, *Rapid Commun. Mass Spectr.* **1988**, *2*, 151.
53. W. E. Stephens, *Phys. Rev.* **1946**, *55*, 691.
54. W. C. Wiley, I. H. Mclaren, *The Review of Scientific Instruments* **1955**, *26*, 1150.
55. R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **1992**, *64 (21)*, 1027A.
56. M. B. Comisarow, A. G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282.
57. M. B. Comisarow, A. G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 489.
58. E. d. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. second ed. **2002**, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, West Sussex, England.
59. S. Guan, A. G. Marshall, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1996**, *157/158*, 5.
60. A. G. Marshall, T. C. Wang, T. L. Ricca, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7893.
61. R. T. J. McIver, *Rev. Sci. Instr.* **1970**, *41*, 555.
62. M. B. Comisarow, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1981**, *37*, 251.
63. A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, G. S. Jackson, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 1.
64. M. B. Comisarow, A. G. Marshall, *In USA Patent No. 3,937,955: USA*, **1976**.
65. S. C. Beu, D. A. Laude, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 177.

66. S. C. Beu, D. A. Laude, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1992**, *112*, 215.

67. G. Gabrielse, L. Haarsma, S. L. Rolston, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1989**, *88*, 319.

68. M. Hasegawa, H. Fujiwara, T. Nonaka, K. Wakabayashi, H. Takahashi, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, D. Mann, T. Iwatsubo, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49071.

69. M. Kulartz, S. Kreitz, E. Hiller, E. C. Damoc, M. Przybylski, R. Knippers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 412.

70. K. Polec-Pawlak, D. Schaumloeffel, J. Szpunar, A. Prange, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 908.

71. D. Schaumloeffel, A. Prange, G. Marx, K. G. Heumann, P. Braetter, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 155.

72. A. I. Bush, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 184.

73. C. R. Cornett, W. R. Markesbery, W. D. Ehmann, *Neurotoxicology* **1998**, *19*, 339.

74. M. Zoriy , J. S. Becker, C. Pickhardt, M. Przybylski, J. S. Becker, *2005 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Budapest* **2005**,

75. R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y.-S. Kim, X. Huang, L. E. Goldstein, R. D. Moir, J. T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *Neuron* **2001**, *30*, 665.

76. T. A. Bayer, S. Schaefer, A. Simons, A. Kemmling, T. Kamer, R. Tepest, A. Eckert, K. Schuessel, O. Eikenberg, C. Sturchler-Pierrat, D. Abramowski, M. Staufenbiel, G. Multhaupt, *PNAS* **2003**, *100*, 14187.

77. L. Hesse, D. Beher, C. L. Masters, G. Multhaupt, *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 109.

78. C. Treiber, A. Simons, M. Strauss, M. Hafner, R. Cappai, T. A. Bayer, G. Multhaupt, *J. Biol. Chem.* **204**, *50*, 51958.

79. J. S. Rossier, N. Youhnovski, N. Lion, E. Damoc, J. S. Becker, F. Reymond, H. H. Girault, M. Przybylski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 53.

80. T. Lindemann, J. Hinrichs, M. Hamester, J. Wills, *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, in press.

81. C. J. Smith, I. D. Wilson, F. Abou-Shakra, R. Payne, T. C. Parry, P. Sinclair, D. W. Roberts, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1463.

82. D. Proefrock, P. Leonhard, A. Prange, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 561.

83. C. Pickhardt, J. S. Becker, M. Zoriy , M. Przybylski, J. S. Becker, *Nachrichten aus der Chemie* **2005**, *53*, 31.

84. J. L. Neilsen, A. Abildtrup, J. Christensen, P. Watson, A. Cox, C. W. McLeod, *Spectrochim. Acta B* **1998**, *53*, 339.

85. M. Wind, I. Feldmann, N. Jakubowski, W. D. Lehmann, *Electrophoresis* **2003**, *24*, 1276.

86. D. Schaumloeffel, R. Lobinski, *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *242*, 217.

87. J. S. Becker, M. Zoriy, U. Krause-Buchholz, J. S. Becker, C. Pickhardt, M. Przybylski, W. Pompe, G. Rödel, *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2004**, *19*, 1236.

88. C. Haass, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neuroscience* **1999**, *249 (6)*, 265.

89. S. Grau, A. Baldi, R. Bussani, X. Tian, R. Stefanescu, M. Przybylski, P. Richards, S. A. Jones, V. Shridhar, T. Clausen, M. Ehrmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102 (17)*, 6021.

90. S. Zirah, R. Stefanescu, M. Manea, X. Tian, R. Cecal, S. A. Kozin, P. Debey, S. Rebuffat, M. Przybylski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *321*, 324.

91. L. Buée, T. Bussière, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, P. R. Hof, *Brain Res. Rev.* **2000**, *22*, 95.

92. P. Friedhoff, M. von Bergen, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1502*, 122.

93. A. Delacourte, A. Defossez, *J. Neurol. Sci.* **1986**, *76*, 173.

94. M. Goedert, M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich, R. A. Crowther, *EMBO J.* **1989**, *8*, 393.

95. S. G. Greenberg, P. Davies, J. D. Schein, L. I. Binder, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 564.

96. I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi, H. M. Wisniewski, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 6084.

97. I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, L. I. Binder, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 4913.

98. P. M. Horowitz, K. R. Patterson, A. L. Guillozet-Bongaarts, M. R. Reynolds, C. A. Carroll, S. T. Weintraub, D. A. Bennett, V. L. Cryns, R. W. Berry, L. I. Binder, *J. Neurosci.* **2004**, *24 (36)*, 7895.

99. Y. Ihara, N. Nukina, R. Miura, M. Ogawara, *J. Biochem.* **1986**, *99*, 1807.

100. K. S. Kosik, C. L. Joachim, D. J. Selkoe, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 4044.

101. V. M.-Y. Lee, B. J. Balin, L. Otvos, J. Q. Trojanowski, *Science* **1991**, *251*, 675.

102. E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *trends in CELL BIOLOGY* **1998**, *8*, 425.

103. *http://en.wikipedia.org/wiki/Hyperphosphorylation.*

104. A. Schneider, J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow, E.-M. Mandelkow, *Biochem.* **1999**, *38*, 3549.

105. A. C. Alonso, T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 6923.

106. V. M. Lee, L. Otvos, M. L. Schmidt, J. Q. Trojanowski, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85 (19)*, 7384.

107. A. D. Alonso, I. Grundke-Iqbal, H. S. Barra, K. Iqbal, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 298.

108. Q. Lu, J. G. Wood, *J. Neurosci.* **1993**, *13*, 508.

109. R. D. Terry, H. M. Wisniewski, *Ultastructure of senile dementia and of experimental analogs. In Aging and the Brain: Advances in Behavioral Biology*. **1972**, Plenum Press: New York, 89-116.

110. S. Khatoon, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *FEBS Lett.* **1994**, *351*, 80.

111. S. Khatoon, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *J. Neurochem.* **1992**, *59*, 750.

112. N. F. Bence, R. M. Sampat, R. R. Kopito, *Science* **2001**, *292*, 1552.

113. L.-F. Lau, J. B. Schachter, P. A. Seymore, M. A. Sanner, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2002**, *2*, 395.

114. O. Schweers, E. Schonbrunn-Hanebeck, A. Marx, E. Mandelkow, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24290.

115. H. Wille, G. Drewes, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *J. Cell. Biol.* **1992**, *118*, 573.

116. A. Andreadis, W. M. Brown, K. S. Kosik, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10626.

117. M. Goedert, C. M. Wischik, R. A. Crowther, J. E. Walker, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 4051.

118. R. L. Neve, P. Harris, K. S. Kosik, D. M. Kurnit, T. A. Donlon, *Brain Res.* **1986**, *387*, 271.

119. M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R. A. Crowther, *Neuron* **1989**, *3*, 519.

120. A. Himmler, D. Drechsel, M. W. Kirschner, D. W. Martin, *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 1381.

121. M. Goedert, R. Jakes, *EMBO J.* **1990**, *9*, 4225.

122. K. S. Kosik, L. D. Orecchio, S. Bakalis, R. L. Neve, *Neuron* **1989**, *2*, 1389.

123. L. I. Binder, A. Frankfurter, L. I. Rebhun, *J. Cell. Biol.* **1985**, *101*, 1371.

124. D. W. Cleveland, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *J. Mol. Biol.* **1977**, *116*, 207.

125. D. Couchie, C. Mavilia, I. S. Georgieff, R. K. Liem, M. L. Shelanski, J. Nunez, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 4378.

126. P. LoPresti, S. Szuchet, S. C. Papasozomenos, R. P. Zinkowski, L. I. Binder, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 10369.

127. R. W. Shin, T. Iwaki, T. Kitamoto, J. Tateishi, *Lab. Invest.* **1991**, *64*, 693.

128. R. M. Brady, R. P. Zinkowski, L. I. Binder, *Neurobiol. Aging* **1995**, *15*, 479.

129. K. S. Kosik, J. E. Crandall, E. J. Mufson, R. L. Neve, *Ann. Neurol.* **1989**, *26*, 352.

130. I. S. Georgieff, R. K. Liem, D. Couchie, C. Mavilia, J. Nunez, M. L. Shelanski, *J. Cell. Sci.* **1993**, *105*, 729.

131. M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1975**, *72*, 1858.

132. S. Khatoon, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 777.

133. A. Harada, K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda, N. Hirokawa, *Nature* **1994**, *369*, 488.

134. G. Lee, S. T. Newman, D. L. Gard, H. Band, G. Panchamoorthy, *J. Cell. Sci.* **1998**, *111*, 3167.

135. S. C. Hwang, D. Y. Jhon, Y. S. Bae, J. H. Kim, S. G. Rhee, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18342.

136. M. Morishima-Kawashima, K. S. Kosik, *Mol. Biol. Cell.* **1996**, *7*, 893.

137. A. A. Reszka, R. Seger, C. D. Diltz, E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 8881.

138. K. Sobue, A. Agarwal-Mawal, W. Li, W. Sun, Y. Miura, H. K. Paudel, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16673.

139. H. Liao, Y. Li, D. L. Brautigan, G. G. Gundersen, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21901.

140. E. Sontag, V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, R. Brandt, C. Kamibayashi, J. Kuret, C. L. White, M. C. Mumby, G. S. Bloom, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25490.

141. M. F. Carlier, C. Simon, R. Cassoly, L. A. Pradel, *Biochimie* **1984**, *66*, 305.

142. I. Correas, R. Padilla, J. Avila, *Biochem. J.* **1990**, *269*, 61.

143. L. M. Griffith, T. D. Pollard, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 9143.

144. R. F. Sattilaro, W. L. Dentler, E. L. LeCluyse, *J. Cell. Biol.* **1981**, *90*, 467.

145. R. Brandt, J. Leger, G. Lee, *J. Cell. Biol.* **1995**, *131*, 1327.

146. T. Maas, J. Eidenmuller, R. Brandt, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 15733.

147. J.-Z. Wang, C.-X. Gong, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4854.

148. J. M. Litersky, G. V. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1563.

149. J. M. Litersky, G. V. Johnson, *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 903.

150. Y. D. Huang, X. Q. Liu, T. Wyss-Coray, W. J. Brecht, D. A. Sanan, R. W. Mahley, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 8838.

151. M. Przybylski, N. Youhnovski, F. Reymond, J. Rossier, *UK Patent GB0121590.4*, **2001**.

152. N. Lion, V. Gobry, H. Jensen, J. S. Rossier, H. Girault, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3583.

153. G. B. Fields, R. L. Noble, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, *35*, 161.

154. G. Vydac, *The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC*. Third ed. **2002**, Grace Vydac Technical Support Group: USA.

155. J. C. Rogalski, M. S. Lin, M. J. Sniatynski, R. J. Taylor, N. Youhnovski, M. Przybylsk, J. Kast, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16 (4)*, 505.

156. *www.calbiochem.com/alzheimers*.

157. H. Schaegger, W. A. Cramer, G. v. Jagow, *Anal. Biochem.* **1994**, *217*, 220.

158. H. Schaegger, G. v. Jagow, *Anal. Biochem.* **1991**, *199*, 223.

159. N. V. Bykova, H. Egsgaard, I. M. Moller, *FEBS Lett.* **2003**, *540*, 141.

160. S. Hann, G. Koellensperger, C. Obinger, P. G. Furtmüller, G. Stingeder, *J. Anal. At. Spectrom.* **2003**, *19*, 74.

161. U. Krause-Buchholz, J. S. Becker, M. Zoriy, C. Pickhardt, M. Przybylski, G. Rödel, J. S. Becker, *Int. J. Mass Spectr.* **2006**, *248 (1-2)*, 56.

162. M. J. Davies, R. T. Dean, D. Davies. *Radical-Mediated Protein Oxidation: From Chemistry to Medicine.* **1998**, Oxford University Press: Oxford, UK.

163. B. M. Sefton, T. Hunter, *Protein Phosphorylation*. Vol. 1st edition. **1998**, Academic Press: San Diego, CA.

164. J. S. Becker, S. F. Boulyga, C. Pickhardt, J. S. Becker, S. Buddrus, M. Przybylski, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *375 (4)*, 561.

165. J. S. Becker, S. F. Boulyga, J. S. Becker, C. Pickhardt, E. Damoc, M. Przybylski, *Int. J. Mass Spectr.* **2003**, *228 (2-3)*, 985.

166. K. J. R. Rosman, P. D. P. Taylor, *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 5N.

167. U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680.

168. J. Heukeshoven, R. Dernick, *Electrophoresis* **1985**, *6*, 103.

169. D. C. Muddiman, V. Bakhtiar, S. A. Hofstadler, R. D. Smith, *J. Chem. Edu.* **1997**, *74*, 1288.

170. R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 337.

171. J. S. Becker, *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 1173.

172. S. F. Boulyga, C. Pickhardt, J. S. Becker, M. Przybylski, J. S. Becker, *Plasma Source Mass Spectrometry, RSC, (eds. G. Holland and S.D. Tanner)* **2003**, 54.

173. M. Zoriy, M. Kayser, A. Izmer, C. Pickhardt, J. S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *242 (2-3)*, 297.