

Funktionsbasierte Isolierung von Subproteomen mit trifunktionellen Fangverbindungen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Peter Poot

aus Waldfeucht

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Elmar Weinhold
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Lothar Elling

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2004 bis Juli 2010 am Institut für Organische Chemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen unter Anleitung von Professor Dr. Elmar Weinhold angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. E. Weinhold für die interessante Themenstellung, das entgegengebrachte Vertrauen, die Möglichkeit viele eigene Ideen umzusetzen, sein stetes Interesse und seine fortwährende Bereitschaft zum wissenschaftlichen Disput.

Herrn Prof. Dr. L. Elling danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Dalhoff, C., Hüben, M., Lenz, T., Poot, P., Nordhoff, E., Köster, H. und Weinhold, E. (2010) Synthesis of S-Adenosyl-L-homocysteine Capture Compounds for Selective Photoinduced Isolation of Methyltransferases. *CemBioChem* **11**, 256-265.

Lenz, T., Poot, P., Gräbner, O., Glinski, M., Weinhold, E., Dreger, M. und Köster, H. (2010) Profiling of methyltransferases and other S-adenosyl-L-homocysteine-binding proteins by Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS). *JoVE*, zur Publikation angenommen.

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Vom Genom zum Proteom	1
1.2 Fortschritte der Proteomik	4
1.3 Trifunktionelle Fangverbindungen – Molekulare Angelhaken als neues Werkzeug zur funktionsbasierten Isolierung von Subproteomen	7
1.4 Fangverbindungen zum Einfangen des Methyloms.....	13
2 Zielsetzung	16
3 Ergebnisse und Diskussion	17
3.1 Aktivitätsbasierte Substrat- und Proteinprofilierung mit Aziridin-Kofaktoren.....	17
3.2 Optimierung der Bedingungen für das Einfangen von gereinigten MTasen durch trifunktionelle Fangverbindungen.....	20
3.2.1 Einfangen von M.TaqI mit der trifunktionellen Fangverbindung B1-N6-SAH	22
3.2.2 Einfangen der MTasen M.HhaI, Cfr4 und Trm4 mit B1-N6-SAH – ein Vergleich.....	26
3.2.3 Einfluss der Konzentration der Fangverbindung auf die Ausbeute an isoliertem Protein	27
3.2.4 Einfluss der Bestrahlungsintensität auf die Ausbeute an isoliertem Protein.....	31
3.2.5 Einfluss von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) im Fangpuffer auf die Ausbeute an spezifisch eingefangener M.TaqI	38
3.2.6 Einfluss der Linkerlänge auf die Ausbeute beim Einfangen von M.TaqI und M.HhaI mit B1-N6-SAH.....	39
3.2.7 Fangverbindungen mit anderen Reaktivitätsfunktionen und veränderter Verknüpfungsstelle an der Selektivitätsfunktion	41
3.2.8 Einfluss von Salzen und Glycerin auf die Spezifität.....	45
3.2.9 Einfluss der Temperatur auf die Spezifität.....	47

3.2.10 Einfluss der puffernden Komponente auf die Spezifität	48
3.2.11 Gleichzeitiges Einfangen von acht MTasen mit der Fangverbindung B1-N6-SAH.....	50
3.2.12 Einfangen von gereinigten MTasen mit der Fangverbindung B1-N6-SAH – eine Zusammenfassung	53
3.3 Geeignete Bedingungen für das Einfangen SAH bindenden Proteinen aus <i>E. coli</i> -Zelllysate	55
3.3.1 Herstellung geeigneter Zelllysate aus <i>E. coli</i>	55
3.3.2 Reduktion der SAM- und SAH-Konzentration im Zelllysate von <i>E. coli</i>	59
3.3.3 Einfangen des <i>E. coli</i> Methyloms mit der Fangverbindung B1-N6-SAH.....	62
3.3.4 Einfluss der Konzentration von Proteinen und Fangverbindung auf Ausbeute und Spezifität	64
3.3.5 Einfluss größerer Fangverbindungskonzentrationen auf Ausbeute und Spezifität	67
3.3.6 Beeinflussung von Ausbeute und Spezifität durch die Magnetpartikelmenge.....	70
3.3.7 Einfluss von Biotin auf die Spezifität beim Einfangen des Methyloms von <i>E. coli</i> 72	
3.3.8 Fangverbindungsanalogon zur Reduktion unspezifischer Nebenreaktionen	74
3.3.9 Adenosin und L-Methionin als Kompetitoren der Selektivitätsfunktion SAH	76
3.3.10 Abreicherung unspezifisch bindender Proteine durch Fangverbindungsgrundgerüste	79
3.3.11 Einfluss von sehr hohen HEPES-Konzentrationen	80
3.3.12 Einfangen funktioneller Subproteome aus Zelllysaten mit sehr hohen Glycerin-Konzentrationen.....	82
3.3.13 Einfluss unterschiedlicher Detergenzien auf unspezifische Nebenreaktionen.....	84
3.3.14 Einfluss von Quenchern auf Spezifität und Ausbeute beim funktionsbasierten Einfangen von Subproteomen	85
3.3.15 Trypton bewirkt eine Reduktion unspezifischer Nebenreaktionen	87

3.3.16 Fangverbindung mit umgekehrten Proportionen: Großer Abstand zwischen Selektivitätsfunktion und Reaktivitätsfunktion, kleiner Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion und Isolierfunktion.	89
3.3.17 Auswirkungen eines vergrößerten Abstands zwischen Reaktivitätsfunktion und Selektivitätsfunktion bei B1-N6-SAH	91
3.3.18 Fangverbindungen mit anderen Reaktivitätsfunktionen und veränderter Verknüpfungsstelle an der Selektivitätsfunktion	93
3.3.19 Unspezifische Nebenreaktionen	95
3.4 Einfangen von SAH-bindenden Proteinen mit Fangpartikeln	100
3.4.1 Das Konzept der Fangpartikel	100
3.4.2 Benötigte Zeit für die Vorbindung der Proteine an Fangpartikel.....	102
3.4.3 Erforderliche Bestrahlung bei Verwendung von Fangpartikeln.....	104
3.4.4 Überprüfung der Waschschrte bei Verwendung von Fangpartikeln.....	106
3.4.5 Untersuchungen zur Kapazität von Fangpartikeln	108
3.4.6 Fraktioniertes Einfangen von Proteinen	113
3.4.7 Einfluss des Probenvolumens auf die Ausbeute beim Einfangen von Proteinen mit Fangpartikeln.....	115
3.4.8 Ausbeutenvergleich beim Einfangen von SAH-bindenden Proteinen mit Fangpartikeln oder frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen.....	117
3.4.9 Verwendung unterschiedlicher Träger-Magnetpartikel zur Herstellung von Fangpartikeln.....	121
3.4.10 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Spezifität beim Einfangen des Methyloms von <i>E. coli</i> mit Fangpartikeln.....	123
3.4.11 Einfluss des Abstands zwischen Selektivitätsfunktion und Reaktivitätsfunktion beim partikelgebundenen Einfangen des Methyloms von <i>E. coli</i>	125
3.4.12 Differentielles Einfangen funktioneller Subproteome	127
3.4.13 Fortschritte bei der Analyse des Methyloms von <i>E. coli</i>	129
3.5 Eukaryontische Zelllysate.....	135

3.5.1 Einfluss des verwendeten Puffers auf die Spezifität beim Einfangen pflanzlicher Subproteome mit Fangpartikeln.....	136
3.5.2 Einfangen des Methyloms von <i>A. thaliana</i> mit unterschiedlichen Fangpartikeln.....	142
3.5.3 Pflanzliche Zelllysate aus <i>Glycine max</i> (Soja) und <i>Nicotiana tabacum</i> (Tabak).....	144
3.5.4 Einfangen des Methyloms von <i>Sus scrofa domestica</i> mit unterschiedlichen Fangpartikeln.....	146
3.5.5 Nachweis differentieller Expression des Methyloms von Eukaryonten	147
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	151
5 Experimenteller Teil	154
5.1 Materialien.....	154
5.1.1 Geräte	154
5.1.2 Verbrauchsmaterial	155
5.1.3 Chemikalien.....	156
5.1.4 Proteine, Bakterienstämme und Probenmaterialien	158
5.1.5 Puffer und Medien.....	159
5.2 Allgemeine Methoden.....	161
5.2.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	161
5.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	161
5.2.3 Coomassie-Färbung.....	162
5.2.4 Silberfärbung.....	162
5.2.5 Photometrische Messungen.....	162
5.2.6 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	163
5.2.7 Konzentrationsbestimmung bei Fangverbindungen.....	163
5.2.8 Gelfiltration	163
5.3 Herstellung von Zelllysaten.....	164
5.3.1 Herstellung von Zelllysaten aus <i>E. coli</i>	164

5.3.2	Herstellung von Zelllysaten aus Pflanzen	168
5.3.3	Herstellung von Zelllysaten aus <i>Sus scrofa</i>	170
5.4	Einfangen von Proteinen mit Fangverbindungen	172
5.4.1	Einfangen von Proteinen mit gelösten Fangverbindungen.....	172
5.4.2	Einfangen von Proteinen mit Fangpartikeln.....	176
5.4.3	Waschen der auf Magnetpartikel immobilisierten Proteine	179
6	Literatur	182

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABPP	<i>activity-based protein profiling</i>
BCCP	Biotin Carboxyl Carrier Protein
APS	Ammoniumpersulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Az	Aziridin-Kofaktor
6-BAz	Aziridin-Kofaktor mit Biotinrest
6-BdFlAz	Aziridin-Kofaktor mit dem Fluorophor Bodipy Fl
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
c	centi (10^{-2}) oder Konzentration
Cm	Methylcytosin (methyliert am Ribosylteil)
ca.	circa
CC	trifunktionelle Fangverbindung (<i>capture compound</i>)
CCMS	<i>capture compound mass spectrometry</i>
cDNA	copy-DNA (aus reverser Transkription von mRNA)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propan sulfonat
cmnm5s2U	5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, mo5U: 5-Methoxyuridin
cmo5U	5-Carboxymethoxyuridin
CTAB	<i>N,N,N</i> -Trimethylhexadecylammoniumbromid
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Dam	DNA-Adenin- <i>N</i> 6-Methyltransferase
DDM	Dodecyl- β -D-maltosid
DDMQH2	2-Polyprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol
2DE	2-dimensionale Gelelektrophorese
DHHB	3,4-Dihydroxy-5-hexaprenyl-benzoat
DMKH2	Demethyl Menaquinon

DMQH2	2-Polyprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
[E] :	Enzymkonzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
Eppendorfgefäß	Kunststoff-Kleinstreaktionsgefäße der Firma Eppendorf
[ES] :	Konzentration Enzym-Substrat-Komplex
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
G	Guanosin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (bei Zentrifugalkräften)
Gm	Methylguanosin (methyliert am Ribosylteil)
h	Stunde
Hcy	L-Homocystein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
ho5U	5-Hydroxyuridin
HPLC	<i>high pressure/performance liquid chromatography</i>
ICAT	<i>isotope-coded affinity tag</i>
IF	isoelektrische Focussierung
iTRAQ	<i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
k_{Ass}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
K_D	Dissoziationskonstante
k_{Diss}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
k	Kilo (10^3)
Da	Dalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBA	<i>lysogeny broth with ampicillin</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
μ	Mikro (10^{-6})

m	Milli (10^{-3}) oder Meter
M	mol/l
m2A	C2-Methyladenosin
m6A	N6-Methyladenosin
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
m4C	N4-Methylcytosin
m5C	C5-Methylcytosin
m1G	N1-Methylguanosin
m2G	N2-Methylguanosin
m7G	N7-Methylguanosin
min	Minute
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mnm5s2U	5-Methylaminomethyl-2-thiouridin
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MOWSE	<i>molecular weight search</i>
m3Ψ	N3-Methylpseudouridin
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTA	5'-Methylthioadenosin
MTase	Methyltransferase
m3U	N3-Methyluridin
m5U	C5-Methyluridin
n	Nano (10^{-9})
OAc	Acetat
OD	Optische Dichte
p	Piko (10^{-12})
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
REase	Restriktionsendonuklease

RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	<i>ribosomal</i> RNA
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase
s	Sekunde
[S] :	Substratkonzentration
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodiumdodecylsulfate polyacrylamid Gelelectrophoresis</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
SMILing DNA	<i>Sequence-specific Methyltransferase-Induced Labelling of DNA</i>
$\tau_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TB	<i>terrific broth</i>
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Polyethylen(9-10)-glycol-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
tRNA	transfer RNA
Um	Methyluridin (methyliert am Ribosylteil)
US oder USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
v_{Ass} :	Geschwindigkeit der Assoziation
v_{Diss} :	Geschwindigkeit der Dissoziation
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Ws	Wattsekunde
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Vom Genom zum Proteom

Das 20. Jahrhundert war gekennzeichnet durch eine Vielzahl bahnbrechender Entdeckungen im Bereich der Molekularbiologie. 1943 konnte Desoxyribonucleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information identifiziert werden (Avery *et al.*, 1944) und zehn Jahre später wurden konkrete Vorstellungen zur Molekularstruktur publiziert (Watson und Crick, 1953). Eine definierte, lineare Anordnung unterschiedlicher Aminosäuren in Proteinen wurde zu diesem Zeitpunkt bereits als gesichert betrachtet (Sanger, 1952). Die Verbindung zwischen genetischer Information und der Synthese von Proteinen konnte danach in ihren Grundzügen verhältnismäßig schnell aufgeklärt werden. Den Gipfel dieser Entwicklung bildete 1966 die vollständige Aufklärung des genetischen Codes durch Verwendung künstlicher Oligoribonucleotide (Khorana *et al.*, 1966).

In den folgenden Jahrzehnten wurden einige bedeutende Techniken zur Erforschung des Genoms entwickelt, wie die Kettenabbruchmethode zur Sequenzierung von DNA (Sanger *et al.*, 1977) und die *polymerase chain reaction* (PCR) zur Vervielfältigung langer DNA-Abschnitte (Mullis *et al.*, 1986). Diese immer weiter verbesserten Techniken ermöglichten schließlich die Sequenzierung des menschlichen Genoms, die am 14. April 2003, rund 50 Jahre nach der Aufklärung der DNA Struktur, für erfolgreich beendet erklärt wurde (offizielle Pressemitteilung, U.S. Human Genome Project).

Eine besondere Herausforderung in der Biologie besteht darin, dass mit der Klärung einer Frage in der Regel ein Berg neuer Fragen aufgeworfen wird. Die gelungene Sequenzierung der DNA von immer mehr Organismen macht dies besonders deutlich. Ein Molekularbiologe, der die DNA-Sequenz eines Organismus kennt, befindet sich in einer ähnlichen Situation wie ein Archäologe, der eine gefundene Steintafel so eben vom Schmutz befreit hat und nun auf eine Vielzahl kryptischer Zeichen blickt. Vielleicht weisen viele der Zeichen gewisse Ähnlichkeiten mit Zeichen anderer Schriften auf, und etliche lassen sie sich sogar einem bestimmten „Buchstaben“ zuordnen. In einigen Fällen lassen sich sogar mehrere „Buchstaben“ in den höheren Sinnzusammenhang eines „Wortes“ fassen, die „Sprache“ aber bleibt ihm völlig unbekannt. Diese Analogie zwischen Biologie und Archäologie ist jedoch nur bedingt in der Lage das wahre Ausmaß der Herausforderung zu beschreiben, besteht im

Falle des menschlichen Genoms doch schon jedes „Wort“ aus etlichen Tausend „Buchstaben“ und die „Sprache der Gene“ aus über 20000 unterschiedlichen „Worten“ (Clamp *et al.*, 2007). Lange Zeit galt das besondere Interesse der Molekularbiologie der Erforschung der DNA und der damit in direktem Zusammenhang stehenden Vorgänge. Proteine fanden dabei eher am Rande Beachtung. Bezeichnend dafür ist, dass der Begriff „Proteom“ (ein Kunstwort aus **Protein** und **Genom**), der die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem Organismus, einem Gewebe oder einer Zelle vorhandenen Proteine bezeichnet, erst seit den 1990er Jahren in der Literatur zu finden ist (Wilkins *et al.*, 1994). Der Zustand eines Organismus oder einer Zelle ist jedoch durch sein Proteom, nicht durch sein Genom gekennzeichnet. Im Gegensatz zum relativ statischen Genom ist das Proteom eines Organismus ständigen Veränderungen unterworfen, die auf innere und äußere Ursachen zurückzuführen sind. Dies sei durch das folgende Beispiel verdeutlicht.

In Abb. 1 sind gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine der Honigbiene während unterschiedlicher Entwicklungsstadien dargestellt. Der morphologische Zustand der Tiere in diesen Entwicklungsstadien ist daneben ebenfalls abgebildet. Deutlich ist zu erkennen, dass sich die Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien nicht nur auf die Morphologie beschränken, sondern dass auch die Expressionsmuster der Proteine drastische Unterschiede aufweisen. Die Basensequenz der genomischen DNA bleibt aber während der gesamten Entwicklung unverändert. Lediglich das Methylierungsmuster der DNA unterliegt, natürlich katalysiert durch Proteine, einigen Veränderungen (Foret *et al.*, 2009).

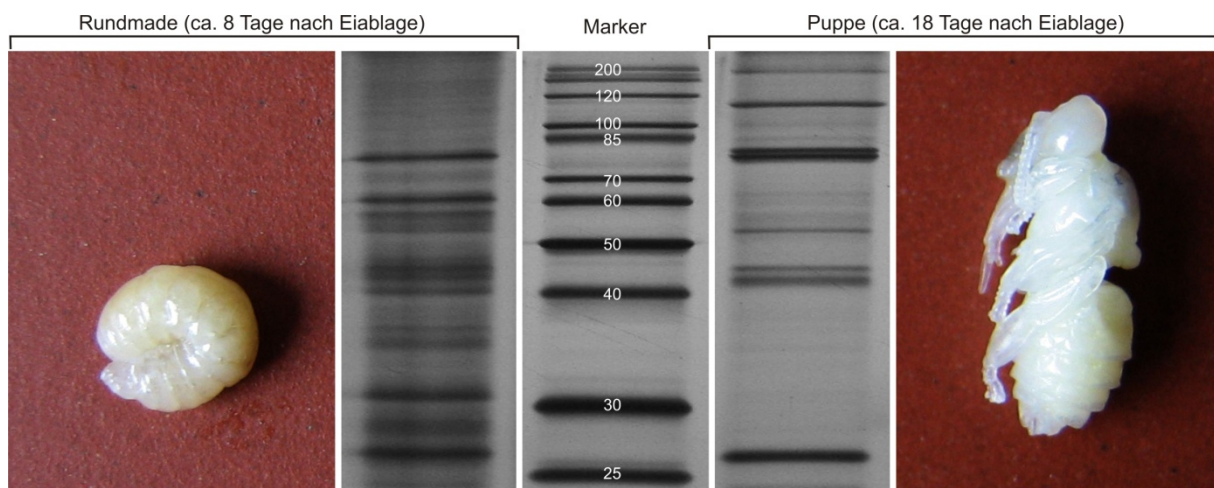


Abb. 1: Honigbienen (*Apis mellifica*) in verschiedenen Entwicklungsstadien, mit den Proteinbandenmustern der löslichen Proteine während dieser Entwicklungsstadien. Es wurden jeweils 200 ng Gesamtprotein durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Bei den analysierten Tieren handelte es sich um Drohnen.

Auch innerhalb eines Organismus unterscheiden sich die Proteinexpressionsmuster unterschiedlicher Gewebe. So werden z.B. in der Leber eines Säugetiers teilweise andere Proteine expremiert als im Gehirn.

Selbst bei Betrachtung einer einzigen Zelle stellt sich das Proteom nicht statisch dar, sondern unterliegt mitunter starken zeitlichen Schwankungen, die sowohl intern (z.B. durch den Zellzyklus) als auch extern bedingt sind. So wird man etwa in einer *E. coli* Zelle, die kürzlich in frisches Nährmedium gelangt ist, eine andere Proteinzusammensetzung finden, als in Zellen einer Kultur, die sich seit Tagen in der Absterbephase befindet.

Die Reaktionsnorm eines Organismus ist durch sein Genom festgelegt. Letztendlich ist auf genomischer Ebene vorbestimmt, wie eine Zelle unter bestimmten Bedingungen reagieren kann. Proteine sind dabei innerhalb einer Zelle jedoch nicht nur die Stellglieder, sondern auch die Sensoren, welche die Interaktion zwischen DNA und Umwelt erst ermöglichen. Dabei liegen den Abläufen aber fast nie einfache, lineare Zusammenhänge zugrunde, sondern eine extrem komplexe Verknüpfung vieler, wenn nicht sogar aller Vorgänge innerhalb einer Zelle oder eines Organismus. Alle rezenten Lebewesen sind somit das Ergebnis extrem verschachtelter, zumeist proteinvermittelter Abläufe, deren fundamentale Ordnung in DNA-Molekülen gespeichert ist. Diese Ordnung hatte Milliarden Jahren zur Verfügung, um sich in Richtung immer größerer Komplexität zu entwickeln. Als Ergebnis dieser Entwicklung sind selbst die Vorgänge in primitiven Einzellern derartig komplex, dass sie bislang nur in Ansätzen verstanden sind.

Momentan können aus dem sequenzierten Genom eines Organismus nur sehr begrenzte Informationen bezogen werden. So kann man z.B. ein Teil der Strukturgene als solche identifizieren und die resultierenden Proteine manchmal aufgrund von Sequenzhomologien einer bestimmten Funktion zuordnen. Für ein tieferes Verständnis der komplexen Lebensvorgänge ist es jedoch erforderlich, diese verstärkt auf Proteinebene zu untersuchen, um dann im nächsten Schritt einen Zusammenhang zwischen den gemachten Beobachtungen und der DNA-Sequenz herzustellen. Da eine isolierte Betrachtung einzelner Proteine dabei bei weitem nicht ausreicht, wird seit einigen Jahren nach Methoden gesucht, die es ermöglichen einen immer größeren Ausschnitt des Proteoms eines Organismus zu betrachten. Für den Wissenschaftszeig, der sich mit der Erforschung ganzer Proteome oder zumindest größerer Teile von Proteomen befasst, hat sich seit den späten 1990er Jahren der Begriff Proteomik (engl. *Proteomics*) etabliert (James, 1997).

1.2 Fortschritte der Proteomik

Seit im Jahre 1955 mit der Sequenz von Insulin erstmalig die vollständige Primärstruktur eines Proteins vorgestellt wurde, hat die Erforschung von Proteinen einige bahnbrechende methodische Fortschritte zu verzeichnen. Bereits 1967 konnte basierend auf der Edman-Methode der erste automatische Proteinsequenzierautomat entwickelt werden (Edman und Berr, 1967). Allerdings hatte diese chemische Proteinsequenzierung zwei bedeutende Nachteile. Man benötigte relativ große Proteinmengen und das zu untersuchende Protein musste in Reinform vorliegen. Für die Aufreinigung eines Proteins ist in der Regel eine Kombination verschiedener chromatographischer Verfahren erforderlich. Auch unterschiedliche Fällungsmethoden können angewandt werden. Der Aufwand für die Aufreinigung eines Proteins ist aber immer relativ groß. Zudem müssen schwach expremierte Proteine vorher kloniert und überexpremiert werden.

Einen großen Fortschritt stellte die 1970 entwickelte SDS-PAGE (*sodiumdodecylsulfate solyacrylamid seleelectrophoresis*) dar (Laemmli, 1970). Diese Technik konnte bereits nach wenigen Jahren mit der IF (isoelektrische Focussierung) kombiniert werden (Klose, 1975). Eine solche Kombination aus IF und SDS-PAGE wird als 2DE (2-dimensionale Gelelektrophorese) bezeichnet. Dabei wird ein Proteingemisch zuerst durch eine IF nach den pI-Werten der Proteine aufgetrennt. Anschließend erfolgt eine weitere Auftrennung dieser nunmehr linear im Trägermaterial angeordneten Proteine durch eine SDS-PAGE. Durch diese zweidimensionale Auftrennung der Proteine wird eine erstaunliche Trennleistung erzielt. Wird ein solches Gel mit einer hinreichend sensiblen Färbetechnik wie, z.B. Silberfärbung, angefärbt (Merril *et al.*, 1981), lassen sich aus Zelllysaten einige Hundert unterschiedliche Proteine nachweisen. Die Nachweisgrenze liegt unterhalb von einem Nanogramm. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass über ein 2D-Gel auch eine gute Quantifizierung der Proteine möglich ist. Somit können durch einen Vergleich zweier Gele z.B. auch Unterschiede im Expressionsmuster nachgewiesen werden. Bis heute ist die 2DE eine der wichtigsten Techniken zur Untersuchung komplexer Proteingemische geblieben.

Der wesentliche Nachteil der 2DE bestand anfänglich jedoch darin, dass eine Identifizierung der einzelnen Proteine im Gel fast unmöglich war. Für eine chemische Sequenzierung waren die für eine 2DE eingesetzten Mengen der schwächer expremierten Proteine zu gering. Um die einzelnen Flecken auf 2D-Gelen bestimmten Proteinen zuordnen zu können, war man auf Immunblots angewiesen, was wiederum die Verfügbarkeit der entsprechenden spezifischen Antikörper voraussetzte. In der 1980ern wurden dann Techniken entwickelt, die es

ermöglichten mit einem auf der Edman-Methode basierendem Verfahren, nach dem Blotten auf Nitrozellulose eine Sequenzierung der Proteine durchzuführen (Aebersold *et al.*, 1987). Allerdings waren auch hierfür noch relativ große Proteinmengen erforderlich.

Eine beachtliche Verbesserung der analytischen Möglichkeiten brachte gegen Ende der 1980er zwei neue Verfahren zur Ionisierung von Proben in der Massenspektrometrie. Durch MALDI (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**isorption/**I**onisation, Karas und Hillenkamp, 1988) und ESI (**E**lektrospray-**I**onisation, Fenn *et al.*, 1989) wurden längere Peptide oder sogar vollständige Proteine für die Massenspektrometrie zugänglich.

Damit diese neuen Möglichkeiten aber richtig genutzt werden konnten, bedurfte es zusätzlich einiger weiterer Entwicklungen in einem relativ jungen Teilbereich innerhalb der Biologie – der Bioinformatik. Die exponentiell ansteigenden Mengen an Sequenzdaten aus Protein-Genom- oder cDNA-Sequenzierungsprojekten, wurde in öffentlich zugänglichen Datenbanken zusammengefasst. Basierend auf verschiedenen Algorithmen, wie dem Needleman-Wunsch-Algorithmus (Needleman und Wunsch, 1970), dem Smith-Waterman-Algorithmus (Smith und Waterman, 1981) oder dem BLAST-Algorithmus (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, Altschul *et al.*, 1990) wurden Suchmaschinen entwickelt, die diese Sequenzen für Sequenzvergleiche zugänglich machten. Damit ergab sich auch die Möglichkeit einer neuen Analysetechnik für unbekannte Proteinproben. Beim *peptide mass fingerprinting* wird das zu untersuchende Protein zuerst sequenzspezifisch fragmentiert (meistens durch Trypsin) und das entstandene Peptidgemisch anschließend massenspektrometrisch analysiert. Die ermittelten Massen der Peptide werden dann mit den Massen aus Proteindatenbanken oder den Massen hypothetischer Proteine, die aus genomischen Datenbanken abgeleitet werden, verglichen. Hierzu können verschiedene Algorithmen wie z.B. MOWSE (**m**olecular **w**eight **s**earch, Pappin *et al.*, 1993) oder FRAGFIT (Henzel *et al.*, 1993) verwendet werden. Solche Programme führen eine *in silico*-Fragmentierung der in Datenbanken aufgeführten Proteine durch, errechnen die Massen der resultierenden Peptide und vergleichen diese Daten mit massenspektrometrischen Befunden. Durch *peptide mass fingerprinting* wird eine vereinfachte Identifizierung von Proteinen ermöglicht, die zuvor z.B. durch 2DE aufgetrennt wurden. Allerdings ist mit dieser Methode und einfachen Massenspektrometern eine direkte Analyse komplexer Proteingemische nur begrenzt möglich. Selbst wenn ein Massenspektrometer alle Peptide, die bei einer tryptischen Fragmentierung z.B. eines Zelllysats entstehen, hinreichend genau erfassen könnte, so würde die zur Auswertung der Daten benötigte Rechenleistung die heute zur Verfügung stehenden Möglichkeiten deutlich sprengen.

Die Lösung des Problems liegt in der Tandem-Massenspektrometrie (oft als MS/MS bezeichnet). Hierbei werden praktisch zwei Massenspektrometer hintereinander geschaltet. Ein kleiner Teil aus dem Spektrum der im ersten Massenspektrometer aufgetrennten Peptide kann aus diesem wieder austreten und wird mit hochenergetischen Edelgasatomen zur Kollision gebracht, wobei die Peptide weiter fragmentiert werden. Diese Fragmente werden im zweiten Massenspektrometer analysiert. Durch die Art und die statistische Verteilung dieser Fragmente kann dabei die Aminosäuresequenz dieser Peptide ermittelt werden. Ein Sequenzvergleich mit Datenbanken ist anschließend relativ einfach möglich. Eine zusätzliche Verbesserung bietet eine der massenspektrometrischen Analyse vorgeschaltete chromatographische Auftrennung durch HPLC (*high pressure liquid chromatography*), die gekoppelt mit ESI kontinuierlich betrieben werden kann.

Der Bereich der Massenspektrometrie ist auch weiterhin durch ständige technische Neuerungen oder Verbesserungen gekennzeichnet. Diese betreffen sowohl die Geräte selber, als auch die Probenvorbereitung oder die nachfolgende Datenauswertung. So ist z.B. durch die Verwendung von Isotopenmarkierungen mittlerweile eine relativ gute Quantifizierung der Proteine in den Proben möglich. Bei einigen Verfahren wie ICAT (*isotope-coded affinity tag*, Hansen *et al.*, 2003) oder iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*, Khainovski *et al.*, 2004) werden die Proben nach enzymatischer Fragmentierung auf chemischem Wege markiert. Beim SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*, Ong *et al.*, 2002) werden isotopenmarkierte Aminosäuren von lebenden Zellen direkt in die Proteine eingebaut. Durch gleichzeitiges Messen einer markierten und einer unmarkierten Probe können Unterschiede in der Expression sehr gut detektiert werden.

Die Kombination aus verbesserten Massenspektrometern und immer ausgefeilteren Algorithmen zur Auswertung der Primärdaten (z.B. Lu *et al.*, 2007) ermöglicht aber auch schon eine relativ gute Quantifizierung nicht isotopenmarkierter Proben. Werden die Proben vor der MS-Analytik noch mit verschiedenen Verfahren fraktioniert, so kann bereits ein erstaunlich großer Anteil bakterieller Proteome nachgewiesen und quantifiziert werden. Aus dem ca. 4400 Proteine umfassenden Proteom von *E. coli* konnten auf diese Weise 1103 Proteine, also ein Viertel des maximal möglichen Proteoms, erfasst werden (Ishihama *et al.*, 2008).

Vermutlich wird es bereits in wenigen Jahren möglich sein, auch die Proteine in sehr komplexen Proben mit verhältnismäßig geringem Aufwand nachzuweisen und zu quantifizieren. Für die Proteomik wird dies zweifelsfrei einen gewaltigen Fortschritt

darstellen. Aber wie weit wird dieser Schritt zum Verständnis der extrem komplexen Lebensvorgänge führen?

Ähnlich wie das Wissen um die Genomsequenz eines Organismus ist das Wissen um die zu einem bestimmten Zeitpunkt expremierten Proteine nicht ausreichend. Da ein Proteom nicht statisch ist, gilt es seine Veränderung in verschiedenen Entwicklungsphasen und unter unterschiedlichen Bedingungen zu untersuchen. Solche Untersuchungen sind unabdingbar, wenn die komplexen Regelungsnetzwerke innerhalb eines Organismus verstanden werden sollen. Die MS-Analytik kann hierbei unschätzbare Dienste leisten. Es bleibt jedoch bei vielen Proteinen eine grundlegende Fragestellung, die auch durch die beste MS-Analytik nicht beantwortet werden kann. Welche Funktion hat das betreffende Protein?

1.3 Trifunktionelle Fangverbindungen – Molekulare Angelhaken als neues Werkzeug zur funktionsbasierten Isolierung von Subproteomen

Wenn es um die Untersuchung biologischer Prozesse geht, ist der Nachweis der beteiligten Komponenten zwar unerlässlich, aber es ist ebenso erforderlich ihre Funktion zu kennen. Eine der wichtigsten Rollen bei biologischen Prozessen kommt zweifelsfrei den Proteinen zu. Das Problem, mit welchem sich die Wissenschaft konfrontiert sieht, besteht darin, dass jeder Organismus tausende, oder sogar zehntausende verschiedene Proteine aufweisen kann. Von einigen dieser Proteine werden gewaltige Mengen produziert, von anderen nur ein einziges Molekül in zehn Generationen. Einige sind praktisch immer in gleichbleibenden Mengen vorhanden, andere nur kurzzeitig während bestimmter Entwicklungsphasen oder unter ganz besonderen Umweltbedingungen.

Lange Zeit gab es praktisch nur eine Möglichkeit, um die Funktion eines Proteins zu bestimmen. Man musste das Protein isolieren und versuchen es biochemisch zu charakterisieren. Das erste Protein, mit dem dies gelang, war Amylase. Bereits 1833, mehr als 100 Jahre bevor der genaue Aufbau von Proteinen bekannt war, gelang es dem französischen Chemiker Anselme Payen dieses stärke-spaltende „Ferment“ und seine Funktion nachzuweisen.

Später erlangte ein genetischer Ansatz, die Untersuchung von Mangelmutanten, eine immer größere Bedeutung. Besonders seit Mangelmutanten wegen der großen Fortschritte im Bereich der Molekularbiologie genau charakterisiert oder gezielt erzeugt werden können, konnten viele Stoffwechselwege samt der an ihnen beteiligten Enzyme aufgeklärt werden.

Auch heute noch lassen sich aus Mutationsstudien wertvolle Hinweise über die Funktion der mutierten Gene erhalten.

Besonders viel Information lässt sich aus dreidimensionalen Proteinstrukturen, z.B. durch Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen, gewinnen. Dies gelang erstmalig mit dem Protein Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1958). Wenn Enzyme mit gebundenem Substrat oder Substratanalogen kristallisieren, lassen sich oftmals sogar Rückschlüsse auf den Mechanismus der Katalyse ziehen. Um reine Kristalle eines Proteins zu erhalten, muss dieses aber zuerst in größeren Mengen aufgereinigt werden, was relativ aufwendig ist. Das nächste, und wohl auch größte Problem besteht darin, dass es nur mit einem Teil der Proteine gelingt die benötigten Kristalle zu züchten. Auch die Auswertung und Interpretation von Röntgenbeugemustern ist relativ aufwendig und kann mehrere Monate oder Jahre in Anspruch nehmen. Somit bleibt die für Proteine die Untersuchung von Kristallstrukturen eine sehr gute, für einen großen Probendurchsatz jedoch ungeeignete Technik.

In den späten 1980ern und frühen 1990ern etablierten sich mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System (Field und Song, 1989) und der Phagen-Display Methode (Bradbury und Cattaneo, 1995) zwei Techniken, die es ermöglichten ganze Genbibliotheken oder cDNA-Bibliotheken hinsichtlich Protein-Protein Wechselwirkungen oder beim Phagen-Display auch hinsichtlich Protein-Substrat Wechselwirkungen zu untersuchen. Beide Methoden ermöglichen eine effiziente Untersuchung vieler Proteine gleichzeitig und werden seit ihrer Einführung in einer Vielzahl von Varianten für unterschiedliche Zwecke eingesetzt. Eine Eigenschaft, die für viele Anwendungen sehr vorteilhaft sein mag, ist jedoch gleichzeitig ein entscheidender Nachteil. Beide Techniken sind klonierungsbasiert. Eine Untersuchung eines komplexen Proteingemisches z.B. aus einem speziellen Gewebe oder von Zellen eines bestimmten physiologischen Zustands ist somit nicht möglich.

Eine schleichende Revolution, die funktionelle Untersuchungen komplexer Proteingemische in naher Zukunft deutlich vereinfachen könnte, ist zum Teil technischer Natur. Neue Werkstoffe, verbesserte Verarbeitungstechniken und eine zunehmende Verfeinerung der Mikrorobotertechnik ermöglichen mittlerweile die Herstellung von Mikroarrays mit mehreren tausend unterschiedlichen Proben. Diese sind längst nicht mehr nur auf DNA beschränkt. So sind z.B. Mikroarrays mit verschiedenen Antigenen, Kohlenhydraten oder Proteinen kommerziell erhältlich (MacBeath und Schreiber, 2000). Die modernen, chipbasierten Techniken zur Untersuchung komplexer Proteingemische bergen zweifellos ein großes Potential, besonders im Bereich der klinischen Diagnostik. Sie besitzen aber auch einige entscheidende Nachteile, die sie mit anderen, auf Affinitätschromatographie basierenden

Verfahren teilen. So kann es zu unerwünschten Wechselwirkungen mit der Oberfläche kommen. Ein anderer Nachteil liegt in der Natur der relativ schwachen, nicht-kovalenten Bindung, die die Basis aller Affinitätschromatographischen Verfahren bildet. Im Falle einer starken Bindung mag dies noch unproblematisch sein, aber schwach bindende Proteine können sehr schnell wieder fortgewaschen werden. Auch das Auffinden sehr schwach exprimierter Proteine ist bei chipbasierten Verfahren ein Problem, da das Verhältnis Oberfläche/Volumen recht ungünstig ist und, der Vergrößerung des Probenvolumens zur Vergrößerung der Stoffmengen dadurch Grenzen gesetzt sind.

Eine Technik, die das Problem schwacher, nicht-kovalenter Bindungen umgehen kann, ist das aktivitätsbasierte Proteinprofilieren (ABPP, *activity-based protein profiling*, Barglow und Cravatt, 2007). Hierbei werden kleine, synthetische, bifunktionelle Verbindungen verwendet. Ihre erste Funktion dient der Selektivität und gleichzeitig der Reaktivität. Dieser Teil des Moleküls muss als ein Analogon des natürlichen Substrats, in die entsprechenden Bindetaschen der Zielproteine passen. Anders als die natürlichen Substrate muss es bei der folgenden Reaktion aber zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Protein kommen, weshalb die Selektivitätsfunktion des Moleküls auch gleichzeitig als Reaktivitätsfunktion fungiert. Das Problem einer schwachen, nicht-kovalenten Bindung, das bei Affinitätschromatographischen Verfahren auftritt, besteht danach nicht mehr. Als zweite Funktion können Reportergruppen (z.B. Fluorophore) oder Affinitätsmarkierungen (z.B. Biotin) verwendet werden. ABPP ist eine sehr gute Technik, um bestimmte Proteine hochspezifisch aus komplexen Proteingemischen, wie z.B. Zelllysaten zu isolieren. Sie hat jedoch einen sehr gravierenden Nachteil: Die Verfügbarkeit einer brauchbaren kombinierten Selektivitäts- und Reaktivitätsfunktion ist ein seltener Glücksfall. Und wenn sie für eine bestimmte Enzymklasse vorhanden ist, so passt sie nicht zwangsläufig in die Bindungstaschen aller Enzyme aus dieser Klasse, da es sich nicht um das natürliche Substrat, sondern nur um ein Substratanalogon handelt.

Die Lösung des Problems liegt in der Entkopplung von Selektivitätsfunktion und Reaktivitätsfunktion. Die resultierende trifunktionelle Verbindung bietet im Vergleich zur für das ABPP verwendeten bifunktionelle Verbindung entscheidende Vorteile:

1. Die Selektivitätsfunktion kann hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften optimiert sein, da sie nur noch die Aufgabe hat, eine nicht-kovalente Bindung zum Zielprotein herzustellen. Prinzipiell kann hierfür das natürliche Substrat oder ein Reaktionsprodukt eines Enzyms benutzt werden. Außerdem besteht keine Beschränkung auf Proteine mit katalytischen

Eigenschaften. Auch Botenstoffe, die z.B. an Transkriptionsfaktoren binden, können als Selektivitätsfunktion dienen.

2. Weil die Art der Reaktivitätsfunktion in keiner Weise von einer katalytischen Aktivität des Zielproteins abhängig ist, steht eine Vielzahl möglicher Reaktivitätsfunktionen zur Auswahl. Besonders günstig sind photoaktivierbare Gruppen, weil dadurch sogar der Zeitpunkt, zu dem die kovalente Verknüpfung erfolgt, bestimmt werden kann.

Solche trifunktionellen Verbindungen werden als Fangverbindungen (*capture compounds*, CC) bezeichnet. In Abb. 2 ist schematischer Vergleich zwischen trifunktionellen Fangverbindungen und den beim ABPP verwendeten bifunktionellen Verbindungen dargestellt.

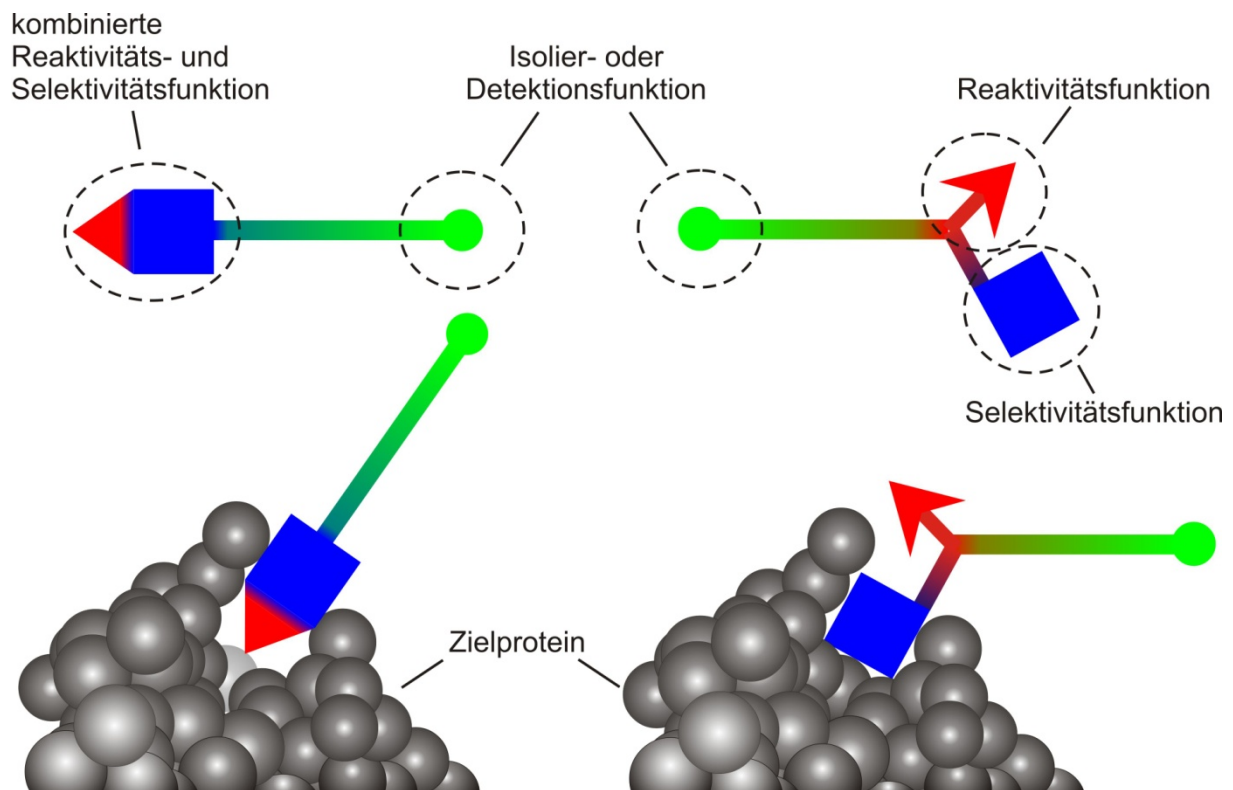


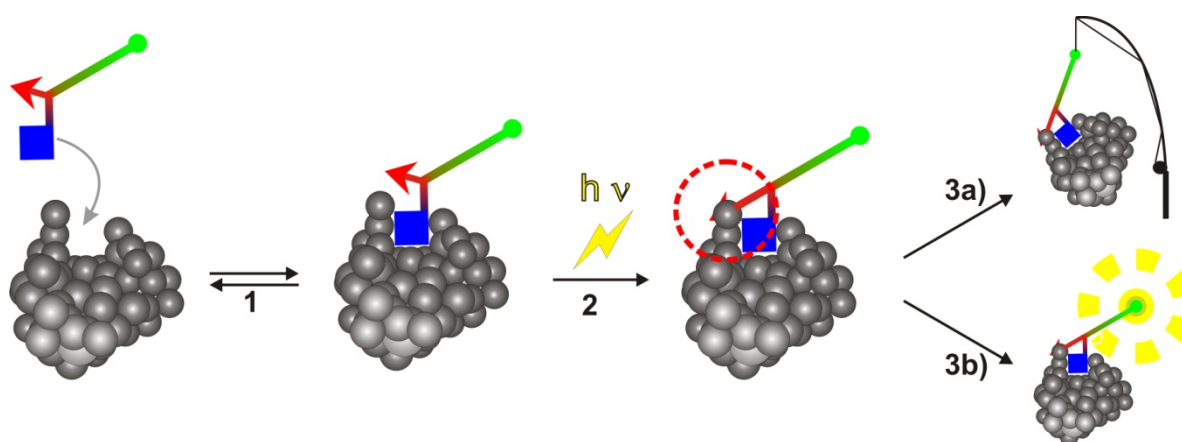
Abb. 2: Vergleich zwischen bifunktionellen Verbindungen für ABPP (links) und trifunktionellen Fangverbindungen (rechts). Beide verfügen über eine Reaktivitätsfunktion (rot), eine Selektivitätsfunktion (blau) und eine Isolier- oder Detektionsfunktion (grün). Im Falle der beim ABPP verwendeten bifunktionellen Verbindungen sind Reaktivitäts- und Selektivitätsfunktion jedoch in einer chemischen Gruppe kombiniert, so dass oft keine optimale Bindung an das Zielprotein erfolgen kann.

Die beim ABPP verwendeten bifunktionellen Verbindungen müssen mit ihrer kombinierten Reaktivitäts- und Selektivitätsfunktion genau in das aktive Zentrum des Zielproteins passen. Oft ist dies, wie in Abb. 2 angedeutet, nicht möglich. Trifunktionelle Fangverbindungen hingegen können im Idealfall sogar das natürliche Substrat des Zielproteins als

Selektivitätsfunktion tragen, was eine optimale Bindung ermöglicht. Somit entfällt der die Einsatzmöglichkeiten limitierende Faktor der Verfügbarkeit eines geeigneten reaktiven Substratanalogons.

Trifunktionelle Fangverbindungen können prinzipiell fast alle denkbaren organischen Verbindungen als Selektivitätsfunktion tragen. Neben natürlichen Substraten oder Effektoren können dies auch Xenobiotika, wie z.B. Pflanzenschutzmittel oder Pharmazeutika sein.

Während beim ABPP die Reaktion mit dem Zielprotein in der Regel sofort auf die Bindung an das aktive Zentrum folgt, binden trifunktionelle Fangverbindungen zunächst zwar spezifisch, aber nicht-kovalent an ihre Zielproteine.



Schema 1: Einfangen eines Proteins durch eine photoaktivierbare, trifunktionelle Fangverbindung. Im ersten Schritt bindet die Fangverbindung mit ihrer Selektivitätsfunktion (blau) nicht-kovalent an das Protein (1). Im zweiten Schritt erfolgt nach einer Photoaktivierung eine kovalente Verknüpfung zwischen der Reaktivitätsfunktion (rot) und dem Protein (2). Im dritten Schritt kann das Protein mit Hilfe der Isolierfunktion der Fangverbindung (grün) isoliert werden (3a). Trägt die Fangverbindung an dieser Stelle alternativ eine Detektionsfunktion (z.B. einen Fluorophor), so kann auch eine Detektion erfolgen (3b).

Schema 1 zeigt einen Überblick der Abläufe beim Einfangen von Proteinen mit trifunktionellen Fangverbindungen. Die im ersten Schritt erfolgende, nicht-kovalente Bindung an das Zielprotein ist noch reversibel. Erst im zweiten Schritt erfolgt die kovalente Verknüpfung zwischen Fangverbindung und Zielprotein. Im Zuge dieser Arbeit wurden ausschließlich photoaktivierbare Fangverbindungen verwendet. Prinzipiell wären aber auch Reaktivitätsfunktionen denkbar, die auf anderem Wege aktiviert werden.

Photoaktivierbare Fangverbindungen bilden nach ihrer Photoaktivierung kurzlebige und sehr reaktive Zwischenprodukte (vgl. Abschnitt 3.2.4). Ist die Fangverbindung in diesem Moment mit ihrer Selektivitätsfunktion an ein Protein gebunden, kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen der Fangverbindung und dem Protein. Dieser Vorgang wird im

Englischen als „*photocrosslinking*“ bezeichnet. Die im Deutschen häufig benutzte Übersetzung „Photoquervernetzung“ ist irreführend, da sie die Ausbildung eines dreidimensionalen Polymers suggeriert. Im Folgenden wird deshalb der besser geeignete Begriff Photoverknüpfung verwendet.

Nach der Photoverknüpfung sind Fangverbindung und Protein kovalent und damit irreversibel miteinander verbunden und können ohne eine Zerstörung der Molekularstruktur nicht mehr getrennt werden. Dies ermöglicht im dritten Schritt eine einfache Isolierung der Proteine, wenn die Fangverbindung eine geeignete Isolierfunktion aufweist. Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Fangverbindungen tragen alle einen Biotinrest als Isolierfunktion. Die extrem stabile, nicht-kovalente Bindung, die Biotin mit dem Protein Streptavidin eingeht, kann z.B. durch Verwendung streptavidinbeschichteter Magnetpartikel für die Isolierung der zuvor mit einer biotinylierten Fangverbindung verknüpften Proteine genutzt werden. Anschließend können die isolierten Proteine massenspektrometrisch analysiert werden. Das Untersuchen von Proteinen unter Verwendung trifunktioneller Fangverbindungen bei nachfolgender massenspektrometrischer Analyse wird auch als CCMS (*capture compound mass spectrometry*) bezeichnet (Köster *et al.*, 2007).

Trifunktionelle Fangverbindungen können statt einer Isolierfunktion aber auch eine Detektierfunktion wie z.B. Fluorophore aufweisen. Die eingefangenen Proteine können dadurch nach chromatographischer oder elektrophoretischer Auftrennung direkt detektiert werden.

Bezüglich Aufbau und Funktion können trifunktionelle Fangverbindungen als „molekulare Angelhaken“ zum hochspezifischen „Angeln“ von Proteinen betrachtet werden. Die Auswahl an möglichen „Ködern“ und möglicher „Beute“ ist dabei extrem groß.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf das Einfangen von Methyltransferasen. Deshalb soll im Folgenden ein kurzer Überblick über diese „Beute“ und den benötigten „Köder“ gegeben werden.

1.4 Fangverbindungen zum Einfangen des Methyloms

Einer Klasse von Enzymen gilt seit einigen Jahren das besondere Interesse der Wissenschaft – den Methyltransferasen (MTasen). Der Grund dafür ist, dass die Übertragung einer winzigen Methylgruppe oft eine große Wirkung nach sich zieht.

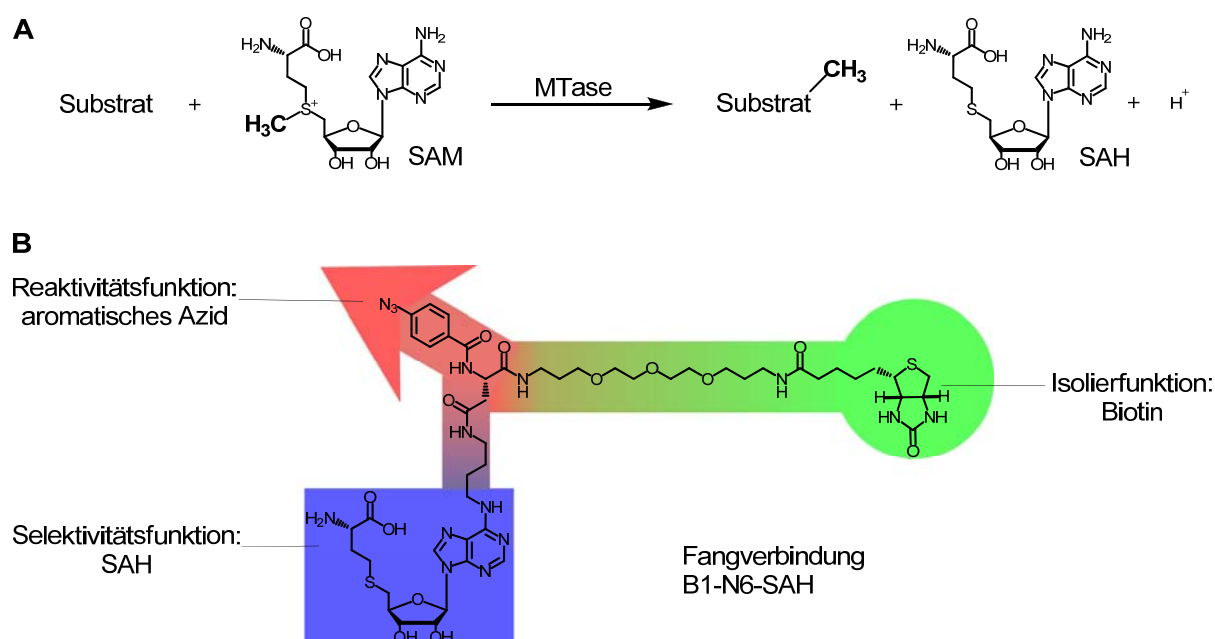
Die wohl bekannteste Funktion übernehmen MTasen bei den Restriktions/Modifikations-Systemen der Prokaryonten (Roberts *et al.*, 2003). Es gibt in Prokaryonten aber auch DNA-MTasen, die andere Aufgaben übernehmen, wie z.B. die Regulation des Zellzyklus oder die Regulation bestimmter Virulenzgene (Heithoff *et al.*, 1999). In Eukaryonten ist die Regulation der Genexpression stark mit der DNA-Methylierung verknüpft (Zilberman *et al.*, 2007). Auch bei der Steuerung von Transpositionseignissen, sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten, spielt die Methylierung von DNA eine Rolle (Miura *et al.*, 2001). Eine andere, wichtige Rolle spielt die DNA-Methylierung bei der postreplikativen DNA-Reparatur. Unmittelbar nach der Replikation ist der neu synthetisierte DNA-Strang noch nicht methyliert, was DNA-Reparatursystemen eine Unterscheidung zwischen Eltern- und Tochter-DNA-Strang ermöglicht.

Es konnte beobachtet werden, dass einige Tumorarten durch veränderte Methylierungsmuster der DNA charakterisiert sind (Feinberg und Volgelstein, 1983), weshalb das Wissen um DNA-Methylierung eine immer größere medizinische Relevanz erlangt. Neuere klinische Studien lassen sogar vermuten, dass Säuger über ein epigenetisches Kurzzeitgedächtnis verfügen, welches durch Umwelteinflüsse beeinflusst werden kann und somit in der Lage ist, individuelle Erfahrungen über einige Generationen zu „vererben“ (Tobi, 2009).

DNA ist jedoch nicht das einzige Substrat für MTasen. Auch mRNA, tRNA und rRNA wird an unterschiedlichen Positionen methyliert (Knippers, 2001). Proteine können an Lysin, Arginin, Glutamin und Histidin *N*-methyliert und an Asparaginsäure und Glutaminsäure *O*-methyliert werden (Walsh, 2006). Immer bedeutender wird momentan die Untersuchung von Histon-Methylierungen und anderen Histon-Modifikationen. Diese steuern nicht nur den Zustand des Chromatins im Zellkern sondern haben auch direkten Einfluss auf die Genexpression (Strahl und Allis, 2000). Neben den DNA- RNA- und Protein-MTasen gibt es noch eine Reihe von Kleinmolekül-MTasen, die an der Synthese verschiedener niedermolekularer Verbindungen beteiligt sind.

Fast allen MTasen ist gemeinsam, dass sie die Methylgruppe ausgehend vom Kofaktor *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) auf die jeweiligen Substrate übertragen. Dabei entsteht neben dem methylierten Substrat noch der demethylierte Kofaktor *S*-Adenosyl-L-homocystein

(SAH). Um eine trifunktionelle Fangverbindung zu kreieren, mit der MTasen aus komplexen Proteingemischen isoliert werden können, bietet es sich an, entweder den Kofaktor SAM oder das Reaktionsprodukt SAH als Selektivitätsfunktion zu verwenden. Mit der trifunktionelle Fangverbindung B1-N6-SAH stand 2005 erstmalig eine Fangverbindung zum Einfangen von MTasen zur Verfügung (Dalhoff *et al.*, 2010). Die Struktur von B1-N6-SAH und das Reaktionsschema einer MTase-katalysierten Methylgruppenübertragung auf ein Substrat sind in Schema 2 dargestellt.



Schema 2: Reaktionsschema einer MTase-katalysierten Methylgruppenübertragung auf ein Substrat (A) und Struktur der Fangverbindung B1-N6-SAH (B).

B1-N6-SAH besitzt SAH als Selektivitätsfunktion. Prinzipiell hätte auch SAM als Selektivitätsfunktion für eine MTasen-spezifische Fangverbindung benutzt werden können. Allerdings ist die Sulfoniumverbindung SAM in wässrigen Lösungen nicht sehr stabil. Zudem gibt es außer den MTasen noch weitere Enzyme, die SAM als Kofaktor zur Durchführung anderer Reaktionen, wie z.B. für radikalische Reaktionen, benutzen. Ein Beispiel hierfür ist die Biotin Synthase (Berkovitch *et al.*, 2004). Daher ist SAH zum Einfangen von MTasen eine günstigere Selektivitätsfunktion. SAH ist in wässrigen Lösungen sehr stabil und entsteht nur als Reaktionsprodukt bei Methylierungsreaktionen. Lediglich Enzyme, die am SAH-Abbau beteiligt sind, könnten dieses Eventuell noch spezifisch binden. Ein weiterer Vorteil von SAH ist, dass das Kofaktorprodukt allgemein ein guter Produktinhibitor für MTasen ist und somit oft mit hohen Affinitäten an MTasen bindet. Bei B1-N6-SAH ist SAH mit der N6-

Position des Adenosylrests über einen C4-Linker amidisch an das Grundgerüst der Fangverbindung gebunden.

Als Reaktivitätsfunktion verfügt B1-N6-SAH über ein aromatisches Azid, welches Licht mit einer Wellenlänge bis zu 310 nm absorbieren kann (Reiser und Marley, 1968) und dann unter Stickstoffabspaltung ein äußerst reaktives Nitren bildet (Wang *et al.*, 2007). Dieses ist so reaktiv, dass es selbst in C-C oder C-H Bindungen insertieren kann (Torres *et al.*, 1986). Innerhalb weniger ps reagiert dieses zu einem zyklischen Ketenimin weiter (Wang *et al.*, 2007), welches auch noch relativ reaktiv ist und in Wasser nur wenige μ s überdauert (Rizk *et al.*, 2006). Ein aromatisches Azid ist also eine gute, photoaktivierbare Reaktivitätsfunktion, welche mit einem gebundenen Protein effektiv reagieren sollte; Bei ausbleibender Verknüpfung mit einem Zielprotein nach ihrer Aktivierung aber sehr schnell zerfällt.

Als Isolierfunktion trägt B1-N6-SAH einen Biotinrest. Für Isolierungs- und Aufreinigungszwecke ist Biotin ein gut untersuchter und oft verwendeter Affinitätsmarker, da Biotin mit dem Protein Streptavidin eine nicht-kovalente, aber extrem stabile Bindung bilden kann (Avarana *et al.*, 1986).

Die Fangverbindung ist in Wasser verhältnismäßig stabil. Ihre Wasserlöslichkeit beträgt mindestens 1 mmol/l, liegt vermutlich aber noch deutlich über diesem Wert. Eine ausreichende Wasserlöslichkeit ist eine Grundvoraussetzung für die praktische Anwendung einer Fangverbindung, weshalb B1-N6-SAH unter anderem ein Grundgerüst aus Polyethylenglycol und drei Amidgruppen zwischen Reaktivitäts- und Isolierfunktion aufweist.

Die trifunktionellen Fangverbindungen, wie B1-N6-SAH, sind faszinierende neue Werkzeuge in den Händen der Molekularbiologie. Bislang war ihr Potential aber schwer einzuschätzen und ihre Handhabung völlig unbekannt.

2 Zielsetzung

Das Isolieren, Identifizieren und Quantifizieren funktioneller Subproteome durch die Verwendung trifunktioneller Fangverbindungen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse ist eine relativ neue, vielversprechende Technik der Proteomik. Besonders für die Aufklärung der Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten oder Pflanzenschutzmitteln, sowie für die molekularbiologische Grundlagenforschung, birgt sie ein nicht zu unterschätzendes Potential.

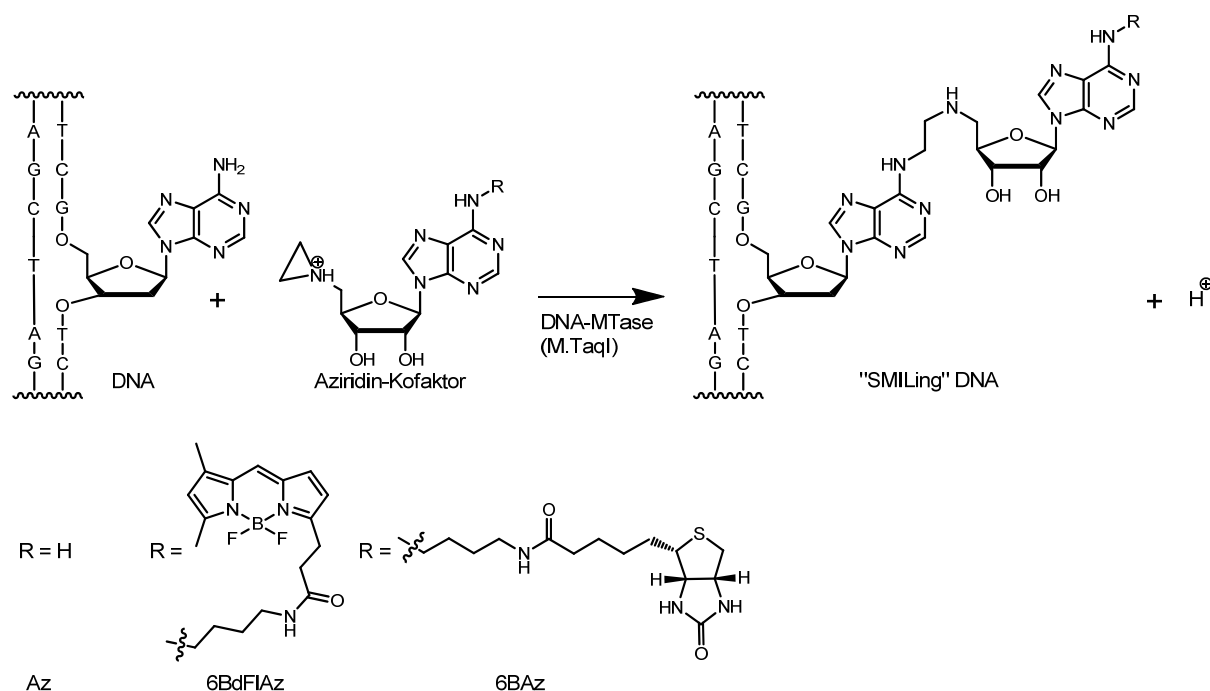
Als 2005 die erste photoaktivierbare Fangverbindung für Methyltransferasen im Arbeitskreis zur Verfügung stand, war noch unklar, auf welche Weise diese eingesetzt werden muss, um zu massenspektrometrisch auswertbaren Proben zu gelangen. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb das Ausarbeiten geeigneter Rahmenbedingungen für den Einsatz trifunktioneller Fangverbindungen. Dies sollte besonders das Austesten einer geeigneten Vorbehandlung des Probenmaterials, geeigneter Pufferbedingungen und effizienter Photoaktivierung, sowie die Maximierung der Ausbeute an spezifisch eingefangenen Proteinen und eine Minimierung unerwünschter Nebenreaktionen umfassen.

Als zweites Ziel sollte die neue Technik am Modellorganismus *E. coli* erprobt werden, um damit einerseits den Nachweis ihrer Anwendbarkeit zu erbringen und außerdem ihre Möglichkeiten auszutesten. Die Isolierung des Methyloms, also der Gesamtheit aller Methyltransferasen dieses Organismus, stellte hierbei eine geeignete Herausforderung dar, da diese Proteine weder extrem gut an ihren Kofaktor binden, noch besonders stark expremiert werden. Das Resultat sollte anschließend mit den Ergebnissen anderer Techniken zur Proteomanalyse verglichen werden. Außerdem sollten auch eukaryontische Methyltransferasen aus pflanzlichen und tierischen Zelllysaten isoliert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Aktivitätsbasierte Substrat- und Proteinprofilierung mit Aziridin-Kofaktoren

Eine Sonderform des aktivitätsbasierten Proteinprofiling basiert auf der SMILing DNA Technologie (*Sequence-specific Methyltransferase-Induced Labelling of DNA*) mit Aziridin-Kofaktoren (Pljevaljcic *et al.*, 2004). Bei den Aziridin-Kofaktoren handelt es sich um synthetische SAM-Analoga, die statt des Methionylrests eine Aziridiningruppe aufweisen. Der Adenosylteil dieser Aziridin-Kofaktoren kann unterschiedlichste Modifikationen aufweisen, wie z.B. Fluorophore (Pljevaljcic *et al.*, 2003 oder Schmidt *et al.*, 2008) oder Affinitätsmarkierungen wie Biotin (Wilkinson *et al.*, 2008).



Schema 3: Sequenzspezifische, MTasen-katalysierte Übertragung von Aziridin-Kofaktoren auf die Zielposition (in diesem Fall die N6-Position von Adenin mit M.TaqI) innerhalb der DNA. Die Aziridin-Kofaktoren können an verschiedenen Positionen des Adeninteils Modifikationen aufweisen (im aufgeführten Fall in N6-Position). Dabei können unterschiedliche Modifikationen benutzt werden, wie z.B. der Fluorophor Bodipy FI bei 6BdFIAz oder die Affinitätsmarkierung Biotin bei 6BAz.

Aus Schema 3 ist ersichtlich, dass bei der durch MTasen katalysierten Reaktion zwischen einem Aziridin-Kofaktor und der DNA nicht wie bei einer normalen Methylierungsreaktion nur ein kleiner Teil des Kofaktors auf die DNA übertragen wird (vgl. Schema 2), sondern der

gesamte Kofaktor, inklusive eventueller Modifikationen mit der DNA kovalent gekuppelt wird.

Bereits früher konnte dabei beobachtet werden, dass einige MTasen nach einer solchen Reaktion eine sehr feste, nicht-kovalente Bindung mit der modifizierten DNA eingehen. Die Bindung kann so stabil sein, dass ein solcher Komplex aus modifizierter DNA und MTase über Anionenaustausch HPLC aufgereinigt werden kann (Schmidt, 2004). Da die DNA-MTase dabei praktisch auf der modifizierten DNA gefangen ist, wurde das Phänomen als *trapping* bezeichnet. Der Mechanismus beim *trapping* ist jedoch ganz anders als bei der klassischen aktivitätsbasierten Proteinprofilierung, da beim *trapping* keine kovalente Verknüpfung zwischen dem modifizierten Kofaktor und dem Zielprotein entsteht. Trotzdem kann *trapping* dazu genutzt werden bestimmte Proteine sehr spezifisch aus komplexen Proteingemischen zu isolieren, wie das folgende Beispiel zeigen soll.

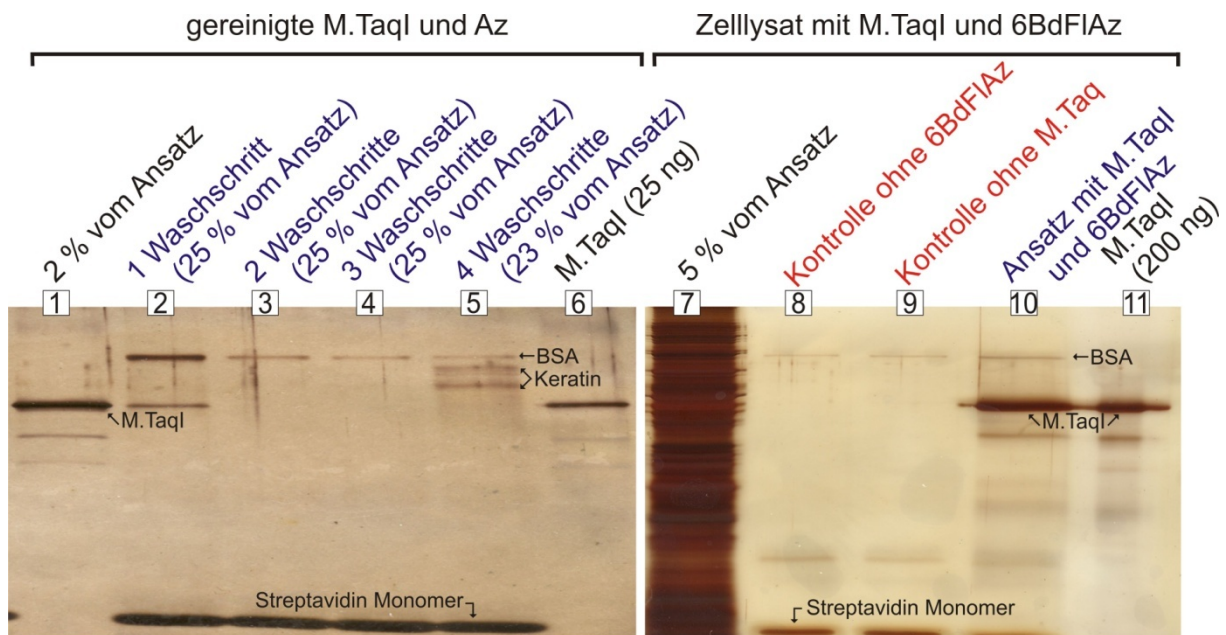


Abb. 3: Immobilisierung von M.TaqI mit Aziridin-Kofaktoren. Links: Duplex-DNA 14+TCGA-Bio/14-TCGA (500 nM), Aziridin-Kofaktor Az (100 μ M) und M.TaqI (400 nM) wurden in 100 μ l Ex-Vivo-SMILing-Puffer 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 100 μ l 2 x B&W Puffer und 400 μ g Magnetpartikel (Dynabeads® M-280 Streptavidin) versetzt und bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Schütteln 30 min inkubiert. Danach wurde die Probe viermal mit 200 μ l B&W Puffer gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift ein Viertel der Magnetpartikel für die spätere Analyse abgenommen wurde.

Rechts: Duplex-DNA 14+TCGA-Bio/14-TCGA (500 nM), Aziridin-Kofaktor 6BdFIAz (100 μ M) und Zelllysate von *E. coli* ER2276-pA1 (1,5 mg/ml) wurden in 100 μ l Ex-Vivo-SMILing-Puffer 60 min bei 37°C inkubiert. Ein Kontrollansatz wurde ohne 6BdFIAz durchgeführt, ein weiterer Kontrollansatz mit Zelllysate von *E. coli* ER2267 (ohne M.TaqI). Anschließend wurden die Proben mit 100 μ l 2 x B&W Puffer und 500 μ g Magnetpartikel (Dynabeads® M-280 Streptavidin) versetzt und bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Schütteln 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe viermal mit 200 μ l B&W Puffer gewaschen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In Abb. 3 ist das Ergebnis zweier Experimente dargestellt, bei dem die DNA-MTase M.TaqI mit Hilfe von Aziridin-Kofaktoren, biotinylierter Duplex-DNA und streptavidinbeschichteten Magnetpartikeln spezifisch isoliert werden sollte. Das linke Gel lässt deutlich erkennen, dass die verwendete M.TaqI durch mit dem Kofaktor Az modifizierte Duplex-DNA kaum isoliert werden kann. Bereits nach zwei Waschschritten konnte auf den Magnetpartikeln keine M.TaqI mehr nachgewiesen werden (Spur 3). *Trapping* von M.TaqI ist mit diesem Kofaktor also nicht möglich, da die Bindung zwischen M.TaqI und der mit Az modifizierten Duplex-DNA zu schwach ist. Anders ist dies bei Verwendung des Kofaktors 6BdFlAz. Die im rechten Gel aufgetrennten Proben wurden viermal gewaschen. Im Unterschied zum linken Gel wurde bei diesem Experiment aber keine gereinigte M.TaqI, sondern Zelllysate eines M.TaqI exprimierenden *E. coli* Stamms eingesetzt. Wie aus Spur 10 ersichtlich ist, konnten mit 6BdFlAz große Mengen M.TaqI sehr spezifisch aus diesem komplexen Proteingemisch isoliert werden. Aus zwei Kontrollansätzen, einer ohne den Kofaktor 6BdFlAz (Spur 8) und einer mit einem Zelllysate eines nicht M.TaqI exprimierenden *E. coli* Stamms (Spur 9), wurden fast keine Proteine isoliert. Dies zeigt, dass M.TaqI mit dieser Methode sehr spezifisch isoliert werden kann.

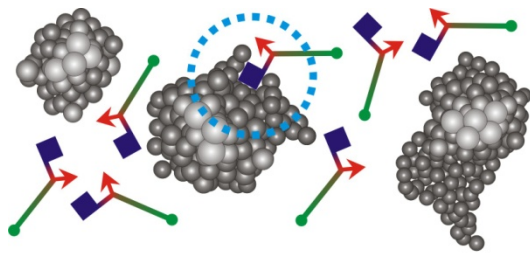
Die Methode hat jedoch auch einige gravierende Nachteile. Das Beispiel des unmodifizierten Aziridin-Kofaktors Az zeigt, dass nicht jeder Kofaktor, der auf das Zielsubstrat (in diesem Fall Duplex-DNA) übertragen wird, auch zu einem Produkt führt, zu welchem das betreffende Enzym auch eine genügend starke Bindungsaffinität aufweist. Das Fehlen einer kovalenten Verknüpfung zwischen der für die Isolierung herangezogenen Komponente (in diesem Fall biotinylierte Duplex-DNA) und dem zu isolierenden Enzym stellt einen deutlichen Unsicherheitsfaktor dar.

Außerdem ist nicht unbedingt jedes der potentiellen Zielproteine in der Lage das verwendete Kofaktoranalogen umzusetzen. Die in verschiedensten coliformen Bakterien vorkommende Dam MTase (Heithoff *et al.*, 1999) kann die Aziridin-Kofaktoren nicht mit der DNA koppeln. Der größte Nachteil, sowohl beim *trapping* als auch bei der klassischen aktivitätsbasierten Proteinprofilierung, ist aber die Tatsache, dass ein geeignetes, reaktives Kofaktor- oder Substratanalogen verfügbar sein muss. Dies stellt aber einen seltenen Glücksfall dar. Deshalb wird zur spezifischen Isolierung von Proteinen dringend eine Methodik benötigt, die die Ausbildung einer hinreichend starken Bindung zum Zielprotein unabhängig von dessen katalytischen Eigenschaften ermöglicht.

3.2 Optimierung der Bedingungen für das Einfangen von gereinigten MTasen durch trifunktionelle Fangverbindungen

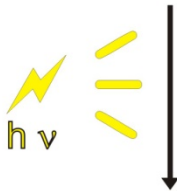
Die naheliegende Vorgehensweise bei der Verwendung trifunktioneller Fangverbindungen zur Isolierung funktioneller Subproteome ist der Einsatz frei in Lösung befindlicher Fangverbindung. Alle in dieser Arbeit verwendeten Fangverbindungen sind relativ gut wasserlöslich. Eine minimale Wasserlöslichkeit von 1 mM wurde für jede dieser Fangverbindungen experimentell bestätigt. Eine noch deutlich höhere Wasserlöslichkeit ist wahrscheinlich, für praktische Anwendungen aber nicht von Bedeutung.

Schema 4 (nächste Seite) gibt einen Überblick über die Vorgehensweise bei der Isolierung eines funktionellen Subproteoms aus einem Zelllysät.



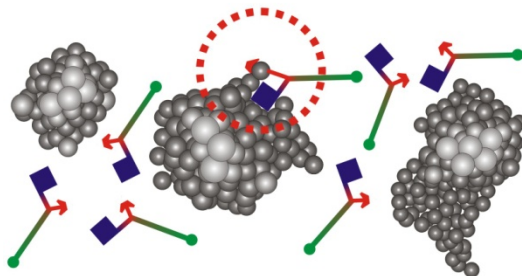
Selektion:

Die Fangverbindung bindet mit ihrer Selektivitätsfunktion (blau) spezifisch, jedoch nicht-kovalent an die Zielproteine (blauer Kreis).



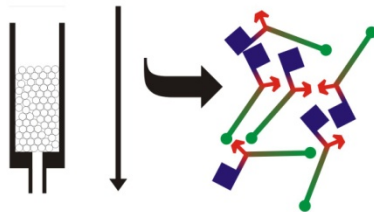
Photoaktivierung:

Durch Licht wird die Reaktivitätsfunktion (rot) der Fangverbindung aktiviert.



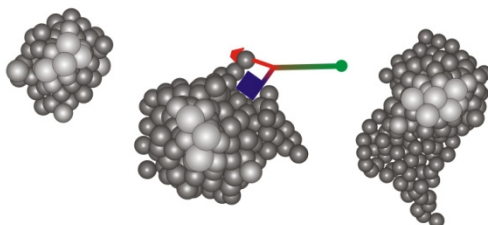
Photoverknüpfung:

Nach der Photoaktivierung der Reaktivitätsfunktion gehen die zuvor an ein Zielprotein gebundenen Fangverbindungsmoleküle mit dem Zielprotein eine kovalente Bindung ein (roter Kreis).

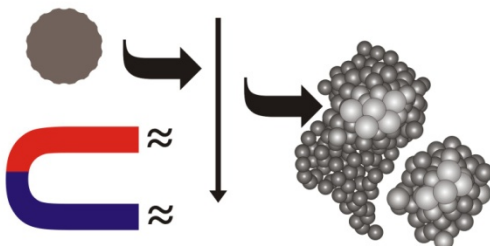


Entfernen überschüssiger Fangverbindung:

Fangverbindungsmoleküle, die nicht mit einem Protein reagiert haben werden durch Gel-permeationschromatographie abgetrennt.

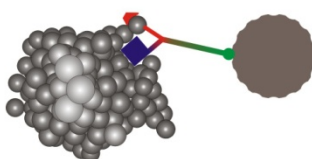


Danach sind noch alle Proteine vorhanden, aber nur einige sind kovalent mit einer Fangverbindung verknüpft



Isolierung:

Streptavidinbeschichtete Magnetpartikel (braun) binden an die Isolierfunktion der Fangverbindung (grün). Alle anderen Proteine werden durch Waschschrte abgetrennt.



Analyse:

Die isolierten Proteine können z.B. durch Massenspektrometrie oder Gelelektrophorese identifiziert und quantifiziert werden.

Schema 4: Funktionsbasierte Isolierung von Subproteomen mit Hilfe von in Lösung befindlichen trifunktionellen Fangverbindungen.

Die Selektion findet bereits gleich zu Beginn dadurch statt, dass die Fangverbindung eine sehr spezifische, nicht-kovalente Bindung mit der zur Selektivitätsfunktion passenden Bindetasche der Zielproteine eingeht (blauer Kreis). Die in Lösung befindliche Fangverbindung verhält sich dabei wie ein zum natürlichen Substrat analoger, kompetitiver Inhibitor.

Im nächsten Schritt erfolgt die Photoaktivierung der Fangverbindung, woraufhin diese eine Photoverknüpfung mit dem Zielprotein eingeht (roter Kreis). Aus der reversiblen, nicht-kovalenten Bindung ist damit eine irreversible, kovalente Bindung geworden.

Der Überwiegende Teil der Fangverbindung befindet sich während der Photoaktivierung frei in Lösung da die Zielproteine im Vergleich zur Fangverbindung normalerweise in deutlichem Unterschuss vorliegen. Diese Fangverbindungsmoleküle reagieren nach der Photoaktivierung nicht mit einem der Zielproteine sondern mit Wasser oder einer der Pufferkomponenten. Die überschüssige Fangverbindung muss durch Gelfiltration abgetrennt werden, da sie im Folgenden Schritt zu Problemen führen kann.

Zur Isolierung der kovalent mit der Fangverbindung verknüpften Proteine werden magnetische, mit Streptavidin beschichtete Partikeln eingesetzt. Das Streptavidin auf der Partikeloberfläche kann mit Biotin, welches die Isolierfunktion der Fangverbindungen darstellt, eine nicht-kovalente, aber dennoch extrem feste Bindung eingehen. Von ganz wenigen, natürlicherweise biotinylierten Proteinen abgesehen binden nur solche Proteine an diese Magnetpartikel, die zuvor eine kovalente Verknüpfung mit der Fangverbindung eingegangen sind. Die restlichen Proteine können durch verschiedene Waschschrte praktisch vollständig entfernt werden.

Am Ende sind auf der Oberfläche der Magnetpartikel die Proteine immobilisiert, die zuvor spezifisch an die Selektivitätsfunktion der Fangverbindung gebunden hatten. Das extrem komplexe Zelllysate wurde auf ein bezüglich der gewählten Selektivitätsfunktion der Fangverbindung spezifisches Subproteom reduziert, welches z.B. durch elektrophoretische oder massenspektrometrische Verfahren analysiert werden kann.

3.2.1 Einfangen von M.TaqI mit der trifunktionellen Fangverbindung B1-N6-SAH

Mit der Fangverbindung B1-N6-SAH stand zum ersten Mal eine trifunktionelle Fangverbindung für das Einfangen von SAM- oder SAH-bindenden Proteinen zur Verfügung.

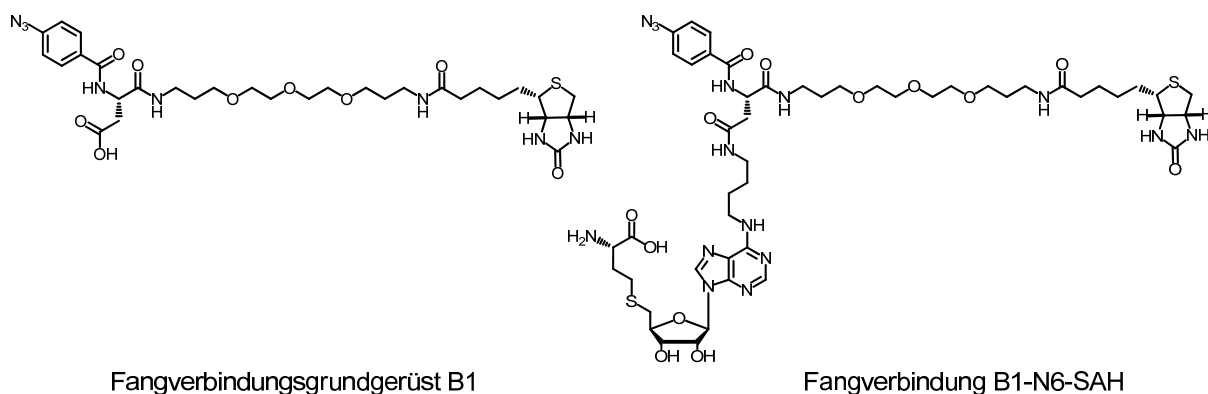


Abb. 4: Strukturformeln des Fangverbindungsgrundgerüsts B1 und der Fangverbindung B1-N6-SAH.

Im Gegensatz zu dem oben aufgeführten Aziridin-Kofaktor sollte sie eine kovalente Verknüpfung mit dem gewünschten Zielprotein eingehen und damit eine extrem stringente Isolierung des Zielproteins von anderen Proteinen, Nukleinsäuren und weiteren Zellbestandteilen ermöglichen. Um die Funktion dieses neuen Verfahrens zu demonstrieren, wurden verschiedene Experimente mit der adeninspezifischen DNA-MTase M.TaqI durchgeführt, die in aufgereinigter Form zur Verfügung stand.

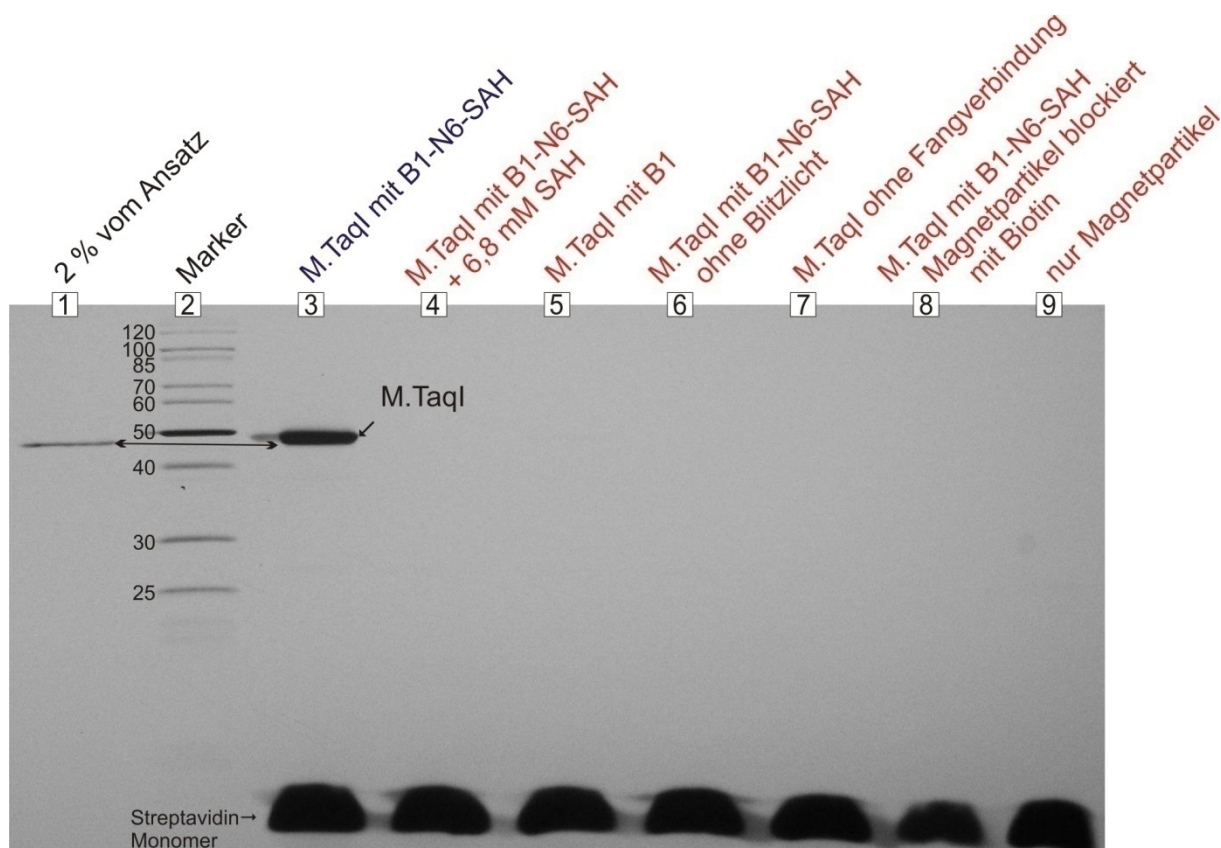


Abb. 5: Einfangen von M.TaqI mit der Fangverbindung B1-N6-SAH. Das Experiment wurde durchgeführt mit aufgereinigter M.TaqI (1 μ M) und B1-N6-SAH (10 μ M) bzw. B1 (10 μ M) als Kontrolle. Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Abb. 5 zeigt das Ergebnis eines typischen Einfangexperiments mit M.TaqI und der Fangverbindung B1-N6-SAH. In Spur 1 sind 2 % des gesamten Ansatzes vor der Bestrahlung aufgetragen, in den Spuren 3 – 9 jeweils 100 % der Einfangexperimente. In jedem Ansatz befanden sich 100 pmol (4,8 µg) M.TaqI. Die Bande in Spur 1 entspricht also 2 pmol (0,1 µg) M.TaqI. In Spur 3 ist eine analoge, aber deutlich stärkere Bande zu sehen. Hierbei handelt es sich um kovalent an B1-N6-SAH gebundene M.TaqI. Man beachte, dass die kovalent mit B1-N6-SAH modifizierte M.TaqI in Spur 3 aufgrund des um ca. 1,1 kDa größeren Molekulargewichts im Gel nicht ganz so weit gelaufen ist wie die M.TaqI in Spur 1 (vgl. Doppelpfeil). Bei den sehr dicken Banden am unteren Rand des Gels handelt es sich um Streptavidin Monomer (Avarana *et al.*, 1986), welches unter den harschen Bedingungen der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE von den Magnetpartikeln eluiert wird.

Durch einen Vergleich der M.TaqI-Banden in den Spuren 1 und 3 lässt sich die Ausbeute an M.TaqI grob auf 10 – 20 % der eingesetzten Menge abschätzen. Allerdings muss eine derartige Quantifizierung kritisch betrachtet werden, da zwischen Proteinmenge und Bandenintensität bei Silberfärbung kein linearer Zusammenhang besteht (Merril *et al.*, 1984).

In den Spuren 4 – 9 sind die Ergebnisse einiger Kontrollansätze zu sehen. Sie sollen die Spezifität der Methode belegen. So kann die Fangverbindung B1-N6-SAH z.B. mit einem Überschuss an freiem SAH aus der SAH-Bindetasche des Enzyms verdrängt werden. Als Folge kommt es bei Bestrahlung mit Blitzlicht nicht mehr zu einer kovalenten Verknüpfung zwischen Enzym und Fangverbindung (Spur 4). Auch ohne die SAH-Selektivitätsfunktion am Fangverbindungsgrundgerüst B1 kommt es nicht zu einer kovalenten Verknüpfung mit dem Enzym (Spur 5). Wenn die Proben vor der Isolierung durch die Magnetpartikel nicht mit einer Blitzlampe bestrahlt wurde, kann ebenfalls keine M.TaqI isoliert werden (Spur 6). Dies zeigt deutlich, dass die isolierte M.TaqI in Spur 3 tatsächlich kovalent an die Fangverbindung gebunden ist. Würde sie über die nicht-kovalente Bindung an die SAH-Gruppen der Fangverbindung auch auf den Magnetpartikeln immobilisiert werden, so wäre dieser Effekt ohne Bestrahlung gleichermaßen zu beobachten. Auch eine direkte Wechselwirkung zwischen den Magnetpartikeln und M.TaqI kann ausgeschlossen werden, da beim Fehlen der Fangverbindung ebenfalls keine M.TaqI isoliert werden kann (Spur 7). Wenn die Biotin-Bindestellen des Streptavidins auf der Oberfläche der Magnetpartikel bereits vor der Inkubation mit der kovalent an die Fangverbindung gebundenen M.TaqI von Biotin belegt sind, dann kommt es zu keiner zusätzlichen Bindung von biotinylierter M.TaqI oder einem Austausch des zuvor gebundenen Biotins durch biotinylierte M.TaqI (Spur 8). Die MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel selber erzeugen auf dem Gel genau eine Bande, die allerdings

sehr dick ist (Spur 9). Das Auftreten dieser aus monomerem Streptavidin bestehenden Bande ist wegen der für die SDS-PAGE nötigen Probenvorbereitung unvermeidlich. Um die an Streptavidin gebundenen biotinylierten Proteine wieder frei zu setzen, müssen die Proben in Gegenwart von SDS auf 100°C erhitzt werden. Dabei zerfällt das homotetramere Streptavidin in seine Untereinheiten. Da das Streptavidin nur mit einer Untereinheit kovalent an die Oberfläche der Magnetpartikel gebunden ist (Produktbeschreibung des Herstellers), können sich drei der vier Untereinheiten von den Magnetpartikeln lösen.

Die oben aufgeführten Ergebnisse demonstrieren deutlich das Funktionsprinzip der neuen, auf trifunktionellen Fangverbindungen beruhenden Technik. Obwohl sich in den Ansätzen sowohl M.TaqI als auch Magnetpartikel befanden, konnte eine Immobilisierung auf der Partikeloberfläche nur erfolgen, wenn alle nötigen Rahmenbedingungen erfüllt waren:

1. Es muss eine Fangverbindung mit passender Selektivitätsfunktion (in diesem Fall SAH) vorhanden sein.
2. Es sollten keine potentiellen Kompetitoren vorliegen.
3. Es muss eine genügende Menge Lichtenergie geeigneter Wellenlänge appliziert werden, damit es zu einer Photoverknüpfung zwischen Zielprotein und Fangverbindung kommt.
4. Es müssen Streptavidin-ummantelte Magnetpartikel mit freier Bindekapazität für die biotinylierten Zielproteine zur Verfügung stehen.

3.2.2 Einfangen der MTasen M.HhaI, Clr4 und Trm4 mit B1-N6-SAH – ein Vergleich

Mit der trifunktionellen Fangverbindung B1-N6-SAH kann die adeninspezifische DNA-MTase M.TaqI spezifisch biotinyliert werden, um sie anschließend auf Streptavidinummantelten Magnetpartikeln zu immobilisieren. Dies konnte mit dem oben aufgeführten Experiment (Kapitel 3.2.1) gezeigt werden. Da die angewandte Methode aber zur Isolierung vollständiger funktioneller Subproteome – im Fall der SAH-Fangverbindungen des Methyloms – eingesetzt werden soll, müssen sich andere MTasen ebenfalls isolieren lassen.

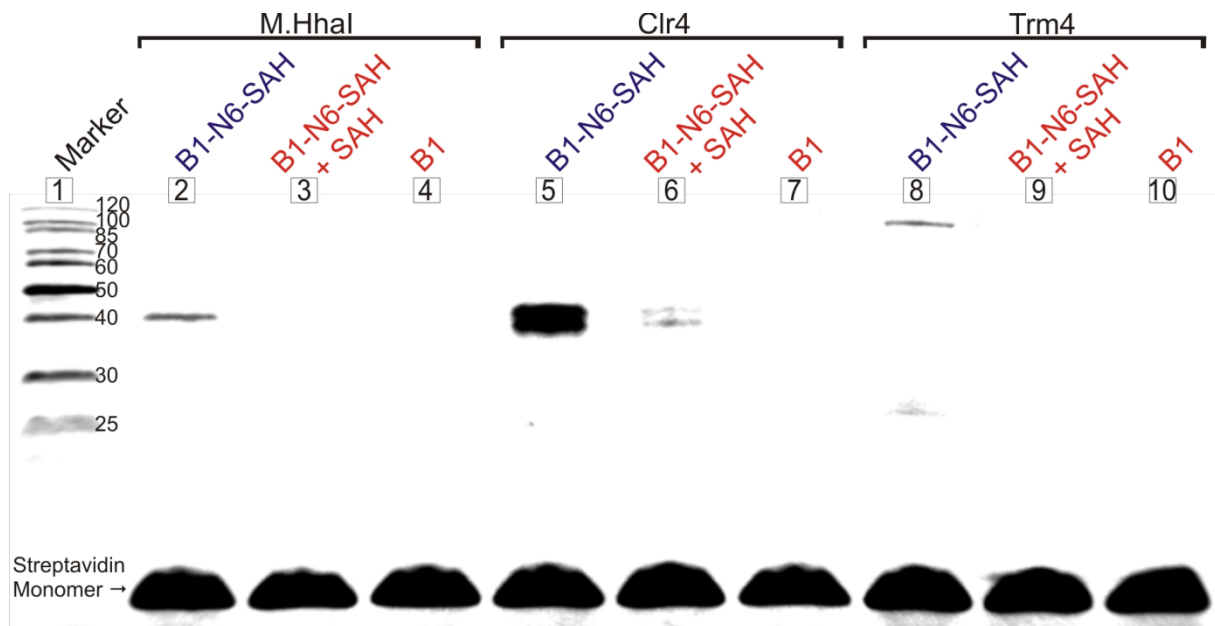


Abb. 6: Einfangen der DNA-MTasen M.HhaI, der Protein-MTase Clr4 und RNA-MTase Trm4 mit der Fangverbindung B1-N6-SAH. Für das Experiment wurden aufgereinigte Enzyme verwendet (jeweils 1 μ M). Eingesetzt wurde die Fangverbindung B1-N6-SAH bzw. das entsprechende Fangverbindungsgrundgerüst B1 (jeweils 10 μ M). Für Verdrängungskontrollen wurden Ansätze zusätzlich mit SAH (6,8 mM) versetzt. Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Eine breite Einsetzbarkeit des neuen Einfangverfahrens wurde mit der DNA-Cytosin-C4-DNA-MTase M.HhaI (Klimasauskas *et al.*, 1994), der Histon H3-Lysin9-MTase Clr4 (Rea *et al.*, 2000) und der tRNA:m⁵C-MTase Trm4 (Motorin und Grosjean, 1999) überprüft. Dabei wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie im oben aufgeführten Experiment mit M.TaqI (10 μ M B1-N6-SAH bzw. B1, 1 μ M der jeweiligen MTase, 6,8 mM SAH in den Verdrängungskontrollen und 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel für das Isolieren).

Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 6 dargestellt. Es ist erkennbar, dass nur bei Verwendung der Fangverbindung B1-N6-SAH und nur in Abwesenheit des Kompetitors SAH Proteine isoliert werden konnten (Spuren 2, 5 und 8). Dies entspricht den Erwartungen, da es zu keiner Vorbindung zwischen Fangverbindung und MTase kommen kann, wenn der Fangverbindung die Selektivitätsfunktion SAH fehlt (Spuren 4, 7 und 10). Auch das Vorhandensein eines Überschusses an freiem SAH verhindert eine Vorbindung zwischen MTase und Fangverbindung, da die SAH-Selektivitätsfunktion der Fangverbindung durch das freie SAH aus der Bindetasche der betreffenden MTase kompetitiv verdrängt wird (Spuren 3, 6 und 9).

Bei der Betrachtung des Gels fällt allerdings sofort auf, dass die Ausbeute an isolierter MTase bei den drei eingesetzten Enzymen deutlich variiert. Zwar ist eine absolute Quantifizierung bei diesem Gel wegen des Fehlens eines Mengenstandards nicht möglich, aber ein Vergleich der Banden untereinander ist – abgesehen von den der Silberfärbetechnik anhaftenden Beschränkungen hinsichtlich der Linearität – durchaus möglich. Die Ausbeute an isoliertem Enzym ist bei M.HhaI demnach ca. zehnmal kleiner als die der als Doppelbande auftretenden Ctr4. Die Ausbeute der Trm4 ist noch kleiner.

3.2.3 Einfluss der Konzentration der Fangverbindung auf die Ausbeute an isoliertem Protein

Beim selektiven Einfangen von Enzymen durch trifunktionelle Fangverbindungen ist eine spezifische, nicht-kovalente Vorbindung zwischen Enzym und Selektivitätsfunktion der Fangverbindung eine Grundvoraussetzung. Diese Vorbindung wird dann durch die Photoverknüpfung zwischen Enzym und Fangverbindung kovalent fixiert.

Um den Zusammenhang zwischen nicht-kovalenter Vorbindung und Ausbeute genauer zu untersuchen, wurden gleichzeitig mehrere MTasen mit einer Fangverbindung in unterschiedlichen Konzentrationen eingefangen.

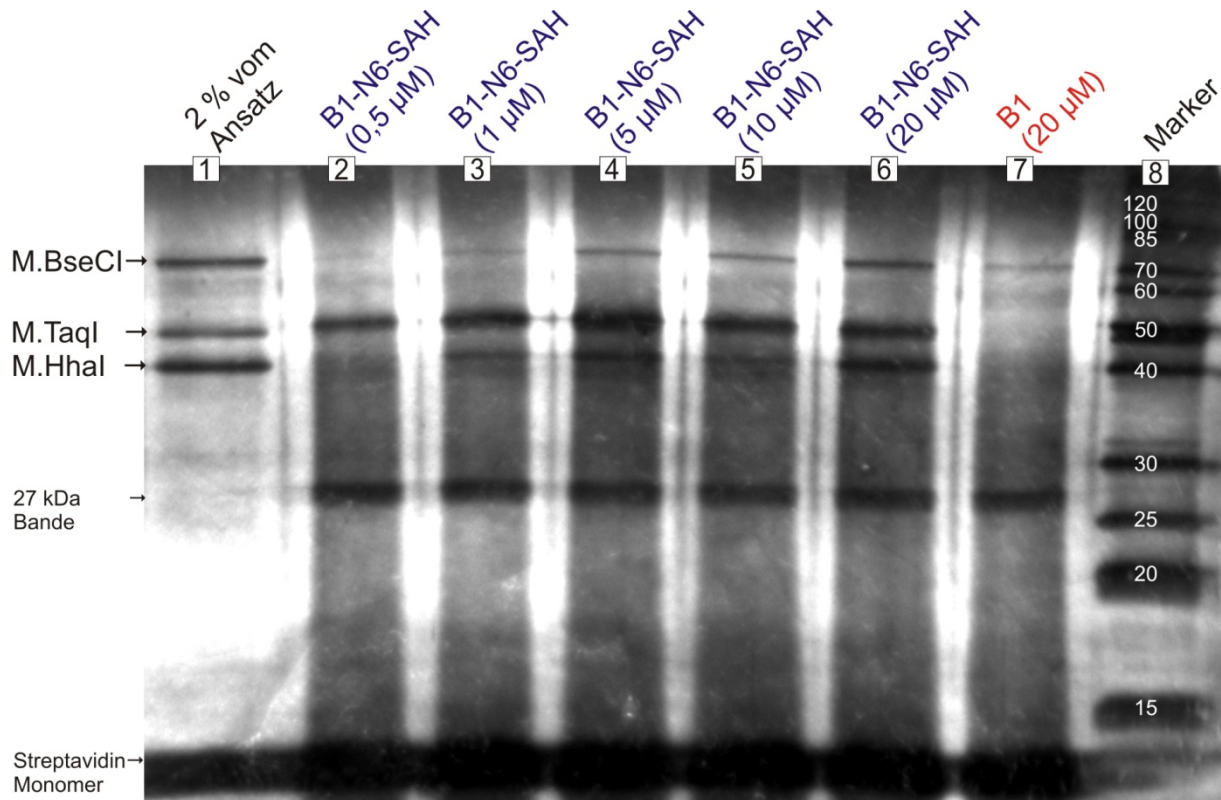


Abb. 7: Einfangen der DNA-MTasen M.BseCI, M.TaqI und M.HhaI bei unterschiedlichen Konzentrationen der Fangverbindung B1-N6-SAH. Für das Experiment wurden aufgereinigte Enzyme verwendet (jeweils 0,5 µM). Die Konzentration der Fangverbindung B1-N6-SAH wurde variiert (0,5 µM bis 20 µM). Ein Kontrollexperiment wurde unter Verwendung des Fangverbindungsgrundgerüts B1 (20 µM) durchgeführt. Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 µl und für das Isolieren wurden jeweils 200 µg MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In Abb. 7 ist das Ergebnis von Einfangexperimenten mit M.BseCI (Rina und Bouriotis, 1993), M.TaqI, M.HhaI und der Fangverbindung B1-N6-SAH in unterschiedlichen Konzentrationen gezeigt. Ein Kontrollexperiment wurde unter Verwendung des Fangverbindungsgrundgerüts B1 durchgeführt. Während die Konzentration der MTasen in allen Ansätzen identisch war (0,5 µM), variierte die Konzentration der Fangverbindung von 0,5 µM bis 20 µM. Dabei konnte mit einer B1-N6-SAH-Konzentration von 0,5 µM lediglich M.TaqI in nennenswerten Mengen eingefangen werden (Spur 2). Mit steigender B1-N6-SAH-Konzentration konnten dann auch M.HhaI und M.BseCI eingefangen werden. Besonders auffallend ist, dass bei M.TaqI die maximale Ausbeute bereits bei einer B1-N6-SAH-Konzentration von 5 µM erreicht ist (Spur 4) und auch nicht mehr weiter ansteigt, während in diesem Experiment die Ausbeute an M.HhaI und M.BseCI bei einer B1-N6-SAH-Konzentration von 20 µM am größten war (Spur 6). Solche Konzentration an Fangverbindung führten bei M.BseCI jedoch schon zu Ausbildung eines unspezifischen Hintergrunds (Spur 7). Eigentlich sollte mit der

Kontroll-Fangverbindung B1 keine der eingesetzten MTasen eingefangen werden können, da die Selektivitätsfunktion SAH fehlt.

Zudem ist auf diesem Gel eine weitere Bande bei ca. 27 kDa zu erkennen. Diese Bande tauchte auf sehr vielen Gelen in unterschiedlichen Intensitäten auf. Vermutlich handelt es sich bei dem betreffenden Protein um dimeres Streptavidin. Allerdings wurde dies nicht durch Ausschneiden der Bande und anschließende massenspektrometrische Untersuchung überprüft, so dass diese Bande im Folgenden lediglich mit „27 kDa Bande“ bezeichnet sein wird.

Das Experiment zeigt deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen Ausbeute an spezifisch eingefangenen Proteinen und der Konzentration der eingesetzten Fangverbindung besteht. Dies entspricht den Erwartungen, da eine spezifische, nicht-kovalente Verbindung zwischen Enzym und Selektivitätsfunktion der Fangverbindung eine Grundvoraussetzung für eine spätere spezifische Photoverknüpfung ist. Diese Verbindung ist aber besonders im Konzentrationsbereich unterhalb der jeweiligen Dissoziationskonstante (K_D) stark konzentrationsabhängig. Für die spezifische, nicht-kovalente Verbindung zwischen Enzym (E) und Kofaktor bzw. Substrat (S) gilt:

$$K_D = \frac{([E_0] - [ES]) \times ([S_0] - [ES])}{[ES]}$$

Aufgelöst nach [ES] ergibt sich:

$$[ES] = \frac{[E_0] + [S_0] + K_D}{2} + \sqrt{\left(\frac{[E_0] + [S_0] + K_D}{2}\right)^2 - [E_0] \times [S_0]}$$

Dabei ist:

K_D	:	Dissoziationskonstante
$[E_0]$	:	eingesetzte Enzymkonzentration
$[S_0]$	:	eingesetzte Substratkonzentration
$[ES]$	:	Konzentration des Enzym-Substrat Komplexes im Gleichgewichtszustand

Der gleiche mathematische Zusammenhang würde aber auch für eine unspezifische, nicht-kovalenten Verbindung zwischen Enzym und Fangverbindung gelten. Diese könnte z.B. auf ionischen oder polaren Wechselwirkungen beruhen. Für eine solche unspezifische, nicht-kovalente Verbindung ist aber eine deutlich größere Dissoziationskonstante anzunehmen.

Der Anteil der Enzyme, der eine spezifische bzw. unspezifische Verbindung mit einer Fangverbindung eingeht, lässt sich berechnen wenn die entsprechenden K_D Werte bekannt sind. Im folgenden Beispiel wurden die Verhältnisse für ein hypothetisches Enzym mit einer

spezifischen Bindungstasche und einer unspezifischen Bindungsstelle simuliert (Abb. 8). Für die Dissoziationskonstante der spezifischen Bindung wurde in diesem Beispiel 5 μM , für die der unspezifischen Bindung 500 μM angenommen. Dabei wurde mit einer Enzymkonzentration von 1 μM gerechnet. Die Substratkonzentration wurde zwischen 1 μM und 100 000 μM variiert.

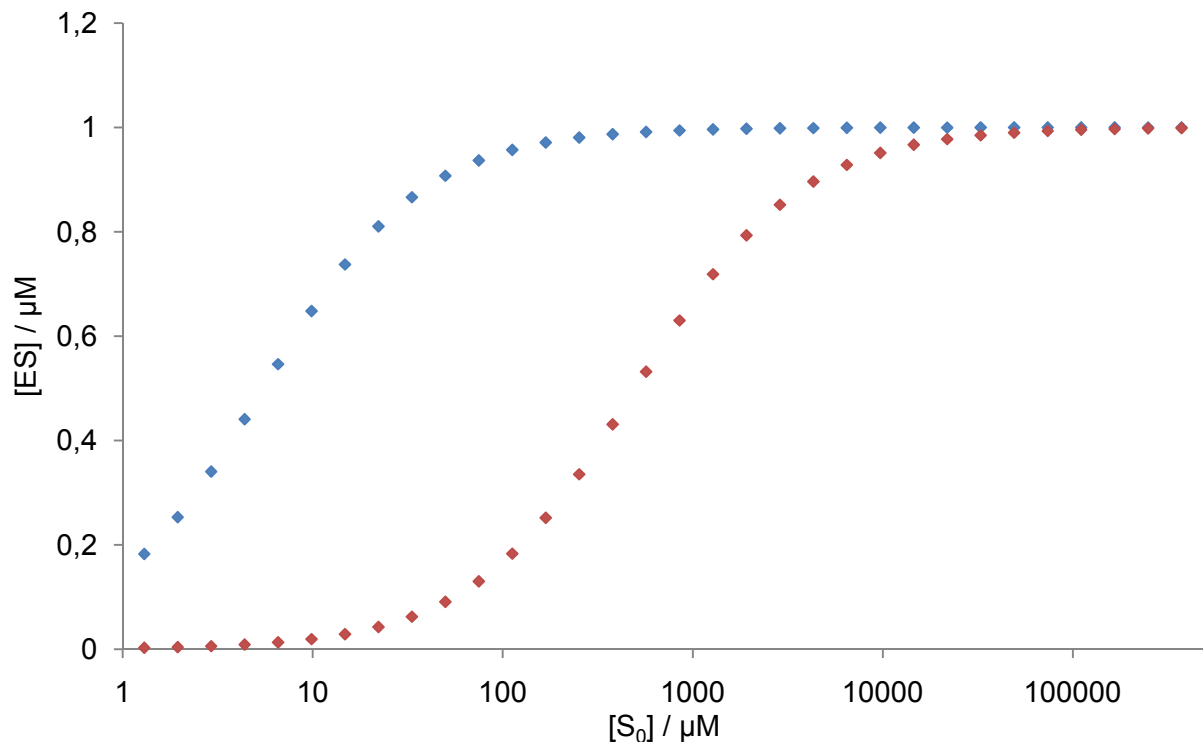


Abb. 8: Konzentration eines Enzym-Substrat-Komplexes [ES] in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration [S₀]. In dieser Simulation bindet ein hypothetisches Enzym (1 μM) ein Substrat spezifisch mit einem K_D -Wert von 5 μM (blau) oder unspezifisch mit einem K_D -Wert von 500 μM (rot).

Bei dem in Abb. 8 dargestellten Beispiel ist der K_D -Wert der unspezifischen Bindung um den Faktor 100 größer als der K_D -Wert der spezifischen Bindung. Der Anteil von Enzym mit spezifisch gebundenem Substrat beträgt bei einer Substratkonzentration von $1 \times K_D$ fast 50 %, bei $2 \times K_D$ ca. 65 % und bei $10 \times K_D$ über 90 %. Bei diesen Substratkonzentrationen liegen die Anteile von Enzym mit unspezifisch gebundenem Substrat lediglich bei 1 %, 2 % bzw. 10 %. Diese Modellrechnung zeigt weiterhin, dass zum spezifischen Einfangen von Enzymen mindestens Fangverbindungskonzentrationen in der Größenordnung zwischen ein- und zehnmal K_D eingesetzt werden sollten. Bei einer Unterschreitung des K_D -Werts sinkt der Anteil von Enzym mit gebundener Fangverbindung drastisch und damit sinkt auch die zu erwartende Ausbeute an spezifisch eingefangenen Enzym. Allerdings sollte eine zu große Fangverbindungskonzentration ebenfalls vermieden werden. Beträgt die

Fangverbindungskonzentration nämlich bereits ein Mehrfaches des spezifischen K_D -Werts, so steigt der Anteil Enzym mit spezifisch gebundener Fangverbindung bei weiterer Konzentrationserhöhung nur noch marginal, während der Anteil Enzym mit unspezifisch gebundener Fangverbindung stark ansteigt.

Die beim spezifischen Einfangen von Enzymen mittels trifunktioneller Fangverbindungen gewählte Fangverbindungskonzentration stellt also prinzipiell einen Kompromiss dar und richtet sich sowohl nach der Stärke der spezifischen Vorbindung als auch nach der Stärke einer eventuell auftretenden unspezifischen Vorbindung. Dabei muss auch erwogen werden, ob die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein maximiert werden soll, oder ob die Spezifität, also das Verhältnis zwischen spezifisch und unspezifisch eingefangenen Enzym möglichst groß sein soll.

Es sind aber auch andere Mechanismen denkbar, die zu einer unspezifischen kovalenten Quervernetzung zwischen Protein und Fangverbindung führen. Es könnte z.B. auch der Fall sein, dass sich die Fangverbindung bei ihrer Photoaktivierung zufällig in unmittelbarer Nähe eines beliebigen Proteins befindet. Sie könnte dann unmittelbar nach ihrer Photoaktivierung mit einem Protein kollidieren und reagieren.

3.2.4 Einfluss des Bestrahlungsintensität auf die Ausbeute an isoliertem Protein

Bei photochemischen Reaktionen kommt dem Licht natürlich eine besondere Bedeutung zu. Dabei muss nicht nur die Wellenlänge des verwendeten Lichts für die Aktivierung der photoreaktiven Verbindung geeignet sein. Auch die eingesetzte Lichtmenge muss ausreichend sein.

Für alle aufgeführten Experimente wurde eine B1600 Studio Blitzlampe (AlienBees) mit einer AWFT14MMUV Blitzröhre (Paul C. Buff Inc.) verwendet. Sie liefert einen ca. 1 ms andauernden Blitz mit einer Energie von 640 Ws, wobei der Hauptteil der Lichtenergie sogar in einer deutlich kleineren Zeitspanne frei wird (Produktbeschreibung des Herstellers).

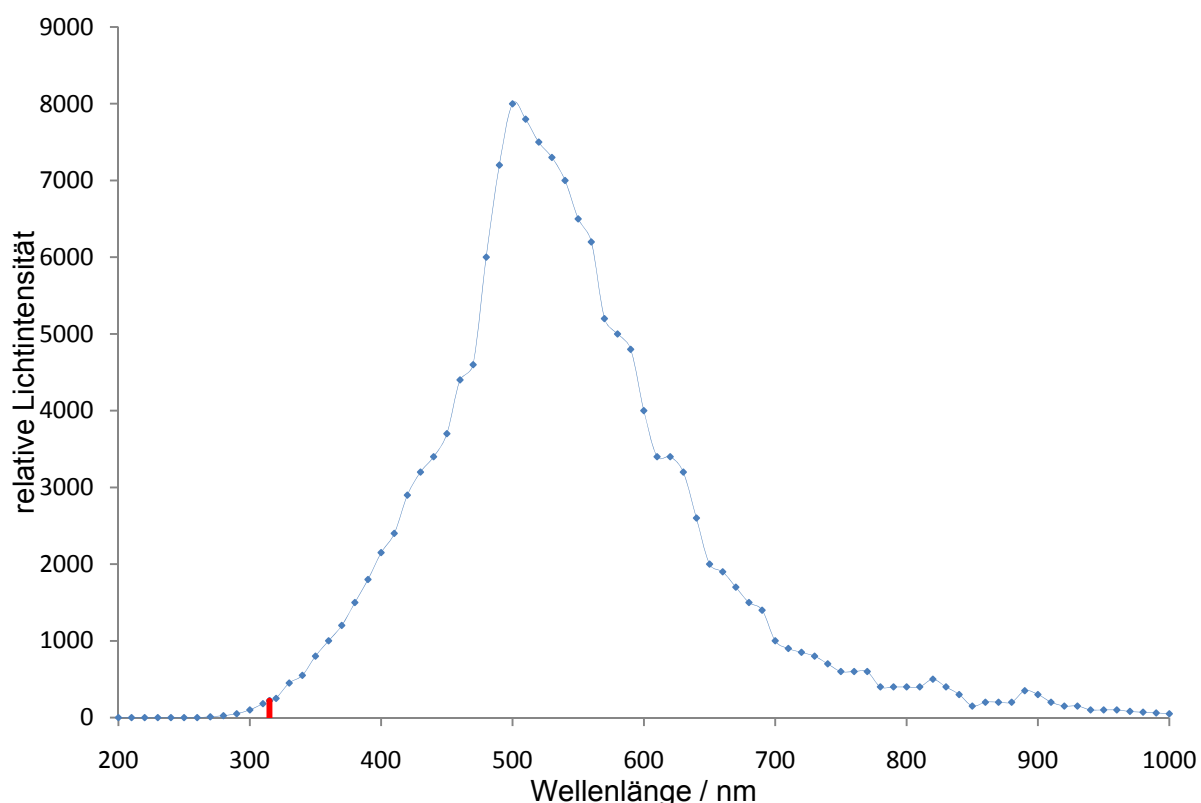


Abb. 9: Emissionsspektrum (in Anlehnung an Angaben des Herstellers) der AWFT14MMUV Blitzröhre. Die rote Markierung entspricht 315 nm.

Geht man vereinfacht von einer punktförmigen Lichtquelle ohne Reflektor aus, so treffen in 2 cm Entfernung von der Lampe pro cm^2 rund $12,8 \text{ J}$ an Energie auf. In Westeuropa braucht die Sonne an einem klaren Sommertag ca. 30 min um diese Energiemenge zu liefern. Bei einer Entfernung von 20 cm verringert sich dieser Betrag jedoch auf $1/100$.

Allerdings ist zur Aktivierung von para-substituierten Arylaziden UV-Licht mit einer Wellenlänge um 310 nm erforderlich (Reiser und Marley, 1968). Somit ist nur der Lichtanteil unterhalb von 315 nm geeignet, um eine Aktivierung der Fangverbindung zu bewirken. Wie aus Abb. 9 hervorgeht, ist dieser Anteil bei der eingesetzten Blitzröhre sehr klein. Er beträgt ca. 0,25 %.

Um die geeignete Lichtenergie für eine quantitative Umsetzung der eingesetzten Fangverbindung zur Verfügung zu stellen, gibt es zwei prinzipielle Möglichkeiten. Zum Einen kann die Lichtintensität optimiert werden. Dies kann z.B. durch eine geringere Entfernung zur Lichtquelle erfolgen. Zum Anderen kann die Bestrahlungsdauer erhöht werden. Bei Verwendung einer Blitzlampe bedeutet dies eine Erhöhung der Blitzzahl. Um zu überprüfen, ob es günstiger ist die benötigte Lichtmenge durch eine maximierte Lichtintensität oder durch eine höhere Belichtungsdauer zur Verfügung zu stellen, wurde ein

vergleichendes Experiment unter Verwendung der B1-N6-SAH Fangverbindung und der DNA-MTasen M.BseCI und M.HhaI durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

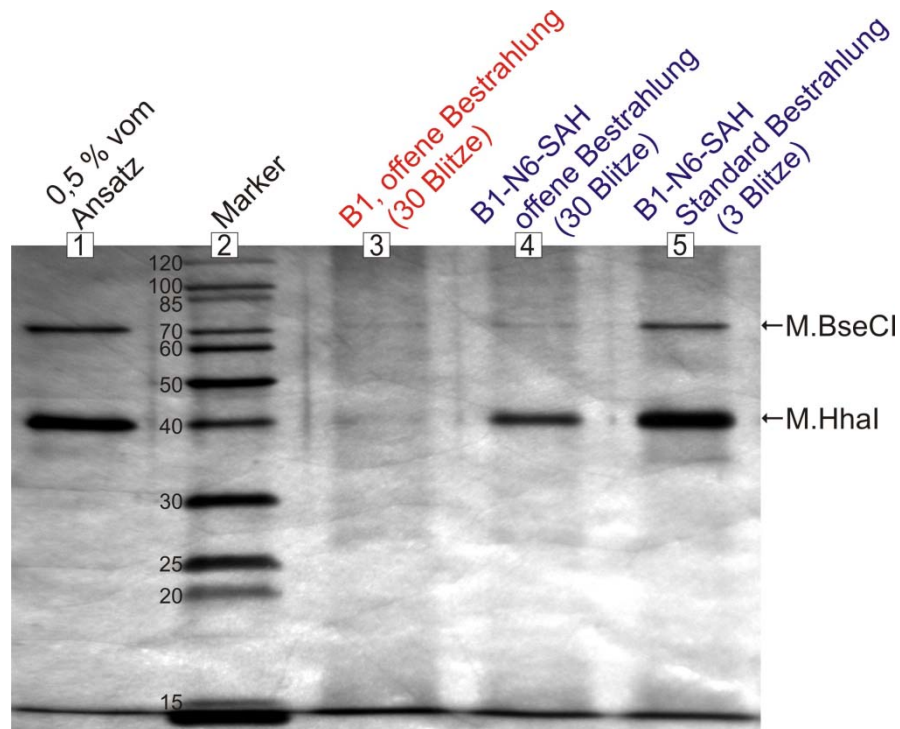


Abb. 10: Einfangen der DNA-MTasen M.BseCI und M.HhaI mit der Fangverbindung B1-N6-SAH unter unterschiedlichen Bestrahlungsbedingungen. Neben der Standardmethode (Proben befinden sich in PCR-Eppendorfgefäßen und schwimmen in einem eiswassergekühlten Reflektor nur 2 cm von der Blitzröhre entfernt) wurde ein Ansatz in einem offenen Schälchen aus silanisiertem Glas in einem Abstand von 20 cm von der Blitzröhre 30 mal bestrahlt (offene Bestrahlung). Das Schälchen stand dabei auf einer eisgekühlten Edelstahlplatte. Für das Experiment wurden aufgereinigte Enzyme verwendet (5 μ M M.HhaI und 2,3 μ M M.BseCI). Die Fangverbindungskonzentration betrug 20 μ M. Die Isolierung erfolgte jeweils mit 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In dem mit „offene Bestrahlung“ bezeichneten Ansätzen wurden die Proben in offenen Glasschälchen (Innendurchmesser 12 mm) aus silanisiertem Glas insgesamt 30mal aus einer Entfernung von 20 cm bestrahlt. Zur Kühlung befand sich das Schälchen dabei auf einer mit einem dünnen Wasserfilm versehenen, eisgekühlten, reflektierenden Metallfläche.

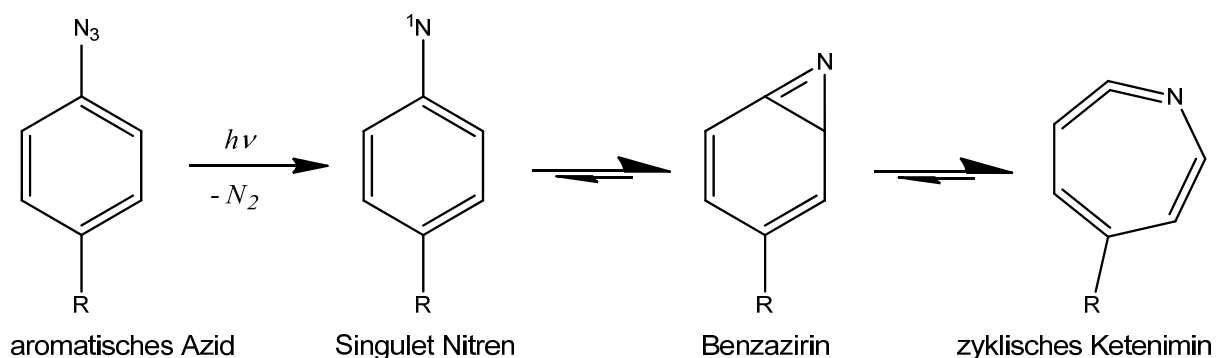
Bei dem mit der „Standard Bestrahlung“ behandelten Ansatz befand sich die Probe in einem 0,5 ml PCR Eppendorfgefäß, welches in nur 2 cm Abstand von der Blitzlampe in einem mit Eiswasser gefüllten Aluminiumreflektor schwamm. Hierbei wurden lediglich drei Blitze appliziert.

Zuvor war für beide Bestrahlungsverfahren der Zerfall des B1-N6-SAH durch UV-Vis-Spektrometrie verfolgt worden. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit der „offenen

Bestrahlung“ nach 10 Blitzen ca. 90 % der Fangverbindung reagiert hatten während dies bei der „standard Bestrahlung“ bereits nach einem Blitz der Fall war.

Bei der Betrachtung der in Abb. 10 dargestellten Ergebnisse fällt nun sofort auf, dass mit der „Standard Bestrahlung“ bei beiden MTasen eine deutlich größere Ausbeute erzielt wurde. Ein Grund hierfür findet sich in der praktischen Durchführung der Experimente. Während bei der „Standard Bestrahlung“ das Gefäß zum Zusammenpipettieren der Ansätze gleichzeitig auch das Gefäß war, in dem die Proben anschließend bestrahlt wurden war bei der „offenen Bestrahlung“ sowohl nach dem Zusammenpipettieren, als auch nach dem Bestrahlen der Ansätze ein Wechsel der Gefäße erforderlich. Bei einem Probenvolumen von 100 μ l betrugen die Verluste dabei mindestens 10 %. Bei früheren Versuchen mit nicht silanisiertem Glas waren die Verluste sogar noch deutlich größer.

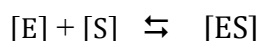
Ein weitaus wichtigerer Unterschied zwischen den beiden Bestrahlungsmethoden resultiert aber aus der Kinetik der ablaufenden Vorgänge. Bei der Aktivierung der Fangverbindung kommt es unter Stickstoffabspaltung zur Entstehung eines sehr reaktiven Nitrens (Wang *et al.*, 2007), welches intramolekular binnen weniger ps zu einem zyklischen Ketenimin weiterreagieren kann (Burdzinski *et al.*, 2006)(Schema 5).



Schema 5: Photoaktivierung von aromatischen Aziden.

Auch dieses Ketenimin ist sehr reaktiv und reagiert in wässrigem Milieu sehr schnell (Halbwertszeit ca. 1 μ s, Rizk *et al.*, 2006) mit Nukleophilen. Verglichen mit der sehr kurzen Lebensdauer der bei der Photoaktivierung entstehenden reaktiven Spezies ist die durchschnittliche Verweildauer der Fangverbindung in der Bindungstasche einer MTase recht lange. Sie lässt sich aus der Dissoziationskonstante abschätzen.

Legt man folgende Gleichgewichtsreaktion zu Grunde:



so gilt für die Geschwindigkeit von Assoziation und Dissoziation:

$$v_{Ass} = [E] \times [S] \times k_{Ass} \quad \text{und} \quad v_{Diss} = [ES] \times k_{Diss}$$

Für den Gleichgewichtszustand gilt:

$$v_{Ass} = v_{Diss}$$

$$[E] \times [S] \times k_{Ass} = [ES] \times k_{Diss}$$

$$\frac{[E] + [S]}{[ES]} = \frac{k_{Diss}}{k_{Ass}} = K_D$$

Dabei ist:

v_{Ass}	:	Geschwindigkeit der Assoziation
v_{Diss}	:	Geschwindigkeit der Dissoziation
$[E]$	:	Enzymkonzentration
$[S]$	:	Substratkonzentration
$[ES]$	:	Konzentration Enzym-Substrat-Komplex
k_{Ass}	:	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k_{Diss}	:	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K_D	:	Dissoziationskonstante

Für M.TaqI und SAH ist der K_D -Wert $2,3 \times 10^{-6}$ M. Da bei der Assoziation von einer bimolekularen Kinetik aus zu gehen ist, kann für k_{Ass} vereinfacht $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ als Obergrenze für eine diffusionskontrollierte Reaktion angenommen werden. Löst man die oben aufgeführte Formel nach k_{Diss} auf und setzt diese Werte ein, so ergibt sich:

$$k_{Diss} = K_D \times k_{Ass}$$

$$k_{Diss} = 2,3 \times 10^{-6} \text{ M} \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} = 230 \text{ s}^{-1}$$

Da die Dissoziation eine Reaktion erster Ordnung ist und k_{Diss} nun bekannt ist lässt sich auch die Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ von ES berechnen:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{Diss}} = \frac{0,693}{230 \text{ s}^{-1}} = 3 \text{ ms}$$

Die durchschnittliche minimale Verweildauer der Fangverbindung im aktiven Zentrum von Enzymen mit K_D -Werten im μM Bereich ist also vergleichbar mit der Dauer eines Photoblitzes und wesentlich größer als die Halbwertszeit des zyklischen Ketenimins (ca. $1 \mu\text{s}$). Das bedeutet, dass ein Fangverbindungsmolekül, welches sich im Moment der Photoaktivierung im aktiven Zentrum eines Zielenzyms befindet auch an dieser Position weiter reagiert. Allerdings muss dies nicht zwangsläufig zu einer Photoverknüpfung mit dem

Zielenzym führen, da Nitrene auch mit Wasser oder anderen Komponenten des Puffers reagieren können.

Der besondere Vorteil einer möglichst schnellen Photoaktivierung aller Fangverbindungsmoleküle resultiert aus der Tatsache, dass durch die Photoaktivierung der Fangverbindung lediglich die photoreaktive Gruppe zerstört wird, nicht aber die Selektivitätsfunktion. Ein Fangverbindungsmolekül, welches nach seiner Photoaktivierung z.B. mit Wasser reagiert hat, kann danach zwar keine kovalente Verknüpfung mit den Zielproteinen mehr eingehen, ist aber trotzdem noch in der Lage mit seiner Selektivitätsfunktion nicht-kovalent an diese zu binden. Die daraus resultierenden Konsequenzen sollen an einem Gedankenexperiment verdeutlicht werden.

Es soll ein Enzym mit einem Überschuss einer Fangverbindung eingefangen werden. Zur Vereinfachung sei eine Quervernetzungsausbeute von 100 % angenommen und die Fangverbindungskonzentration sei so hoch, dass jedes Enzym ein Fangverbindungsmolekül gebunden hat. Bei einem genügend starken Photoblitz wäre in diesem Fall auch die Ausbeute an eingefangenen Enzym 100 %. Würden durch einen schwächeren Photoblitz aber nur 50 % der Fangverbindung abreagieren, so wäre die Ausbeute nach diesem ersten Photoblitz auch nur 50 %. Am aktiven Zentrum der nicht eingefangenen Enzyme stellt sich danach ein neues Gleichgewicht ein, wobei die Hälfte der Bindungstaschen mit bereits abreagierter Fangverbindung belegt ist. Selbst wenn ein zweiter Photoblitz so stark wäre, dass der ganze Rest an Fangverbindung abreagiert, so wäre die Gesamtausbeute am Ende nur 75 %.

Zur Maximierung der Ausbeute an spezifisch eingefangenen Enzym ist es also sinnvoll, alle Fangverbindungsmoleküle in einem Zeitraum zu aktivieren, der kürzer ist als die mittlere Verweildauer der Fangverbindung im aktiven Zentrum des betreffenden Enzyms. Bei Enzymen mit K_D -Werten im μM Bereich ist dies mit einer starken Photoblitzlampe durchaus möglich. Allerdings sollte zur Maximierung der Lichtausbeute folgendes beachtet werden:

1. Der Abstand zwischen Probe und Blitzröhre sollte möglichst kurz sein.
2. Wenn möglich sollte ein Reflektor verwendet werden.
3. Bei stark lichtabsorbierenden Proben sollte deren Schichtdicke gering gehalten werden.
3. Die verwendeten Probengefäße sollten Licht um 300 nm möglichst gut passieren lassen.

Besonders der letzte Punkt spricht für die Verwendung von offenen Gefäßen. Allerdings ist dies besonders bei einer größeren Anzahl an Proben aus praktischen Gründen recht kompliziert, so dass auf die in biologischen Laboratorien gebräuchlichen Einweggefäße aus Kunststoff, wie z.B. Kunststoff-Kleinstreaktionsgefäße der Firma Eppendorf

(Eppendorfgefäße) zurückgegriffen werden muss. In Abb. 11 sind Transmissionsspektren der Gefäßwände einiger gebräuchlicher Kunststoffgefäße dargestellt.

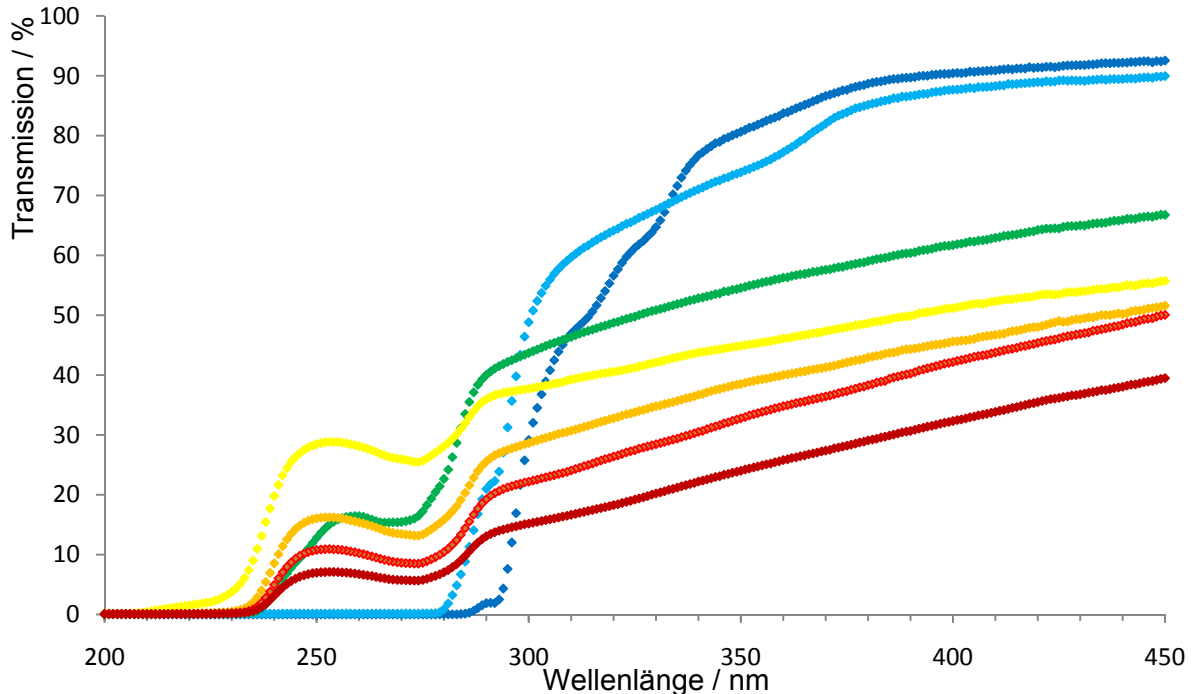


Abb. 11: Transmissionsspektren der Kunststoffwandung einiger gebräuchlicher Einweggefäße aus Kunststoff. Für die Messungen wurden die Gefäße zerschnitten, so dass die Transmission einer Wandung gemessen wurde. Dunkelblau: Polystyrolküvette, blau: Kunststoffpetrischale, grün: 0,5 ml PCR-Eppendorfgefäß, hellgelb: 0,2 ml PCR-Eppendorfgefäß, dunkelgelb: 0,5 ml Eppendorfgefäß, orange: 2 ml Eppendorfgefäß, rot: 1,5 ml Eppendorfgefäß.

Die Messungen haben eindeutig gezeigt, dass dünnwandige 0,5 ml PCR-Eppendorfgefäße am besten geeignet sind. Die Verwendung großvolumiger Eppendorfgefäße ist nur dann zu empfehlen, wenn dies wegen größerer Probenvolumina erforderlich ist. Bei sehr großen Probenvolumina kann auch auf Petrischalen aus Polystyrol zurückgegriffen werden. Besonders bei Probenmaterial mit starker Absorption um 300 nm hat dies zudem den Vorteil, dass die vom Licht zu durchdringende Schichtdicke verhältnismäßig gering bleibt.

3.2.5 Einfluss von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) im Fangpuffer auf die Ausbeute an spezifisch eingefangener M.TaqI

Die bei der Photodissoziation von aromatischen Aziden entstehenden primären Produkte sind Nitrene, welche zwar so reaktiv sind, dass sie selbst in C–H-Bindungen insertieren können (Torres *et al.*, 1986), aber binnen weniger ps zu zyklischen Ketenimininen weiter reagieren (Wang *et al.*, 2007). Diese sind aber nicht mehr zu C–H-Insertionen in der Lage und benötigen Nucleophile um weiter zu reagieren. In reinem Wasser zerfallen sie mit Halbwertszeiten im μ s-Bereich (Rizk *et al.*, 2006). In Anwesenheit von guten Nucleophilen wäre es aber denkbar, dass es zu einem deutlich schnelleren Zerfall kommt und dadurch die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Proteinen reduziert wird.

Ob Nucleophile im Allgemeinen zu einem Quenchen der Photoverknüpfung durch Abfangen der reaktiven Spezies führen, sollte experimentell mit der Fangverbindung B1-N6-SAH, der DNA-MTase M.TaqI und der häufig verwendeten Pufferverbindung Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) mit einer primären Aminogruppe überprüft werden. Das Ergebnis ist in Abb. 12 dargestellt.

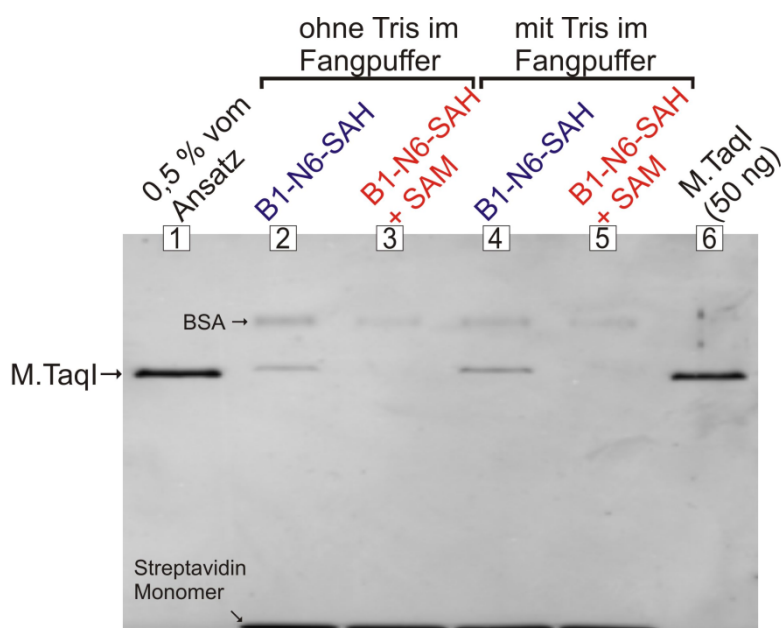


Abb. 12: Einfangen der DNA-MTase M.TaqI mit der Fangverbindung B1-N6-SAH (1 μ M) in Gegenwart von Tris (100 mM). Als Vergleich diente ein Ansatz ohne Tris und eine Verdrängungskontrolle mit SAM (10 mM) unter Standardbedingungen. Für das Experiment wurde aufgereinigte M.TaqI verwendet (5 μ M). Das Probenvolumen der Ansätze betrug je 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g M-280 Streptavidin Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Die im Experiment eingesetzte Tris-Konzentration war mit 100 mM relativ hoch gewählt. Trotzdem war die Menge an eingefangener M.TaqI sogar etwas höher als in der

Vergleichsprobe, wie aus dem Vergleich zwischen Spur 2 und Spur 4 in Abb. 12 ersichtlich ist. Dieses Experiment wurde mehrmals mit variierenden Fangverbindungskonzentrationen durchgeführt und in keinem der Fälle konnte eine Verringerung der Ausbeute an spezifisch eingefangener M.TaqI beobachtet werden.

Den vorliegenden Ergebnissen zu Folge hat Tris also keine negativen Auswirkungen auf die Ausbeute beim spezifischen Einfangen von M.TaqI. Wenn man die durchschnittliche Verweildauer von Kofaktor oder Kofaktoranalogen im aktiven Zentrum von M.TaqI, sowie die Lebensdauer der reaktiven Spezies nach Photoaktivierung der Fangverbindung berücksichtigt, ist dies auch zu erwarten. Es ist nämlich viel wahrscheinlicher, dass es wegen der extremen räumlichen Nähe und der sterischen Abschirmung zu einer Reaktion mit dem Enzym oder mit Wassermolekülen kommt. Die Reaktion mit dem Enzym wäre dabei eine Reaktion erster Ordnung. Anders könnte dies jedoch bei frei in Lösung befindlichen Fangverbindungsmolekülen sein. Sie reagieren, wenn sie auf einen geeigneten Reaktionspartner treffen, nach einer Reaktionskinetik zweiter Ordnung. Unter den oben gewählten Bedingungen war die Tris-Konzentration aber 100 000-fach höher als die M.TaqI-Konzentration, und die Wasser-Konzentration immerhin 550-fach höher als die Tris-Konzentration. Eine Reaktion mit Tris oder Wasser ist unter diesen Bedingungen also viel wahrscheinlicher als die Reaktion mit M.TaqI. Dies ist auch wünschenswert, da eine Reaktion zwischen freier Fangverbindung und Enzym eine unspezifische Reaktion darstellen würde. Diese würde nämlich prinzipiell auch ohne Selektivitätsfunktion an der Fangverbindung stattfinden. Somit ist es denkbar, dass Tris beim spezifischen Einfangen von Enzymen sogar einen positiven Effekt hat, in dem es unerwünschte Nebenreaktionen reduziert und somit die Spezifität erhöht. Auf diese Fragestellung soll jedoch später in verschiedenen Kapiteln noch näher eingegangen werden.

3.2.6 Einfluss der Linkerlänge auf die Ausbeute beim Einfangen von M.TaqI und M.HhaI mit B1-N6-SAH

Eine grundlegende Voraussetzung für das spezifische Einfangen von Proteinen durch trifunktionelle Fangverbindungen ist eine spezifische Vorbindung der Fangverbindung an das betreffende Zielprotein. Hierfür muss die entsprechende Bindungstasche im aktiven Zentrum des Proteins für die Selektivitätsfunktion der Fangverbindung zugänglich sein. Eine Möglichkeit die Zugänglichkeit der Selektivitätsfunktion zu erhöhen ist den Abstand zwischen dem Fangverbindungsgrundgerüst und der Selektivitätsfunktion zu vergrößern.

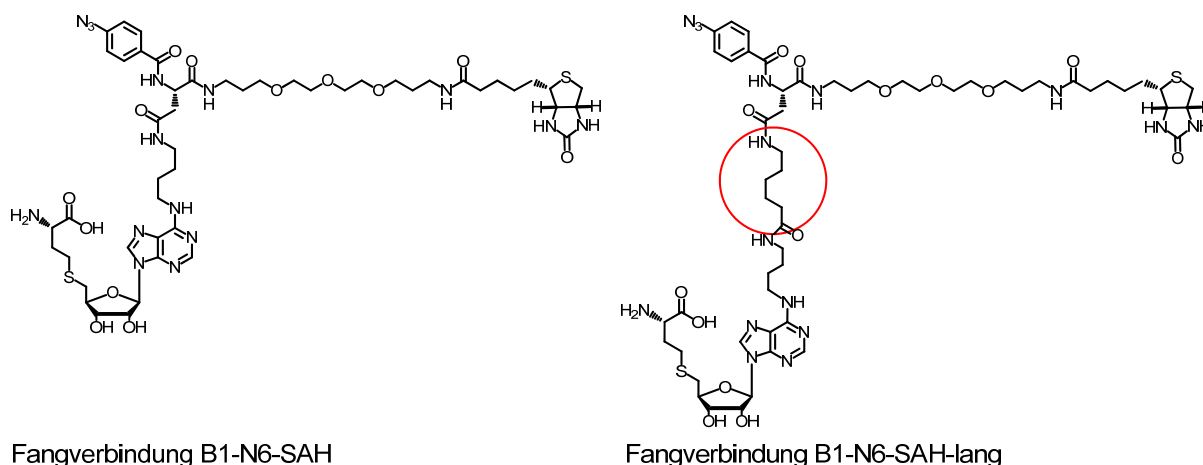


Abb. 13: Strukturformeln der Fangverbindungen B1-N6-SAH und B1-N6-SAH-lang. Bei der langen Variante ist der Abstand zwischen dem Fangverbindungsgrundgerüst und der Selektivitätsfunktion um sieben Atome verlängert (rote Markierung).

In Abb. 13 ist eine Variante der Fangverbindung B1-N6-SAH dargestellt, bei der der Abstand zwischen dem Fangverbindungsgrundgerüst und der Selektivitätsfunktion SAH durch den Einbau von ϵ -Aminohexansäure um sieben Atome verlängert wurde. In Einfangexperimenten mit den DNA-MTasen M.TaqI und M.HhaI wurde die Ausbeute der mit diesen Fangverbindungen spezifisch eingefangenen Enzyme verglichen. Das Ergebnis der Experimente ist in Abb. 14 dargestellt.

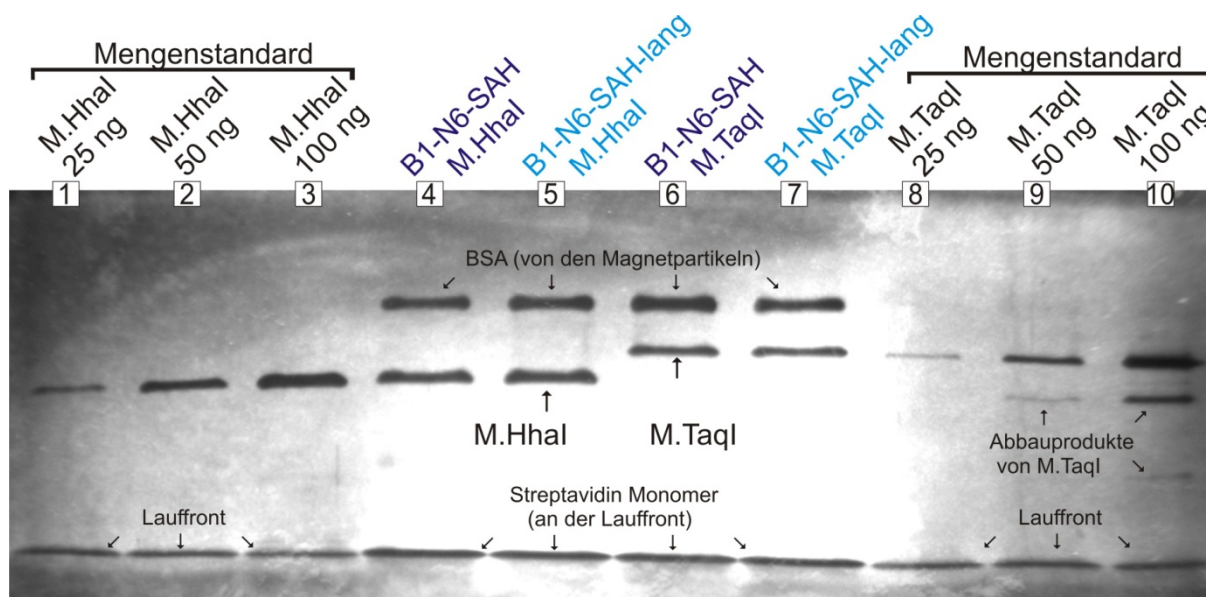


Abb. 14: Die DNA-MTasen M.HhaI und M.TaqI eingefangen mit den zwei unterschiedlichen Fangverbindungen B1-N6-SAH und B1-N6-SAH-lang. Diese unterscheiden sich in der Länge des Linkers zwischen dem Fangverbindungsgrundgerüst und der Selektivitätsfunktion SAH. Für das Experiment wurden aufgereinigte Enzyme verwendet (5 μ M M.HhaI und 5 μ M M.TaqI). Die Konzentration der Fangverbindungen betrug 5 μ M. Das Probenvolumen der Ansätze betrug je 100 μ l und für die Isolierung wurden jeweils 200 μ g M-280 Streptavidin Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Neben Banden, die auf Streptavidin und BSA von den Magnetpartikeln zurückzuführen sind, kann man in dem Gel deutlich die beiden DNA-MTasen erkennen. Die Spuren 1, 2 und 3, bzw. 8, 9 und 10 sind dabei lediglich Mengenstandards. In den Spuren 4 und 5 ist die mit den Fangverbindungen B1-N6-SAH und B1-N6-SAH-lang eingefangene M.HhaI zu erkennen, und in den Spuren 6 und 7 die eingefangene M.TaqI. Vergleicht man bei beiden MTasen die mit den unterschiedlichen Fangverbindungen erzielten Ausbeuten, so ist kaum ein Unterschied festzustellen.

Unter den gewählten Bedingungen (hohe Enzymkonzentration und äquimolare Mengen an Fangverbindung) hatte der um ca. 30 % größere Abstand zwischen Fangverbindungsgrundgerüst und Selektivitätsfunktion keinen Einfluss auf die Ausbeute an eingefangenen Protein. Die Tatsache, dass die Ausbeute bei größerem Abstand nicht zunimmt könnte darauf zurück zu führen sein, dass die beiden getesteten MTasen keine außergewöhnlich tiefen Bindungstaschen für SAM bzw. SAH besitzen (Cheng *et al.*, 1993; Goedecke *et al.*, 2001). Ein sterisch bedingter Einfluss auf die Ausbeute kann bei diesen beiden MTasen also gar nicht zum Tragen kommen. Als positiv zu bewerten ist jedoch die Tatsache, dass der um 30 % größere Abstand zwischen Fangverbindungsgrundgerüst und Selektivitätsfunktion keinen negativen Einfluss auf die Ausbeute hatte. Fangverbindungen mit größerem Abstand zwischen Fangverbindungsgrundgerüst und Selektivitätsfunktion können also ohne Probleme eingesetzt werden, falls tiefe Bindungstaschen beim Zielprotein dies erforderlich machen sollten.

3.2.7 Fangverbindungen mit anderen Reaktivitätsfunktionen und veränderter Verknüpfungsstelle an der Selektivitätsfunktion

Eine Möglichkeit die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein zu erhöhen könnte die Verwendung veränderter Reaktivitätsfunktionen sein. Eine Variante stellen hierbei Aryl(trifluormethyl)diazirine dar. Anders als die aromatischen Azide, reagieren diese nach ihrer Photoaktivierung und Stickstoffabspaltung über ein Carben weiter (Platz *et al.*, 1991). Auf Grundlage eines aromatischen Trifluormethyldiazirins wurde das Fangverbindungsgrundgerüst B2 entwickelt (vgl. Abb. 15) Im Vergleich zum B1-Grundgerüst, das in den bisherigen Experimenten benutzt wurde ist lediglich die Reaktivitätsfunktion ausgetauscht. Auch die Anknüpfungsstelle der Selektivitätsfunktion an das Fangverbindungsgrundgerüst ist von Bedeutung. Damit ein Enzym sein Substrat bzw. Kofaktor spezifisch binden kann muss nicht nur dessen Orientierung im aktiven Zentrum des Enzyms stimmen. Es müssen auch eine Reihe spezifischer Wechselwirkungen ermöglicht werden. Neben hydrophoben, hydrophilen

oder ionischen Wechselwirkungen ist dabei besonders die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen von Bedeutung. Wenn z.B. ein Kofaktor eines Enzyms als Selektivitätsfunktion kovalent an eine Fangverbindung gebunden vorliegt, so kann es durchaus passieren, dass dadurch eine wichtige Wasserstoffbrückenbindung gestört wird oder der Kofaktor aus sterischen Gründen gar nicht mehr in das aktive Zentrum des Enzyms passt. Das betreffende Enzym könnte mit einer solchen Fangverbindung im Extremfall gar nicht mehr spezifisch eingefangen werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist die Verwendung unterschiedlicher Verknüpfungsstellen. Für das Einfangen von MTasen wurden auch Fangverbindungen synthetisiert, bei denen die Selektivitätsfunktion SAH nicht über die N6-Position, sondern über die C8-Position an die Fangverbindungsgrundgerüste verknüpft ist (B1-C8-SAH, bzw. B2-C8-SAH, vgl. Abb. 15).

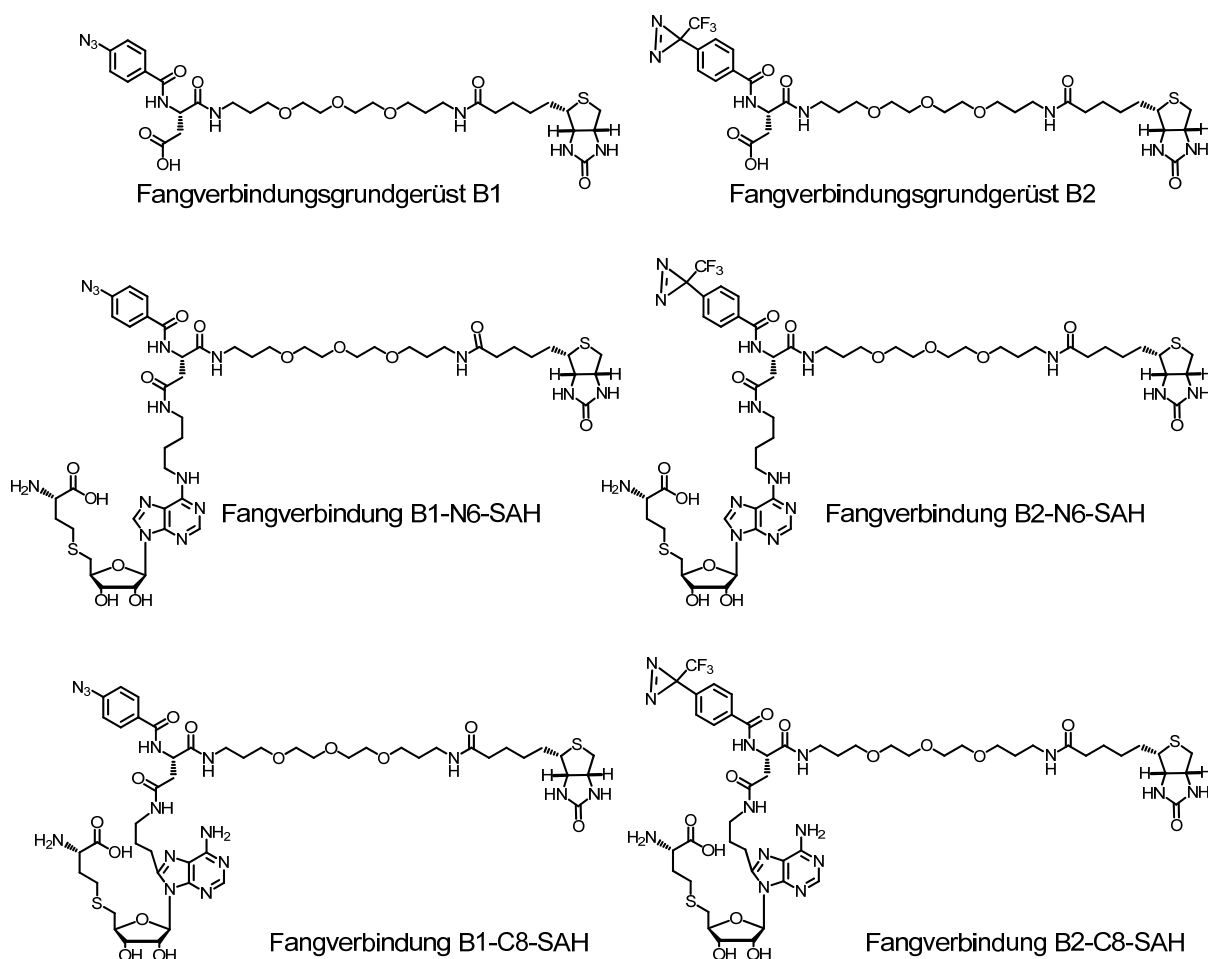


Abb. 15: Strukturformeln der Fangverbindungsgrundgerüste B1 und B2, und der Fangverbindungen B1-N6-SAH, B2-N6-SAH, B1-C8-SAH und B2-C8-SAH.

Die Fangverbindungen mit variierenden Reaktivitätsfunktionen und verschiedenen Anknüpfungspositionen an die Selektivitätsfunktion wurden unter identischen Bedingungen

für das Einfangen der beiden DNA-MTasen M.TaqI und M.HhaI verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt.

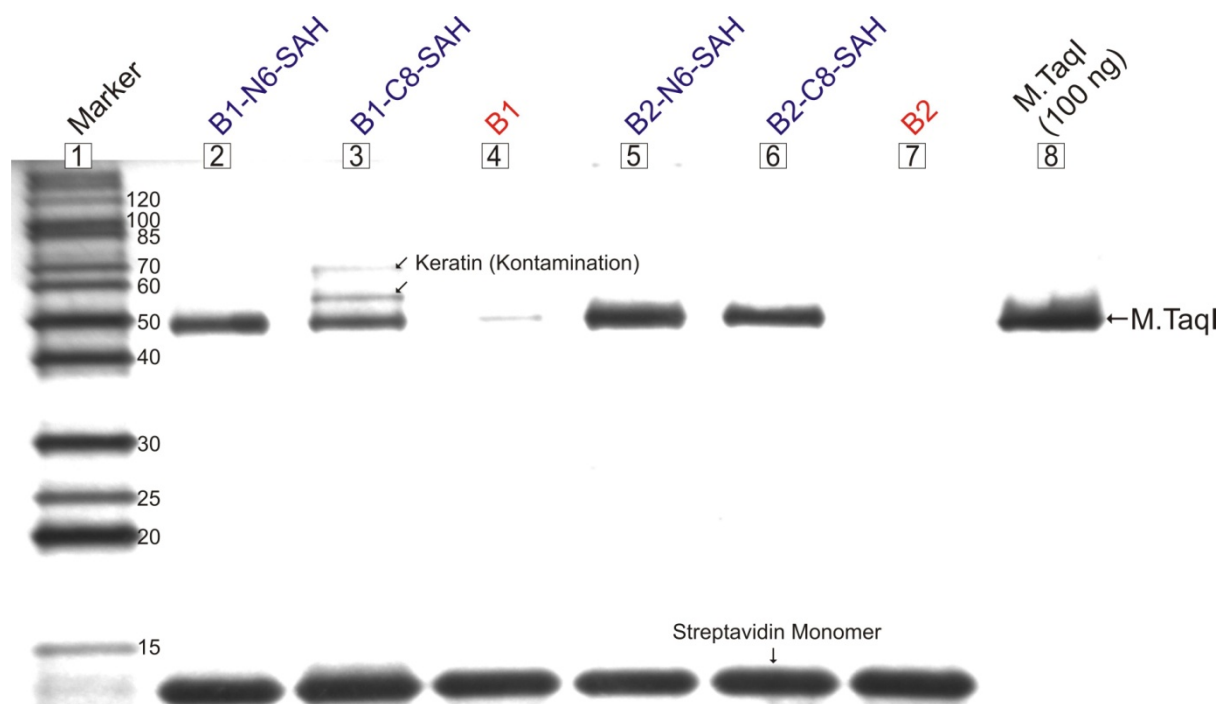


Abb. 16: Einfangen der DNA-MTase M.TaqI mit unterschiedlichen Fangverbindungen. Die Fangverbindungen unterscheiden sich in ihrer Reaktivitätsfunktion (B1-Fangverbindungen sind aromatische Azide, B2-Fangverbindungen sind aromatische Diazirine) und ihrer Anknüpfposition an die Selektivitätsfunktion (bei N6-SAH-Fangverbindungen ist der SAH Teil in N6-Position verknüpft, bei C8-SAH-Fangverbindungen in C8-Position). Für das Experiment wurde aufgereinigte M.TaqI (1 μ M) eingesetzt. Die Konzentration aller Fangverbindungen betrug 2 μ M. Das Probenvolumen der Ansätze betrug je 100 μ l und für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel verwendet. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In dem Einfangexperiment mit M.TaqI und den unterschiedlichen Fangverbindungen konnte mit den reaktiveren B2-Fangverbindungen tendenziell etwas mehr M.TaqI eingefangen werden als mit den entsprechenden B1-Fangverbindungen. Die größte Ausbeute wurde dabei mit der Fangverbindung B2-N6-SAH erzielt. Sie betrug ca. 2 %. Die kleinste Ausbeute (ca. 1 %) wurde mit B1-C8-SAH erzielt. Insgesamt kann festgestellt werden, dass M.TaqI bei Betrachtung der Anknüpfposition mit N6-SAH-Fangverbindungen besser eingefangen werden kann als mit C8-SAH-Fangverbindungen. Bei Betrachtung der Reaktivitätsfunktion sind für das Einfangen von M.TaqI die B2-Fangverbindungen zu bevorzugen.

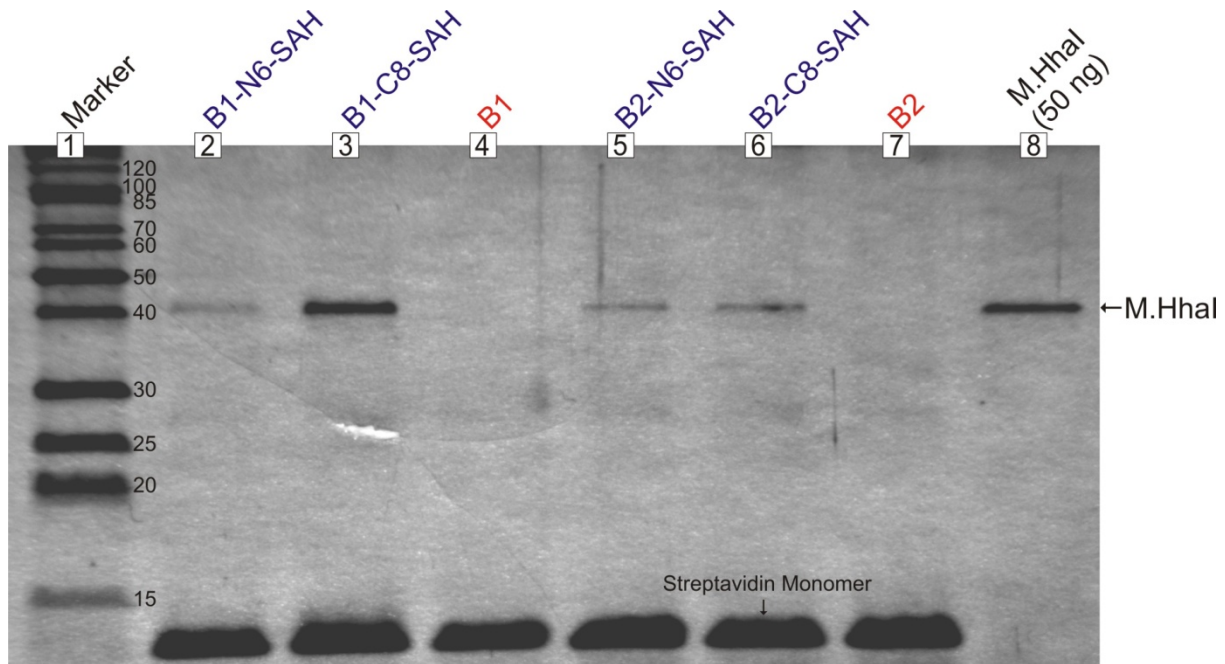


Abb. 17: Einfangen der DNA-MTase M.HhaI mit unterschiedlichen Fangverbindungen. Für das Experiment wurde aufgereinigte M.HhaI (1 μ M) eingesetzt. Die Konzentration aller Fangverbindungen betrug 2 μ M. Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 μ l und für die Isolierung wurden jeweils 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel verwendet. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Bei dem Einfangexperiment mit M.HhaI wirft das Ergebnis einige Fragen auf. Bei der Betrachtung des Gels sticht die Spur 3 hervor. Unter Verwendung der Fangverbindung B1-C8-SAH konnte bei dem Experiment deutlich mehr M.HhaI eingefangen werden als mit den drei anderen Fangverbindungen. Dies ist nur schwer zu verstehen, da bei einer Bevorzugung der C8-Verknüpfungsposition auch mit der Fangverbindung B2-C8-SAH eine verhältnismäßig hohe Ausbeute zu erwarten gewesen wäre. Zudem zeigt die Kristallstruktur von M.HhaI im Komplex mit DNA (O’Gara *et al.*, 1996), dass gegenüber der C8-Position des gebundenen Kofaktors nur wenig Platz bleibt. Mit den C8-Fangverbindungen wäre deshalb eine schlechte Ausbeute zu erwarten gewesen. Trotzdem konnte die gute Ausbeute bei Verwendung der Fangverbindung B1-C8-SAH in mehreren Experimenten bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass zufällig auch die Reaktivitätsfunktion dieser Fangverbindung gut an M.HhaI bindet und somit die spezifische Vorbindung von B1-C8-SAH an M.HhaI verstärkt.

3.2.8 Einfluss von Salzen und Glycerin auf die Spezifität

Bei den oben aufgeführten Experimenten ist es gelungen die DNA-MTasen M.TaqI und M.HhaI mit Hilfe von unterschiedlichen Fangverbindungen sehr spezifisch einzufangen (vgl. z.B. Abschnitt 2.3.7). Allerdings wurden bei diesen Experimenten aufgereinigte MTasen und verhältnismäßig geringe Fangverbindungskonzentrationen eingesetzt. Einige andere MTasen tendieren jedoch zu unspezifischen Nebenreaktionen, das heißt sie können auch mit Fangverbindungsgrundgerüsten oder in Gegenwart des Kompetitors SAH eingefangen werden. Von allen getesteten MTasen bereiten die DNA-MTase M.BseCI (Rina *et al.*, 1992) die Histon H3-Lysin9-MTase Dim5 (Jeltsch *et al.*, 2008) und die Histon H3-Lysin9-MTase Clr4 (Nakayama *et al.*, 2001) bezüglich dieser unspezifischen Nebenreaktionen die meisten Probleme. Deshalb wurden einige Experimente mit diesen drei MTasen und dem Fangverbindungsgrundgerüst B1 durchgeführt. Ziel dabei war, die unspezifischen Nebenreaktionen zu minimieren.

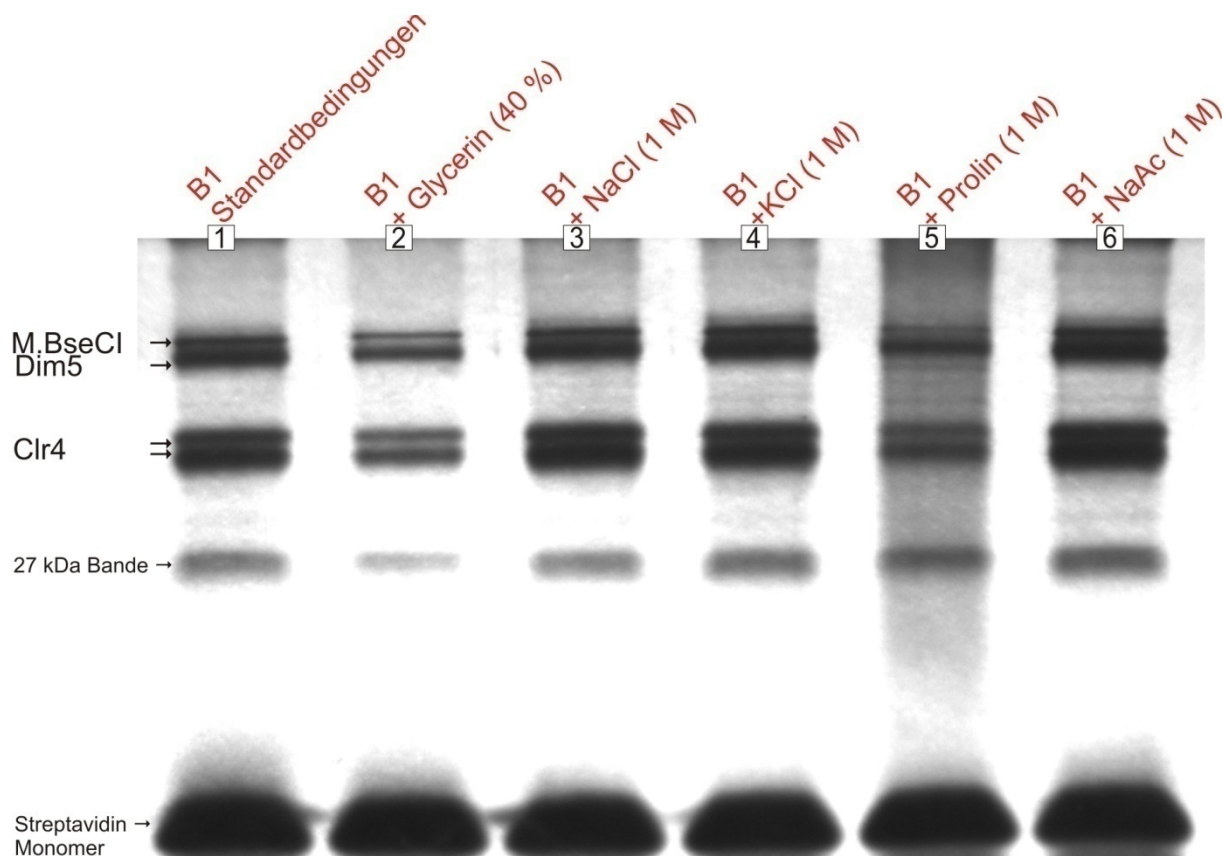


Abb. 18: Unspezifisches Einfangen der MTasen M.BseCI, Dim5 und Clr4 (jeweils 1 μ M) mit dem Fangverbindungsgrundgerüst B1 (10 μ M) unter verschiedenen Pufferbedingungen. Die Standardbedingungen sind: HEPES (20 mM), KOAc (50 mM), Mg(OAc)₂ (10 mM), NaCl (200 mM), Glycerin (10 % v/v), pH 7,9. Im Experiment wurden Ansätze zusätzlich mit Glycerin (40 % v/v), NaCl, KCl, Prolin oder NaOAc (jeweils 1 M) versetzt. Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 μ l und für die Isolierung wurden jeweils 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel verwendet. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In Abb. 18 ist das Ergebnis eines Experiments dargestellt, bei dem sich in den Ansätzen neben dem standardmäßig verwendeten Einfangpuffer noch zusätzliche Verbindungen in relativ hohen Konzentrationen befanden. Das Gel wurde bei der Silberfärbung relativ stark entwickelt, um die unspezifisch eingefangenen Proteine möglichst gut sehen zu können. In dem Gel ist deutlich zu erkennen, dass durch erhöhte Salzkonzentrationen keine Reduktion der unspezifischen Nebenreaktionen erreicht werden konnte (vgl. Spur 1 mit den Spuren 3, 4 und 6). Durch den Zusatz von Prolin konnte scheinbar eine Reduktion der unspezifischen Nebenreaktionen erreicht werden (vgl. Spur 5). Allerdings ist in der betreffenden Spur des Gels ein deutlicher Hintergrund zu erkennen, so dass dieser Zusatz nicht weiter untersucht wurde. Auch die „27 kDa-Bande“, bei der es sich um dimeres Streptavidin handeln könnte, in auf diesem Gel in allen Spuren zu sehen.

In dem Ansatz mit zusätzlichen 40 % Glycerin (was einer Gesamtkonzentration von 50 % Glycerin im Ansatz entspricht) konnte eine deutliche Reduktion der unspezifischen Nebenreaktionen erreicht werden (vgl. Spur 2). Allerdings kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass unter diesen Bedingungen nicht auch das spezifische Einfangen der drei MTasen gestört worden wäre. Auf diese Fragestellung soll jedoch in Abschnitt 3.3 noch näher eingegangen werden.

3.2.9 Einfluss der Temperatur auf die Spezifität

Eine weitere Einflussgröße beim Einfangen von Proteinen mittels trifunktioneller Fangverbindungen ist die Temperatur. Die Temperatur beeinflusst nicht nur Faltung und Stabilität von Proteinen, sondern auch die Lebensdauer der nach Photoaktivierung der Fangverbindungen entstehenden reaktiven Spezies.

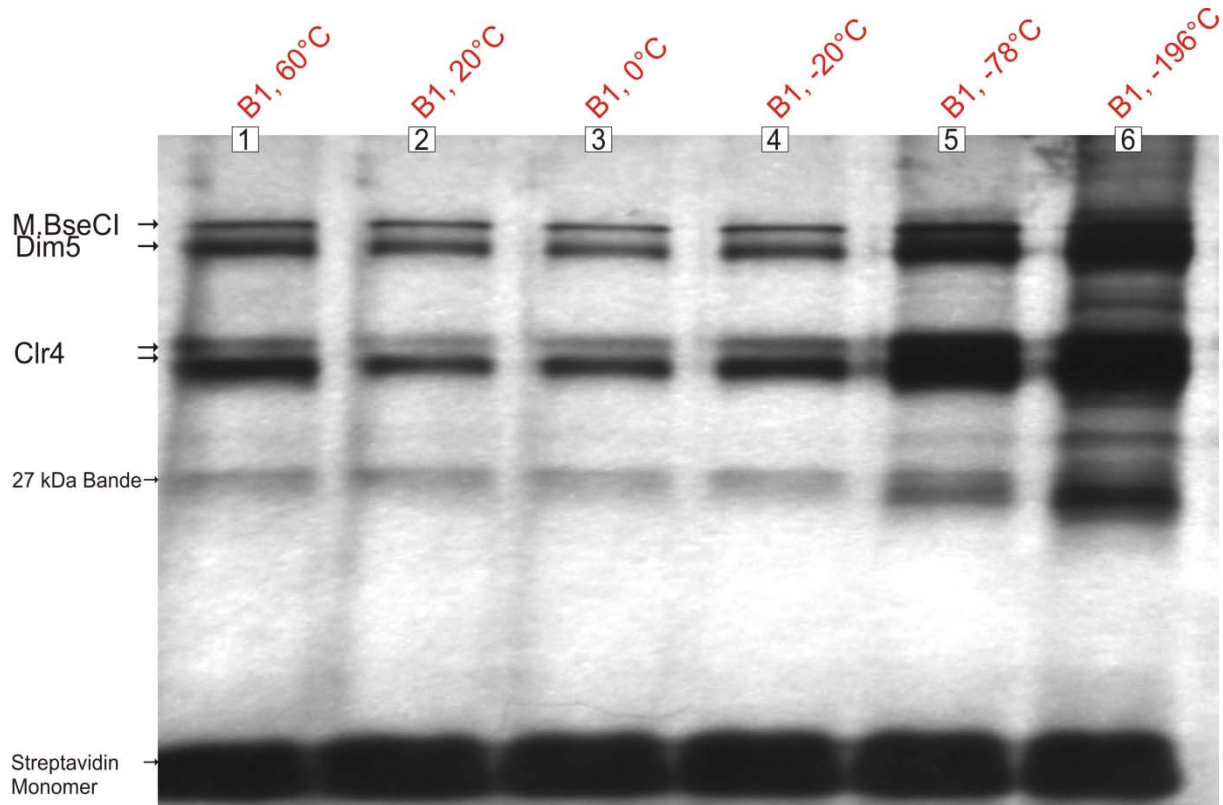


Abb. 19: Unspezifisches Einfangen der MTasen M.BseCI, Dim5 und Clr4 (jeweils 1 μ M) mit dem Fangverbindungsgrundgerüst B1 (10 μ M) bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Photoaktivierung erfolgte nach der Standardmethode in einem flüssigkeitsgefüllten Aluminiumreflektor. Allerdings wurde dieser mit Flüssigkeiten unterschiedlicher Temperatur gefüllt. Für die Ansätze 1, 2 und 3 wurde unterschiedlich temperiertes Wasser verwendet und für Ansatz 4 eine gesättigte NaCl-Lösung mit einer Temperatur von -20°C . Für die Ansätze 5 und 6 wurden zur Kühlung Aceton-Trockeneis bzw. flüssiger Stickstoff verwendet. Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In Abb. 19 ist das Ergebnis eines Experiments dargestellt, bei dem die Proben während der Photoverknüpfung unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt waren. Hierbei wurden wiederum die MTasen BseCI, Clr4 und Dim5 verwendet, da diese besonders stark zu unspezifischen Nebenreaktionen neigen. Für das Einfangen wurde das Fangverbindungsgrundgerüst B1 verwendet, so dass bei diesem Experiment jedwedes Einfangen auf unspezifische Nebenreaktionen zurückzuführen war.

Aus dem Gel ist ersichtlich, dass es besonders bei sehr tiefen Temperaturen zu unspezifischen Nebenreaktionen kam (Spuren 5 und 6), während es keinen Unterschied gemacht hat, ob bei 0°C oder 20°C gearbeitet wurde (Spuren 2 und 3). Die Tatsache, dass es besonders bei sehr tiefen Temperaturen zu unspezifischen Nebenreaktionen kam, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese unspezifischen Nebenreaktionen auf einer unspezifischen Verbindung des Fangverbindungsgrundgerüsts an die Proteine beruht. Bei Temperaturen von -78°C oder von -196°C sind die Proben nämlich fest. Unter diesen Bedingungen kann eine Fangverbindung nach ihrer Photoaktivierung also nicht mehr durch die Lösung diffundieren, zufällig mit einem Protein kollidieren und dann mit diesem reagieren. Allerdings könnte es durch ein Ausfrieren des im Einfangpuffer befindlichen Wassers zu einer lokalen Erhöhung der Fangverbindungskonzentration kommen. Auch dies könnte dann verstärkt zu nicht spezifischen Nebenreaktionen führen. Dieser Effekt wäre jedoch eher beim langsamen Einfrieren als beim Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff zu erwarten.

3.2.10 Einfluss der puffernden Komponente auf die Spezifität

Die Pufferbedingungen sind beim spezifischen Einfangen von Proteinen mittels trifunktioneller Fangverbindungen die Einflussgröße, die sich mit dem geringsten Aufwand verändern lässt. Deshalb wurden die gängigsten Pufferverbindungen hinsichtlich ihres Einflusses auf unspezifische Nebenreaktionen untersucht.

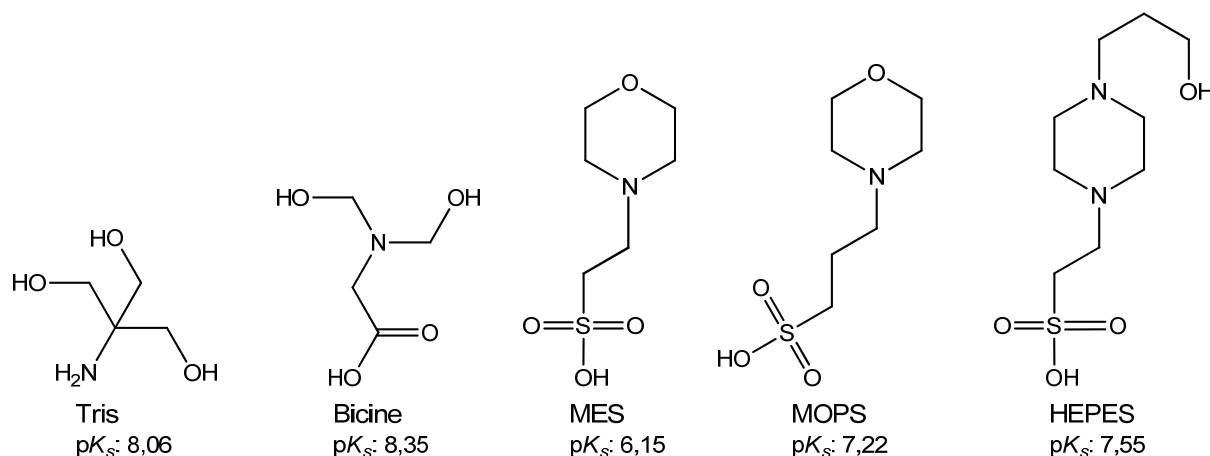


Abb. 20: Strukturen von Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)glycin (Bicine), 2-(*N*-morpholino)ethansulfonsäure (MES), 3-(*N*-Morpholino)propan-sulfonsäure (MOPS) und (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure (HEPES).

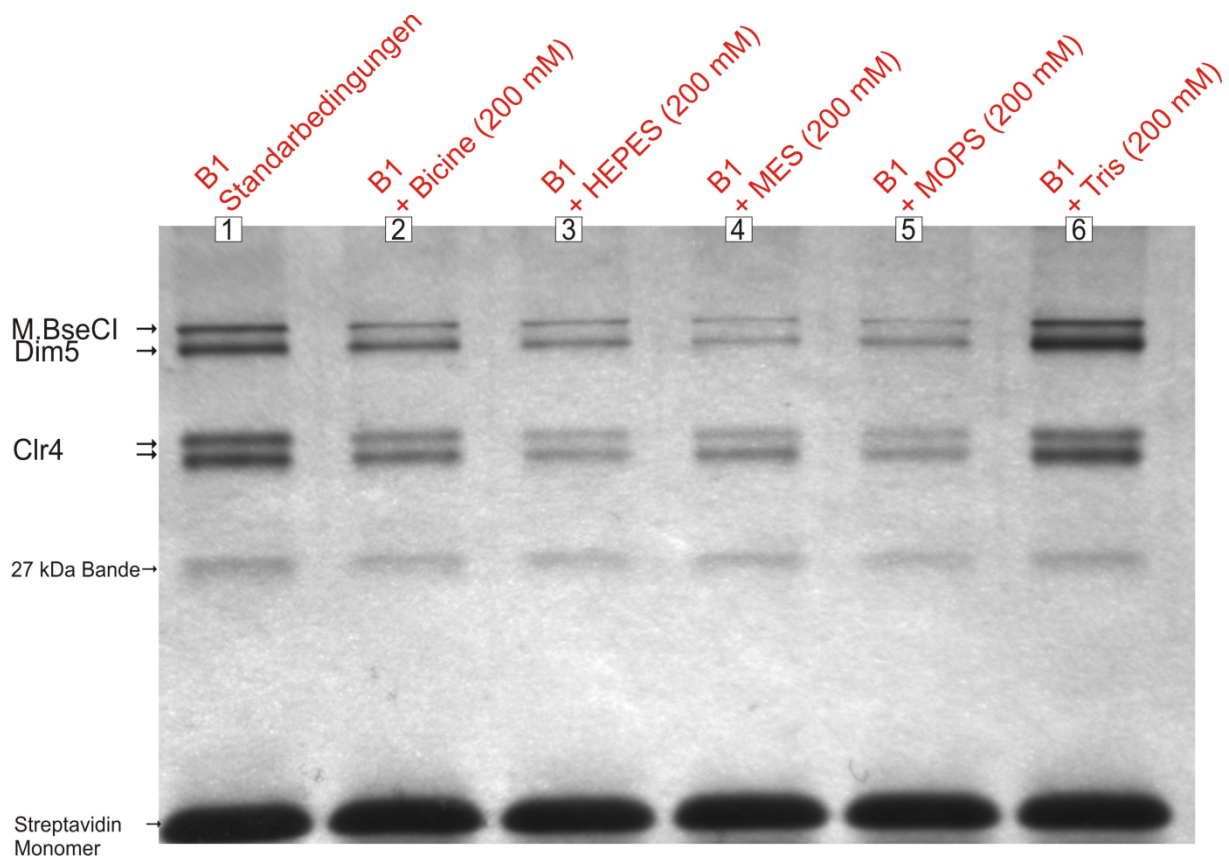


Abb. 21: Unspezifisches Einfangen der MTasen M.BseCI, Dim5 und Ctr4 (jeweils 1 μ M) mit dem Fangverbindungsgrundgerüst B1 (10 μ M) unter verschiedenen Pufferbedingungen. Der Standardpuffer (*E. coli*-Efangpuffer) besteht aus: HEPES (20 mM), KOAc (50 mM), MgOAc (10 mM), NaCl (200 mM), Glycerin (10 % v/v), pH 7,9. Die Ansätze 2 – 6 wurden zusätzlich mit Bicine, HEPES, MES MOPS oder Tris versetzt (jeweils 200 mM). Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel verwendet. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Abb. 21 zeigt das Ergebnis eines Einfangexperiments mit den MTasen BseCI, Dim5 und Ctr4 mit dem Fangverbindungsgrundgerüst B1. Alle bei diesem Experiment eingefangenen MTasen wurden also unspezifisch eingefangen. Aus dem Gel ist ersichtlich, dass die unspezifischen Nebenreaktionen durch den Zusatz von 200 mM HEPES, MES oder MOPS um mehr als 50 % reduziert werden konnten (Spuren 3, 4 und 5). Auch durch Bicine konnte eine Reduktion erreicht werden (Spur 2), während Tris keinen Einfluss hatte (Spur 6).

HEPES, MES, MOPS waren am wirksamsten. Diese Verbindungen liegen bei dem pH-Wert von 7,9 als Zwitterionen vor. Besonders bei MOPS und HEPES wird aber auch ein gewisser Anteil der Moleküle eine negative Nettoladung tragen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese Eigenschaft den beobachteten Effekt bewirkt. HEPES, MES, MOPS und Bicine besitzen im Gegensatz zu Tris eine tertiäre Aminogruppe. Die Reduktion der unspezifischen Nebenreaktionen könnte auch hiermit zusammenhängen.

Im dem für die Experimente standardmäßig verwendeten *E. coli*-Einfangpuffer ist HEPES in einer Konzentration von 20 mM vorhanden. Um eine Vergleichbarkeit der durchgeführten Experimente zu ermöglichen wurde diese Konzentration bei sämtlichen Experimenten beibehalten. Vor dem Hintergrund der oben aufgeführten Ergebnisse könnte es in Zukunft jedoch sinnvoll sein diese Konzentration zu erhöhen. Allerdings sollte vorher genau überprüft werden, ob HEPES nicht auch die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Proteinen negativ beeinflusst.

3.2.11 Gleichzeitiges Einfangen von acht MTasen mit der Fangverbindung B1-N6-SAH

Die trifunktionellen Fangverbindungen mit der Selektivitätsfunktion SAH wurden mit dem Ziel entwickelt das Methylohm eines Organismus möglichst vollständig zu isolieren, zu identifizieren und eventuell auch zu quantifizieren. Um dies mit möglichst wenigen Experimenten erreichen zu können ist es erforderlich eine Vielzahl SAH bindender Proteine gleichzeitig aus einem Gemisch unterschiedlicher Proteine zu isolieren. Um zu überprüfen, ob es prinzipiell möglich ist, in einem einzigen Experiment mehrere MTasen gleichzeitig spezifisch einzufangen, wurde ein Experiment mit einem Gemisch aus acht MTasen und der Fangverbindung B1-N6-SAH durchgeführt.

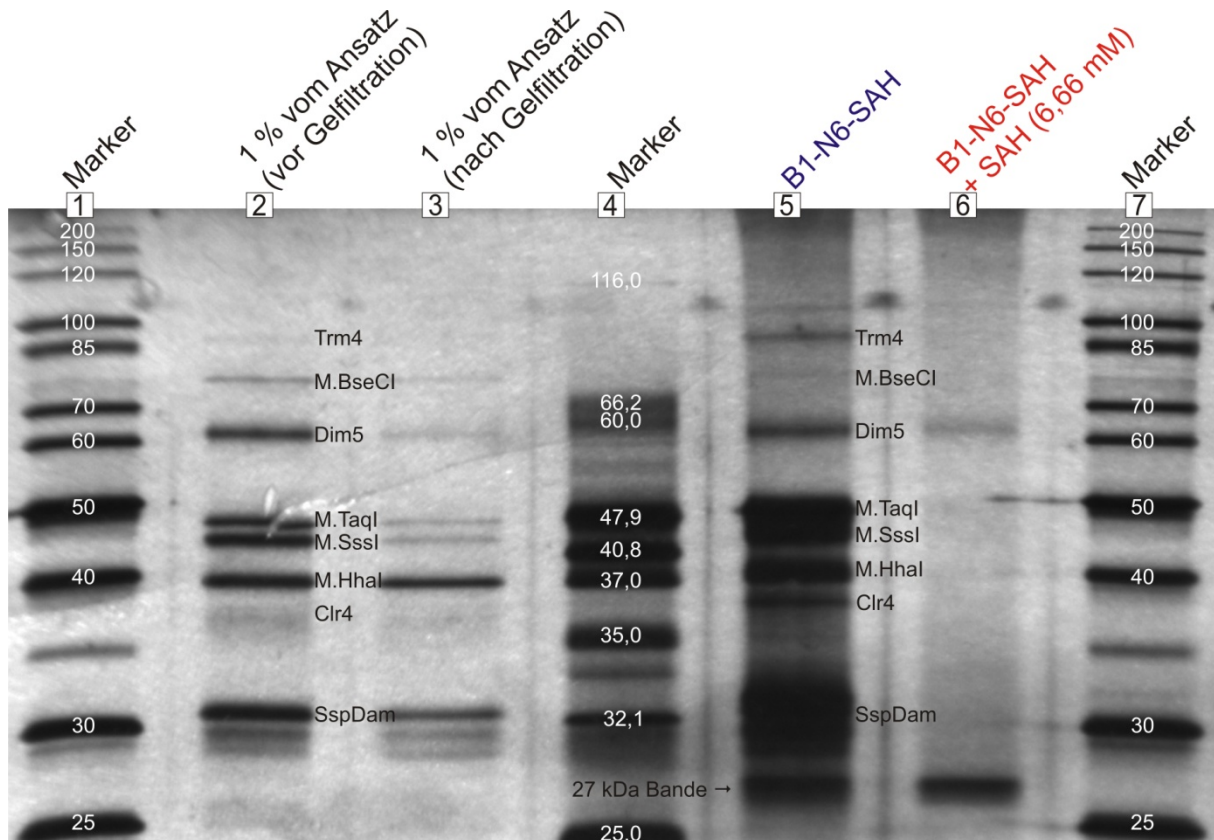


Abb. 22: Einfangen der MTasen Trm4, M.BseCI, Dim5, M.TaqI, M.SssI, M.HhaI, Clr4 und SspDam (jeweils 0,5 µM) mit der Fangverbindung B1-N6-SAH (25 µM). Im Kontroll-Ansatz befand sich zusätzlich SAH (6,66 mM). Das Probenvolumen betrug jeweils 100 µl und für das Isolieren wurden jeweils 200 µg MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel verwendet. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Unmittelbar vor und nach der Gelfiltration mittels 0,5 ml ZEBAX™ Desalt Spin Columns (PIERCE) wurden 1 % des Ansatzes entnommen und ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

Es stellte sich heraus, dass die MTasen mit sehr unterschiedlichen Ausbeuten eingefangen wurden (vgl. Abb. 22). Dies hatte mehrere Ursachen. Bereits in Abschnitt 3.2.3 wurde gezeigt, dass verschiedene MTasen mit unterschiedlichen Ausbeuten eingefangen werden, und dass der Unterschied bei den Ausbeuten außerdem noch von der Konzentration der Fangverbindung abhängt. Bei der verhältnismäßig hohen Fangverbindungskonzentration von 25 µM konnten die DNA-MTasen M.TaqI, M.SssI, M.HhaI und SspDam gut eingefangen werden. Auch die beiden Protein-MTasen Dim5 und Clr4 und die tRNA-MTase Trm4 wurden noch in befriedigenden Mengen eingefangen. Bei der Clr4 und der Trm4 gelang dies, obwohl die verwendeten Proteinchargen schon deutlich degradiert waren (vgl. Spuren 2 und 3). Die DNA-MTase M.BseCI wurde nur mit sehr schlechter Ausbeute eingefangen.

Auf dem in Abb. 22 dargestellten Gel ist dabei eine weitere, sehr triviale Ursache für unterschiedliche Ausbeuten an spezifisch eingefangenen Protein zu erkennen. Vor dem Isolieren der kovalent an die Fangverbindung gebundenen Proteine werden die nicht-kovalent an ein Protein gebundenen Fangverbindungsmoleküle in einem Gelfiltrationsschritt

abgetrennt. Hierbei kann aber ein beträchtlicher Teil der Proteine verloren gehen. Das Ausmaß dieser Verluste ist aber von Protein zu Protein unterschiedlich. So gingen bei dem oben aufgeführten Experiment z.B. über 90 % der Dim5 bei der Gelfiltration verloren, während die Verluste bei M.HhaI lediglich 10 % betrugen. An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass die bei der Gelfiltration auftretenden Verluste starken Schwankungen unterliegen und die Verluste bei diesem Experiment außergewöhnlich groß waren. Der Grund für diese Schwankungen konnte leider nicht genau geklärt werden.

Eine naheliegende Lösung für das Problem wäre natürlich der Verzicht auf den Gelfiltrationsschritt. Die Biotin-Bindekapazität der eingesetzten MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel beträgt jedoch lediglich 2500 pmol/mg. Mit den standardmäßig verwendeten 200 µg Magnetpartikel könnten also maximal 500 pmol Biotin gebunden werden. Bei dem typischen Ansatzvolumen von 100 µl wird dieser Wert jedoch schon ab einer Fangverbindungskonzentration von 5 µM überschritten. Proteine, die nur schlecht an die Selektivitätsfunktion der Fangverbindung binden, müssten jedoch bei deutlich höheren Fangverbindungskonzentrationen eingefangen werden (vgl. Abschnitt 3.2.3). Dies würde beim Isolierungsschritt mit den Magnetpartikeln jedoch aus technischen und ökonomischen Gründen zu Problemen führen, wenn die überschüssige Fangverbindung nach der Photoverknüpfung nicht abgetrennt würde. So wären bei einer Fangverbindungskonzentration von 250 µM bereits 10 mg der Magnetpartikel erforderlich. Dies würde Kosten von über 150 € pro Ansatz verursachen (Aktueller Preis für 20 mg MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel: 316 €, Vertrieb: Invitrogen). Das Waschen einer solchen Menge Magnetpartikel wäre unter Anderem wegen der Ausbildung eines dickeren und festeren Niederschlags bei der Magnetpräzipitation sehr schwierig.

Verluste durch die verwendeten Gelfiltrationssäulen hatten z.T. deutlichen Einfluss auf die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein, wenn für die Experimente aufgereinigte MTasen verwendet wurden. Die trifunktionellen Fangverbindungen wurden jedoch entwickelt, um funktionelle Subproteome aus komplexen Gemischen, wie z.B. Zelllysaten zu isolieren. Bei dem Einfangen von MTasen aus Zelllysaten hat sich dann herausgestellt, dass Proteinverluste durch Adsorption an den Probengefäßen oder den Gelfiltrationssäulen kaum noch nachweisbar waren. Beim Einfangen von MTasen aus Zelllysaten ist die Gesamtproteinmenge typischerweise 1000-fach größer als beim Einfangen aufgereinigter MTasen. Vermutlich werden potentielle Adsorptionsstellen auf den Materialoberflächen unter diesen Bedingungen unspezifisch von Proteinen blockiert, ohne dass die Konzentration der vorhandenen MTasen dabei nennenswert beeinflusst wird.

3.2.12 Einfangen von gereinigten MTasen mit der Fangverbindung B1-N6-SAH – eine Zusammenfassung

Die bis zu diesem Punkt aufgeführten Ergebnisse haben deutlich gezeigt, dass das spezifische Einfangen von MTasen mittels trifunktioneller Fangverbindungen durchaus möglich ist. Allerdings wurde dabei auch gezeigt, dass sich diese Technik nicht bei jeder MTase gleich gut anwenden lässt, dass die Optimalbedingungen dabei von Enzym zu Enzym verschieden sein können und dass es auch zu unterschiedlichen Problemen kommen kann. Im Folgenden sind deshalb die beim Einfangen von aufgereinigten MTasen gemachten Erfahrungen zusammengefasst.

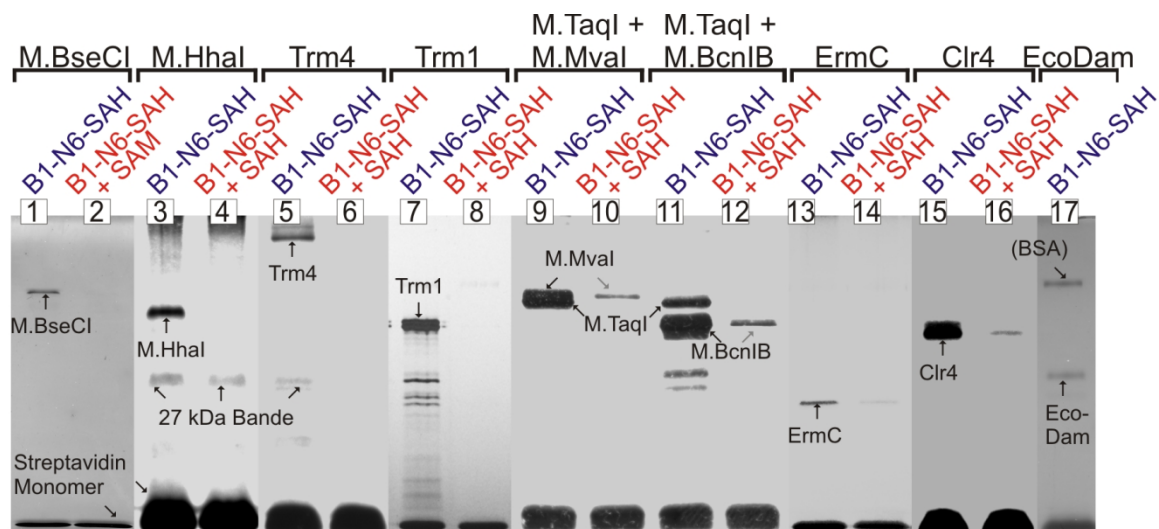


Abb. 23: Einfangen unterschiedlicher MTasen mit der Fangverbindung B1-N6-SAH. Alle Experimente wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Die eingesetzten MTasen- Fangverbindungs- und Kompetitor-Konzentrationen variierten jedoch und sind im Folgenden Aufgeführt: BseCI: 1 μ M BseCI, 5 μ M B1-N6-SAH, 10 mM SAM; M.HhaI: 1 μ M M.HhaI, 5 μ M B1-N6-SAH, 7,3 mM SAH; Trm4: 0,5 μ M M.Trm4, 20 μ M B1-N6-SAH, 4 mM SAH; Trm1: 1 μ M Trm1, 1 μ M B1-N6-SAH, 6,8 mM SAH; M.MvaI + M.TaqI: 5 μ M M.MvaI, 1 μ M M.TaqI, 10 μ M B1-N6-SAH, 6,6 mM SAH; M.BclI + M.TaqI: 5 μ M M.BclI, 1 μ M M.TaqI, 10 μ M B1-N6-SAH, 6,6 mM SAH; ErmC: 5 μ M ErmC, 1 μ M B1-N6-SAH, 6,8 mM SAH; Cfr4: 1 μ M Cfr4, 10 μ M B1-N6-SAH, 6,8 mM SAH; EcoDam: 5 μ M EcoDam, 5 μ M B1-N6-SAH. Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Abb. 23 zeigt eine Zusammenstellung einiger Resultate und soll einen Eindruck davon vermitteln, was die Methode prinzipiell leisten kann. Sie zeigt aber auch einige Grenzen auf. So ist z.B. in den Spuren 10, 12, 14 und 16 eine der jeweils betreffenden MTase zuzuordnende Bande zu erkennen, obwohl es sich um Kontrollexperimente handelte. Auch konnten einige der MTasen, wie z.B. die M.BseCI (Spur 1) und die ErmC (Spur 13) lediglich in geringen Mengen eingefangen werden.

Insgesamt konnten mit der Fangverbindung B1-N6-SAH von den 14 getesteten MTasen 13 spezifisch eingefangen werden. Drei dieser MTasen ließen sich allerdings nur sehr schlecht einfangen. Eine Übersicht über die bei den einzelnen MTasen zu erzielenden Gesamtausbeuten gibt Tab. 1.

Tab. 1: Übersicht über die Gesamtausbeuten, über die durch ZEBA™ Desalt Spin Columns verursachten Verluste und über die häufigsten Probleme bei den eingefangenen MTasen. Dabei handelt es sich um grobe Abschätzungen, die auf den Ergebnissen aller durchgeführten Experimente beruhen.

Enzym-name	Substrat	Gesamt-ausbeute	Verluste durch Zeba™ Column	Bemerkungen / Probleme
M.TaqI	N6-Adenin (DNA)	20 %	50 %	unproblematisch
M.HhaI	N4-Cytosin (DNA)	15 %	20 %	unproblematisch
SspDam	N6-Adenin (DNA)	15 %	50 %	unproblematisch
M.SssI	C5-Cytosin (DNA)	5 %	80 %	hohe Verluste durch Zeba-Säule
Trm4	C5-Cytosin (tRNA)	10 %	50 %	hohe Fangverbindungskonzentration nötig
EcoDam	N6-Adenin (DNA)	10 %	50 %	unproblematisch
M.BcnIB	N4-Cytosin (DNA)	10 %	?	neigt zu Nebenreaktionen
M.MvaI	N4-Cytosin (DNA)	10 %	?	neigt zu Nebenreaktionen
Trm1	N1-Adenin (tRNA)	10 %	50 %	erscheint als Doppelbande
Clr4	Lys 9 (Histon H3)	10 %	30 %	erscheint als Doppelbande, Nebenreaktionen
Dim5	Lys 9 (Histon H3)	2 %	60 %	Verluste durch Zeba-Säule, Nebenreaktionen
M.BseCI	N6-Adenin (DNA)	2 %	40 %	sehr starke Nebenreaktionen
ErmC	N6-Adenin (rRNA)	1 %	30 %	extrem starke Nebenreaktionen
TrmI	tRNA	0 %	50 %	konnte nicht eingefangen werden

Dabei wurde versucht, die einzelnen MTasen von „gut einzufangen“ bis „schlecht einzufangen“ einzuordnen. Die Rangfolge berücksichtigt dabei nicht nur die Ausbeuten, sondern auch die Spezifität des Einfangens, sowie Probleme wie z.B. Verluste durch die ZEBA™ Desalt Spin Columns oder eventuelle Ausbildung von Doppelbanden. Die angegebenen möglichen Gesamtausbeuten beziehen sich auf eher hohe Fangverbindungskonzentrationen und sind bei einigen MTasen mit dem Auftreten unspezifischer Nebenreaktionen verbunden (vgl. Spalte „Bemerkungen / Probleme“).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass über 90 % der getesteten MTasen mit der Fangverbindung B1-N6-SAH mehr oder weniger spezifisch eingefangen werden können. Dabei sind Ausbeuten von 10 % durchaus möglich. Allerdings können einige MTasen nur mit deutlich kleinerer Ausbeute eingefangen werden.

3.3 Geeignete Bedingungen für das Einfangen SAH bindenden Proteinen aus *E. coli*-Zelllysate

Mit den trifunktionellen Fangverbindungen steht der Proteomforschung ein relativ neues Werkzeug zur Verfügung, welches bislang noch kaum Verwendung gefunden hat. Neben der Neuartigkeit dieser Technik mag dies besonders an dem fehlenden Wissen um die geeignetsten Rahmenbedingungen für den Einsatz trifunktioneller Fangverbindungen liegen. Das Ermitteln geeigneter Rahmenbedingungen ist aber nicht trivial. Eine wesentliche Voraussetzung für das Einfangen funktioneller Subproteome ist z.B. das Vorliegen richtig gefalteter Proteine, was unter anderem denaturierende Bedingungen ausschließt. Außerdem muss vermieden werden, dass Proteine unspezifisch eingefangen werden, und zwar auch dann, wenn die Zielproteine im Vergleich zu den restlichen Proteinen um mehrere Größenordnungen geringer konzentriert vorliegen.

3.3.1 Herstellung geeigneter Zelllysate aus *E. coli*

Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* aus der Familie der *Enterobacteriaceae* ist vermutlich der weltweit bestuntersuchte Mikroorganismus. Der am häufigsten verwendete Stamm K-12 ist nicht pathogen und sehr einfach im Labor zu kultivieren. Außerdem ist seit 1997 die vollständige Sequenz seines Genoms bekannt (Blattner *et al.*, 1997). Deshalb diente *E. coli* DH5 α , ein von *E. coli* K-12 abgeleiteter Stamm, in dieser Arbeit als Modell Organismus.

Geeignete Puffer- und Lagerbedingungen für Zelllysate zur Proteomanalysen mittels trifunktioneller Fangverbindungen sollten vier wesentliche Voraussetzungen erfüllen:

1. Die Proteine müssen funktionell bleiben oder zumindest ihre Fähigkeit behalten, spezifisch an die Selektivitätsfunktion einer Fangverbindung zu binden.
2. Es darf zu keiner Präzipitation von Proteinen kommen, da ausgefallenes Protein zu Problemen bei der Isolierung der eingefangenen Proteine führen kann.
3. Der verwendete Puffer darf nicht die eingesetzte Fangverbindung, auch nicht im aktivierten Zustand, zerstören.
4. Im Zelllysate sollten sich möglichst wenige Moleküle befinden, die Kompetitoren der eingesetzten Fangverbindung darstellen.

Bezüglich der Punkte 1 und 2 hat sich ein Puffer als geeignet erwiesen, der sich bereits bei der Aufreinigung der oben verwendeten DNA-MTase M.TaqI bewährt hatte (*E. coli*-Aufschlusspuffer). Auf das Problem der Stabilität von Fangverbindungen im Puffer (Punkt 3) soll in Kapitel 3.3.14 näher eingegangen werden.

Wenn Zellen lysiert werden, so entsteht dabei zunächst ein sehr komplexes Gemisch aus den löslichen Bestandteilen des Cytosols und anderer Zellkompartimenten, sowie Zelltrümmern und Membranfragmenten. Durch Zentrifugation lassen sich die löslichen Bestandteile von den suspendierten Partikeln trennen. Nach der Zentrifugation enthält das Zelllysate neben Makromolekülen wie Nukleinsäuren, Polysacchariden und Proteinen auch noch kleinere organische Verbindungen. Hinzu kommen noch verschiedene Salze. Gerade die kleineren organischen Verbindungen, wie z.B. Zucker, Aminosäuren oder verschiedenste Kofaktoren sind aber Substrate für viele Enzyme oder regulatorische Proteine und können mit Fangverbindungen um die entsprechenden Bindungstaschen ihrer Zielproteine konkurrieren. Um solche potentiellen Kompetitoren aus den Zelllysaten zu entfernen können prinzipiell drei Verfahren angewendet werden: Dialyse, Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration) und Ultra-Membranfiltration.

Für die in den nächsten zwei Kapiteln aufgeführten Experimente wurden *E. coli* DH5 α -Zelllysate verwendet, die nach folgender Abfolge von Reinigungsschritten hergestellt wurden:

1. Ernte der Zellen durch Zentrifugation.
2. Lyse der in *E. coli*-Aufschlusspuffer resuspendierten Zellen durch Ultraschall.
3. Entfernen von Zelltrümmern und weiteren unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation.
4. Aufkonzentrieren des Lysats durch schwerefeldgetriebene Ultra-Membranfiltration.
5. Gelpermeationschromatographie unter Verwendung des *E. coli*-Aufschlusspuffers.
6. Verdünnung mit *E. coli*-Aufschlusspuffer und nochmaliges Aufkonzentrieren durch Ultra-Membranfiltration.
7. Zusetzen von 50 % Glycerin und Lagerung bei -20°C.

In Abb. 24 ist ein SDS-Gel mit Proben eines Zelllysats von unterschiedlichen Stufen des Herstellungsprozesses dargestellt. Auch Proben der aufgetretenen Verluste sind aufgetragen (gewonnen durch Resuspendieren der Zelltrümmer, Abspülen der eingesetzten Filtrationsmembranen und Entleeren der verwendeten Gelfiltrationssäulen).

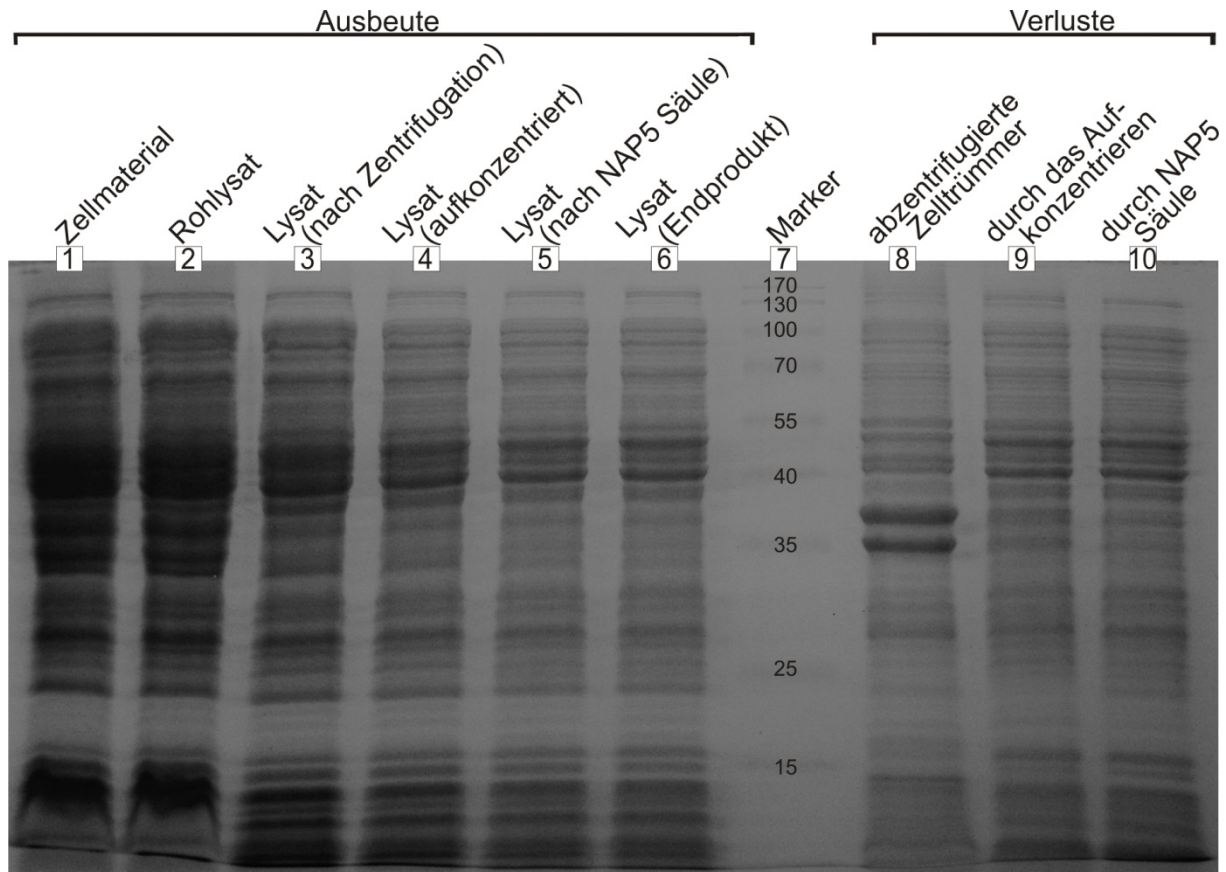


Abb. 24: Proteinausbeuten und -verluste bei verschiedenen Stufen während der Herstellung von Zelllysaten aus *E. coli*. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 0,0025 % der Gesamtmenge mittels SDS-PAGE analysiert (Coomassie-Färbung). Aus einer 10 l Kultur (aerobe Schüttelkultur von *E. coli* DH5 α in LB Medium bei 37°C, OD₆₀₀ ca. 0,8) wurden 25 g Zellmaterial durch Zentrifugation geerntet (4 200 g, 30 min). Die Zellen wurden in 100 ml *E. coli*-Aufschlusspuffer (6,7 mM MES, 6,7 mM NaOAc, 6,7 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 200 mM NaCl, 0,2 mM PMSF, 10 % Glycerin, pH 7,5) resuspendiert und mit einem Ultraschalldesintegrator aufgeschlossen. Das resultierende Rohlysat wurde zentrifugiert (35 000 g, 60 min) und der Überstand durch schwerefeldgetriebene Ultra-Membranfiltration eingengt (500 g, 10 K cut-off Membran). Das aufkonzentrierte Lysat wurde einer Gelpermeationschromatographie unterzogen (NAP5-Säulen, equilibriert mit *E. coli*-Aufschlusspuffer) und danach nochmals mittels Membranfiltration aufkonzentriert. Vor der Lagerung bei -20°C wurde das Zelllysate mit 50 % Glycerin versetzt.

In dem Gel ist zu erkennen, dass es bei der Herstellung der Zelllysate zu deutlichen Proteinverlusten gekommen ist. Besonders beim Abzentrifugieren der Zelltrümmer (Spur 3), beim anschließenden Aufkonzentrieren (Spur 4) und während der Gelpermeationschromatographie (Spur 5) kam es zu größeren Verlusten, während das abschließende Aufkonzentrieren praktisch nicht mehr zu Verlusten führte. Bei der Betrachtung der Proteinbandenmuster in den Spuren 8, 9 und 10 fällt auf, dass beim Abzentrifugieren der Zelltrümmer andere Proteine verloren gehen als beim Aufkonzentrieren und bei der Gelpermeationschromatographie. Dies ist damit zu erklären, dass unter den gewählten

Bedingungen (Puffer mit 200 mM NaCl und ohne Detergenzien, Zentrifugation für 60 min bei 35 000 g) neben den Zellwandtrümmern auch größere Membranfragmente samt Transmembran- und membranassoziierten Proteinen sedimentieren. Membranassoziierte Proteine würden sich erst bei Salzkonzentrationen um 1 M von den Membranfragmenten lösen. Um Transmembranproteine zu solubilisieren müsste dem Puffer ein Detergenz in ausreichender Konzentration beigelegt werden. Obwohl zum quantitativen Entfernen der Ribosomen stärkere Schwerefelder eingesetzt werden müssen (ca. 100 000 g), wird bei den relativ großen Zentrifugalkräften von 35 000 g wahrscheinlich auch ein Teil der Ribosomen abzentrifugiert worden sein.

Die Proteinbandenmuster der Verluste durch die Membranfiltration und die Gelpermeationschromatographie (Spuren 9 und 10) ähneln sich sehr. Außerdem ähneln die Muster dem des fertigen Zelllysats (Spur 6). Diese Verluste korrelieren also mit der Häufigkeit der einzelnen Proteine im Zelllysats.

Tab. 2: Übersicht über Proteinmengen und Proteinausbeuten bei der Herstellung von Zelllysaten aus *E. coli* DH5 α . Für die Herstellung der Zelllysate wurden 25 g Zellen (Gewicht des nassen Zelniederschlags) aus 10 l LB-Medium verwendet.

Stufe	Gesamtvolumen	Proteinkonzentration	Gesamtprotein	Ausbeute
Rohlysats	125,0 ml	14,8 mg/ml	1,85 g	100 %
nach Zentrifugation	125,0 ml	13,2 mg/ml	1,65 g	89 %
nach 1. Membranfiltration	17,5 ml	58,5 mg/ml	1,02 g	55 %
nach Gelfiltration	23,0 ml	28,7 mg/ml	0,66 g	36 %
Endprodukt	20,0 ml	35,0 mg/ml	0,70 g	38 %

Ein Vergleich der Proteinbandenmuster von eingesetztem Zellmaterial (Spur 1) und fertig aufgearbeitetem Zelllysats (Spur 6) zeigt, dass das Proteinbandenmuster weitestgehend erhalten bleibt. Das lässt darauf schließen, dass bei der Aufarbeitung der Zelllysate kein selektiver Verlust bestimmter Proteine stattfindet. Lediglich beim Abtrennen der festen Bestandteile nach dem Zellaufschluss gehen einige Proteine selektiv verloren. Vermutlich handelt es sich hierbei um membranständige Proteine, die gegebenenfalls durch eine hohe NaCl-Konzentration oder Detergenzien zum Teil ebenfalls solubilisiert werden könnten.

Insgesamt konnten aus 25 g Zellmaterial 1,65 g lösliche Proteine gewonnen werden. Allerdings enthielt der Zelniederschlag noch ca. 25 % Wasser, so dass nur 18,8 g des Gewichts auf die Bakterienzellen entfällt. Eine *E. coli* Zelle besitzt ein Volumen von ca. 0,9 μm^3 , von denen ca. 0,75 μm^3 auf das Cytosol entfallen (Koolman und Röhm, 1994).

Nimmt man für die *E. coli* Zellen annäherungsweise eine Dichte von 1 g/ml an, so entfallen auf die 18,8 g Zellmasse ca. 15,7 g bzw. ml Cytosol. Da hieraus 1,65 g lösliches Protein gewonnen wurde kann man die Proteinkonzentration im Cytosol von *E. coli* Zellen im exponentiellen Wachstum grob mit 100 mg/ml angeben. Dies entspricht in etwa dem Eiklar von Hühnereiern.

3.3.2 Reduktion der SAM- und SAH-Konzentration im Zelllysate von *E. coli*

Die Spezifität von trifunktionellen Fangverbindungen resultiert aus der Tatsache, dass sie mit ihren Selektivitätsfunktionen Strukturanaloga natürlicher Substrate oder Kofaktoren darstellen. Somit konkurrieren die natürlichen Substrate bzw. Kofaktoren mit den Fangverbindungen um die aktiven Zentren der Zielproteine und sollten deshalb weitestgehend aus den eingesetzten Zelllysaten entfernt werden. Im Falle der MTasen und der SAH-Fangverbindungen sind besonders SAM und sein Reaktionsprodukt SAH von Bedeutung. Aber auch Adenosin oder Methionin wären denkbare Kompetitoren. Wegen der relativ geringen Größe dieser Verbindungen können sie über größendiskriminierende Techniken wie Dialyse, Ultra-Membranfiltration oder Gelpermeationschromatographie von Makromolekülen wie Proteinen getrennt werden. Die letzteren zwei Techniken wurden bei der Herstellung von Zelllysaten aus *E. coli* DH5 α eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.3.1).

Ob, und mit welchem Aufwand SAM und SAH aus den Zelllysaten entfernt werden müssen, hängt von den natürlich vorkommenden Konzentrationen dieser Verbindungen ab. Im Fall von SAM konnten diese mit Hilfe von DNA-Protektionsuntersuchungen ermittelt werden. Dabei wird eine definierte Menge DNA durch eine DNA-MTase sequenzspezifisch methyliert und dadurch vor Abbau durch eine kognate Restriktionsendonuklease (REase) geschützt. Das als Methylgruppendonor fungierende SAM kommt dabei ausschließlich aus dem zu untersuchenden Zelllysate, welches einer Reihe einzelner Ansätze, die DNA und eine DNA-MTase enthalten, in immer geringeren Mengen zugesetzt wird. Nach einer hinreichend langen Inkubationszeit wird allen Ansätzen die REase zugesetzt. Nach der Restriktion der DNA werden die Proben dann mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Bei dem im Folgenden aufgeführten Test wurde Zelllysate, welches lediglich durch Zentrifugation von unlöslichen Zellbestandteilen befreit worden war mit Zelllysate verglichen, welches wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben aufgearbeitet worden war. Dabei wurde pBR322 Plasmid-DNA, die DNA-MTase M.TaqI und die REase R.TaqI verwendet.

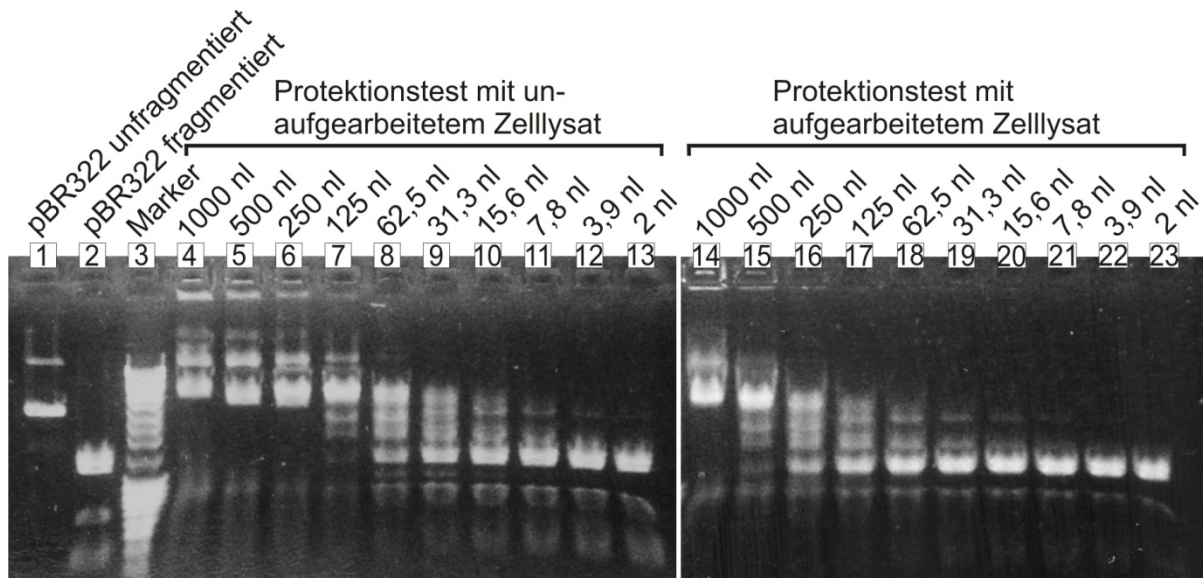


Abb. 25: Bestimmung der SAM-Konzentration von Zelllysaten durch einen Protektionstest. Das unaufgearbeitete Zelllysats hatte eine Proteinkonzentration von 18 mg/ml, das fertig aufgearbeitete Zelllysats 13 mg/ml. Ansätze (jeweils 20 µl) mit pBR322 (25 ng/µl), M.TaqI (200 nM) und einer abnehmenden Menge an Zelllysats (2000 nl – 2 nl) wurden für 60 min bei 60°C inkubiert, danach mit R.TaqI versetzt (jeweils 6 µl mit 3 U/µl) und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 6-fach Probenpuffer (2 µl) für Agarosegelelektrophorese versetzt und in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Ausführlichere Angaben zur Durchführung dieses Experiments sind dem Abschnitt Material und Methoden zu entnehmen.

Das Plasmid pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) weist sieben Erkennungsstellen für M.TaqI bzw. R.TaqI auf, die nur im methyliertem Zustand vor der Restriktion durch R.TaqI vollständig geschützt sind (Gruenbaum *et al.*, 1981). Für den vollständigen Schutz eines Plasmid-Moleküls werden also 14 Moleküle SAM benötigt. In jedem Ansatz befanden sich 500 ng Plasmid-DNA (4 361 bp, 2 860 000 g/mol), das entspricht ca. $1,7 \times 10^{-13}$ mol. Zur vollständigen Methylierung dieser DNA-Menge sind 24×10^{-13} mol SAM erforderlich. Bei Verwendung von unaufgearbeitetem Zelllysats reichten 125 nl des Zelllysats nicht mehr aus um eine vollständige Methylierung der eingesetzten DNA zu gewährleisten. Bei Verwendung des aufgearbeiteten Zelllysats reichten bereits 500 nl Zelllysats nicht mehr aus. Im ersten Fall lag die SAM-Konzentration also ca. bei 20 µM. Berücksichtigt man die bei der Herstellung der Zelllysate erfolgte 1:5 Verdünnung von Zellmaterial mit *E. coli*-Aufschlusspuffer, so lässt sich die SAM-Konzentration im *E. coli* Cytosol grob auf 100 µM beziffern. Dieser Wert stimmt relativ gut mit einer kürzlich durch LC-MS/MS ermittelten Konzentration von 180 µM überein (Bennett *et al.*, 2009).

Verglichen mit dem unaufgearbeiteten Zelllysats wies das fertig aufgearbeitete Zelllysats mit ca. 5 µM eine deutlich geringere SAM-Konzentration auf. Durch die bei der Aufarbeitung durchgeführte Gelpermeationschromatographie wäre nach Herstellerangaben jedoch eine

Reduktion der SAM-Konzentration um mindestens 90 % zu erwarten gewesen und durch die darauf folgende Membranfiltration eine Reduktion um nochmals 90 %. Insgesamt hätte sich die SAM-Konzentration im Zelllysats durch die Aufarbeitung also um 99 % verringern sollen. Tatsächlich konnte die SAM-Konzentration aber nur um 75 % verringert werden.

Die Anwendung größendiskriminierender Verfahren zur Reduktion der SAM-Konzentration in Zelllysaten ist also nur eingeschränkt möglich. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass SAM sich durch die hohe Affinität zu den SAM-bindenden Proteinen der Isolierung durch größendiskriminierende Verfahren entzieht. Diese These wird auch durch eine Beobachtung untermauert, die bei der präparativen Aufreinigung von MTasen wie M.TaqI oder M.HhaI gemacht werden konnten. Wenn diese MTasen nach ihrer Expression in *E. coli* von SAM befreit werden sollen, so werden sie an einer Kationentauschersäule immobilisiert und die Säule mit bis zu 200 Säulenvolumen Puffer gespült. Dieser Vorgang dauert über 20 h. Dieser enorme Aufwand ist aber unbedingt erforderlich, wenn über 95 % der Enzyme SAM-frei sein sollen.

Das oben getestete Zelllysats hatte am Ende eine SAM-Konzentration von 5 μM und einen Proteingehalt von 13 mg/ml. Wäre während der Aufarbeitung des Zelllysats jedes SAM-Molekül an ein Protein gebunden gewesen und geht man bei *E. coli* von einer durchschnittlichen Proteingröße von 40 kDa aus, so müssten ca. 1,5 % der Proteine SAM binden.

Das oben aufgeführte Experiment hat gezeigt, dass das Entfernen von SAM aus Zelllysaten von *E. coli* nur begrenzt möglich ist. Beim spezifischen Einfangen SAH-bindender Proteine mittels SAH-Fangverbindungen werden die Zelllysate aber nochmals deutlich verdünnt. So enthält ein typischer Ansatz mit 100 μl Gesamtvolumen nur 10 μl Zelllysats. Im Ansatz beträgt die SAM-Konzentration somit nur noch 0,5 μM und liegt damit deutlich unter dem entsprechenden K_D -Wert der meisten MTasen (um 5 μM). Deutliche Ausbeuteverluste an spezifisch eingefangenen Proteinen sind deshalb nicht zu erwarten. Bei der Verwendung anderer Selektivitätsfunktionen, die zu ihren Zielproteinen eine deutlich höhere Affinität besitzen, könnte es möglicherweise jedoch zu Problemen mit natürlich vorkommenden Kompetitoren kommen. Eine drastische Verdünnung der Ansätze und eine erhöhte Fangverbindungskonzentration können dann Abhilfe schaffen.

3.3.3 Einfangen des *E. coli* Methyloms mit der Fangverbindung B1-N6-SAH

E. coli K-12 hat ein Genom mit ca. 4 640 000 bp, auf dem ca. 4 400 Gene codiert sind (Posfai *et al.*, 2006). Zu den Genprodukten zählen neben verschiedenen RNAs 1563 Enzyme, 894 Transporter und Membranproteine, 510 regulatorische Proteine und Proteinfaktoren, sowie 124 Strukturproteine (Serres *et al.*, 2004). Es konnten zwar einige Gene als Pseudogene identifiziert werden, aber trotzdem verfügt *E. coli* vermutlich über ein Repertoire von über 4400 unterschiedlichen Proteinen. Das Methylom ist dabei nur ein verhältnismäßig überschaubares Subproteom, bestehend aus wahrscheinlich 61 Proteinen, die alle dadurch charakterisiert sind, dass sie SAH, das bei SAM-abhängigen Methylierungsreaktionen anfallende Reaktionsprodukt, binden können. Anderen SAM-bindenden Proteinen, die SAM zur Durchführung radikalischer Reaktionen nutzen, fehlt diese Eigenschaft, da bei solchen Reaktionen kein SAH als Reaktionsprodukt anfällt. Nach derzeitigem Wissensstand umfasst das Methylom von *E. coli* 44 bekannte MTasen, sowie 17 mutmaßliche Methyltransferasen. Außerdem gibt es noch mindestens ein weiteres Enzym, welches ebenfalls SAH bindet, nämlich die MTA/SAH Nucleosidase. Das Isolieren des gesamten Methyloms stellt also eine Reduktion der Komplexität des Proteoms um ca. 98,6 % dar.

Eine besondere Herausforderung ergibt sich dabei aus der Tatsache, dass wahrscheinlich viele der MTasen, wie z.B. die DNA-MTasen, im Vergleich zu Strukturproteinen oder zu Proteinen der Hauptstoffwechselwege, stark unterrepräsentiert sind. Um solche Proteine erfolgreich einfangen zu können, muss nicht nur die angewandte Methodik sehr spezifisch sein. Zusätzlich muss auch genügend Ausgangsmaterial eingesetzt werden, um von solchen MTasen eine für die beabsichtigte Analytik ausreichende Menge isolieren zu können.

Für das im Folgenden aufgeführte Experiment wurden pro Ansatz 350 µg Gesamtprotein eingesetzt. Hierfür wurden je 10 µl Lysat von *E. coli* DH5α (vgl. Abschnitt 3.3.1) in Ansätzen mit einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt.

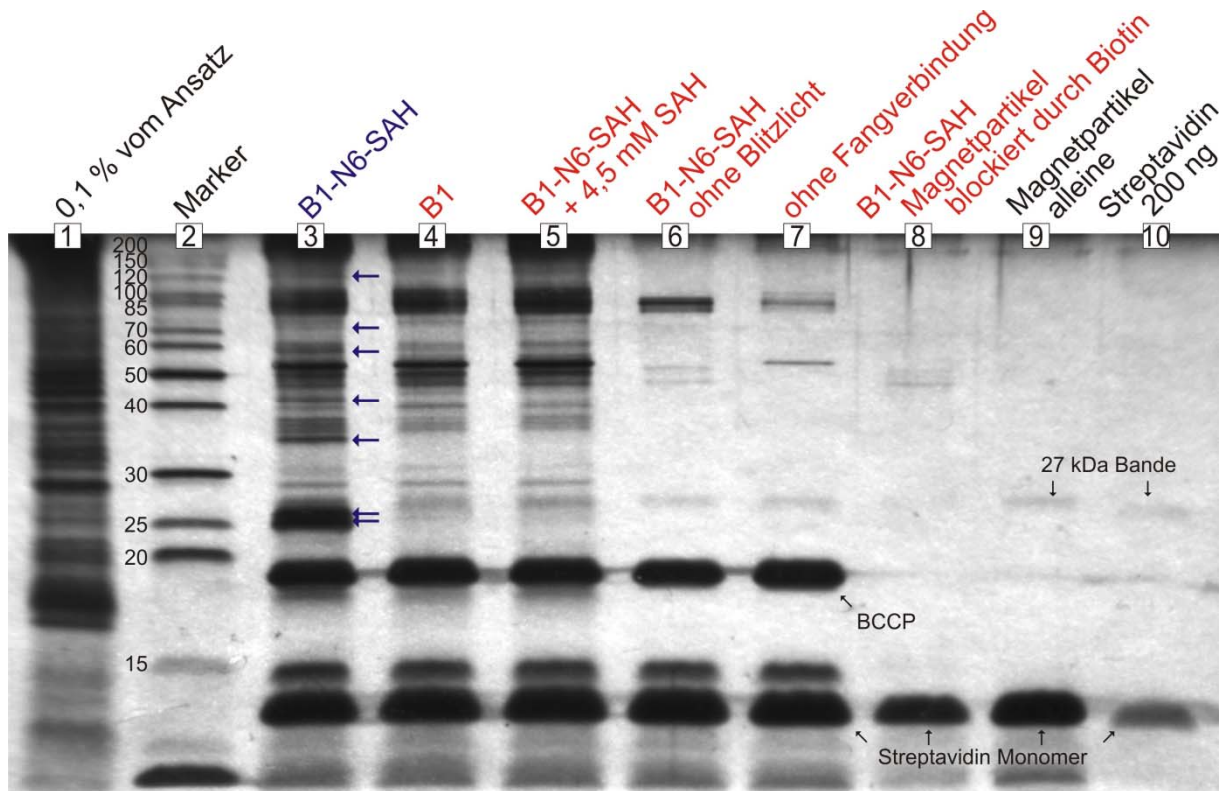


Abb. 26: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit der Fangverbindung B1-N6-SAH. Für das Experiment wurde Zelllysate von *E. coli* DH5 α eingesetzt (Glycerinlagerung mit 35 mg/ml, Endkonzentration 3,5 mg/ml). Es wurde die Fangverbindung B1-N6-SAH (2,5 μ M) verwendet. Kontrollansätze wurden unter Verwendung des Fangverbindungsgrundgerüsts B1 (2,5 μ M), unter Zugabe von SAH (4,5 mM), ohne Bestrahlung mit der Blitzlampe oder ohne Zugabe der Fangverbindung oder deren Grundgerüst durchgeführt. Für einen weiteren Kontrollansatz wurden Magnetpartikel eingesetzt, die zuvor für 10 min mit Biotin behandelt wurden (5 nmol). Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Die wichtigsten spezifischen Banden sind mit blauen Pfeilen markiert.

Beim Vergleich der Spur 1 und den Spuren 3 – 8 fällt sofort auf, dass die Proteinmengen in den einzelnen Spuren immer weiter abnehmen. Besonders der Unterschied zwischen Spur 1 und den anderen Spuren zeigt dabei die starke Reduktion der Proteinmenge. In Spur 1 ist lediglich 0,1 % der eingesetzten Proteinmenge aufgetragen, während die anderen Spuren 100 % der eingefangenen Proteine zeigen. Es ist während des Einfangens der Proteine also zu einer Reduktion der Proteinmenge um einen Faktor von ca. 1 000 gekommen.

Die Spuren 4 und 5 sehen fast identisch aus. In beiden Fällen handelt es sich um Proteine, die mit B1 oder B1-N6-SAH unspezifisch eingefangen wurden. Dabei macht es keinen Unterschied, ob die Selektivitätsfunktion fehlt, wie im Fall von B1, oder die Fangverbindung durch einen großen Überschuss des Kompetitors SAH aus den aktiven Zentren der Zielproteine verdrängt wird.

Im Vergleich zu den Spuren 4 und 5 sind in Spur 3 mehrere, teils sehr starke Banden zu sehen, die auf spezifisches Einfangen von Proteinen zurückzuführen sind (gekennzeichnet durch blaue Pfeile). In Abwesenheit der Selektivitätsfunktion oder in Anwesenheit des Kompetitors SAH fehlen diese Banden völlig. Leider machen diese spezifisch eingefangenen Proteine grob geschätzt aber nur 20 % der eingefangenen Proteinmenge aus. Zusätzlich gibt es eine sehr starke Bande, die in Spur 8 fehlt. Bei diesem Ansatz wurden Magnetpartikel eingesetzt, bei denen die Biotin-Bindestellen des Streptavidins zuvor durch Biotin blockiert worden waren, so dass diese Magnetpartikel keine freie Bindekapazität für biotinylierte Moleküle mehr besaßen. Dieser Befund und die Tatsache, dass die betreffende Bande auch dann zu sehen war, wenn die Ansätze nicht mit der Blitzlampe bestrahlt wurden oder lediglich Zelllysate enthielten, weist darauf hin, dass es sich hierbei um ein natürlicherweise biotinyliertes Protein handelt. Durch eine Suche in Proteindatenbanken konnte bestätigt werden, dass es in *E. coli* tatsächlich ein biotinyliertes Protein gibt. Es handelt sich um das Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP), eine Untereinheit des Acetyl-CoA Carboxylase Komplexes, der aus insgesamt acht Untereinheiten besteht. BCCP katalysiert den Transfer einer Carboxylgruppe auf Acetyl-CoA, wodurch Malonyl-CoA entsteht. Da es sich hierbei um einen für die Synthese von Fettsäuren grundlegenden Reaktionsschritt handelt, verwundert es nicht, dass BCCP im Zelllysate in nicht unerheblichen Mengen vorhanden ist. Da dieses Protein natürlicherweise biotinyliert ist, wird es beim Einfangen von Proteinen aus *E. coli*-Zelllysate während des Isolierungsschritts ebenfalls beobachtet. Die einzige Möglichkeit dies zu verhindern besteht darin, dieses Protein bereits vor der Zugabe der Fangverbindung mittels streptavidinbeschichteter Magnetpartikel aus den Ansätzen zu entfernen.

3.3.4 Einfluss der Konzentration von Proteinen und Fangverbindung auf Ausbeute und Spezifität

Beim spezifischen Einfangen von funktionellen Subproteomen mittels trifunktioneller Fangverbindungen ist die Fangverbindungskonzentration ein verhältnismäßig einfach zu variierender Parameter. Auch die Proteinkonzentration im Ansatz kann variiert werden. Anders als beim Einfangen von aufgereinigten Enzymen kann man sich dabei aber nicht an einzelnen Dissoziationskonstanten orientieren. Das Ziel-Subproteom ist hierfür in der Regel zu komplex und enthält zudem eine nicht bekannte Anzahl unbekannter Zielproteine.

Um den Einfluss von Fangverbindungs- und Proteinkonzentration auf Spezifität und Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein zu untersuchen wurden mehrere Experimente mit

variierenden Fangverbindungs- und Proteinkonzentrationen durchgeführt. Alle anderen Parameter inklusive des Ansatzvolumens wurden dabei nicht variiert.

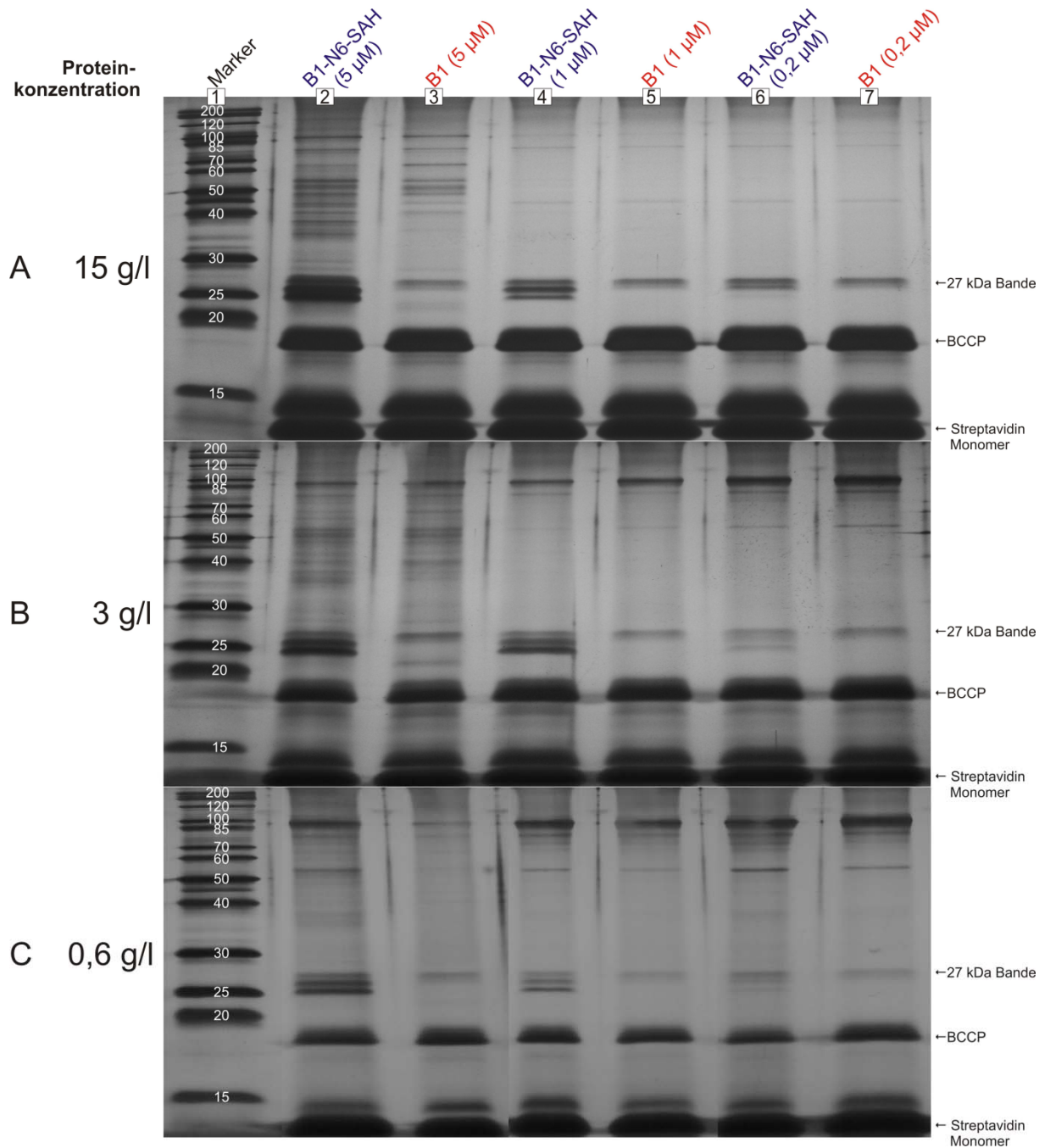


Abb. 27: Einfangen des Methyloms aus *E. coli* mit der Fangverbindung B1-N6-SAH. Als Kontrollen dienten Ansätze mit dem Fangverbindungsgrundgerüst B1. Dargestellt sind die Ergebnisse von Experimenten mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (15 mg/ml, 3 mg/ml und 0,6 mg/ml). Dabei wurden jeweils 3 unterschiedliche Fangverbindungskonzentrationen getestet (0,2 μM, 1 μM und 5 μM). Das Volumen der Ansätze betrug jeweils 100 μl. Für das Isolieren der eingefangenen Proteine wurden jeweils 200 μg MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Erwartungsgemäß ließen sich bei hohen Fangverbindungs- und Proteinkonzentrationen größere Proteinmenge einfangen als bei niedrigen Fangverbindungs- und Proteinkonzentrationen (vgl. Gel A/Spur 2 mit Gel C/Spur 6). Mit einer Fangverbindungskonzentration von $0,2\ \mu\text{M}$ ließen sich auch bei sehr hohen Proteinkonzentrationen kaum Proteine spezifisch einfangen (Gel A/Spur 6). Zwei Banden bei ca. $25\ \text{kDa}$ sind der einzige Unterschied zum Kontrollansatz. Auch bei Fangverbindungskonzentrationen von $1\ \mu\text{M}$ sind lediglich diese zwei Banden als Unterschied zu erkennen (vgl. jeweils die Spuren 4 mit Spuren 3). Mit Fangverbindungskonzentration von $5\ \mu\text{M}$ konnten mehrere Proteine zwischen $30\ \text{kDa}$ und $60\ \text{kDa}$ ausschließlich spezifisch eingefangen werden. Dies funktionierte besonders gut bei höheren Proteinkonzentrationen (vgl. jeweils die Spuren 2). Allerdings führten höhere Fangverbindungskonzentrationen auch zu mehr unspezifisch eingefangenen Proteinen. Das war besonders bei mittleren Proteinkonzentrationen der Fall (vgl. Gel A/Spur 3 mit Gel B/Spur 3).

Die vorliegenden Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass zum Isolieren von funktionellen Subproteomen aus komplexen Proteingemischen hohe Proteinkonzentrationen und hohe Fangverbindungskonzentrationen am günstigsten sind. Allerdings wurden bei dem oben aufgeführten Experiment lediglich niedrige Fangverbindungskonzentrationen getestet. Typische Dissoziationskonstanten zwischen MTasen und SAH liegen im unteren mikromolaren Bereich. Die eingesetzten Fangverbindungskonzentrationen bewegten sich also eher um oder unterhalb dieses Wertes. Ob höhere Fangverbindungskonzentrationen noch zu deutlich besseren Ausbeuten führen könnten, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht sagen. Niedrige Fangverbindungskonzentrationen, die deutlich unterhalb der zu erwartenden Dissoziationskonstanten liegen, sind aber eindeutig ungeeignet.

Von den getesteten Proteinkonzentrationen hat sich die höchste Konzentration als die günstigste erwiesen. Allerdings ging unter den gewählten Versuchsbedingungen die höhere Konzentration mit einer höheren Stoffmenge einher, da das Volumen wegen der benutzten ZebaTM Desalt Spin Columns das Ansatzvolumen auf $100\ \mu\text{l}$ beschränkt war.

Vergleicht man bei den Ansätzen mit $5\ \mu\text{M}$ Fangverbindung das Verhältnis zwischen spezifisch eingefangenen Protein und unspezifisch eingefangenen Protein im Kontrollansatz, so fällt auf, dass durch die Steigerung der Proteinkonzentration von $3\ \text{mg/ml}$ auf $15\ \text{mg/ml}$ auch die Menge an spezifisch eingefangenen Protein gestiegen ist, die Menge an unspezifisch eingefangenen Protein aber praktisch nicht. Im Ansatz mit der hohen Proteinkonzentration war die Spezifität also deutlich größer. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Proteinkonzentration sich aus praktischen Gründen nicht beliebig steigern lässt. Häufig steht

das Probenmaterial nur in sehr begrenzten Mengen zur Verfügung, und die Proteinkonzentration der verwendeten Zelllysate ist bereits sehr gering. Zudem werden Zelllysate oft in Puffern mit Reduktionsmitteln und 50 % Glycerin gelagert. Zwar macht sich das Glycerin bis zu einer Konzentration von 30 % nicht negativ bemerkbar, aber eventuell vorhandene Reduktionsmittel, insbesondere Dithiothreitol (DTT) kann in millimolaren Konzentrationen bereits deutlich stören.

Größere Mengen an eingesetztem Zelllysat bergen aber noch ein weiteres Problem. In *E. coli* gibt es das Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP), welches einen kovalent gebundenen Biotinrest trägt. Auch knapp unterhalb von 15 kDa befindet sich eine relativ dicke Bande. Diese Bande findet sich auch in den Kontrollansätzen und wächst mit der eingesetzten Proteinkonzentration an. Sie ist auch in Abb. 26 zu sehen, selbst in den Ansätzen, die nicht bestrahlt wurden oder keine Fangverbindung enthielten. Es ist also anzunehmen, dass es sich hierbei ebenfalls um ein biotinyliertes Protein handelt. Allerdings findet sich bislang in keiner *E. coli* Proteindatenbank ein biotinyliertes Protein mit ca. 15 kDa. Biotinylierte Proteine stellen ein besonderes Problem dar. Sie können eine Analyse durch Massenspektrometrie erschweren, wenn sie im Vergleich zu den spezifisch eingefangenen Proteinen in zu großen Mengen auf den Magnetpartikeln immobilisiert wurden. Außerdem können sie dazu führen, dass die Biotin-Bindekapazität der eingesetzten Magnetpartikel überschritten wird.

3.3.5 Einfluss größerer Fangverbindungskonzentrationen auf Ausbeute und Spezifität

Das vorangehende Experiment hat gezeigt, dass Fangverbindungskonzentrationen, die deutlich unterhalb der zu erwartenden Dissoziationskonstante zwischen Fangverbindung und Zielprotein liegen, nicht geeignet sind, die Proteine effizient einzufangen. Die Frage welchen Einfluss deutlich höhere Fangverbindungskonzentrationen auf Ausbeute und Spezifität haben, blieb dabei offen und soll an dieser Stelle geklärt werden.

Hierzu wurden Ansätze mit Fangverbindungskonzentrationen von 2,5 μM bis 20 μM unter identischen Bedingungen durchgeführt. Als Kontrollen dienten Ansätze mit dem Fangverbindungsgrundgerüst.

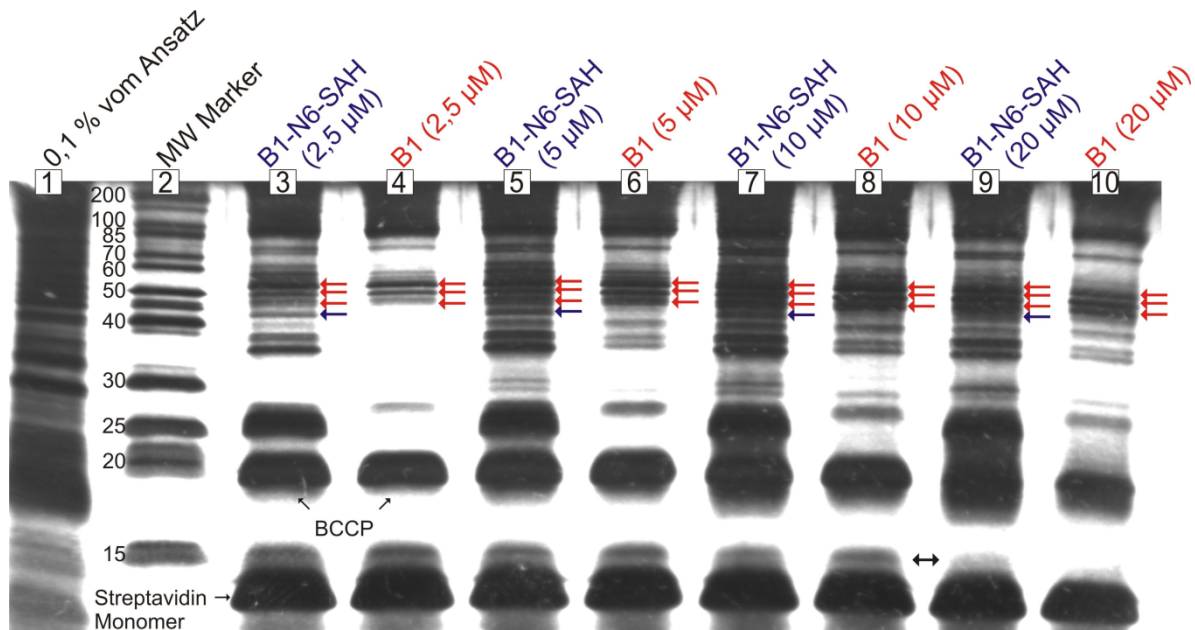


Abb. 28: Einfangen des *E. coli* Methyloms mit unterschiedlichen Fangverbindungskonzentrationen. Die Konzentrationen der Fangverbindung B1-N6-SAH bzw. des Fangverbindungsgrundgerüsts B1 variierten zwischen 2,5 µM und 20 µM. Die Proteinkonzentration betrug in allen Ansätzen 3,5 mg/ml. Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 µl und für das Isolieren wurden jeweils 200 µg MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Da das Gel bei diesem Experiment sehr stark angefärbt wurde und einige Banden nicht mehr klar zu unterscheiden sind, können für die Auswertung nicht mehr alle Banden herangezogen werden. So erscheinen die Proteine, die in den Abbildungen 26 und 27 als klare Doppelbande bei ca. 25 kDa erkennbar waren, hier nur noch als eine sehr dicke Bande, deren Intensität sich zwischen den einzelnen Ansätzen kaum unterscheidet. Im Bereich zwischen 40 kDa und 50 kDa gibt es aber eine spezifische Bande, die klar erkennbar ist (mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet). Verglichen mit einigen anderen Banden wurde dieses Protein nur in verhältnismäßig kleinen Mengen eingefangen. Die entsprechende Bande ist in keinem der Kontrollansätze sichtbar. Vergleicht man die Banden bei unterschiedlichen Fangverbindungskonzentrationen (vgl. Spuren 3, 5, 7 und 9) so fällt auf, dass sie bei 5 µM B1-N6-SAH deutlich stärker ist als bei 2,5 µM. Eine Erhöhung der Fangverbindungskonzentration auf 10 µM brachte jedoch keine deutliche Steigerung mehr und bei 20 µM B1-N6-SAH scheint die Bandenstärke sogar wieder etwas abzunehmen. Auch die Menge an unspezifisch eingefangenen Proteinen steigt mit zunehmender B1-Konzentration deutlich an (vgl. Spuren 4, 6 und 8). Bei einer B1-Konzentration von 20 µM ist sie aber wieder etwas kleiner.

Die Tatsache, dass die Menge an spezifisch eingefangenen Protein mit steigender Fangverbindungskonzentration zunächst deutlich zunimmt um dann ab einer gewissen Konzentration stagniert, entspricht den Erwartungen. Ist die Fangverbindungskonzentration deutlich größer als der zugehörige K_D -Wert des betreffenden Proteins, so hat im Moment der Photoaktivierung der Fangverbindung praktisch jedes Protein ein Fangverbindungsmolekül gebunden. Eine Erhöhung der Fangverbindungskonzentration kann somit nicht zu einer Erhöhung der Menge an spezifisch eingefangenen Protein führen.

Anders verhält es sich aber bei den unspezifisch eingefangenen Proteinen. Bei einem Vergleich der Spuren 6 und 8 ist festzustellen, dass es durch eine Erhöhung der B1-Konzentration von 5 μM auf 10 μM zu einer deutlichen Vergrößerung der Menge an unspezifisch eingefangenen Proteinen kommt (vgl. z.B. rote Pfeile). Das Ergebnis dieses Experiments führt also zu dem Schluss, dass für das spezifische Einfangen von Proteinen eine Fangverbindungskonzentration, die deutlich über dem zu erwartenden K_D -Wert der einzufangenden Proteine liegt, keinen Sinn macht.

Eine Auffälligkeit beim diesem Experiment ist die Tatsache, dass die Menge an eingefangenen Protein bei der größten Fangverbindungskonzentration wieder etwas geringer war. Auch die Menge an eingefangenen BCCP oder des vermutlich biotinylierten 20 kDa-Proteins (vgl. Doppelpfeil) ist in diesem Ansatz geringer. Die Erklärung für dieses Phänomen ist in der beschränkten Bindekapazität der verwendeten Magnetpartikel zu suchen. Auch die nicht-kovalent an ein Protein gebundenen Fangverbindungsmoleküle tragen nach ihrer Photoaktivierung noch einen Biotinrest und können somit Bindungsstellen auf der Oberfläche der Magnetpartikel belegen. Mit den zu ihrer Abtrennung verwendeten ZEBTM Desalt Spin Columns kann leider nur ein Teil von ihnen abgetrennt werden. Die Kapazität der Magnetpartikel reicht dann eventuell nicht aus, um alle biotinylierten Proteine zu binden.

3.3.6 Beeinflussung von Ausbeute und Spezifität durch die Magnetpartikelmenge

Das vorhergehende Experiment hat gezeigt, dass die für die Isolierung der biotinylierten Proteine verwendeten streptavidinbeschichteten Magnetpartikel bei hohen Fangverbindungs- und Proteinkonzentrationen an die Grenzen ihrer Bindekapazität stoßen. Die MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel von Dynal haben sich als besonders geeignet erwiesen (persönliche Mitteilung von Thomas Lenz, Caprotec GmbH), da sie die Vorteile relativ großer Kapazität und besonders geringer unspezifischer Wechselwirkungen vereinen. Dabei enthalten sie kein BSA als Blockierungsreagenz. Die hydrophilen Magnetpartikel weisen bei pH-Werten oberhalb von 6 ein negatives Zeta-Potenzial von ca. 40 mV auf und besitzen für freies Biotin eine Bindekapazität von mindestens 2500 pmol/mg (Herstellerangaben).

Bei den meisten Experimenten wurden für das Isolieren 200 µg Magnetpartikel verwendet. Die Biotin-Bindekapazität dieser Menge beträgt 500 pmol. Da die Fangverbindungen mit ca. 1,1 kDa ein relativ geringes Molekulargewicht aufweisen, kann angenommen werden, dass sie in ebenso großer Menge gebunden werden wie freies Biotin. Bei einem Ansatzvolumen von 100 µl ist die Kapazitätsgrenze bei einer Fangverbindungskonzentration von 5 µM erreicht.

Die vor dem Isolieren angewandten ZEBA™ Desalt Spin Columns sollten 95 % der nicht an Proteine gebundenen Fangverbindungsmoleküle abtrennen (nach Herstellerangaben). Das in Abschnitt 3.3.5 aufgeführte Experiment hat jedoch gezeigt, dass bereits bei einer Fangverbindungskonzentration von 20 µM im Ansatz und einer Proteinkonzentration von 0,35 mg/ml die Bindekapazität der eingesetzten 200 µg Magnetpartikel überschritten wird. Dies mag zum Teil daran liegen, dass im Zelllysate von *E. coli* mindestens ein Protein, BCCP, natürlicherweise biotinyliert vorliegt und zudem in relativ großen Mengen vorhanden ist. Die MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel haben für biotinylierte Antikörper nach Herstellerangaben aber eine Bindekapazität von 25 µg/mg. Die 200 µg Magnetpartikel sollten also 5 µg Protein binden können. Dies ist eine relativ große Menge, da Nachweisgrenze für Proteine in einem silbergefärbten SDS-PAGE-Gel erfahrungsgemäß deutlich unterhalb von 10 ng pro Bande liegt. Bei den meisten mit *E. coli*-Zelllysate durchgeführten Experimenten lag die mit den Magnetpartikeln isolierte Gesamtproteinmenge aber unterhalb von 1 µg, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die in Abschnitt 3.3.5 beobachtete Überschreitung der Kapazitätsgrenze auf noch vorhandene Fangverbindung zurückzuführen ist. Die verwendeten ZEBA™ Desalt Spin Columns trennen demnach lediglich ca. 75 % der eingesetzten Fangverbindung ab, ein Umstand der bei der Planung von Experimenten berücksichtigt werden sollte.

Wenn in einem Experiment höhere Fangverbindungskonzentrationen eingesetzt werden sollen, so kann die Proteinlösung vor dem Isolieren auch mehrfach mit ZEBTM Desalt Spin Columns umgepuffert werden. Dies führt aber in keinem Fall zu einer vollständigen Abtrennung der Fangverbindung und kann zu Proteinverlusten führen, so dass eventuell eine Erhöhung der verwendeten Magnetpartikelmenge sinnvoll sein kann. Die Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass dies nicht zu einer größeren Menge unspezifisch eingefangener Proteine führt. Deshalb wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem alle Ansätze gleich behandelt wurden und lediglich die eingesetzte Magnetpartikelmenge variierte.

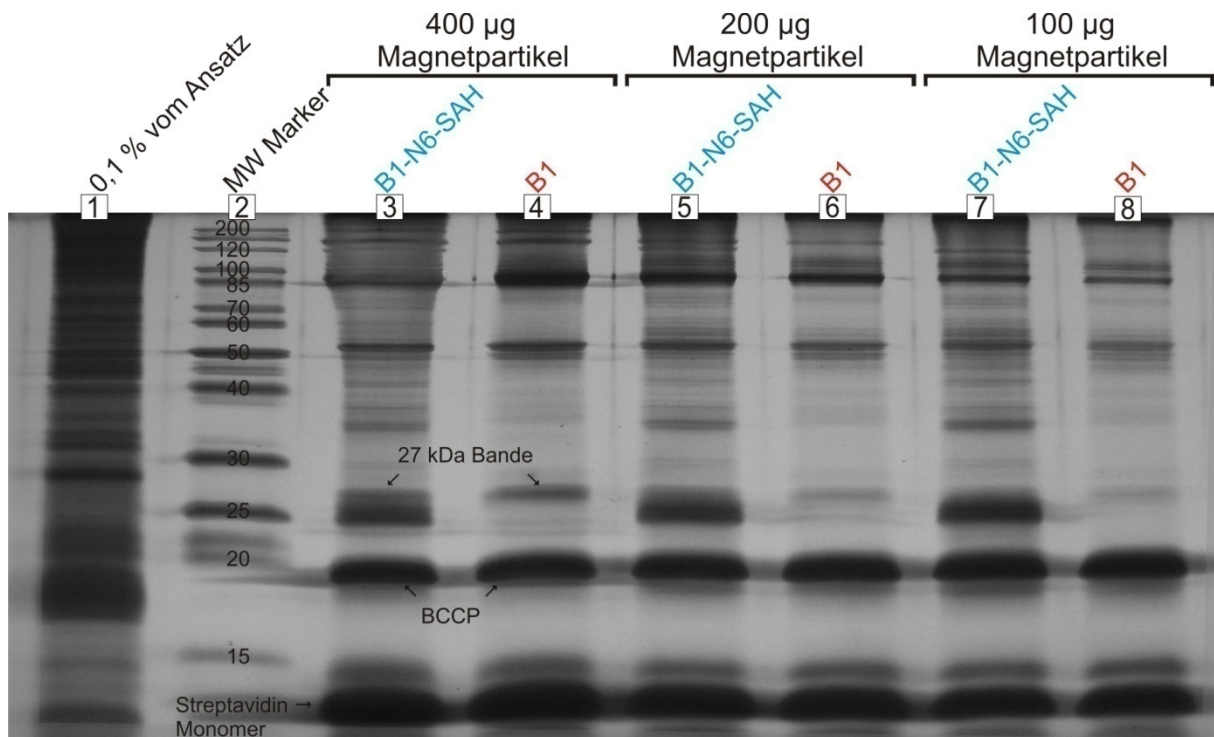


Abb. 29: Einfangexperiment mit variierender Menge Magnetpartikel. Die Ansätze enthielten B1-N6-SAH oder B1 (2,5 µM), sowie Zelllysate aus *E. coli* DH5α (Proteinkonzentration im Ansatz 0,35 mg/ml) bei einem Ansatzvolumen von 100 µl. Für das Isolieren wurden unterschiedliche Mengen MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt (400 µg, 200 µg und 100 µg). Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung.

Bei der Betrachtung des Gels fällt zunächst auf, dass alle Ansätze, bzw. Kontrollansätze relativ gleich aussehen. Allerdings nimmt die Intensität der mit den Magnetpartikeln in Zusammenhang stehenden 27 kDa Bande (vermutlich Streptavidin Dimer) mit steigender Magnetpartikelmenge erwartungsgemäß zu, da die Menge an Streptavidin zunimmt. Die Menge des isolierten BCCP ist bei allen Ansätzen gleich groß. Auch die Intensität der bei ca. 15 kDa liegenden Bande ist in allen Spuren gleich stark. Dies spricht dafür, dass in keinem der Ansätze die Kapazitätsgrenze der eingesetzten Magnetpartikel überschritten wurde.

Allerdings gibt es oberhalb von 85 kDa einige Banden, die mit steigender Magnetpartikelmenge an Intensität zunehmen. Dies könnte daran liegen, dass sehr große Proteine aus sterischen Gründen schlechter an die Magnetpartikel binden und die Immobilisierung der größeren biotinylierten Proteine nach 30 min noch nicht abgeschlossen ist. Eine Erhöhung der Magnetpartikelmenge würde das Binden in diesem Fall beschleunigen. Die zwei dicksten unspezifischen Banden finden sich etwas oberhalb von 50 kDa und zwischen 85 kDa und 100 kDa. Diese unspezifischen Banden, auf die am Ende von Kapitel 3.3 noch ausführlich eingegangen werden soll, zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der eingesetzten Magnetpartikelmenge. Abgesehen von diesen Banden wird die Menge der meisten unspezifisch eingefangenen Proteine durch eine Erhöhung der Magnetpartikelmenge aber nicht wesentlich beeinflusst. Somit kann für das Isolieren der biotinylierten Proteine auch eine größere Menge der Magnetpartikel eingesetzt werden. Allerdings zeigt ein Vergleich der mit B1-N6-SAH durchgeführten Ansätze, dass bereits eine Magnetpartikelmenge von 100 µg ausreichend war. Die standardmäßig verwendete Magnetpartikelmenge von 200 µg ist bei Experimenten mit Fangverbindungskonzentrationen von 2,5 µM also völlig ausreichend.

3.3.7 Einfluss von Biotin auf die Spezifität beim Einfangen des Methyloms von *E. coli*

Im vorangegangenen Abschnitt wurde festgestellt, dass das unspezifische Einfangen von Proteinen weitestgehend unabhängig von der eingesetzten Magnetpartikelmenge ist. Das Ereignis, welches zum unspezifischen Einfangen von Proteinen führt, findet also bereits vor dem Isolierungsschritt statt, nämlich bei der Photoverknüpfung. Eine denkbare Möglichkeit wäre hierbei, dass einige der Proteine aus dem Zelllysate nicht an die Selektivitätsfunktion der Fangverbindung binden, sondern an einen anderen Teil des Moleküls, wie z.B. an den Biotinrest. Um dies zu untersuchen wurde bei einem Experiment einem der Kontrollansätze Biotin zugefügt.

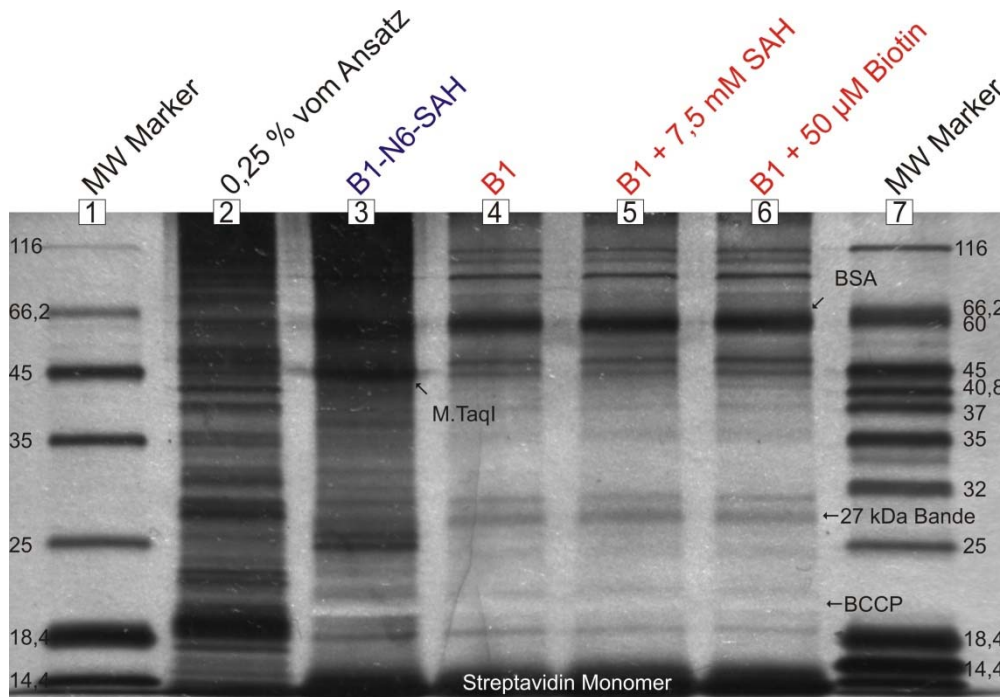


Abb. 30: Einfangen des Methyloms aus Zelllysat des M.TaqI exprimierenden *E. coli* Stamms ER2267-pA1. Für das Einfangen des Methyloms wurde die Fangverbindung B1-N6-SAH benutzt (5 μ M). Für die Kontrollansätze wurde das Fangverbindungsgrundgerüst B1 verwendet (5 μ M). Die Proteinkonzentration in den Ansätzen betrug 2 mg/ml. Das Probenvolumen der Ansätze betrug 100 μ l. Zwei der Kontrollansätze enthielten zusätzlich noch SAH (7,5 mM) oder Biotin (50 μ M). Für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOne™ Streptavidin T1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Bei diesem Experiment wurde Zelllysat von *E. coli* ER2267-pA1 verwendet. Dieser *E. coli* Stamm verfügt über einen Expressionsvektor, in den das M.TaqI-Gen kloniert wurde (Pues *et al.*, 1997). Die eingefangene M.TaqI ist in Spur 3 deutlich zu erkennen und erscheint bei den Kontrollansätzen nur als schwache Bande (Spuren 4, 5 und 6). Auffallend ist dabei, wie stark M.TaqI durch das Einfangen im Vergleich zum Zelllysat angereichert wurde, während andere Proteine, die im Zelllysat stark vertreten waren nicht eingefangen wurden (vgl. Spuren 2 und 3).

Bei der Betrachtung der Kontrollansätze fällt auf, dass sie praktisch identisch aussehen. Dies beweist, dass SAH nicht als photochemischer Quencher wirkt. Würde SAH z.B. durch seine UV-Absorption die Menge unspezifisch eingefangener Proteine verringern, dann dürfte dieser Effekt nicht in einem Kontrollansatz mit nur dem Fangverbindungsgrundgerüst zu beobachten sein.

Die Anwesenheit von 50 μ M Biotin im Ansatz führte ebenfalls zu keiner Reduktion unspezifisch eingefangener Proteine. Dies weist darauf hin, dass die unspezifischen Nebenreaktionen nicht auf einer Bindung der betreffenden Proteine an den Biotinrest der

Fangverbindung beruhen. In diesem Fall hätte das zugesetzte Biotin das B1 zumindest teilweise aus den entsprechenden Bindungstaschen der betroffenen Proteine verdrängen sollen. Allerdings muss dieser Effekt nicht zwingendermaßen so groß sein, dass er durch Unterschiede in der Proteinbandenintensität detektiert werden kann. Wenn eine postulierte unspezifische Vorbindung einer Fangverbindung an ein nicht-Zielprotein so schwach ist, dass z.B. nur 1 % der betreffenden Proteine überhaupt eine Fangverbindung gebunden haben, dann hat die Anwesenheit eines zehnfachen Überschusses eines Kompetitors praktisch keinen Einfluss. Eine Möglichkeit wäre dann mit noch größeren Mengen des Kompetitors zu arbeiten. Im vorliegenden Fall ist dies aus praktischen Gründen jedoch problematisch, da durch die Verwendung einer ZEBATM Desalt Spin Column das Biotin nicht quantitativ abgetrennt werden kann und Biotin beim Isolierungsschritt die Bindestellen auf den Magnetpartikeln blockiert.

3.3.8 Fangverbindungsanalogon zur Reduktion unspezifischer Nebenreaktionen

Das über 700 Da schwere Grundgerüst der B1-Fangverbindungen (Abb. 3.2.1) weist eine Reihe potenzieller Ipitope auf, die Proteine binden könnten. Der Biotinrest mit einer sehr hohen Affinität zu Streptavidin ist nur ein Beispiel. Auch an den PEG-Linker könnten Proteine binden.

Um solche unerwünschten Wechselwirkungen zu unterdrücken, wurde ein Analogon zum Fangverbindungsgrundgerüst B1 (bzw. zum B2-Grundgerüst) synthetisiert, welchem im Vergleich zu B1 lediglich die Azidfunktion fehlt (bzw. im Vergleich zu B2 der Trifluormethyldiazirinrest). Mit diesem als B0 bezeichneten Fangverbindungsderivat könnten sich unerwünschte Wechselwirkungen zwischen der eingesetzten Fangverbindung und nicht-Zielproteinen deutlich reduzieren lassen, da es mit der Fangverbindung um die entsprechenden Bindestellen an diesen Proteinen konkurriert. Lediglich die Bindung an die Selektivitätsfunktion SAH sollte nicht beeinflusst werden, da B0 keine Selektivitätsfunktion aufweist.

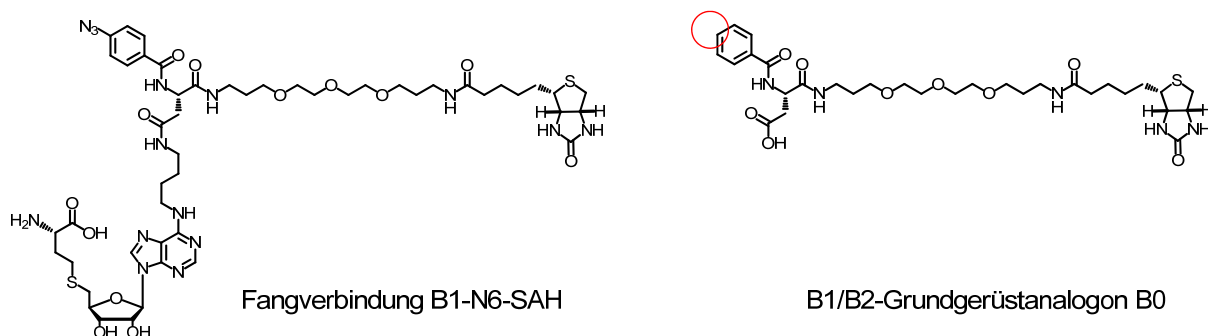


Abb. 31: Strukturformeln der Fangverbindung B1-N6-SAH und des B1/B2-Grundgerüstanalogs B0. Der rote Kreis markiert die fehlende Reaktivitätsfunktion.

Der Einfluss des Fangverbindungsanalogs B0 auf unspezifische Nebenreaktionen bei der Verwendung der Fangverbindung B1-N6-SAH wurde in einem vergleichenden Experiment überprüft. Dabei wurde B0 im Vergleich zu B1-N6-SAH oder B1 in einem 50-fachen Überschuss eingesetzt.

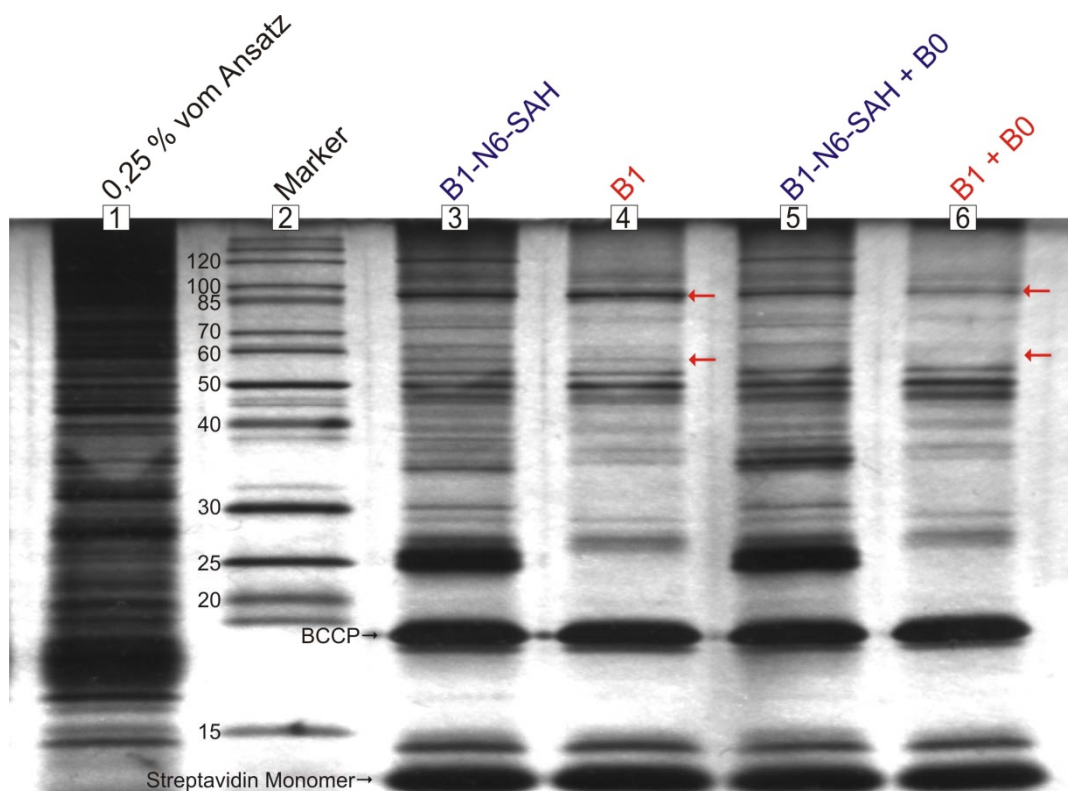


Abb. 32: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit der Fangverbindung B1-N6-SAH (10 μ M) und Kontrollansätze mit dem Fangverbindungsgrundgerüst B1 (10 μ M). Zwei Ansätze enthielten zusätzlich B0 (500 μ M). Alle Ansätze enthielten Zellysate von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml). Abweichend zum Standardprotokoll wurden aufeinanderfolgend zwei ZEBATM Desalt Spin Columns eingesetzt. Für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. Erklärungen zu den Pfeilen und Banden finden sich im Text.

Wegen der großen Mengen an B0 mussten aufeinanderfolgend zwei ZEBATM Desalt Spin Columns eingesetzt werden, da ansonsten die Kapazität der verwendeten Magnetpartikel zu gering gewesen wäre.

Ein Vergleich der Kontrollansätze (Spuren 4 und 6) lässt sofort erkennen, dass die Anwesenheit von B0 nur einen sehr geringen Einfluss auf die unspezifischen Nebenreaktionen hat. Lediglich 2 unspezifische Banden waren bei Anwesenheit von B0 deutlich schwächer (markiert mit roten Pfeilen). Der Befund, dass aber die Mehrzahl der Banden sich nicht durch die Zugabe von B0 unterdrücken ließ, kann damit erklärt werden, dass den unspezifischen Nebenreaktionen keine unerwünschte, nicht-kovalente Verbindung zwischen Fangverbindung und Protein zugrundeliegt. Es könnte jedoch auch sein, dass eine solche Verbindung stattfindet, die entsprechende Dissoziationskonstante jedoch deutlich größer ist als die eingesetzte B0-Konzentration. Der Kompetitor hätte in diesem Fall kaum einen Einfluss. Wegen der begrenzten Kapazität der für die Isolierung verwendeten Magnetpartikel und der ungenügenden Trennleistung der ZEBATM Desalt Spin Columns sind B0-Konzentrationen im millimolaren Bereich aber praktisch nicht einsetzbar.

In einigen hier nicht aufgeführten Experimenten wurden PEG 8000, Asparaginsäure und *p*-Azidobenzoesäure in höheren Konzentrationen als Kompetitoren getestet. Dabei konnte teilweise ein kleiner Einfluss auf einige der unspezifisch eingefangenen Proteine festgestellt werden. Allerdings führen größere Mengen an *p*-Azidobenzoesäure zu Photoquenching, da sie ein ähnliches Absorptionsspektrum wie die Fangverbindung aufweist. Eine deutliche Verringerung unspezifischer Nebenreaktionen konnte dabei nicht erreicht werden.

3.3.9 Adenosin und L-Methionin als Kompetitoren der Selektivitätsfunktion SAH

Das spezifische Einfangen von Proteinen mittels trifunktioneller Fangverbindungen beginnt mit einem spezifischen, nicht-kovalenten Bindungsereignis zwischen Zielprotein und der Selektivitätsfunktion der Fangverbindung. Um die Spezifität zu überprüfen, kann unter Anderem auch die Selektivitätsfunktion in freier Form als Kompetitor zugefügt werden. So konnte mit der Fangverbindung B1-N6-SAH in Gegenwart eines großen Überschusses an SAH keine der gereinigten MTasen eingefangen werden.

Dieser Umstand lässt sich prinzipiell nutzen, um Informationen über die Bindungsverhältnisse im aktiven Zentrum der betreffenden Enzyme zu gewinnen. Prinzipiell könnten dazu Fangverbindungen mit veränderten Selektivitätsfunktionen eingesetzt werden. Die Verwendung unterschiedlicher Kompetitoren ist jedoch eine deutlich kostengünstigere Variante, da hierzu keine neuen Fangverbindungen synthetisiert werden müssen.

Im vorliegenden Beispiel sollte untersucht werden, wie groß der Einfluss des Adenosyl- und des Methionylrests von SAH auf die Bindung im aktiven Zentrum SAH-bindender Proteine in *E. coli* ist.

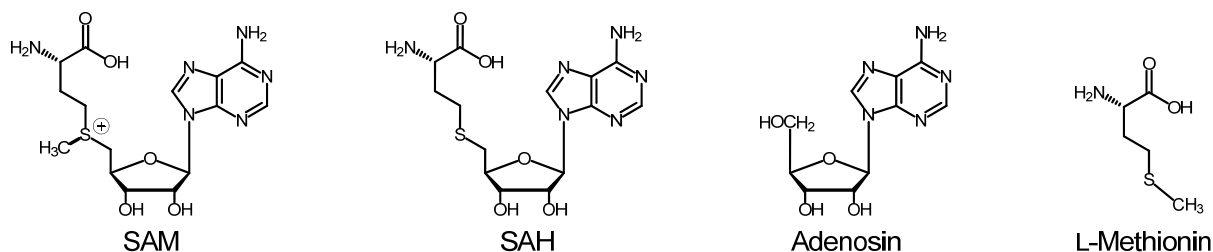


Abb. 33: Strukturformeln von SAM, SAH, Adenosin und L-Methionin.

SAM, der von MTasen als Methylgruppendonor genutzte Kofaktor, kann formal aus Adenosin und L-Methionin unter Eliminierung von Wasser gebildet werden (vgl. Abb. 33). Diese beiden Verbindungen sollten also ebenfalls in die entsprechende Bindungstasche von MTasen passen.

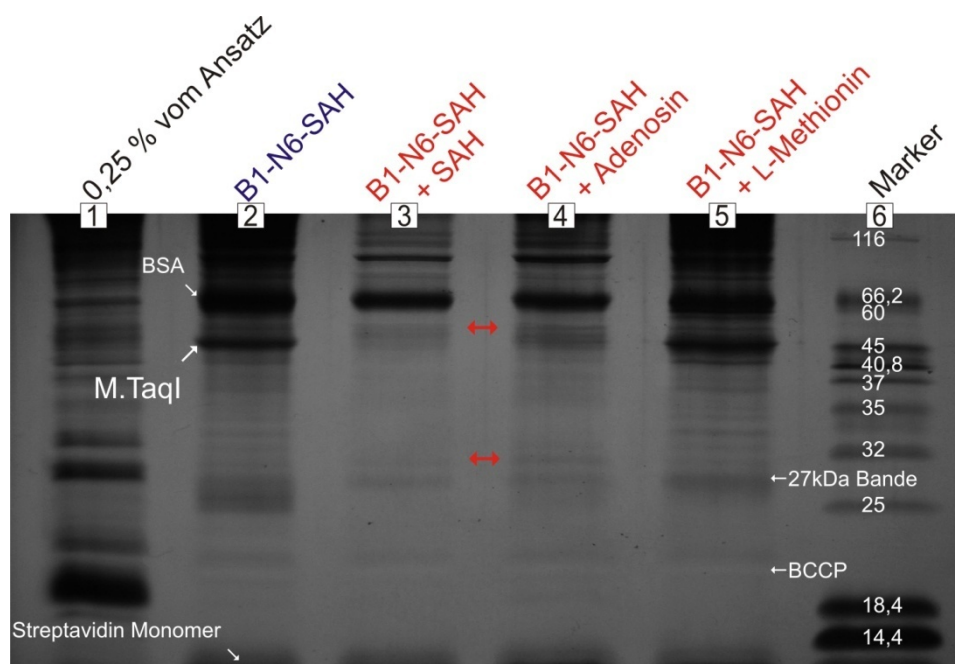


Abb. 34: Einfangen des Methyloms aus Zelllysate des M.TaqI exprimierenden *E. coli* Stamms ER2267-pA1. Dabei wurde die Fangverbindung B1-N6-SAH (5 μ M) und Zusätze von SAH, Adenosin oder L-Methionin (jeweils 7,5 mM) verwendet. Die Proteinkonzentration war in allen Ansätzen 2 mg/ml. Für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOne™ Streptavidin T1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit roten Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Erwartungsgemäß konnten mit der Fangverbindung B1-N6-SAH aus dem Zelllysate viele Proteine eingefangen werden, die in Anwesenheit von SAH nicht eingefangen wurden (vgl.

Spuren 2 und 3). Bereits früher konnte in vielen Experimenten bestätigt werden, dass in Anwesenheit eines großen Überschusses SAH keine Proteine mehr spezifisch eingefangen werden und sich das Ergebnis eines solchen Experiments nicht von dem eines unter Verwendung des Fangverbindungsgrundgerüsts B1 durchgeführten Experiments unterscheidet. Interessanterweise ist aber auch Adenosin in der Lage die Selektivitätsfunktion der Fangverbindung B1-N6-SAH aus den Bindetaschen der Zielproteine zu verdrängen. Zwar gilt dies nicht für jedes der spezifisch eingefangenen Proteine gleichermaßen (vgl. Spuren 3 und 4, rote Doppelpfeile), aber M.TaqI z.B. kann in Anwesenheit von 7.5 mM Adenosin praktisch nicht mehr eingefangen werden. Anders verhält sich dies jedoch bei Zugabe von L-Methionin (Spur 5). Das resultierende Bandenmuster unterscheidet sich kaum von dem in Spur 2. Allerdings wurde mindestens eines der zwei Proteine, die eine Doppelbande bei ca. 25 kDa verursachen deutlich schlechter eingefangen. Einige Banden erscheinen hingegen sogar etwas stärker. Aus dem Ergebnis des vorliegenden Experiments lässt sich also der Schluss ziehen, dass für die spezifische Bindung zwischen SAH und den meisten SAH-bindenden Proteine besonders der Adenosylrest des SAH von Bedeutung ist. Der Methionylrest spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle. Der wesentliche Anker der Kofaktorbindung ist also der Adenosylteil.

Eine besonders schöne Demonstration, welche Möglichkeiten Bindungs- und Kompetitionsstudien mit trifunktionellen Fangverbindungen und deren Kompetitoren bieten, gelang 2009 Thomas Lenz (Dalhoff *et al.* 2010). Durch Versuchsreihen mit nur zehn verschiedenen B1-N6-SAH - bzw. SAH-Konzentrationen konnten die K_D -Werte des B1-N6-SAH-M.TaqI Komplexes (1,4 μ M) bzw. des SAH-M.TaqI Komplexes (2,3 μ M) bestimmt werden. Natürlich ergibt sich damit auch die Möglichkeit eine Vielzahl weiterer Verbindungen (z.B. Medikamente) hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zur entsprechenden Bindetasche eines Proteins zu untersuchen.

Kompetitionsstudien mit trifunktionellen Fangverbindungen und potentiellen Kompetitoren der Selektivitätsfunktion, sind eine einfache und kostengünstige Möglichkeit, Informationen über die Bindungsverhältnisse in den aktiven Zentren der betreffenden Proteine zu erhalten. Sie ermöglichen die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Proteine, z.B. in einem Zelllysat. Außerdem können dabei selbst mit der einfachen Analysetechnik SDS-PAGE gute quantitative Ergebnisse erzielt werden, wenn die untersuchten Proteinmengen im linearen Bereich der verwendeten Färbetechnik liegen.

3.3.10 Abreicherung unspezifisch bindender Proteine durch Fangverbindungsgrundgerüste

Eine denkbare Möglichkeit die Spezifität beim Einfangen von funktionellen Subproteomen aus Zelllysaten zu erhöhen ist das Abtrennen von Proteinen, die unspezifisch eingefangen werden. Dies könnte z.B. dadurch erfolgen, dass die betreffenden Proteine in einem ersten Schritt mit dem Fangverbindungsgrundgerüst reagieren und dann durch MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel oder andere Biotin-bindende Materialien entfernt werden.

Dies wurde in einem Experiment überprüft, bei welchem das Fangverbindungsgrundgerüst B1 in verhältnismäßig hoher Konzentration zugesetzt und nach erfolgter Photoverknüpfung zusammen mit den biotinylierten Proteinen wieder abgetrennt wurde.

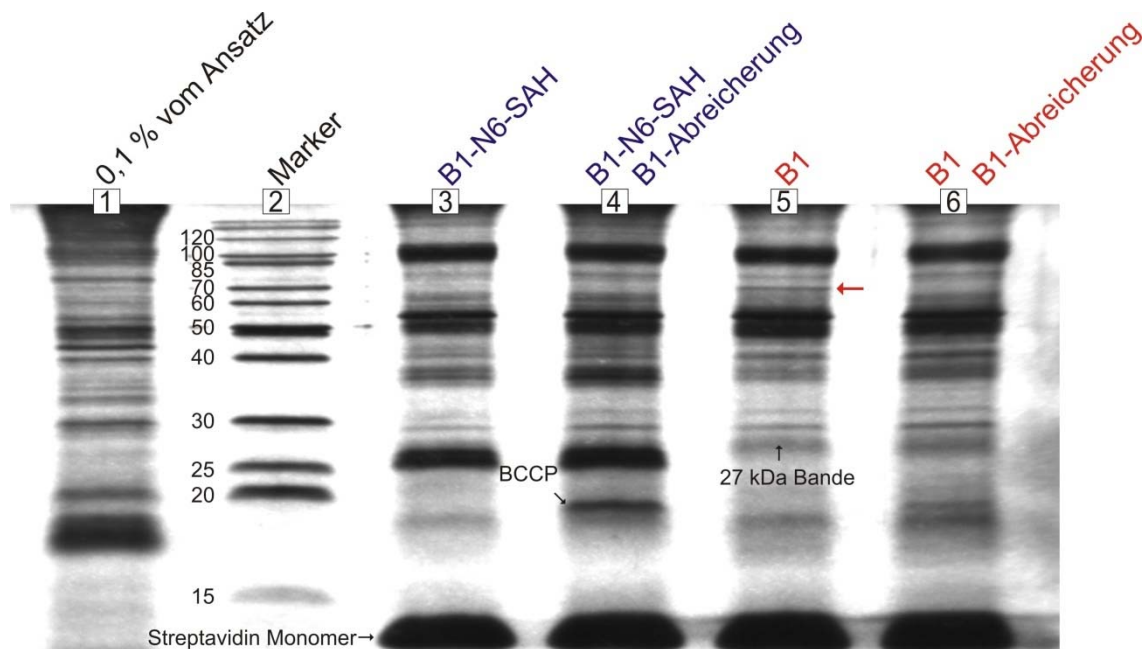


Abb. 35: Abreicherung unspezifisch bindender Proteine durch das Fangverbindungsgrundgerüst B1. Bevor das Experiment gemäß der Standardmethode durchgeführt wurde, wurde die Hälfte der Ansätze mit 20 μ M B1 versetzt. Dann wurden alle Ansätze bestrahlt. Danach erfolgte bei allen vier Ansätzen eine Abtrennung biotinhaltiger Verbindungen durch den Einsatz von SoftLink™ Soft Release Avidin Resin (100 μ l Füllmenge). Zu den so vorbehandelten Proben wurde die Fangverbindung B1-N6-SAH (2 μ M) bzw. deren Grundgerüst B1 (2 μ M) hinzugefügt. Alle Ansätze enthielten Zelllysate von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml). Für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Durch die Abtrennung biotinylierter Proteine und Kleinmoleküle konnte unter Anderem auch das Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP) abgetrennt werden. Allerdings gelang dies in den zuvor mit B1 versetzten Ansätzen nicht vollständig (Spuren 4 und 6). Dies kann nur damit erklärt werden, dass das eingesetzte SoftLink™ Soft Release Avidin Resin eine etwas zu

geringe Bindekapazität besaß um B1 und BCCP vollständig ab zu trennen. Prinzipiell hätten die zur Abreicherung verwendeten 2 nmol B1 auch durch die Verwendung von jeweils 100 µl MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel erfolgen können.

Ein Vergleich der Kontrollansätze zeigt, dass durch die dem eigentlichen Einfangexperiment vorausgehende Photoverknüpfung mit B1 keine Reduktion von unspezifisch eingefangenen Proteinen erfolgt ist (vgl. Spuren 5 und 6). Lediglich eine Bande fehlt in dem zuvor abgereicherten Ansatz (mit einem Pfeil markiert). Eine Erklärung für diesen Befund leitet sich aus den anzunehmenden Bindungsverhältnissen zwischen dem Fangverbindungsgrundgerüst B1 und den daran eventuell bindenden Proteinen ab. Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, ist für eine solche Bindung von einer größeren Dissoziationskonstante auszugehen, als bei der spezifischen Bindung zwischen der Selektivitätsfunktion einer Fangverbindung und deren Zielprotein. Bei einer Dissoziationskonstante im unteren millimolaren Bereich wären bei einer B1-Konzentration von 20 µM nur wenige Prozent der betreffenden Proteine an ein B1-Molekül gebunden. Außerdem liegen die realisierbaren Photoverknüpfungsausbeuten bei 1-10 % (Tab. 1), so dass nur ein geringer Teil der Proteine auf diese Weise entfernt werden kann. Der zu erwartenden Effekt einer Abreicherung unspezifisch eingefangener Proteine ist also eher klein.

3.3.11 Einfluss von sehr hohen HEPES-Konzentrationen

Das größte Problem beim spezifischen Einfangen funktioneller Subproteome unter Verwendung trifunktioneller Fangverbindungen ist das Auftreten unspezifischer Nebenreaktionen. Deren Ausmaß ist abhängig von den Konzentrationen der Fangverbindung und der Proteine. Eine Reduktion der Nebenreaktionen durch Zusatz von Strukturanaloga des Fangverbindungsgrundgerüsts ist nicht effektiv möglich (vgl. Abschnitt 3.3.8). Auch eine Abreicherung solcher Proteine mit dem Fangverbindungsgrundgerüst ist nicht effektiv (vgl. Abschnitt 3.3.10). Diese Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass ein Großteil dieser unspezifischen Nebenreaktionen nach der Photoaktivierung der Fangverbindung durch Kollision der entstehenden reaktiven Spezies mit den in der Lösung befindlichen Proteinen erfolgt. Soll das Ausmaß solcher unspezifischer Nebenreaktionen begrenzt bleiben, so sollten zuerst die Konzentrationen der eingesetzten Fangverbindung und des zu untersuchenden Zelllysats optimal gewählt werden. Im Falle von *E. coli* wären z.B. Proteinkonzentrationen zwischen 3 mg/ml und 10 mg/ml und Fangverbindungskonzentrationen um 5 µM günstig (vgl. Abschnitt 3.3.4). Eine weitere Möglichkeit das Ausmaß unspezifischer Nebenreaktionen zu begrenzen liegt in der Verwendung verschiedener Additive. Diese können entweder die

freien reaktiven Spezies der Fangverbindung abfangen, bevor sie unspezifisch mit einem Protein reagieren können, oder sie können unspezifische Verbindungen zwischen Fangverbindung und den Proteinen vermindern.

Eine Möglichkeit das Ausmaß unspezifischer Nebenreaktionen beim Einfangen einiger aufgereinigter MTasen zu verringern war der Zusatz größerer Mengen der puffernden Komponente HEPES.

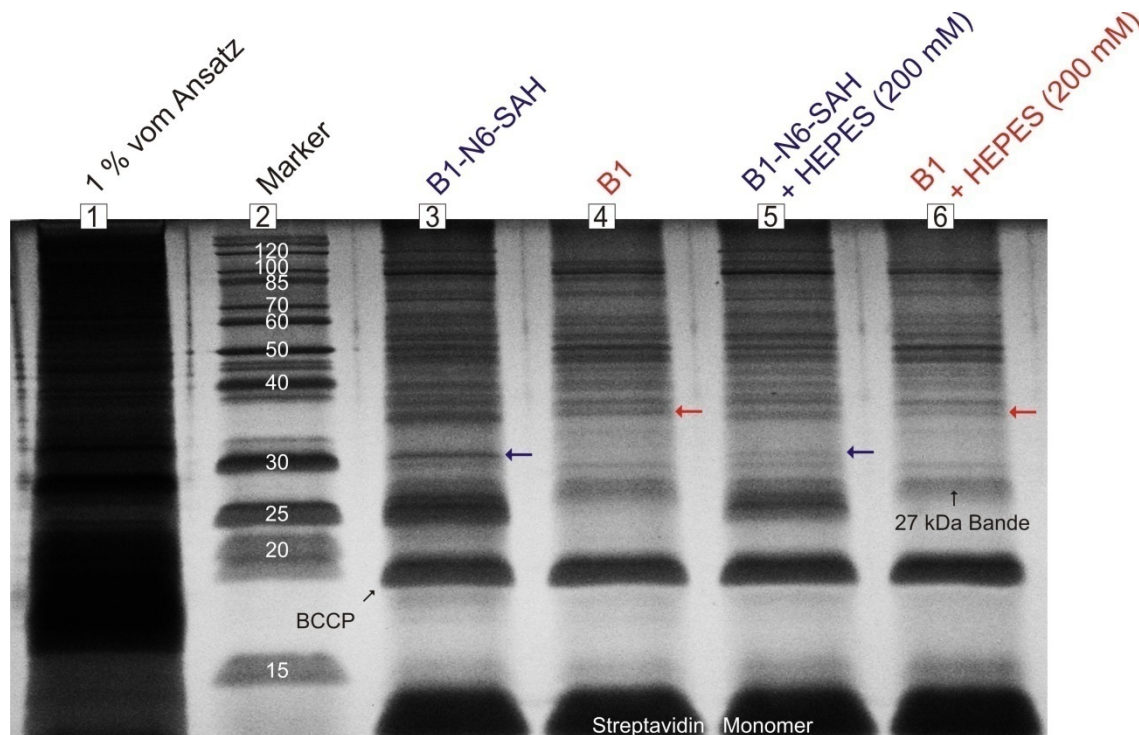


Abb. 36: Einfluss von HEPES auf das Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit der Fangverbindung B1-N6-SAH. Alle Ansätze enthielten B1-N6-SAH oder B1 (10 μ M) und Zelllysate von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml). Die Hälfte der Ansätze enthielt zusätzlich 200 mM HEPES. Das Probenvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden jeweils 200 μ g MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Im Experiment mit *E. coli*-Zelllysate zeigte sich jedoch fast kein Effekt. Im zusätzlich mit HEPES versetzten Kontrollansatz wurden nur unwesentlich weniger Proteine eingefangen als in dem unter Standardbedingungen durchgeführten Kontrollansatz (vgl. Spuren 4 und 6). Lediglich eine unspezifische Bande fällt deutlich geringer aus (rote Pfeile). Dafür ist aber auch die Intensität einer spezifischen Bande drastisch verringert (blaue Pfeile).

Die vorliegenden Ergebnisse legen also den Schluss nahe, dass eine Erhöhung der HEPES-Konzentration keine geeignete Maßnahme zur Reduktion unspezifischer Nebenreaktionen darstellt.

3.3.12 Einfangen funktioneller Subproteome aus Zelllysaten mit sehr hohen Glycerin-Konzentrationen

Glycerin ist ein in der Natur weit verbreitetes Solut. Ähnlich wie Glucose und Prolin wird es von unterschiedlichsten Organismen vermehrt synthetisiert, wenn Proteine bei Frost- oder Trockenstress vor dem Denaturieren geschützt werden müssen.

Welche Funktion Glycerin dabei genau übernimmt, ist nicht bekannt. Sicherlich erfüllt es mehr als einen Zweck. Einerseits führt es zu einer Gefrierpunktserniedrigung im Zytoplasma, andererseits bindet es osmotisch Wasser. Bezüglich der Problematik der unspezifischen Nebenreaktionen sind jedoch andere Eigenschaften von Interesse. So kann Glycerin mit seinen drei OH-Gruppen zwar Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, besitzt im Vergleich zu Wasser jedoch eine geringere Polarität. Es kann somit teilweise Wassermoleküle von der Proteinoberfläche verdrängen und beeinflusst dabei die Möglichkeiten des Proteins, mit anderen Molekülen in Wechselwirkung zu treten. So fallen viele Proteine in Anwesenheit von Glycerin z.B. weniger leicht aus.

Ein anderer, möglicherweise positiver Effekt ist die Erhöhung der Viskosität. Diffusionsvorgänge, wie z.B. die Diffusion einer reaktiven Fangverbindung nach der Photoaktivierung werden dadurch verlangsamt.

Häufig werden Enzyme oder Zelllysate mit 50 % Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Auch beim Aufreinigen von Enzymen oder beim Aufschluss von Zellmaterial kommen sehr häufig Puffer mit Glycerin zum Einsatz. Auf diese Weise gelangt beim Einfangen von Subproteomen mit trifunktionellen Fangverbindungen oft ein ausreichender Anteil Glycerin in die Ansätze und stabilisiert die gelösten Proteine. Wird ein Glycerinanteil von 5 % unterschritten, sollte beim Zusammenstellen der Ansätze an Stelle des häufig verwendeten 10-fach Einfangpuffers ein 5-fach Einfangpuffer zugesetzt werden, der 50 % Glycerin enthält und somit den Glycerinanteil im Ansatz auf mindestens 10 % anhebt.

Da viele Experimente gezeigt hatten, dass der Glycerinanteil in weitem Bereich keinen Einfluss auf Ausbeute und Spezifität hat, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem der Effekt eines extrem geringen und eines extrem hohen Glycerinanteils direkt mit einander verglichen wurde.

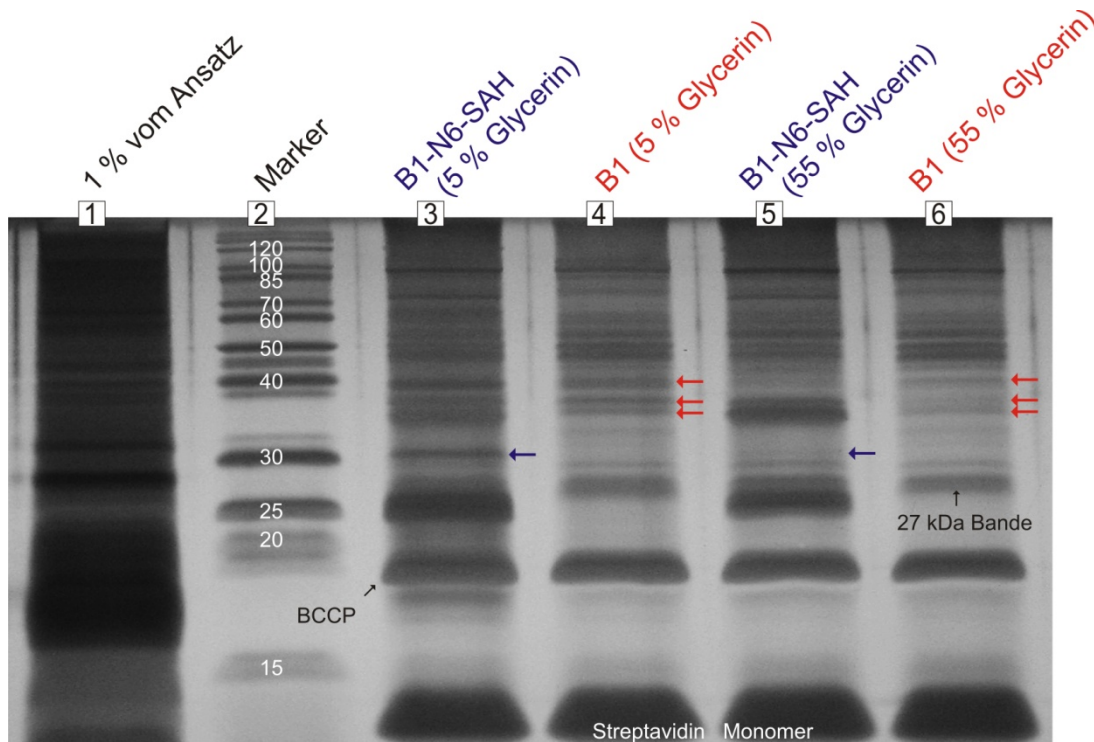


Abb. 37: Einfangen des Methyloms von *E. coli* bei sehr geringem und sehr hohem Glycerinanteil im Einfangpuffer. Alle Ansätze enthielten Zelllysat von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml) und die Fangverbindung B1-N6-SAH (10 μ M) bzw. das Fangverbindungsgrundgerüst B1 (10 μ M). Die verwendeten Einfangpuffer unterschieden sich im Glycerinanteil (5 % bzw. 55 % v/v). Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

In dem resultierenden Gel ist gut zu erkennen, dass ein großer Unterschied im Glycerinanteil einen geringen, aber deutlichen Einfluss auf die Spezifität zeigt. So fallen drei der als unspezifisch einzustufenden Proteinbanden bei 55 % Glycerin im Einfangpuffer deutlich schwächer aus (vgl. rote Pfeile). Leider gilt dies aber auch für eine der als spezifisch einzustufenden Banden (vgl. blaue Pfeile). Eine andere spezifische Bande bei ca. 35 kDa ist hingegen bei hohem Glycerinanteil etwas stärker ausgeprägt.

Der Einfluss von Glycerin ist nach den vorliegenden Ergebnissen somit eher als positiv zu bewerten. Bereits in Abschnitt 3.2.8 konnte gezeigt werden, dass beim Einfangen aufgereinigter MTasen das Ausmaß unspezifischer Nebenreaktionen durch Glycerin deutlich verringert wurde. Jedoch kann ein zu hoher Glycerinanteil beim Einfangen einiger Proteine auch zu einer verringerten Ausbeute führen. Ein Glycerinanteil von 55 % ist zu hoch. Bei fast allen durchgeführten Experimenten lag der Glycerinanteil im Einfangpuffer zwischen 10 % und 25 %. Innerhalb dieses Bereiches konnte praktisch kein Einfluss festgestellt werden. Allerdings sei an dieser Stelle deutlich darauf hingewiesen, dass auf keinen Fall Einfangpuffer ohne Glycerin verwendet werden sollte.

3.3.13 Einfluss unterschiedlicher Detergenzien auf unspezifische Nebenreaktionen

Im Vergleich zu Glycerin weisen Detergenzien bereits in sehr geringen Konzentrationen einen Effekt auf Proteine auf. Einige Proteine, wie z.B. EcoDam, präzipitieren sehr schnell, wenn sie sich in einer Lösung ohne ein geeignetes Detergenz befinden. Andere Proteine wie z.B. Membranproteine können erst durch den Einsatz von Detergenzien in wässrigen Lösungen solubilisiert werden. Da Detergenzien mit den Oberflächen von Proteinen in Wechselwirkung treten, könnten sie eventuell unspezifische Nebenreaktionen zwischen Proteinoberfläche und Fangverbindung beeinflussen.

Es gibt eine große Menge unterschiedlicher Detergenzien. Einige davon sind im Folgenden aufgeführt.

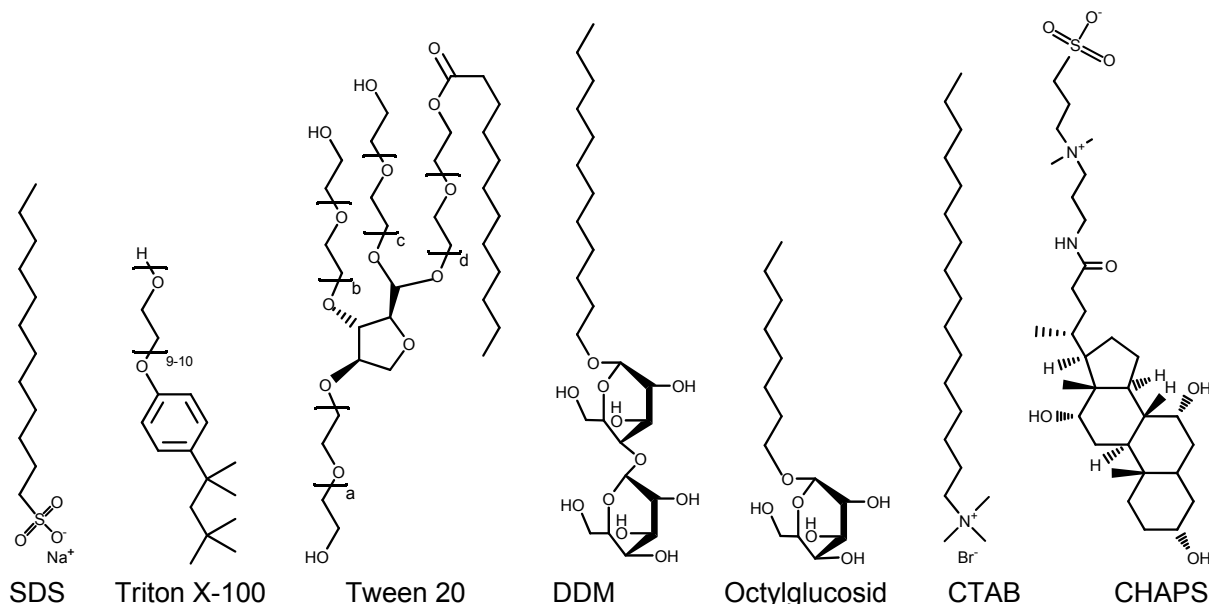


Abb. 38: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Detergenzien. Die ersten sechs aufgeführten Detergenzien wurden bei dem im Folgenden aufgeführten Experiment getestet. Das Detergenz CHAPS wurde zur Herstellung eukaryontischer Zelllysate verwendet (Abschnitt 3.5) und ist deshalb an dieser Stelle ebenfalls aufgeführt.

Sechs dieser Detergenzien wurden auf ihren Einfluss hinsichtlich unspezifischer Nebenreaktionen getestet: SDS (Natriumdodecylsulfat, ein starkes, anionisches Detergenz), Triton X-100 (Polyethylen(9-10)-glycol-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether, ein mittel-starkes, nichtionisches Detergenz), Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat, ein mittelstarkes, nichtionisches Detergenz), DDM (n-Dodecyl-β-D-maltosid, ein mittelstarkes, nichtionisches Detergenz), Octylglucosid (n-Octyl-β-D-glucopyranosid, ein relativ schwaches, nichtionisches Detergenz) und CTAB (N,N,N-

Trimethylhexadecylammoniumbromid, ein relativ starkes, kationisches Detergenz). Die Detergenzien wurden den Ansätzen in einer Konzentration von 1 % (w/v) zugesetzt.

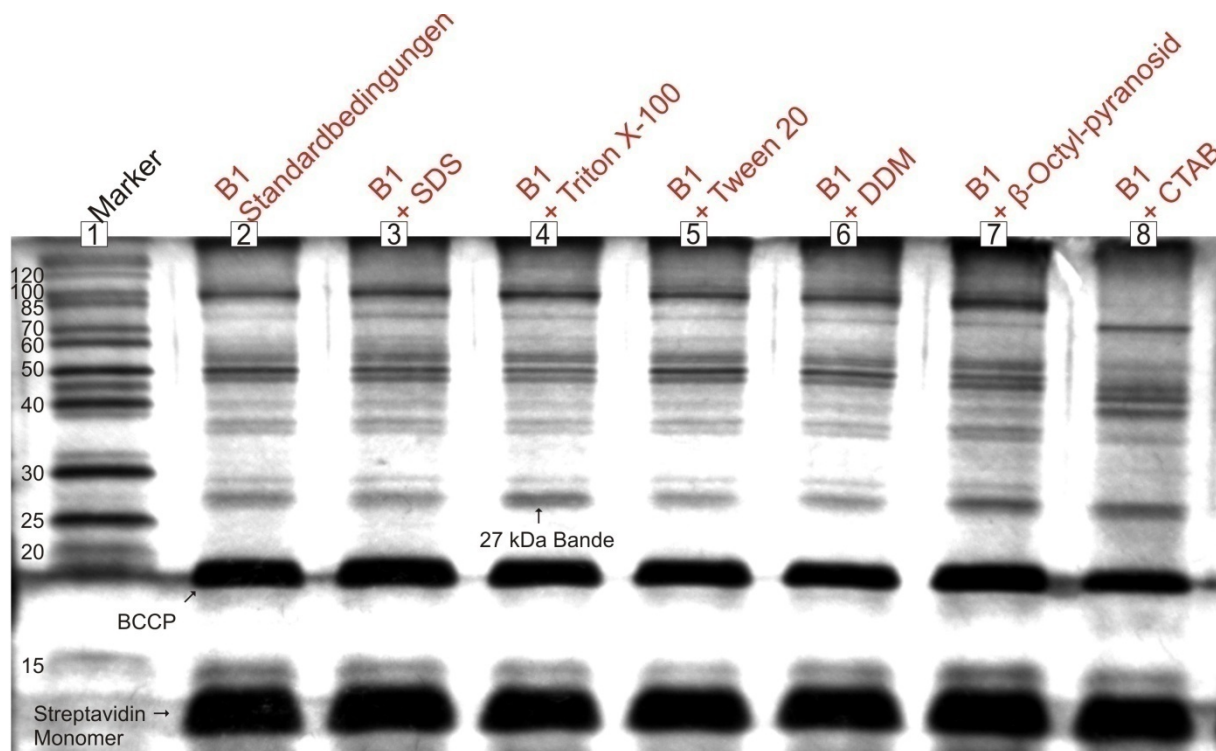


Abb. 39: Unspezifisches Einfangen von Proteinen aus *E. coli*. Alle Ansätze enthielten Zelllysate von *E. coli* DH5α (3,5 mg/ml) und das Fangverbindungsgrundgerüst B1 (10 μM). Zusätzlich wurden die Ansätze mit unterschiedlichen Detergenzien versetzt (1 % w/v). Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μl und für das Isolieren wurden je 200 μg MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In dem Experiment konnte mit den meisten Detergenzien kein Effekt festgestellt werden (Abb. 39). Sowohl Bandenmuster als auch Bandenintensität stimmen in fast allen Spuren überein. Triton X-100 zeigte eventuell einen kleinen Effekt (vgl. Spuren 2 und 4). Mit dem kationischen Detergenz CTAB ergab sich jedoch ein stark abweichendes Bandenmuster. Allerdings ist die Gesamtmenge an unspezifisch eingefangenen Protein vergleichbar mit den anderen Ansätzen. Da auch einige andere verwendete Detergenzien aliphatische Reste aufweisen, muss ein Zusammenhang zwischen dem beobachteten Effekt und dem kationischen Charakter dieser Verbindung bestehen.

3.3.14 Einfluss von Quenchern auf Spezifität und Ausbeute beim funktionsbasierten Einfangen von Subproteomen

Thiole und besonders Dithiole sind literaturbekannte Quencher bei photochemischen Reaktionen mit Arylaziden (Bayley und Staros, 1984). Der Einsatz solcher Quencher birgt

natürlich die Gefahr einer Ausbeutenminderung. Da hierfür aber eine Kollision zwischen aktivierter Fangverbindung und dem Quencher erforderlich ist und spezifisch an ein Enzym gebundene Fangverbindungsmoleküle sterisch abgeschirmt sind, sollten besonders die frei in Lösung befindlichen Fangverbindungsmoleküle vom Quencher betroffen sein. Wenn unspezifische Nebenreaktionen durch eine Kollision aktivierter Fangverbindungsmoleküle mit beliebigen Proteinen erfolgen, sollten sie durch photochemische Quencher also deutlich reduziert werden können.

DTT und β -Mercaptoethanol sind in der Molekularbiologie die am häufigsten verwendeten Reduktionsmittel. Im Konzentrationsbereich um 10 mM eingesetzt, sollen sie biologisches Material wie z.B. Proteine vor oxidativer Schädigung schützen. Auf diesem Wege kann es somit passieren, dass diese Verbindungen unbeabsichtigt mit dem Probenmaterial in einen Ansatz gelangen. Das Wissen um ihren Einfluss beim funktionsbasierten Einfangen von Subproteomen aus Zelllysaten ist also von besonderer Bedeutung.

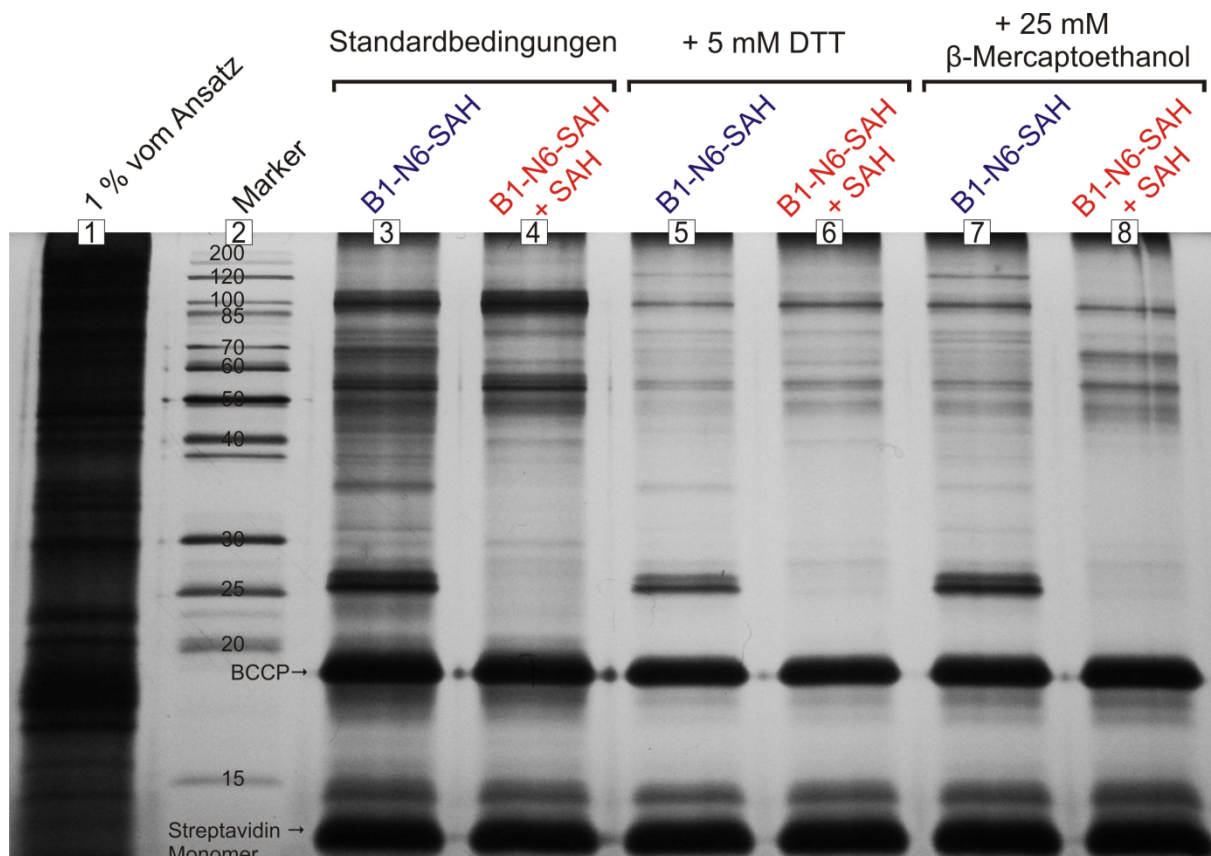


Abb. 40: Einfangen des Methyloms von *E. coli* in Anwesenheit von DTT (5 mM) oder β -Mercaptoethanol (25 mM). Alle Ansätze enthielten Zelllysate von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml) und die Fangverbindung B1-N6-SAH (10 μ M). Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (5 mM). Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Aus dem oben abgebildeten Gel ist ersichtlich, dass in Gegenwart von 5 mM DTT deutlich weniger Proteine eingefangen wurden als unter Standardbedingungen (vgl. Spuren 5 und 3). Auch durch 25 mM β -Mercaptoethanol wurde die Menge an eingefangenen Protein herabgesetzt, allerdings nicht so stark wie durch DTT (vgl. Spuren 7 und 3). Dieser Effekt betrifft die spezifisch eingefangenen Proteine und die unspezifisch eingefangenen Proteine gleichermaßen (vgl. Spuren 5 und 6, bzw. 7 und 8). Eine Erhöhung der Spezifität wurde somit nicht erreicht. Dieser Befund könnte damit zu erklären sein, dass die unspezifischen Nebenreaktionen nicht auf der Kollision der aktivierten Fangverbindung mit Proteinen beruht, sondern auf einer unspezifischen Vorbindung zwischen Fangverbindung und Protein.

Interessanterweise gibt es in Spur 7 eine Bande bei ca. 120 kDa, die nur in Gegenwart von 25 mM β -Mercaptoethanol deutlich auftritt. Ein Vergleich mit anderen Experimenten zeigt jedoch, dass dieses Protein in manchen Experimenten eingefangen wurde, in anderen nicht. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Bande und der Anwesenheit von β -Mercaptoethanol im Ansatz muss folglich nicht zwingendermaßen bestehen.

Das aufgeführte Experiment hat gezeigt, dass β -Mercaptoethanol, besonders aber DTT das spezifische Einfangen funktioneller Subproteome mit B1-Fangverbindungen deutlich stören kann. Allerdings waren die eingesetzten Konzentrationen verhältnismäßig hoch gewählt. In einigen hier nicht aufgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit 1 mM DTT oder 5 mM β -Mercaptoethanol nur noch ein geringer Einfluss festzustellen ist. Diese Konzentrationen sollten bei der Planung von Experimenten als Obergrenze betrachtet und berücksichtigt werden.

3.3.15 Trypton bewirkt eine Reduktion unspezifischer Nebenreaktionen

Einige der gemachten Beobachtungen könnten mit der These erklärt werden, dass unspezifischen Nebenreaktionen ein unspezifisches Bindungsereignis zwischen Fangverbindung und Protein vorausgeht. So erniedrigen Quencher z.B. lediglich die Ausbeute ohne dabei jedoch die Spezifität zu erhöhen.

Proteine tendieren dazu miteinander oder mit Oberflächen in Wechselwirkung zu treten. Dies kann zur Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen oder im schlimmsten Fall zur Präzipitation von Proteinen führen. Um dies zu verhindern kann versucht werden, eine dem Cytosol ähnliche Umgebung zu schaffen, etwa durch die Zugabe von Glycerin, Detergenzien und Salzen. Sehr häufig werden enzymatische Reaktionsansätze aber auch mit BSA versetzt, um optimale Stabilität und Aktivität der eingesetzten Enzyme zu gewährleisten. Da aber ein einzelnes Protein, in gewaltigen Mengen zugesetzt, durch nicht spezifische Nebenreaktionen

ebenfalls eingefangen wird, ist diese Vorgehensweise keine gute Lösung. Eine Alternative ist aber die Zugabe von Peptidgemischen wie Pepton oder Trypton. Diese können auch mit den Oberflächen von Proteinen in Wechselwirkung treten, tauchen nach einer SDS-PAGE jedoch nicht als Bande im Gel auf, da sie zu klein sind. In einem Experiment wurde Trypton den Ansätzen in verhältnismäßig hohen Konzentrationen zugesetzt, um den Einfluss auf Ausbeute und Spezifität zu überprüfen.

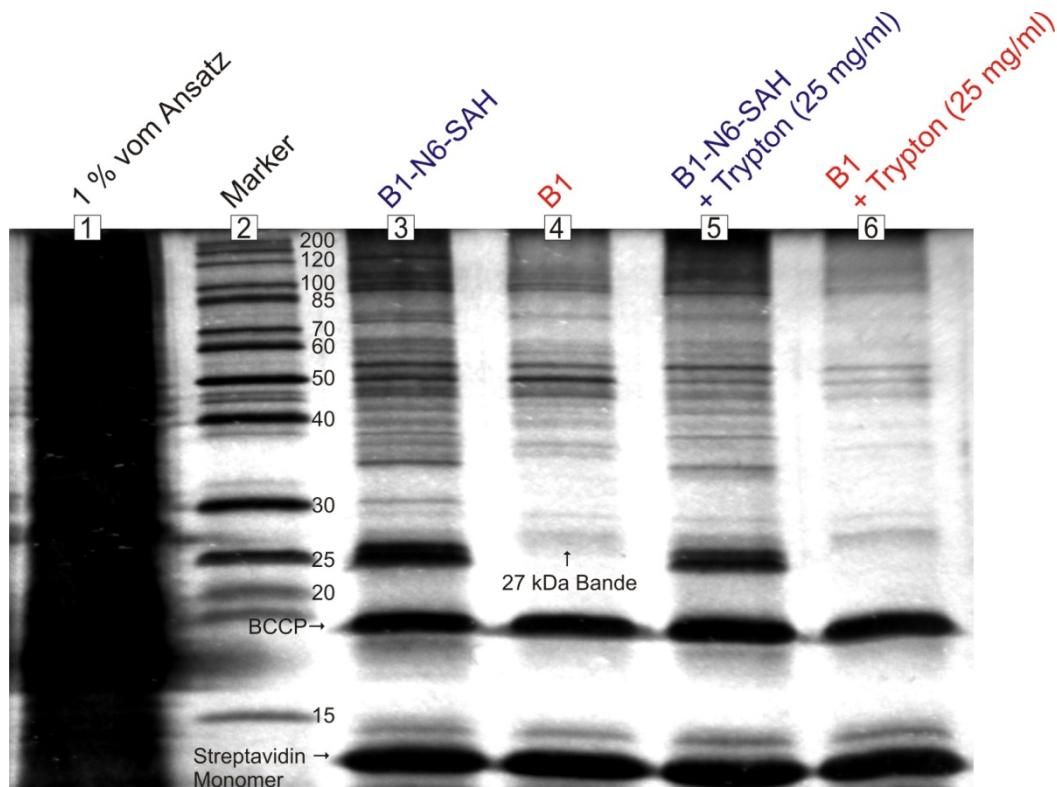


Abb. 41: Einfangen des Methyloms von *E. coli* in Anwesenheit von Trypton. Alle Ansätze enthielten Zelllysat von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml) und die Fangverbindung B1-N6-SAH (10 μ M) bzw. deren Grundgerüst B1 (10 μ M). Die Hälfte der Ansätze wurde zusätzlich mit Trypton aus Casein versetzt (25 mg/ml). Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In dem Gel ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von Trypton eine sehr deutliche Reduktion der unspezifischen Nebenreaktionen bewirkt (vgl. Spuren 4 und 6). Leider wurden aber auch spezifische Banden beeinflusst, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. So fehlt z.B. eine spezifische Bande bei ca. 30 kDa völlig, während andere Banden wie z.B. eine der Banden bei ca. 25 kDa kaum beeinflusst wurden (vgl. Spuren 3 und 5). Generell werden durch Trypton die unspezifischen Reaktionen stärker unterdrückt als spezifische Reaktionen. Dies wirft die Frage auf, nach welchem Mechanismus dies verläuft.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass ein gewisser Anteil der Fangverbindung unspezifisch an einige der tryptischen Peptide bindet und die effektive Fangverbindungskonzentration im Ansatz damit sinkt. Proteine mit höheren K_D -Werten wären davon stärker betroffen.

Eine andere Erklärung könnte sein, dass die zugesetzten Peptide mit den Oberflächen der Proteine interagieren und dabei unspezifische Bindungen zwischen Fangverbindung und den betreffenden Proteinen stören. Dies könnte auch erklären, warum in gewissem Maße spezifische Reaktionen beeinflusst werden. Die im aktiven Zentrum eines Proteins gebundene Fangverbindung kann nach ihrer Photoaktivierung auch mit einem Peptid reagieren, wenn dieses zufällig auf der Oberfläche des Proteins neben dem aktiven Zentrum gebunden hat.

Natürlich ist bei der äußerst begrenzten Datenlage jede Erklärung hoch spekulativ. Eine massenspektrometrische Analyse des eingefangenen Materials könnte zeigen, welche Peptide und in welchem Ausmaß diese eingefangen werden. Allerdings könnte sich dabei auch herausstellen, dass eingefangene Peptide des Tryptons das Massenspektrometer deutlich stören. In diesem Fall wäre Trypton lediglich dann zur Erhöhung der Spezifität geeignet, wenn die eingefangenen Proteine mittels SDS-PAGE analysiert werden sollen.

3.3.16 Fangverbindung mit umgekehrten Proportionen: Großer Abstand zwischen Selektivitätsfunktion und Reaktivitätsfunktion, kleiner Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion und Isolierfunktion.

Es ist zu vermuten, dass die Proportionen einer Fangverbindung Auswirkungen auf ihre Funktion haben. In dem gestreckten Molekül mit seinen drei Funktionen lassen sich zwei Abstände festlegen. Der erste Abstand ist der zwischen Reaktivitätsfunktion und Isolierfunktion (Phenylazid – Biotin) und entspricht im Wesentlichen dem Fangverbindungsgrundgerüst. Der zweite Abstand ist der zwischen Reaktivitätsfunktion und Selektivitätsfunktion (Phenylazid – SAH) und wird im Fall der B1-Fangverbindungen hauptsächlich durch einen Linker bestimmt, über den die Selektivitätsfunktion bei der Synthese der Fangverbindung mit deren Grundgerüst verknüpft wird. Bei P1-N6-SAH ist dieser Abstand etwa doppelt so groß ist wie bei B1-N6-SAH (Abb. 42). Der Abstand Reaktivitätsfunktion – Isolierfunktion ist hingegen nur etwa halb so groß wie bei B1-N6-SAH.

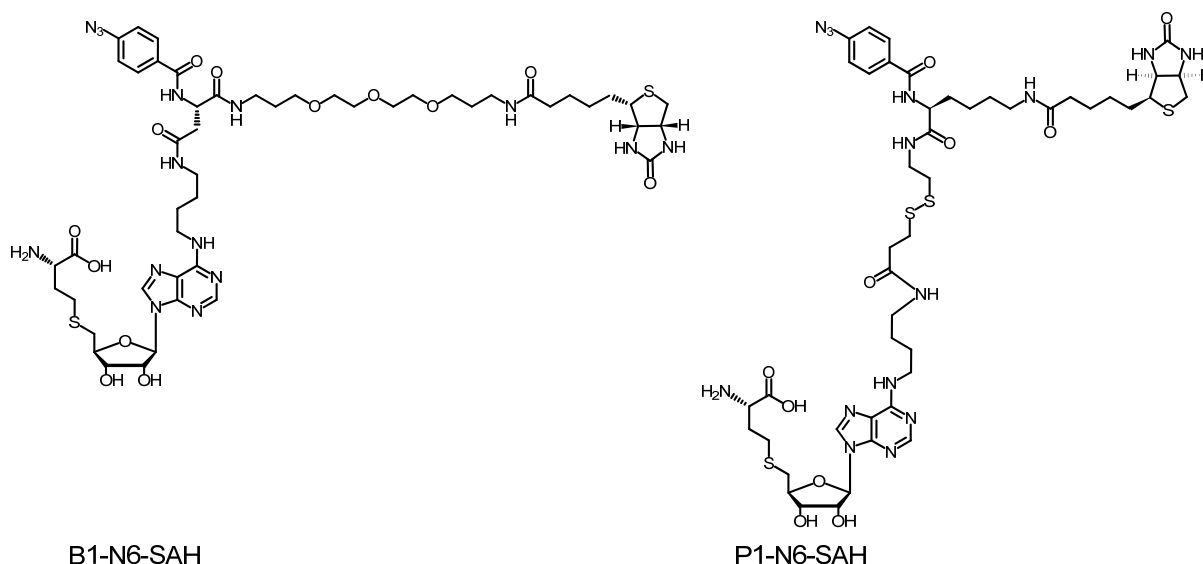


Abb. 42: Vergleich der Strukturen der Fangverbindungen B1-N6-SAH und P1-N6-SAH.

In einem vergleichenden Experiment wurden B1-N6-SAH und P1-N6-SAH zum Einfangen des Methyloms aus *E. coli* eingesetzt, um die Auswirkungen der strukturellen Unterschiede auf Ausbeute und Spezifität zu untersuchen.

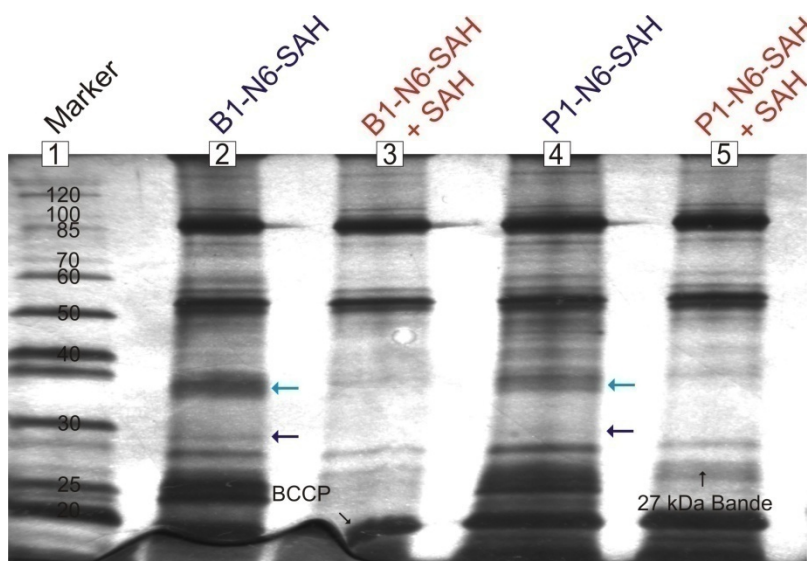


Abb. 43: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit den Fangverbindungen B1-N6-SAH und P1-N6-SAH. Alle Ansätze enthielten Zelllysat von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml) und B1-N6-SAH (5 μ M) oder P1-N6-SAH (5 μ M). Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (6 mM). Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Die Abbildung des Gels (Abb. 43) lässt erkennen, dass Ausbeute und Spezifität bei beiden Fangverbindungen recht ähnlich waren. Bei genauem Hinsehen fällt auf, dass ein spezifisches

Protein, welches mit B1-N6-SAH eingefangen werden konnte, bei P1-N6-SAH fehlt (dunkelblaue Pfeile). Eine weitere spezifische Bande ist im Fall von P1-N6-SAH deutlich schwächer ausgeprägt (hellblaue Pfeile). Unspezifische Nebenreaktionen traten bei P1-N6-SAH etwas stärker auf. Allerdings gibt es zwischen 40 kDa und 50 kDa eine Anzahl von sehr schwachen Banden, die zumindest zum Teil spezifisch zu sein scheinen. Sie sind bei P1-N6-SAH etwas stärker ausgeprägt.

Die vorliegenden Ergebnisse legen also den Schluss nahe, dass die Unterschiede zwischen den zwei verwendeten Fangverbindungen unter den für dieses Experiment gewählten Bedingungen wenig Einfluss auf Ausbeute und Spezifität haben. Der kurze Abstand Reaktivitätsfunktion – Selektivitätsfunktion bei B1-N6-SAH beeinflusst demnach nicht die Bindung an die Zielproteine und der lange Abstand beim P1-N6-SAH wirkt sich nicht negativ auf die Effizienz der Photoverknüpfung aus. Da mit P1-N6-SAH praktisch genau so viel Protein isoliert werden konnte wie mit B1-N6-SAH kann außerdem davon ausgegangen werden, dass der kurze Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion und Isolierfunktion bei P1-N6-SAH die Bindung an das Streptavidin der Magnetpartikel nicht negativ beeinflusst.

3.3.17 Auswirkungen eines vergrößerten Abstands zwischen Reaktivitätsfunktion und Selektivitätsfunktion bei B1-N6-SAH

Von der Fangverbindung B1-N6-SAH stand eine Variante mit verlängertem Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion und Selektivitätsfunktion zur Verfügung (vgl. Abschnitt 3.2.6). Im Vergleich zu B1-N6-SAH ist dieser Abstand bei B1-N6-SAH-lang etwa doppelt so groß, während der Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion und Isolierfunktion bei beiden Molekülen identisch ist. In einem Experiment wurden diese beiden Fangverbindungen direkt verglichen. Für den Kontrollansatz wurde das Fangverbindungsgrundgerüst B1 verwendet, welches bei beiden Fangverbindungen identisch ist.

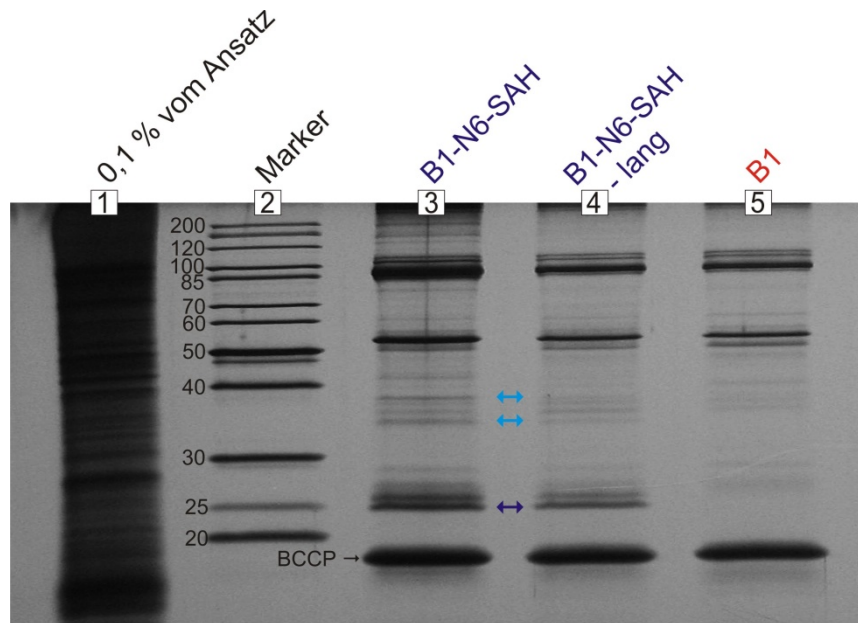


Abb. 44: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit den Fangverbindungen B1-N6-SAH und B1-N6-SAH-lang. Alle Ansätze enthielten Zelllysat von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml) und B1-N6-SAH, B1-N6-SAH-lang oder B1-Grundgerüst (jeweils 2 μ M). Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μ l und für das Isolieren wurden je 200 μ g MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Das Resultat des Experiments war, dass mit B1-N6-SAH von einigen spezifisch eingefangenen Proteinen deutlich mehr eingefangen werden konnte als mit B1-N6-SAH-lang (vgl. hellblaue Pfeile). Allerdings war dieser Unterschied bei mindestens einem der spezifisch eingefangenen Proteine nur sehr schwach (vgl. dunkelblaue Pfeile). Es gibt jedoch keine einzige spezifische Bande, die bei B1-N6-SAH-lang stärker ausgeprägt wäre. Insgesamt scheint es aber, als ließen sich mit der kurzen Fangverbindung mehr Proteine spezifisch einfangen als mit der langen Variante. Allerdings sind auch viele der unspezifischen Banden bei B1-N6-SAH stärker ausgeprägt als bei B1-N6-SAH-lang oder B1.

Die vorliegenden Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass der Abstand zwischen Fangverbindungsgrundgerüst und der Selektivitätsfunktion im Fall von B1-N6-SAH völlig ausreichend ist, da durch eine Verlängerung dieses Abstand keine weiteren Proteine zusätzlich eingefangen werden konnten.

3.3.18 Fangverbindungen mit anderen Reaktivitätsfunktionen und veränderter Verknüpfungsstelle an der Selektivitätsfunktion

In den vorangegangenen zwei Abschnitten wurde gezeigt, dass ein veränderter Abstand zwischen Isolierfunktion und Reaktivitätsfunktion, bzw. zwischen Reaktivitätsfunktion und Selektivitätsfunktion der Fangverbindung einen gewissen Einfluss auf Ausbeute und Spezifität beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* hat. Dieser Einfluss ist aber nicht sehr groß und betrifft nicht jedes der eingefangenen Proteine gleichermaßen.

Im Abschnitt 3.2.7 hat sich herausgestellt, dass eine Veränderung der Reaktivitätsfunktion oder unterschiedliche Verknüfungspositionen an der Selektivitätsfunktion der Fangverbindungen bei den DNA-MTasen M.TaqI und M.HhaI einen deutlicheren Einfluss gezeigt haben als eine Veränderung des Abstands innerhalb des zwischen Selektivitäts- und Reaktivitätsfunktion. Es lag also auf der Hand zu untersuchen, ob sich dies beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* ebenso verhält.

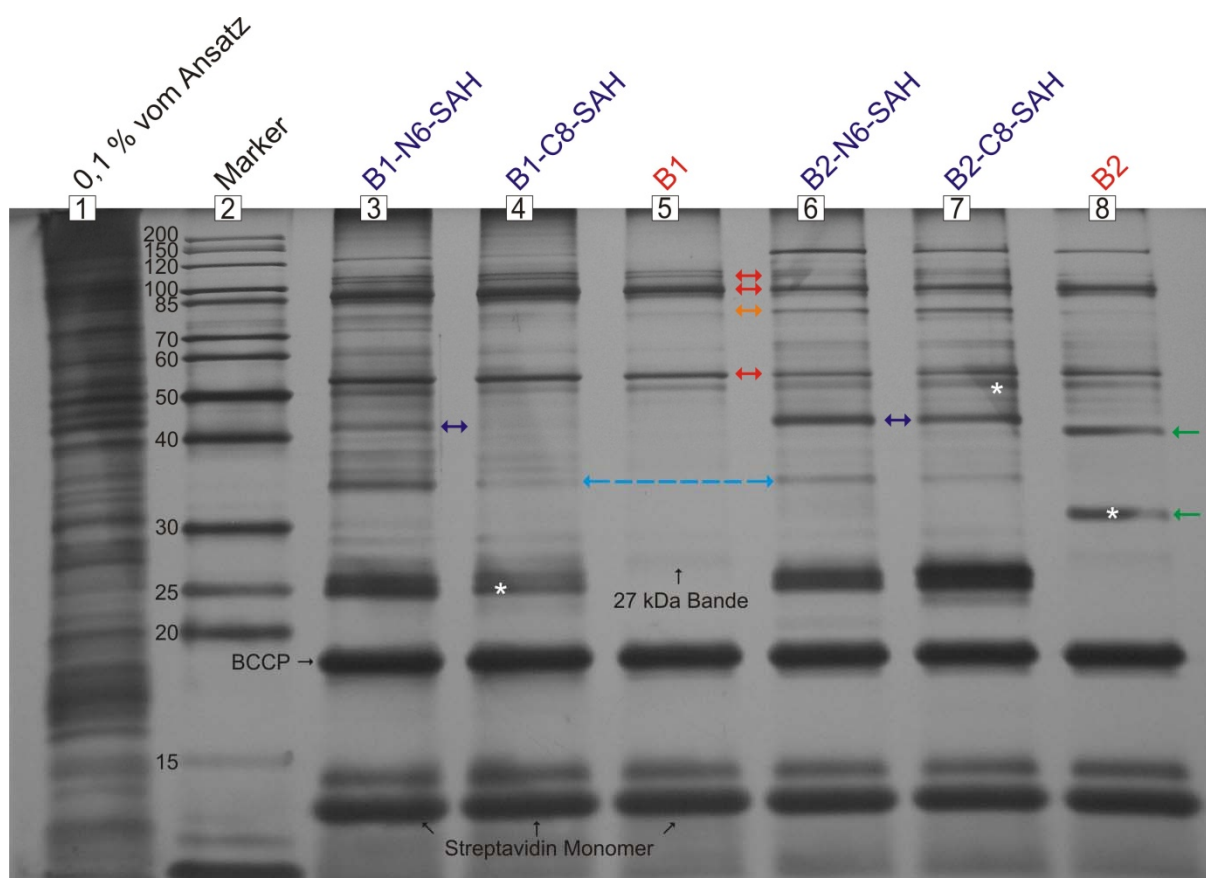


Abb. 45: Einfangen des Methyloms von *E. coli* DH5α mit den Fangverbindungen B1-N6-SAH, B1-C8-SAH, B2-N6-SAH und B2-C8-SAH (je 2 μM). Für die Kontrollansätze wurden die Fangverbindungsgrundgerüste B1 und B2 verwendet (je 2 μM). Die Proteinkonzentration in den Ansätzen betrug 3,5 mg/ml. Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μl und für das Isolieren wurden je 200 μg MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen und Sternchen markierten Banden finden sich im Text.

Die Strukturformeln der hierbei getesteten Fangverbindungen wurden bereits in Abb. 15 vorgestellt. Beim spezifischen Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit verschiedenen Fangverbindungen zeigt sich, dass die strukturellen Unterschiede zwischen den Fangverbindungen recht verschiedene Auswirkungen auf Ausbeute und Spezifität haben. Abb. 45 zeigt das Ergebnis eines Experiments, welches einen direkten Vergleich zwischen den vier wichtigsten Fangverbindungen ermöglicht. Leider verlief das Anfärben dieses Gels nicht ganz gleichförmig (deutlich sichtbar an den mit weißen Sternchen markierten Stellen), so dass im Folgenden eine genaue und kritische Betrachtung des Gels erforderlich ist.

Auf den ersten Blick unterscheiden sich die Ausbeuten an spezifisch eingefangenen Proteinen zwischen den Ansätzen mit B1-N6-SAH und B1-C8-SAH besonders drastisch (vgl. Spuren 3 und 4). Dies betrifft auch die Doppelbande bei ca. 25 kDa. Ein solcher Unterschied durch die N6- oder C8-Verknüfungsposition wäre aber auch bei den B2-Fangverbindungen zu erwarten, was aber nicht der Fall ist (vgl. Spuren 6 und 7). Hier verhält es sich sogar umgekehrt wie im Fall der B1-Fangverbindungen. Der Grund hierfür liegt in der ungleichmäßigen Einfärbung des Gels. Weitere Experimente, die hier nicht aufgeführt sind, haben gezeigt, dass die betreffende Doppelbande auch bei B1-C8-SAH etwas stärker ist als bei B1-N6-SAH. Bei einer sehr genauen Betrachtung der betreffenden Doppelbande in Spur 4 ist auch deutlich zu erkennen, dass nur das linke Viertel gut eingefärbt wurde.

Etwas oberhalb von 40 kDa ist eine Bande stärker ausgefallen, wenn die Selektivitätsfunktion der verwendeten Fangverbindung in N6-Position verknüpft war (vgl. dunkelblauer Doppelpfeil). Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits in Abschnitt 3.2.7 beim Einfangen der DNA-MTase M.TaqI gemacht werden.

Eines der spezifisch eingefangenen Proteine wurde, anders als das mit dem dunkelblauen Doppelpfeil markierte Protein, mit den B1-Fangverbindungen besser eingefangen als mit den B2-Fangverbindungen (vgl. hellblauer Doppelpfeil). Zwar konnte in vielen Experimenten die Beobachtung gemacht werden, dass mit den B2-Fangverbindungen die Ausbeuten der meisten Proteine etwas höher ausfallen als mit den entsprechenden B1-Fangverbindungen, aber das aufgeführte Proteine zeigt deutlich, dass diese Aussage nicht für jedes Protein zutrifft.

Für die Brauchbarkeit einer Fangverbindung ist nicht nur die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein von Bedeutung, sondern auch das Ausmaß, in dem Proteine unspezifisch eingefangen werden. Erwartungsgemäß hat die Verknüfungsposition der Selektivitätsfunktion an das Fangverbindungsgrundgerüst auf das unspezifische Einfangen kaum einen Einfluss. Das schwache Ausfallen der als unspezifisch anzusehenden Banden in Spur 4 und eventuell auch in Spur 5 ist als ein Artefakt, bedingt durch unregelmäßige

Anfärbung, zu betrachten. Einige der deutlichsten, unspezifischen Banden fielen bei Verwendung der B1-Fangverbindungen deutlich stärker aus (vgl. rote Doppelpfeile). Es ist jedoch auch mindestens eine unspezifische Bande zu erkennen, die bei den B2-Fangverbindungen (außer in Spur 8) stärker ausgeprägt ist (vgl. oranger Doppelpfeil). Wieder andere unspezifische Banden sind in allen Spuren praktisch gleich stark.

Insgesamt konnte durch eine Vielzahl von Experimenten bestätigt werden, dass das Ausmaß unspezifischer Nebenreaktionen durch die Wahl der Anknüpfstelle der Selektivitätsfunktion kaum beeinflusst wird. Allerdings verändert sich bei Verwendung der B2-Fangverbindungen im Vergleich zu den B1-Fangverbindungen das Bandenmuster der unspezifisch eingefangenen Proteine, wenngleich die Gesamtmenge recht ähnlich ausfällt.

Interessant sind zwei Banden, die nur in dem Kontrollansatz, der mit dem B2-Grundgerüst durchgeführt wurde, beobachtet werden konnten (vgl. grüne Pfeile). Durch ein hier nicht aufgeführtes Experiment, bei dem 4-(1-Azi-2,2,2-triflurmethyl)-benzoesäure als Kompetitor eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die betreffenden Proteine spezifisch an den 4-(1-Azi-2,2,2-triflurmethyl)-benzoesäurerest des B2-Grundgerüsts binden.

Das oben aufgeführte Experiment hat gezeigt, dass sowohl eine Veränderung der Reaktivitätsfunktion, als auch unterschiedliche Verknüfungspositionen an der Selektivitätsfunktion der Fangverbindungen einen Einfluss auf Ausbeute und Spezifität beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* haben. Dieser Einfluss wirkt sich jedoch nicht auf jedes der eingefangenen Proteine in gleicher Weise aus, so dass keine der getesteten Fangverbindungen als „die beste Fangverbindung“ bezeichnet werden kann.

3.3.19 Unspezifische Nebenreaktionen

Besondere Aufmerksamkeit galt bei den bislang aufgeführten Experimenten den unspezifischen Nebenreaktionen. Diese stellen beim Einfangen funktioneller Subproteome aus komplexen Proteingemischen wie Zelllysaten immer wieder ein Problem dar, welches an dieser Stelle noch einmal zusammenfassend diskutiert werden soll.

Für das Zustandekommen dieser unspezifischen Nebenreaktionen gibt es zwei prinzipielle Erklärungen.

Erklärung 1: Nach der Photoaktivierung diffundiert die aktivierte Fangverbindung durch die Lösung, kollidiert mit Proteinen, und es kommt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Fangverbindung und diesen Proteinen.

Erklärung 2: Die Fangverbindung bindet an einige Proteine unspezifisch und reagiert nach erfolgter Photoaktivierung sofort mit diesen Proteinen. Eine solche unspezifische Vorbindung könnte dabei entweder völlig unspezifisch (Erklärung 2a) erfolgen oder auch das Resultat „ungewollter Spezifität“ sein (Erklärung 2b). So wäre es z.B. denkbar, dass einige Proteine spezifisch an den Biotinrest der Fangverbindung binden.

Leider kann auf Grundlage des bislang vorliegenden Datenmaterials keine dieser Erklärungen eindeutig belegt oder widerlegt werden. Trotzdem können einige mehr oder weniger gut belegbare Schlussfolgerungen gezogen werden:

Als gesichert betrachtet werden kann, dass das unspezifische Einfangen von Proteinen im Wesentlichen eine Folge der Photoverknüpfung zwischen Proteinen und Fangverbindung und nicht eine Folge von z.B. ungenügendem Waschen der Magnetpartikel ist, da ohne eine Photoaktivierung oder ohne Fangverbindung auch keine Proteine unspezifisch eingefangen werden (ausgenommen die natürlicherweise biotinylierten Proteine wie z.B. BCCP). Außerdem werden nicht mehr Proteine unspezifisch eingefangen, wenn für die Experimente mehr Magnetpartikel verwendet werden.

Einigen der unspezifisch eingefangenen Proteine lassen sich mittlerweile mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine „ungewollte Spezifität“ zurückführen. Zum Verständnis der zugrundeliegenden Zusammenhänge ist im Folgenden ein kleiner Exkurs erforderlich.

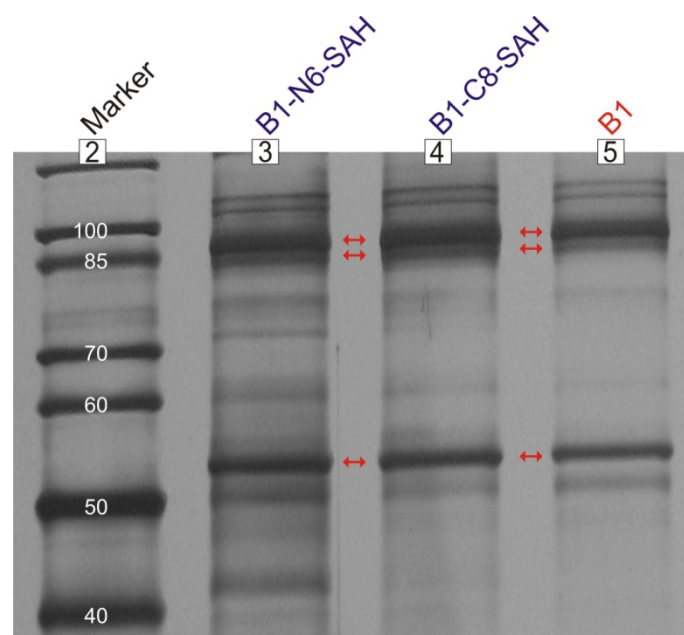


Abb. 46: Vergrößerte Darstellung der Spuren 2 bis 5 aus Abb. 45. Zur besseren Unterscheidbarkeit der Banden wurde die Abbildung zusätzlich in Längsrichtung gestreckt. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

In Abb. 46 sind einige Spuren des in Abb. 45 dargestellten Gels vergrößert und in Längsrichtung gestreckt abgebildet. Dabei sind einige Banden mit roten Doppelpfeilen markiert. Bei diesen Banden handelt es sich höchstwahrscheinlich um die drei Komponenten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (Vogel *et al.*, 1972). Jede dieser drei Komponenten konnte nach Experimenten mit *E. coli*-Zelllysate in den Kontrollansätzen eindeutig massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex katalysiert die Reaktion: $\text{Pyruvat} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$. Er besteht aus drei unterschiedlichen Proteinen mit verschiedenen Funktionen (E1, E2 und E3). E1 katalysiert die Addition des Kofaktors Thiaminpyrophosphat (TPP) an Pyruvat und eine nachfolgende Decarboxylierung, wobei CO_2 und Hydroxyethyl-TPP entstehen. Desweiteren katalysiert E1 die Folgereaktion, bei der die Hydroxyethylgruppe unter Oxidation auf eine Liponamidgruppe übertragen, welche kovalent an E2 gebunden ist. Das dabei entstehende, kovalent an E2 gebundene Acetyl liponamid wird in einer von E2 katalysierten Reaktion auf CoA übertragen. Die aus dieser Reaktion hervorgehende, kovalent an E2 gebundene Dihydroliponamidgruppe wird von E3 wieder zu Liponamid oxidiert, wobei NAD^+ reduziert wird.

Der kovalent an einen langen, flexiblen Arm von E2 gebundenen Liponamidgruppe kommt dabei eine zentrale Rolle zu. Sowohl E1, E2 als auch E3 besitzen eine Bindetasche, für diese Gruppe. Bei der Verwendung der in dieser Arbeit vorgestellten trifunktionellen Fangverbindungen kann dies aber durchaus zu Problemen führen.

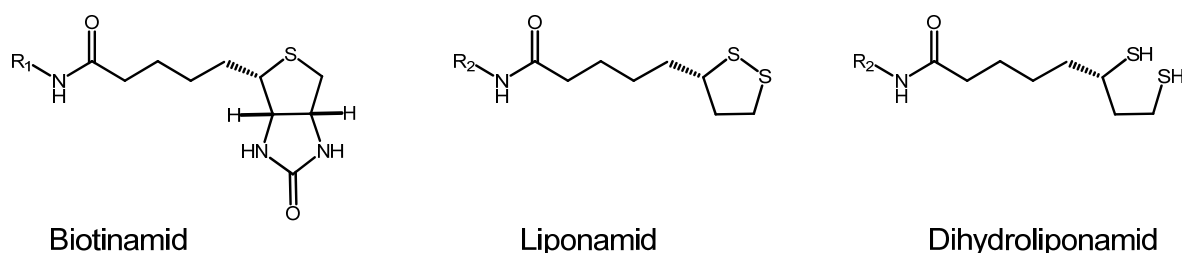


Abb. 47: Strukturformeln der Biotinamidgruppe der Fangverbindungen und der Liponamid- oder Dihydroliponamidgruppe der E2-Untereinheit im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex.

Wie aus Abb. 47 hervorgeht, kann man Biotinamid durchaus als ein Strukturanalogon von Liponamid oder Dihydroliponamid auffassen. Als gesichert gilt, dass die Liponamidgruppe von E2 auch an das Streptavidin der zur Isolierung eingefangener Proteine verwendeten Magnetpartikel binden kann (Hale *et al.*, 1992). Und tatsächlich wurden die entsprechenden Gelbanden auch bei nicht bestrahlten Proben oder bei Proben ohne Fangverbindung beobachtet, wenn auch als sehr schwache Banden (Abb. 26). Es ist aber auch möglich, dass

die Fangverbindungen an die entsprechenden Liponamid-Bindetaschen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes binden. Außerdem würde ein Binden der Fangverbindung an eine der möglichen Bindetaschen im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex die Fangverbindung mit ihrer photoreaktiven Gruppe in räumliche Nähe zum Dithiol Dihydroliponamid bringen. Zumindest die B1-Fangverbindungen sollen aber bereits ohne Photoaktivierung zu Reaktionen mit Dithiolen neigen (Czarnecki *et al.*, 1979).

Weil der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aus insgesamt 60 Untereinheiten (drei verschiedene Proteine) besteht und relativ stabil ist (Bates *et al.*, 1977) ist, kann er wahrscheinlich in seiner Gesamtheit isoliert werden, wenn nur eine der Untereinheiten durch eine Fangverbindung kovalent biotinyliert wurde. Dies ist vermutlich die Erklärung dafür, dass ungenügend starkes und ungenügend häufiges Hoch- und Runterpipettieren während der Waschschrte ein stärkeres Auftreten der betreffenden Gelbanden zur Folge hat, während der Rest der unspezifisch eingefangenen Proteine hiervon nicht beeinflusst wird. Es ist somit nicht davon auszugehen, dass die Mehrheit der unspezifisch eingefangenen Proteine als Komplex isoliert wird. Allerdings können bei massenspektrometrischer Analyse der eingefangenen Proteine immer wieder eine Vielzahl ribosomaler Proteine nachgewiesen werden, wenngleich deren Menge in den Proben nicht so groß ist, dass sie als Gelbande sichtbar sind.

Es ist auch sehr unwahrscheinlich, dass alle anderen unspezifisch eingefangenen Proteine eine Folge „ungewollter Spezifität“ sind. Es konnten durch Zugabe des nicht reaktiven Fangverbindungsderivats B0 lediglich zwei der unspezifischen Banden deutlich reduziert werden (Abschnitt 3.3.8). Somit trifft Erklärung 2b wohl auf einige der unspezifischen Banden zu, die Mehrzahl dieser Banden kann damit aber nicht erklärt werden.

Einige der gemachten Beobachtungen passen eher zu Erklärung 1. Zu erwähnen ist hier z.B. die starke Abhängigkeit zwischen der Fangverbindungskonzentration und den unspezifischen Nebenreaktionen. Dies weist nämlich auf eine Reaktion zweiter Ordnung hin.

Eine Beobachtung, welche gegen Erklärung 1 spricht ist, dass Quencher (z.B. DTT) die nach der Photoaktivierung mit der aktivierten Fangverbindung reagieren, sowohl spezifische als auch unspezifische Reaktionen gleichermaßen unterdrücken. Die Reaktion zwischen (Ziel)protein und gebundener Fangverbindung ist kinetisch betrachtet eine intramolekulare Reaktion und sollte durch solche Quencher weniger stark beeinflusst werden als die intermolekulare Reaktion zwischen einem Protein und frei in Lösung befindlicher Fangverbindung.

Eine weitere Beobachtung, die gegen Erklärung 1 spricht ist, dass das Bandenmuster der unspezifisch eingefangenen Proteine keinerlei Ähnlichkeit mit dem Bandenmuster des untersuchten Zelllysats aufweist. Falls die Fangverbindung nach der Photoaktivierung frei durch die Lösung diffundiert und dann statistisch mit Proteinen kollidiert und reagiert, so sollte die Häufigkeit einer solchen Kollision aber mit der Häufigkeit eines Proteins in der Lösung korrelieren, was nicht der Fall ist. Andererseits könnte es jedoch auch große Unterschiede in der Reaktivität der Proteine geben, so dass einige Proteine relativ inert gegenüber der aktivierten Fangverbindung sind, andere hingegen reagieren besonders gut. Dies könnte auch die großen Unterschiede bei den Ausbeuten der spezifisch eingefangenen Proteine erklären. Eine Quantifizierung einzelner unspezifisch eingefangener Proteine ist bei einer auf SDS-PAGE und Silberfärbung beruhenden Analytik allerdings ohnehin problematisch, da nicht alle Proteine gleich gut angefärbt werden und eine Bande im Gel nicht zwangsläufig nur durch ein einziges Protein verursacht werden muss.

Bislang noch kaum abschätzbar ist, welche Rolle Aggregationsphänomene beim unspezifischen Einfangen von Proteinen spielen. Beim oben diskutierten Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex sind zumindest begründete Vermutungen über den zugrundeliegenden Mechanismus möglich. Aggregate denaturierter Proteine, funktionelle Proteinkomplexe (z.B. Ribosomen) oder vielleicht sogar kleinere Mizellen könnten gemäß Erklärung 1 nach erfolgter Photoaktivierung einfach mit der aktivierten Fangverbindung kollidieren. Je nach Stabilität des Konstrukts könnten dadurch während des Isolierungsschritts sehr viele Proteine an den Magnetpartikeln haften bleiben, obwohl nur wenige davon kovalent biotinyliert sind. Auch eine unspezifische Vorbindung zwischen solchen Aggregaten und der Fangverbindung (Erklärung 2a) ist denkbar.

Leider liegt bislang keine befriedigende Erklärung für das Zustandekommen der unspezifischen Nebenreaktionen vor. Dies mag vielleicht daran liegen, dass es keinen einfachen Mechanismus gibt, mit dem jedes der unspezifisch eingefangenen Proteine erklärt werden kann. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass mehrere oder sogar alle oben aufgeführten Mechanismen in unterschiedlichem Maße zu einer gewissen Begrenzung der Spezifität des Verfahrens beitragen. Zur Lösung dieses Problems ist deshalb eine drastische Änderung der Vorgehensweise bei der Verwendung trifunktionaler Fangverbindungen nötig, wie im nächsten Kapitel geschildert werden soll.

3.4 Einfangen von SAH-bindenden Proteinen mit Fangpartikeln

3.4.1 Das Konzept der Fangpartikel

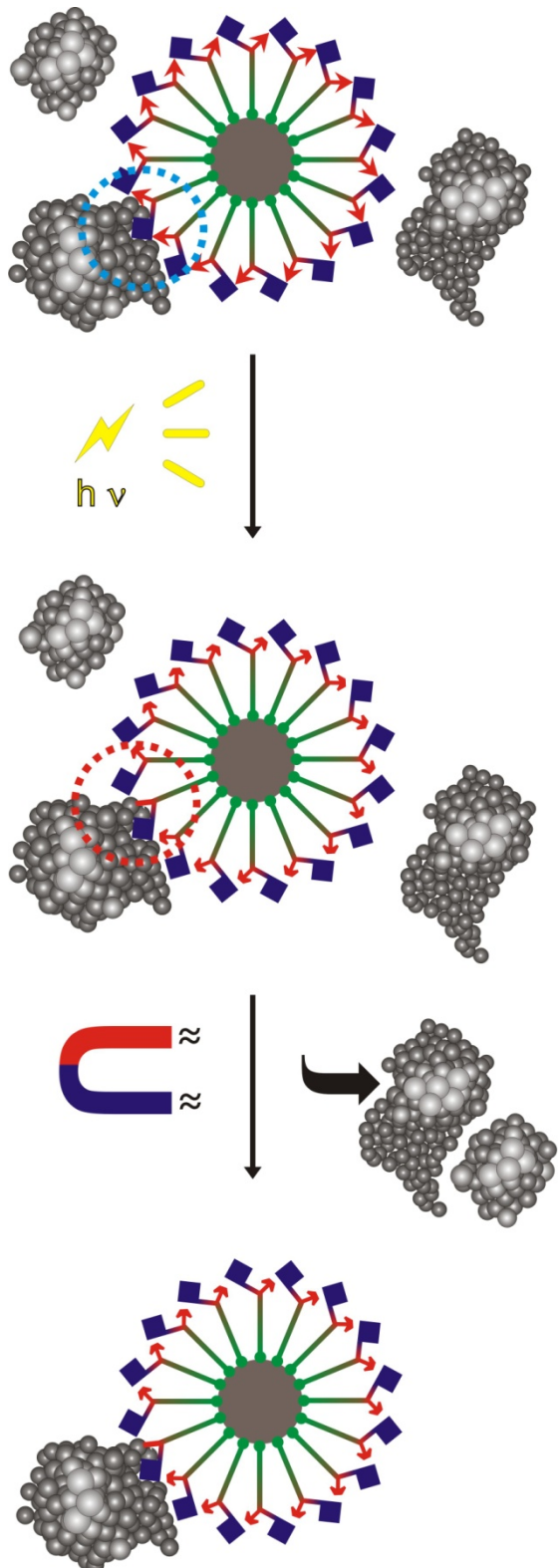
Das spezifische Einfangen funktioneller Subproteome unter Verwendung trifunktioneller Fangverbindungen funktioniert zwar verhältnismäßig gut, wie in den vorangehenden Experimenten gezeigt werden konnte, aber die Methodik beinhaltet auch eine Reihe von Nachteilen. So muss besonders für das Einfangen von Proteinen mit hohen K_D -Werten eine hohe Konzentration an Fangverbindung eingesetzt werden. Der Überschuss muss anschließend wieder abgetrennt werden, da die für das Isolieren der kovalent an eine Fangverbindung geknüpften Proteine benötigten Magnetpartikel nur eine begrenzte Bindekapazität besitzen. Beim Abtrennen überschüssiger Fangverbindung durch Gelfiltration kommt es zudem zu Proteinverlusten.

Ein weiterer Nachteil ist die verhältnismäßig geringe Ausbeute. Wegen der geringen Ausbeute müssen relativ große Mengen an Probenmaterial eingesetzt werden. Der größte Nachteil ist jedoch das Auftreten unspezifischer Nebenreaktionen. Zwar weist die Methodik eine beachtliche Spezifität auf, aber wenn relativ kleine Mengen eines spezifischen Proteins in Gegenwart eines gewaltigen Überschusses an unspezifischen Proteinen eingefangen werden sollen, wäre eine noch höhere Spezifität wünschenswert.

Um Spezifität, Ausbeute und Bindung zwischen Zielprotein und Fangverbindung zu verbessern, wurde ein oberflächenbasiertes Verfahren entwickelt. Dabei werden die streptavidinbeschichteten Magnetpartikel zuerst vollständig mit der Fangverbindung beladen und es entstehen sogenannte Fangpartikel. An die Selektivitätsfunktion der immobilisierten Fangverbindungsmoleküle können nun spezifisch Proteine binden. Ein großer Vorteil ist hierbei, dass die lokale Konzentration der Selektivitätsfunktion sehr hoch ist, so dass auch Proteine mit größeren K_D -Werten binden sollten. Zudem können die nach der Photoaktivierung entstehenden reaktiven Spezies der Fangverbindungen nicht mehr frei durch die Lösung diffundieren und dort zufällig mit unspezifischen Proteinen reagieren. Ein Abtrennen überschüssiger Fangverbindung nach der Photoverknüpfung ist auch nicht mehr nötig. Damit entfällt nicht nur ein Arbeitsschritt, sondern es werden auch die damit verbundenen Proteinverluste vermieden.

Der Einsatz von Fangpartikeln ist für das spezifische Einfangen von funktionellen Subproteomen also eine erfolgversprechende Alternative zu frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen, und deren Möglichkeiten, Vor- und Nachteile werden in den folgenden Abschnitten näher untersucht.

Schema 6 gibt einen Überblick über die Vorgehensweise beim Einfangen funktioneller Subproteome mit Fangpartikeln.



Selektion:

Die Fangverbindung ist bereits an die Magnetpartikel gebunden und bildet mit diesen die sogenannten Fangpartikel. Die immobilisierte Fangverbindung bindet mit ihrer Selektivitätsfunktion (blau) spezifisch, jedoch nicht-kovalent an die Zielproteine (blauer Kreis).

Photoaktivierung:

Durch Licht wird die Reaktivitätsfunktion (rot) der Fangverbindung aktiviert.

Photoverknüpfung:

Nach der Photoaktivierung der Reaktivitätsfunktion gehen die zuvor an ein Zielprotein gebundenen Fangverbindungsmoleküle mit dem Zielprotein eine kovalente Bindung ein (roter Kreis).

Isolierung:

Kovalent gebundene Proteine werden durch mehrmalige Magnetpräzipitation und Waschen der Magnetpartikel von nicht kovalent gebundenen Proteinen getrennt.

Analyse:

Die isolierten Proteine können z.B. durch Massenspektrometrie oder Gelelektrophorese identifiziert und quantifiziert werden.

Schema 6: Einfangen funktioneller Subproteome unter Verwendung von Fangpartikeln.

Die praktische Vorgehensweise bei Verwendung von Fangpartikeln ist etwas anders als bei frei in Lösung befindlicher Fangverbindung. So findet die Bindung zwischen dem Biotin-Rest der Fangverbindung und den streptavidinbeschichteten Magnetpartikeln bereits vor dem Zusatz der zu untersuchenden Zelllysate statt. Die zur Herstellung der Fangpartikel nötige Beladung der Magnetpartikel mit der gewünschten Fangverbindung kann schon Tage vorher erfolgen, da die fertigen Fangpartikel bei 4°C mindestens eine Woche gelagert werden können.

Wie bei Verwendung von frei in Lösung befindlicher Fangverbindung ist die Ausbildung einer sehr spezifischen, nicht-kovalenten Bindung zwischen Selektivitätsfunktion und der entsprechenden Bindetasche der Zielproteine der selektive Schritt (blauer Kreis in Schema 6). Im Gegensatz zu frei in Lösung verwendeten Fangverbindungen ist die lokale Konzentration der Selektivitätsfunktion dabei jedoch sehr hoch. Sie ist außerdem auch bei gleichbleibender Menge der eingesetzten Fangpartikel unabhängig vom Volumen der Proben.

Die Photoaktivierung der immobilisierten Fangverbindung funktioniert im Prinzip wie die Photoaktivierung gelöster Fangverbindung, ist wegen der durch die Magnetpartikel stark getrübbten Ansätze jedoch etwas aufwändiger. Nach erfolgter Photoverknüpfung sind die Zielproteine kovalent mit den Fangbindungsmolekülen auf der Fangpartikeloberfläche verbunden (roter Kreis in Schema 6). Anders als bei Verwendung von frei in Lösung befindlicher Fangverbindung muss aber keine überschüssige Fangverbindung mehr abgetrennt werden. Unmittelbar nach der Photoaktivierung kann mit dem Waschen der Partikel begonnen werden.

Am Ende sind die kovalent mit einer Fangverbindung verknüpften Proteine, genau wie bei Verwendung von frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen, auf der Oberfläche der magnetischen Partikel immobilisiert und können weiter analysiert werden.

3.4.2 Benötigte Zeit für die Vorbindung der Proteine an Fangpartikel

Die nicht-kovalente Vorbindung zwischen Selektivitätsfunktion einer Fangverbindung und dem Zielprotein ist ein bimolekulares Ereignis, da hierbei zwei frei bewegliche Moleküle aufeinander treffen. Die verhältnismäßig kleine Fangverbindung (ca. 1,1 kDa) ist dabei im Vergleich zum Zielprotein sehr beweglich. Experimente mit Fangverbindungen im mikromolaren Bereich haben gezeigt, dass für die nicht-kovalente Vorbindung nur sehr wenig Zeit benötigt wird, so dass die Ansätze nach dem Zusammenmischen praktisch sofort bestrahlt werden können.

Beim oberflächengekoppelten Einfangen von Proteinen mit Fangpartikeln sind die Verhältnisse anders. Hierbei ist die Selektivitätsfunktion immobilisiert und die Bindungsgeschwindigkeit könnte in diesem Fall deutlich geringer sein.

Die Zeit, die zur Bindung der relativ kleinen Fangverbindung an die streptavidinbeschichteten Magnetpartikel benötigt wird ist sehr gering. Zur Herstellung der Fangpartikel werden jeweils 2 µl der Fangverbindung (1 mM) direkt zu 20 µl einer Suspension streptavidinbeschichteter Magnetpartikel (MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel im Lagerpuffer des Herstellers) gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird der Überstand nach Magnetpräzipitation verworfen und die Fangpartikel einmal mit dem jeweiligen Einfangpuffer gewaschen. Nach erneuter Magnetpräzipitation und Entfernung des Überstands können die in 10 µl Einfangpuffer resuspendierten Fangpartikel direkt zu den vorbereiteten Ansätzen gegeben werden.

Proteine sind jedoch um ein Vielfaches größer als Fangverbindungen, und die spezifische Bindung der Proteine an die Selektivitätsfunktion der auf den Magnetpartikeln immobilisierten Fangverbindung ist deutlich schwächer als die Biotin-Streptavidin Bindung.

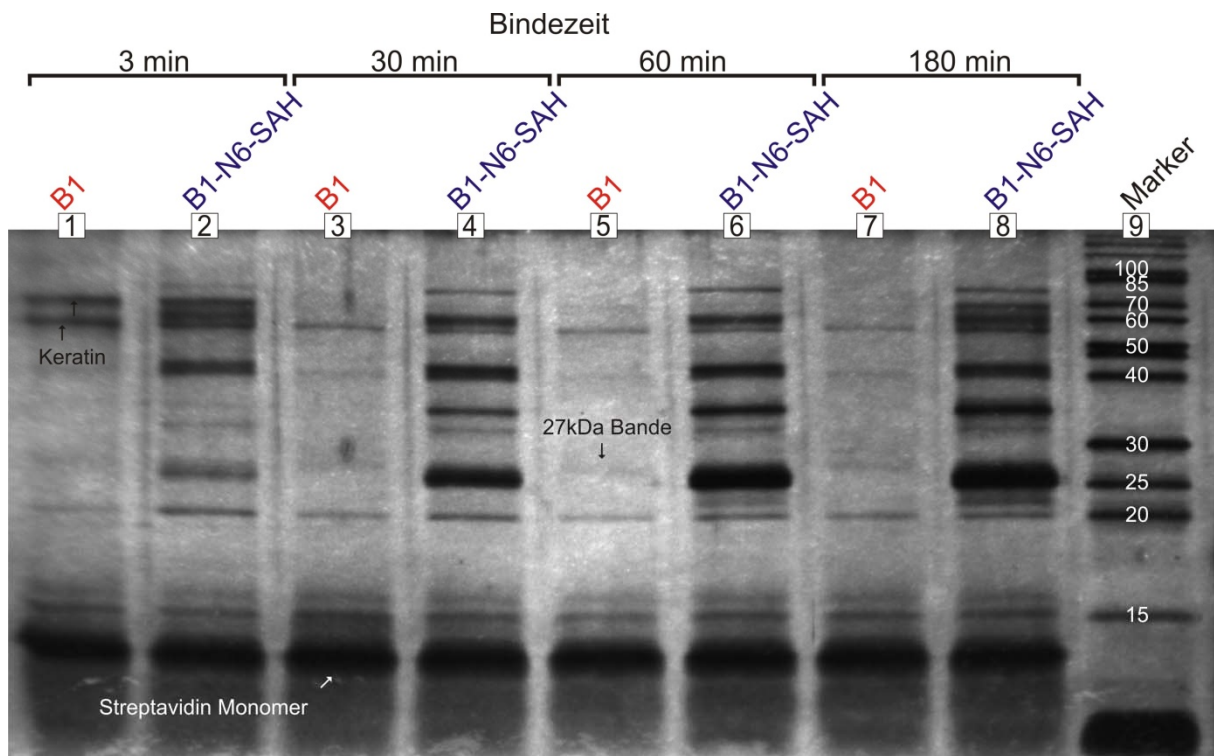


Abb. 48: Einfangen des Methyloms von *E. coli* unter Verwendung von B1-N6-SAH- bzw. B1-Fangpartikeln. Jede Probe (Probenvolumen 100 µl) enthielt 200 µg Fangpartikel und Zelllysate von *E. coli* DH5α (3,5 mg/ml). Die Proben wurden nach dem Zusammenmischen unterschiedlich lange inkubiert, bevor sie 60mal mit der Blitzlampe bestrahlt wurden. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Beim oberflächengekoppelten Einfangen von Proteinen mit Fangpartikeln könnte die Vorinkubation, die vor der Bestrahlung der Proben zu erfolgen hat, somit durchaus eine kritische Größe sein, die einer genaueren Betrachtung bedarf.

Die Bedeutung einer genügenden Vorinkubationszeit wurde durch das oben aufgeführte Experiment bestätigt (vgl. Abb. 48).

Aus dem Ansatz, der unmittelbar nach dem Zusammenmischen bestrahlt wurde, konnte nur verhältnismäßig wenig Protein isoliert werden (Spur 2). Man beachte, dass in den Spuren 1 und 2 eine deutliche Keratin- Verunreinigung zu sehen ist, bei der es sich nicht um im Experiment eingefangenes Protein handelt. Mit zunehmender Vorinkubationszeit stieg in diesem Experiment die Menge an spezifisch eingefangenen Protein deutlich an (Spuren 4, 6 und 8), während die Menge an unspezifisch eingefangenen Protein praktisch gleich blieb (Spuren 3, 5 und 7). Dabei war bei den meisten Banden nach 60 min schon fast die maximale Stärke erreicht gewesen. Allerdings gibt es auch eine spezifische Bande bei ca. 70 kDa, die erst nach einer 180minütigen Vorinkubation in nennenswerter Stärke auftrat (Spur 8).

Das vorliegende Ergebnis legt den Schluss nahe, dass die nicht-kovalente Verbindung der Proteine an die Fangpartikel ein Prozess ist, der sich einer Sättigung nähert, wobei die zugrundeliegende Halbwertszeit nicht bei allen Proteinen gleich ist. Nach 60 min scheinen jedoch bei fast allen Proteinen 80 – 90 % des Wertes nach 180 min erreicht zu sein.

Beim Einfangen von Subproteomen unter Verwendung von Fangpartikeln ist die gewählte Vorinkubationszeit ein Kompromiss. Zwar führen lange Vorinkubationszeiten (z.B. 12 h) zu etwas höheren Ausbeuten als mittlere Inkubationszeiten (1 h – 3 h). Der Vorteil ist dabei jedoch so gering, dass er den erforderlichen zeitlichen Mehraufwand nicht rechtfertigt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass es bei einigen Zelllysaten nach langen Vorinkubationszeiten zu Degradation und Ausfallen von Proteinen kam. Für das Einfangen vom Methylo aus *E. coli* mit Fangpartikeln wird deshalb eine minimale Vorinkubationszeit von 1 h und eine maximale Vorinkubationszeit von 3 h empfohlen.

3.4.3 Erforderliche Bestrahlung bei Verwendung von Fangpartikeln

Der Einsatz von Fangpartikeln birgt im Gegensatz zu frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen eine Besonderheit: Die Fangpartikel sind lichtundurchlässig. Die zum Immobilisieren der Fangverbindungen verwendeten streptavidinbeschichteten MyOne™ C1 Partikel besitzen einen Ferritkern, der ca. 40 % ihrer Masse ausmacht (Herstellerangaben) und weisen einen Durchmesser von ca. 1 µm auf. Wenn sie von oben mit einer Blitzlampe bestrahlt werden, wird jeweils nur eine Seite der runden Partikel bestrahlt. Wie die Intensität

der Sonneneinstrahlung auf der Erdoberfläche, hängt die Lichtintensität an der bestrahlten Seite der Fangpartikel stark vom Winkel zur Lichtquelle ab. Allerdings kann dieser Effekt vermutlich zum Teil durch die Verwendung des Aluminiumreflektors ausgeglichen werden.

Problematisch ist auch die starke Trübung einer Suspension aus Fangpartikeln. Für die meisten Experimente wurden 200 µg der Partikel eingesetzt. Diese Menge entspricht ca. 2×10^8 Partikel (Herstellerangaben). Die lichtundurchlässigen Partikel können sich gegenseitig beschatten. Die in einem Standardexperiment verwendete Anzahl der 1 µm großen Partikel kann eine Fläche von ca. 1,6 cm² decken. Die kegelförmige Oberfläche einer 100 µl großen Probe in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß beträgt hingegen nur ca. 1,3 cm², wenn sich die Flüssigkeit im konischen Ende des Gefäßes befindet. Nur die Lichtmenge, die über diese Oberfläche in die Probe eindringt steht für die Aktivierung der Fangverbindung zur Verfügung. Die ausreichende Bestrahlung einer Suspension aus Fangpartikeln ist also nicht trivial und bedarf besonderer Sorgfalt.

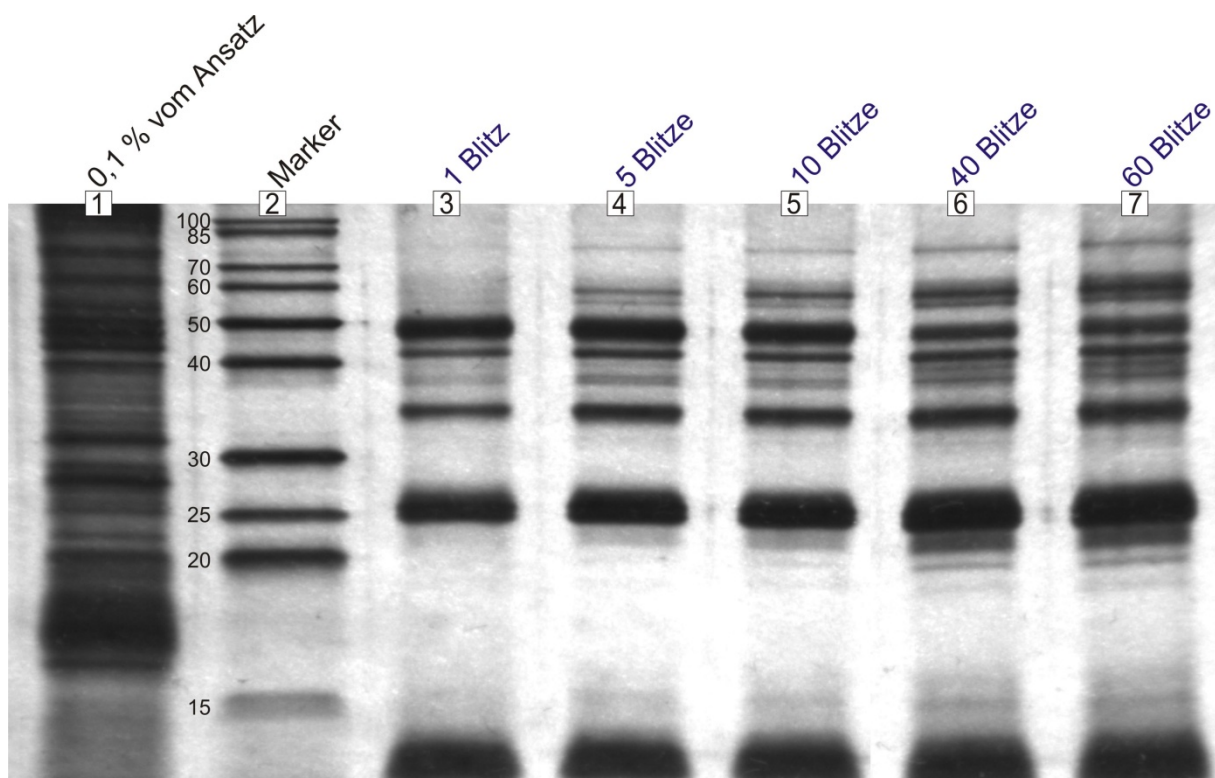


Abb. 49: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Alle Ansätze enthielten Zellysate von *E. coli* DH5α (3,5 mg/ml), B1-N6-SAH-Fangpartikel (200 µg) und besaßen ein Volumen von 100 µl. Die Proben wurden in einem eiswassergefüllten Aluminiumreflektor schwimmend mit einer B1600 Studio Blitzlampe (AlienBees) unterschiedlich oft bestrahlt. Nach jeweils 5 Blitzen wurden die Proben durch Fingerschnippen kurz durchgemischt. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In einem Experiment wurden identische Ansätze mit *E. coli*-Zelllysate und B1-N6-SAH-Fangpartikeln unterschiedlich oft mit einer Blitzlampe bestrahlt, um den Einfluss der Bestrahlung auf die Ausbeute zu untersuchen.

Das Experiment hat gezeigt, dass die maximal mögliche Ausbeute auch nach 10 Blitzen noch nicht erreicht war. Nach 40 Blitzen war die Ausbeute hingegen fast genau so groß wie nach 60 Blitzen (vgl. Spuren 6 und 7). In Spur 7 ist jedoch eine leichte Hintergrundfärbung zu beobachten, die sich über die ganze Spur hinzieht. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es bei einer solch extremen Bestrahlung zu ersten UV-Schäden oder Schäden durch Erwärmung an den Proteinen kommt.

Das vorliegende Ergebnis lässt darauf schließen, dass bei dem angewandten Bestrahlungsverfahren und den verwendeten Fangpartikelmengen eine Anzahl von 20 – 40 Blitzen völlig ausreichend ist. Für die meisten Experimente mit Fangpartikeln wurde deshalb mit 33 Blitzen gearbeitet.

3.4.4 Überprüfung der Waschschritte bei Verwendung von Fangpartikeln

Die zur Herstellung der Fangpartikel verwendeten MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel enthalten nach Herstellerangaben $7 - 12 \times 10^8$ Partikel pro mg und besitzen eine Biotin-Bindekapazität von 2,5 nmol/mg. Nach Rastersekundärelektronenmikroskop Aufnahmen des Herstellers haben die Partikel eine relativ glatte Oberfläche. Die Gesamtoberfläche von 1 mg der 1 µm großen Partikel ist demnach ca. $3,14 \times 10^{-3} \text{ m}^2$. Wenn auf dieser Oberfläche 2,5 nmol (entspricht $1,5 \times 10^{15}$ Moleküle) einer Fangverbindung immobilisiert sind, so entspricht deren mittlerer Abstand nur etwa 1,45 nm. Es könnte aber auch sein, dass die Magnetpartikel eine nicht ganz glatte, und damit größere Oberfläche besitzen. Der mittlere Abstand zwischen den einzelnen Fangverbindungsmolekülen wäre dann etwas größer.

Da die Beladung der Fangverbindungsmoleküle auf der Oberfläche der Magnetpartikel sehr dicht ist, ist auch die lokale Konzentration der Selektivitätsfunktion sehr hoch. Deshalb ist es denkbar, dass spezifische Proteine sehr stark an die Fangpartikel binden und sich nur noch schwer wieder wegwaschen lassen. Ein solcher Effekt wird z.B. bei einer Affinitätschromatographie bewusst ausgenutzt. Ob dieser Effekt auch bei frei in Suspension befindlichen Fangpartikeln eine Rolle spielt, wurde in einem Experiment untersucht.

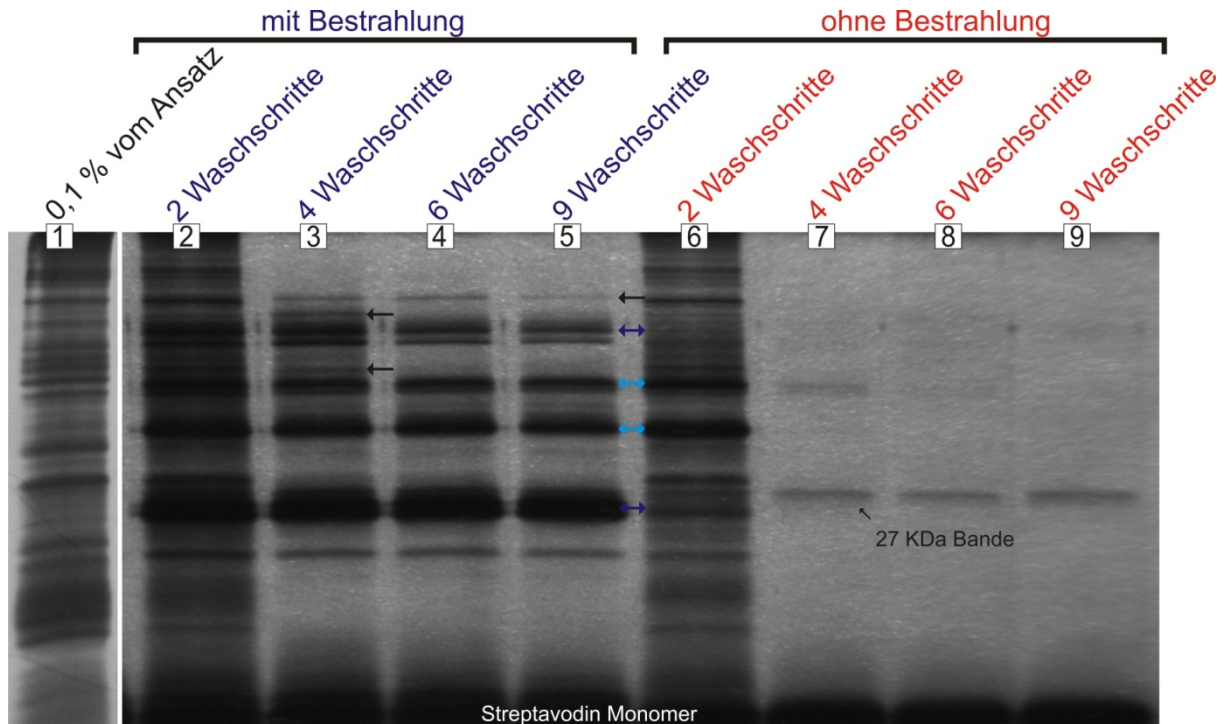


Abb. 50: Untersuchung der verschiedenen Waschschr. nach der Isolierung des Methyloms aus *E. coli* mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Die zwei vorbereiteten Ansätze enthielten jeweils Zelllysat von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml), sowie 400 μ g B1-N6-SAH-Fangpartikel und besaßen ein Volumen von 200 μ l. Nach einer Vorinkubation von 4 h wurde nur einer der Ansätze 25mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Dann wurden beide Proben gemäß der Standardprozedur gewaschen. Allerdings wurden nach jeweils zwei (am Ende drei) Waschschr. 50 μ l der Lösungen entnommen (entspricht 25 % der Ausgangsmenge) und nach Magnetpräzipitation und Abnahme des Überstands sofort mit 1 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Ein Vergleich zwischen zwei Ansätzen mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln und *E. coli*-Zelllysat zeigt deutlich, dass nur dann Proteine stark an den Fangpartikeln haften bleiben, wenn die Probe vor dem Waschen der Fangpartikel bestrahlt wurde (Abb. 50). Nach zwei Waschschr. befanden sich sowohl auf den bestrahlten als auch auf den unbestrahlten Fangpartikeln noch sehr viele Proteine (vgl. Spuren 2 und 6). Allerdings repräsentieren die im Gel auftretenden Banden nicht die Häufigkeitsverteilung der Proteine im Zelllysat (vgl. mit Spur 1). Die Proteine, die bei dem bestrahlten Ansatz nach dem Waschen noch an den Fangpartikeln hafteten waren zum Teil auch in dem nicht bestrahlten Ansatz nach zwei Waschschr. stark angereichert (vgl. Spuren 5 und 6). Dies betraf vor allem die zwei mit hellblauen Doppelpfeilen gekennzeichneten Banden. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass durch die dicht mit Fangverbindung beladenen Partikel tatsächlich ein mit Affinitätschromatographie vergleichbarer Effekt („pull down“) auftritt, der aber nicht alle Proteine in gleichem Maße betrifft. Die mit dunkelblauen Doppelpfeilen gekennzeichneten Banden waren ohne Bestrahlung bereits nach zwei Waschschr. kaum noch erkennbar.

Auffällig sind einige Banden, die nur in der bestrahlten Probe zu beobachten waren, die aber mit steigender Anzahl von Waschschritten immer schwächer wurden (schwarze Pfeile). Dies kann nicht auf ein Lösen der Biotin-Streptavidin-Bindung zurückzuführen sein, da diese mit einer Bindungskonstante von 10^{-15} M extrem stabil ist (Pähler *et al.*, 1987) und ein solcher Effekt alle isolierten Proteine gleichermaßen betreffen müsste. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass es sich hierbei nicht um SAH-bindende Proteine handelt, sondern um Proteine, welche mit einem oder mehreren SAH-bindenden Proteinen einen relativ stabilen Komplex bilden.

Zusammenfassend lässt sich somit die Aussage treffen, dass mit dem standardmäßig angewandten Waschprotokoll nur solche Proteine an den Fangpartikeln haften bleiben, die durch eine Photoverknüpfung kovalent mit einem Fangverbindungsmolekül verbunden sind. Durch die Anwendung von weniger stringenten Waschbedingungen könnte es jedoch durchaus möglich sein auch Proteine zu isolieren, die mit den eingefangenen Proteinen einen Komplex bilden.

3.4.5 Untersuchungen zur Kapazität von Fangpartikeln

Eine wichtige Frage, die sich bei der Verwendung von Fangpartikeln stellt, ist die nach der Kapazität. Zwar wird die Biotin-Bindekapazität der zur Herstellung der Fangpartikel verwendeten MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel vom Hersteller mit 2,5 nmol Biotin / mg angegeben, aber über die Bindekapazität der Fangpartikel für SAH-bindende Proteine sagt dies nicht viel aus. Die Bindekapazität von 1 mg MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikeln für biotinylierte Antikörper wird vom Hersteller mit 20 µg beziffert. Bei einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa wären dies ca. 0,13 nmol. Angesichts der extrem starken Bindung zwischen Biotin und Streptavidin können diese Werte als eine theoretische Obergrenze betrachtet werden. Wegen der deutlich schwächeren Bindung zwischen SAH und SAH-bindenden Proteinen und der nicht 100 %igen Ausbeute bei der Ausbildung von Photoverknüpfungen ist zu erwarten, dass mit 1 mg Fangpartikeln deutlich weniger als 20 µg Protein eingefangen werden.

Für die Planung von Experimenten stellt sich aber nicht nur die Frage nach der absoluten Kapazitätsgrenze der Fangpartikel, sondern vor allem die Frage nach dem richtigen Verhältnis zwischen eingesetztem Zelllysate und den verwendeten Fangpartikeln. Werden zu wenige Fangpartikel eingesetzt, werden unter Umständen nicht alle Zielproteine in befriedigender Ausbeute eingefangen und es wird kostbares Probenmaterial verschwendet. Ein zu großer Überschuss an Fangpartikeln begünstigt unspezifische Nebenreaktionen und

verursacht unnötige Kosten. Deshalb wurden in zwei Experimenten unterschiedliche Protein zu Fangpartikel Verhältnisse getestet.

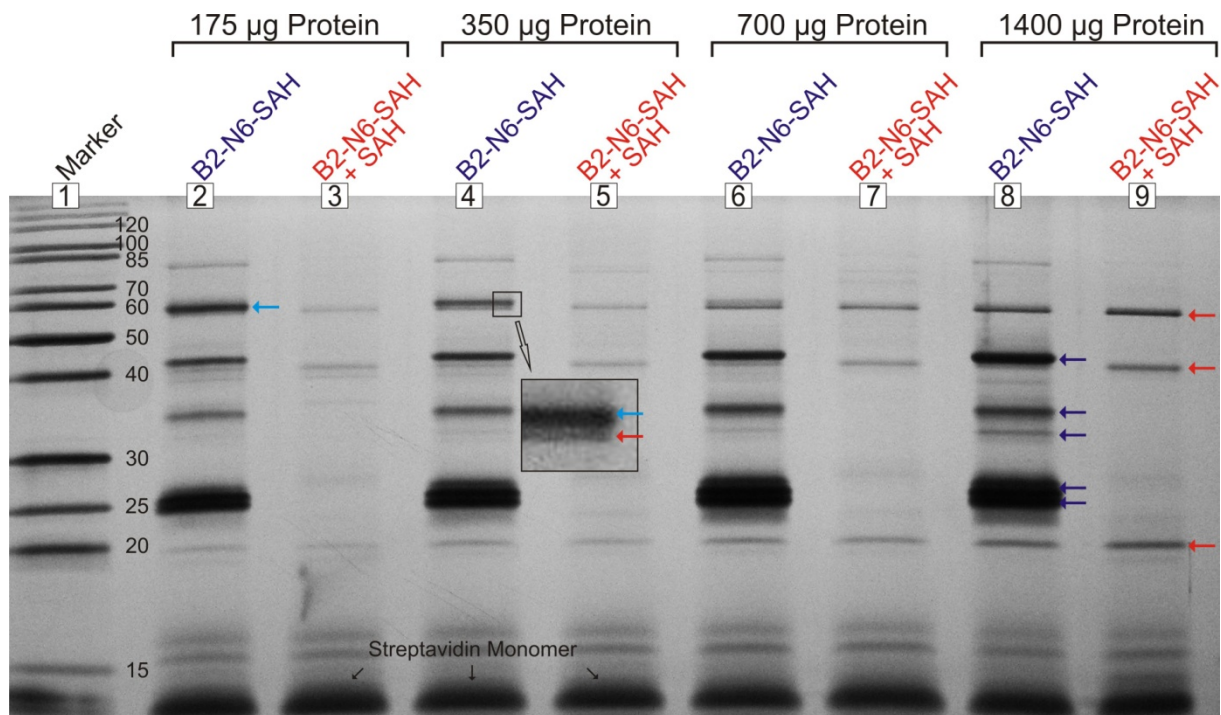


Abb. 51: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit B2-N6-SAH-Fangpartikeln. Alle Ansätze enthielten 200 µg B2-N6-SAH-Fangpartikel und hatten ein Volumen von 100 µl. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich 4 mM SAH. Die Konzentration an Zelllysat von *E. coli* DH5α wurde variiert (1,75 mg/ml, 3,5 mg/ml, 7 mg/ml und 14 mg/ml). Die Vorinkubationszeit der Proben vor dem Bestrahlen betrug 2 h und die Proben wurden 60mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Nähere Erläuterungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

In Abb. 51 ist das Ergebnis eines Experiments gezeigt, bei dem eine konstante Menge an B2-N6-SAH-Fangpartikeln aber unterschiedlichen Mengen und damit auch Konzentrationen an Zelllysat von *E. coli* eingesetzt wurden. Deutlich ist zu erkennen, dass mit zunehmender Proteinkonzentration die Menge an spezifisch eingefangenen Protein (dunkelblaue Pfeile) ansteigt (Spuren 2, 4, 6 und 8), die Menge an unspezifisch eingefangenen Protein (rote Pfeile) aber auch (Spuren 3, 5, 7 und 9). Die kleinste und die größte eingesetzte Proteinkonzentration unterscheidet sich um den Faktor acht. Zwar ist ein Quantifizieren bei silbergefärbten Gelen nur begrenzt möglich, aber dieses Verhältnis scheint sich bei den unspezifisch eingefangenen Proteinen durchaus wieder zu spiegeln (vgl. Spuren 3 und 9). Bei den spezifisch eingefangenen Proteinen kann jedoch maximal ein Faktor von vier beobachtet werden, eher sogar weniger (vgl. Spuren 2 und 8). Die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein scheint sich also einem Sättigungswert zu nähern.

Sehr auffällig ist eine spezifische Bande, die mit zunehmender Proteinkonzentration immer schwächer wurde (hellblauer Pfeil). Unterhalb dieser Bande befindet sich eine unspezifische Bande (siehe Vergrößerung), die gleichzeitig immer stärker wurde. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Kapazität der Fangpartikel bereits bei einer Proteinmenge von 350 µg überschritten war und das betreffende spezifische Protein durch die Konkurrenz mit anderen, besser bindenden Proteinen nicht mehr an die Fangpartikel binden konnte.

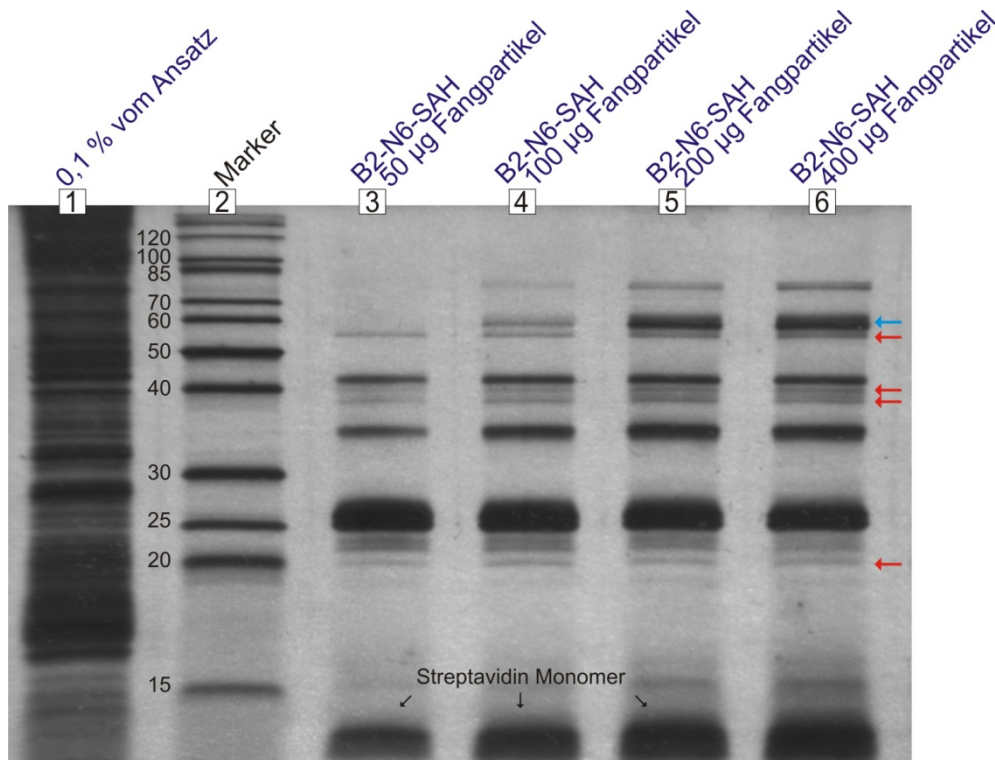


Abb. 52: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit B2-N6-SAH-Fangpartikeln. Alle Ansätze enthielten Zellysat von *E. coli* DH5α (3,5 mg/ml) und hatten ein Volumen von 100 µl. Die Menge an eingesetzten B2-N6-SAH-Fangpartikeln wurde variiert (50 µg, 100 µg, 200 µg und 400 µg). Die Vorinkubationszeit der Proben vor dem Bestrahlen betrug 1 h und die Proben wurden 25mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Nähere Erläuterungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

In Abb. 52 ist das Ergebnis eines komplementären Experiments aufgeführt. Hier wurde bei konstanter Proteinmenge und Konzentration die Menge der eingesetzten Fangpartikel variiert. Dabei konnten mit 200 µg Fangpartikel (Spur 5) alle spezifisch eingefangenen Proteine in maximaler Menge eingefangen werden. Eine Erhöhung der Fangpartikelmenge auf 400 µg führte bei keinem der spezifisch eingefangenen Proteine zu einer Vergrößerung der Ausbeute (Spur 6). Leider fehlte bei diesem Experiment der Kontrollansatz. Durch einen Vergleich mit anderen Gelen konnten jedoch die unspezifischen Banden identifiziert werden (rote Pfeile). Bei den unspezifisch eingefangenen Proteinen scheint die Abhängigkeit von der eingesetzten

Fangpartikelmenge nicht so stark zu sein wie die im vorangehenden Experiment beobachtete Abhängigkeit von der Zelllysatkonzentration (Abb. 51).

In Abb. 51 war eine Bande zu beobachten, die bei zu großen Proteinkonzentrationen fast völlig verschwunden ist. In Abb. 52 ist diese Bande ebenfalls zu sehen (hellblauer Pfeil). Auch in diesem Experiment wurde dieses Protein scheinbar erst dann eingefangen, wenn auf der Oberfläche der Fangpartikel noch genügend freie Bindestellen zur Verfügung standen.

Die beiden vorangehenden Experimente zeigen, dass die Fangpartikel eine Kapazitätsgrenze besitzen. Wenn Zelllysate in solchen Mengen eingesetzt wird, dass diese überschritten wird, so werden dadurch nicht mehr Proteine spezifisch eingefangen, sondern es steigt lediglich die Menge an unspezifisch eingefangenen Protein. Es kann unter diesen Umständen sogar passieren, dass einige spezifisch bindende Proteine durch andere spezifisch bindende Proteine verdrängt werden, so dass deren Ausbeute sinkt. Es ist deshalb sinnvoller mit einem kleinen Überschuss an Fangpartikeln zu arbeiten. Die benötigte Fangpartikelmenge variiert vermutlich bei Zelllysaten unterschiedlicher Organismen und sollte im Zweifelsfall durch Vorexperimente ermittelt werden. Für Zelllysate von *E. coli* sollte ungefähr eine Menge von 1 µg Fangpartikeln pro 2 µg Gesamtprotein eingesetzt werden.

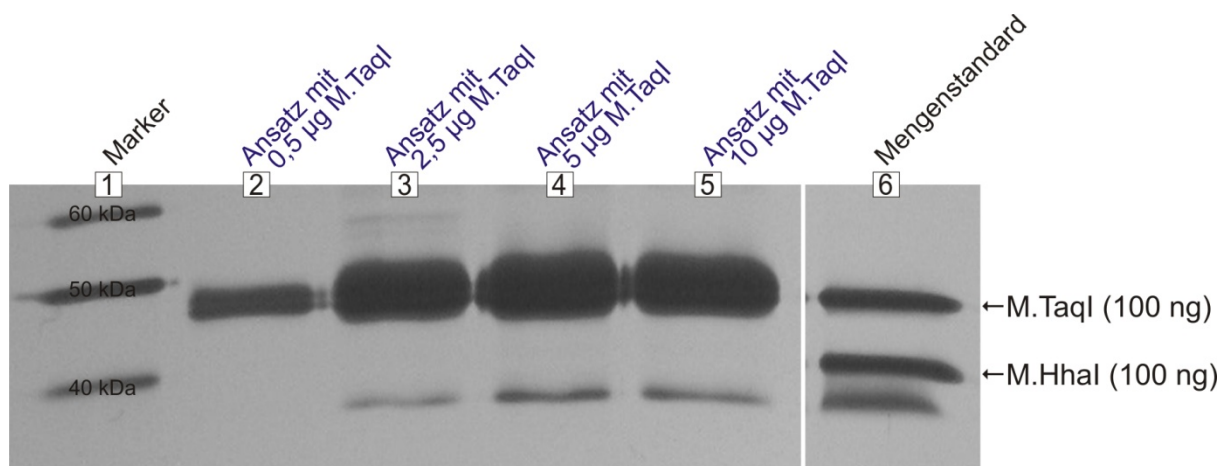


Abb. 53: Einfangen von M.TaqI mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Die Ansätze enthielten unterschiedliche Mengen an M.TaqI (0,5 µg, 2,5 µg, 5 µg und 10 µg, das entspricht Konzentrationen von 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM und 2 µM). Für jeden Ansatz wurden 200 µg B1-N6-SAH-Fangpartikel verwendet und das Probenvolumen betrug jeweils 100 µl. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Zusätzlich wurden noch zwei weitere Experimente mit aufgereinigter M.TaqI und B1-N6-SAH-Fangpartikeln durchgeführt. Dabei wurde im ersten Fall die M.TaqI-Menge bei gleichbleibender Fangpartikelmengen variiert (Abb. 53), im zweiten Fall wurde die Fangpartikelmenge bei gleichbleibender M.TaqI-Menge verändert (Abb. 54).

Aus Abb. 53 ist zu entnehmen, dass die Kapazität von 200 µg B1-N6-SAH-Fangpartikeln in einem Ansatz mit 0,5 µg M.TaqI noch nicht voll ausgeschöpft ist (Spur 2). Bei 2,5 µg M.TaqI im Ansatz wurde die Kapazitätsgrenze der Fangpartikel dann allerdings erreicht (Spur 3). Eine weitere Erhöhung der M.TaqI-Menge im Ansatz führte nicht mehr zu einer Erhöhung der Menge an eingefangener M.TaqI (vgl. Spuren 3, 4 und 5). Durch einen Vergleich der Menge an eingefangener M.TaqI mit einem Mengenstandard (Spur 6) lässt sich die Menge M.TaqI, die mit 200 µg B1-N6-SAH-Fangpartikeln maximal einfangen werden kann grob auf 0,5 µg beziffern. Da die Bandenstärke des Mengenstandards in etwa der Bandenstärke der in Spur 2 eingefangenen M.TaqI entspricht, beträgt die erzielte Ausbeute ungefähr 20 %.

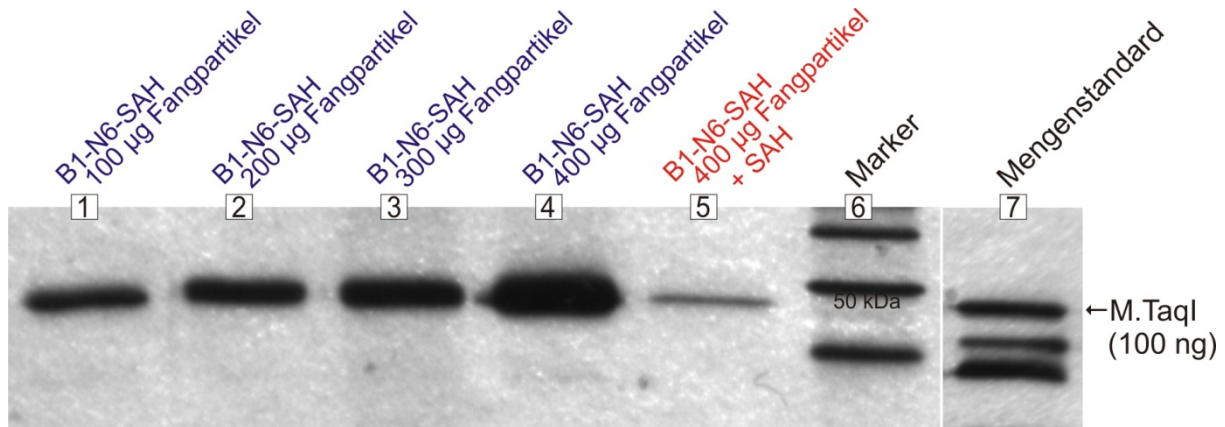


Abb. 54: Einfangen von M.TaqI mit unterschiedlichen Mengen an B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Alle Ansätze enthielten 0,5 µM (entspricht ca. 2,5 µg) M.TaqI und hatten ein Volumen von 100 µl. Es wurden unterschiedliche Mengen an B1-N6-SAH-Fangpartikeln zugesetzt (100 µg, 200 µg, 300 µg und 400 µg). Ein Kontrollansatz enthielt zusätzlich 6,9 mM SAH. Die Vorinkubationszeit der Proben betrug 1 h und es wurde 30mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Aus Abb. 54 ist ersichtlich, dass ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Fangpartikelmenge und eingefangener M.TaqI-Menge besteht, solange die Kapazität der Fangpartikel überschritten ist.

Die Frage nach einer Kapazitätsgrenze der B1-N6-SAH-Fangpartikel für M.TaqI ist auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht ganz einfach zu beantworten. Im ersten Experiment konnten mit 200 µg Fangpartikel ca. 500 ng M.TaqI eingefangen werden während es im zweiten Experiment nur ca. 200 ng M.TaqI waren. Trotzdem soll als sehr grober Richtwert eine Kapazitätsgrenze von 1 µg M.TaqI pro mg Fangpartikel genannt sein. Im Vergleich zu den 20 µg biotinylierter Antikörper, die laut Herstellerangaben mit 1 mg MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikeln eingefangen werden können, erscheint dieser

Wert eher klein. Dies mag nicht zuletzt auch an der Ausbeute von 20 % liegen, mit der M.TaqI bei Verwendung von B1-N6-SAH-Fangpartikeln eingefangen wird. Es gibt allerdings auch Proteine, bei denen diese Ausbeute deutlich höher liegt, wie im nächsten Kapitel gezeigt werden soll.

3.4.6 Fraktioniertes Einfangen von Proteinen

Im vorangehenden Abschnitt konnte beobachtet werden, dass Fangpartikel, die im Vergleich zu den spezifisch bindenden Proteinen im Unterschuss eingesetzt werden, beim Einfangen dieser Proteine in gewissem Umfang zwischen mehr oder weniger gut bindenden Proteinen unterscheiden (vgl. z.B. Abb. 51 und Abb. 52). Diese Eigenschaft könnte für einige Anwendungen durchaus von Vorteil sein, da sie unter Umständen eine Fraktionierung der eingefangenen Subproteome ermöglicht.

Um zu untersuchen, ob mit Fangpartikeln ein fraktioniertes Einfangen funktioneller Subproteome prinzipiell möglich ist, wurde Zelllysate von *E. coli* mehrfach hintereinander mit B2-N6-SAH-Fangpartikeln im Unterschuss behandelt.

In Abb. 55 (nächste Seite) ist das Ergebnis des fraktionierten Einfangens des Methyloms von *E. coli* dargestellt. Auffällig ist einmal, dass sowohl im Ansatz, als auch im Kontrollansatz in jeder Fraktion weniger Protein eingefangen wurde als in der vorherigen Fraktion. Bei den spezifisch eingefangenen Proteinen ist dies verständlich, wenn man davon ausgeht, dass von den vorhandenen SAH-bindenden Proteinen ein relativ hoher Anteil in der ersten Fraktion isoliert werden konnte. Bei den unspezifisch eingefangenen Proteinen ist dies aber überraschend, da nicht anzunehmen ist, dass unspezifisch eingefangene Proteine zu einem hohen Anteil aus der Probe entfernt werden können. Trotzdem legt das vorliegende Ergebnis den Schluss nahe, dass genau dies der Fall ist. Dieses Phänomen wurde aber nicht weiter untersucht. Es könnte sich hierbei eine neue Möglichkeit anbieten, unspezifisch bindende Proteine vor dem Einfangen der Zielproteine aus den Proben zu entfernen. In diesem Fall würde man aber Fangpartikel, die das B1 oder B2 Grundgerüst tragen, zur Abreicherung der unspezifischen Proteine verwenden.

auf, wie sie im vorherigen Abschnitt bei der DNA-MTase M.TaqI beobachtet werden konnten.

3.4.7 Einfluss des Probenvolumens auf die Ausbeute beim Einfangen von Proteinen mit Fangpartikeln

Anders als bei frei in Lösung eingesetzten Fangverbindungen kann bei Verwendung von Fangpartikeln keine konkrete Fangverbindungskonzentration angegeben werden. Hierbei stellt sich die Frage, welchen Einfluss eine Vergrößerung des Probenvolumens bei gleichbleibender Menge an Fangpartikeln hat. Da die Fangverbindungsmoleküle auf Oberflächen immobilisiert sind, ändert sich deren lokale Konzentration in diesem Fall nicht. Eine Vergrößerung des Probenvolumens hat im Wesentlichen eine Verringerung der Proteinkonzentration zur Folge. Aber hat dies auch einen Einfluss auf die Ausbeute?

Um die Komplexität des Ergebnisses in einem überschaubaren Rahmen zu halten wurde zur Klärung dieser Frage ein Experiment mit aufgereinigter M.TaqI durchgeführt. Dabei wurde die eingesetzte Stoffmenge an M.TaqI und die Menge an Fangpartikeln konstant gehalten und lediglich das Volumen der Proben variiert.

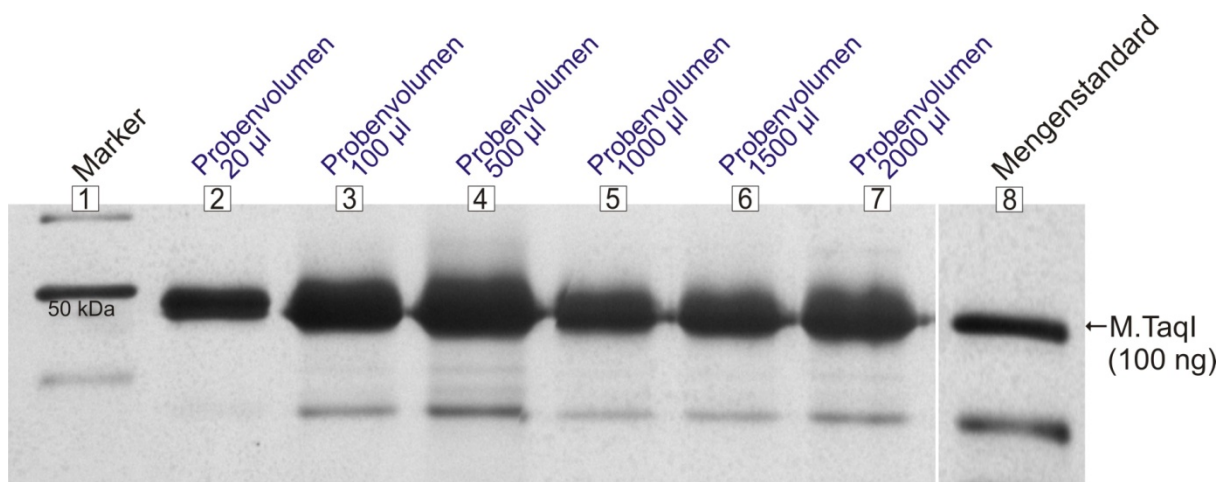


Abb. 56: Einfangen von M.TaqI mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Alle Ansätze enthielten 200 µg B1-N6-SAH-Fangpartikel und 100 pmol M.TaqI. Die Ansätze hatten unterschiedliche Volumen (20 µl, 100 µl und 500 µl angesetzt in 0,5 µl PCR-Eppendorfgefäßen bzw. 1000 µl, 1500 µl und 2000 µl in 2 ml Eppendorfgefäßen). Die Ansätze wurden nach dem Zusammenfügen 1 h inkubiert und dann 30mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach dem Waschen der Partikel erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

In Abb. 56 ist zu erkennen, dass das Probenvolumen zwar einen eindeutigen Einfluss auf die Ausbeute an eingefangenen Protein hat, aber auch, dass keine direkte Abhängigkeit zwischen

Ausbeute und Konzentration an M.TaqI besteht. Bei einem Probenvolumen von 500 μ l war die Ausbeute am größten (Spur 4), bei einem Probenvolumen von 20 μ l war sie am geringsten (Spur 2). Diese Beobachtung erscheint zunächst sehr widersprüchlich, da bei der höchsten Konzentration auch die größte Ausbeute zu erwarten gewesen wäre. Tatsächlich war die Ausbeute bei sehr großen Probenvolumina auch wieder etwas geringer.

Insgesamt schwankte die Ausbeute bei diesem Experiment nur etwa um den Faktor fünf, während die M.TaqI Konzentration um den Faktor 100 variiert wurde. Diese Tatsache und die zunächst schwer verständliche Verteilung der Ausbeuten lassen vermuten, dass die Unterschiede in der Ausbeute nicht mit den Konzentrationsunterschieden der eingesetzten M.TaqI, sondern mit dem unterschiedlichen Volumen der Proben zusammenhängen. Eventuell spielen auch die verwendeten Probengefäße eine Rolle, denn zwischen den Spuren 5 und 7 (erst ab der Spur 5 wurden 2 ml Eppendorfgefäße verwendet) ist nochmals eine leichte Zunahme der Ausbeuten zu sehen. Eine mögliche Interpretation der vorliegenden Ergebnisse könnte auf der verschieden guten Photoaktivierung der Fangpartikel beruhen. Wegen der gegenseitigen Beschattung der Fangpartikel ist eine Bestrahlung kleiner Volumen besonders schwierig, während großvolumige Proben wegen ihrer größeren Oberfläche und ihrer geringeren Partikeldichte deutlich besser vom Licht durchdrungen werden (vgl. auch Abschnitt 3.4.3). Auch die verwendeten Probengefäße unterscheiden sich deutlich in ihrer Lichtdurchlässigkeit (vgl. Abb. 3.2.4). Beim Einfangen von SAH-bindenden Proteinen mit Hilfe von frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen hat sich herausgestellt, dass eine möglichst gleichzeitige Photoaktivierung aller Fangverbindungs-moleküle durch ein möglichst starkes Blitzlicht vorteilhaft ist (vgl. Abschnitt 3.2.4). Möglicherweise gilt dies auch bei Verwendung von immobilisierten Fangverbindungen.

Betreffend des Zusammenhangs zwischen Ausbeute an eingefangenen Protein und der eingesetzten Proteinkonzentration kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse angenommen werden, dass die Proteinkonzentration über einen weiten Konzentrationsbereich nur einen kleinen Einfluss auf die Ausbeute hat.

3.4.8 Ausbeutenvergleich beim Einfangen von SAH-bindenden Proteinen mit Fangpartikeln oder frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen

In den vorangehenden Abschnitten wurden viele Ergebnisse präsentiert, die den Schluss nahelegen, dass sich das Methylozym von *E. coli* mit Fangpartikeln nicht nur viel spezifischer als bei Verwendung von frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen einfangen lässt, sondern dass hierbei auch die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Proteinen deutlich größer ist. Ein direkter Vergleich steht bisher jedoch noch aus und soll an dieser Stelle nachgeliefert werden.

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit beider Verfahren zu ermöglichen wurden alle Experimente bei identischem Probenvolumen (100 μ l) und gleicher Menge an MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikeln (200 μ g) durchgeführt. Da die eingesetzte Magnetpartikelmenge 500 pmol Fangverbindung binden kann und diese Stoffmenge in einem Volumen von 100 μ l einer Konzentration von 5 μ M entspricht wurden Ansätze mit in Lösung befindlichen Fangverbindungen mit dieser Fangverbindungskonzentration durchgeführt, während bei Ansätzen mit Fangpartikeln die gleiche Menge der Fangverbindung partikelgebunden vorlag. Diese Bedingungen sind für einen direkten Vergleich beim Einfangen SAH-bindender Proteine sehr gut geeignet, da eine Fangverbindungskonzentration von 5 μ M bei Verwendung von frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen einen guten Kompromiss darstellt. Mit dieser Fangverbindungskonzentration werden bei MTasen erfahrungsgemäß gute Ausbeuten an spezifisch eingefangenen Protein erzielt, während der Anteil an unspezifisch eingefangenen Protein noch verhältnismäßig gering bleibt.

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die Verwendung von Fangpartikeln beim Einfangen aufgereinigter M.HhaI im Vergleich zu in Lösung befindlichen Fangverbindungen Vorteile bietet (Abb. 57). Dabei konnten mit den in Lösung befindlichen Fangverbindungen B1-N6-SAH und B2-N6-SAH Ausbeuten zwischen 4 % und 10 % erzielt werden (Spuren 2 und 6), wobei mit B1-N6-SAH die größere Ausbeute erzielt wurde.

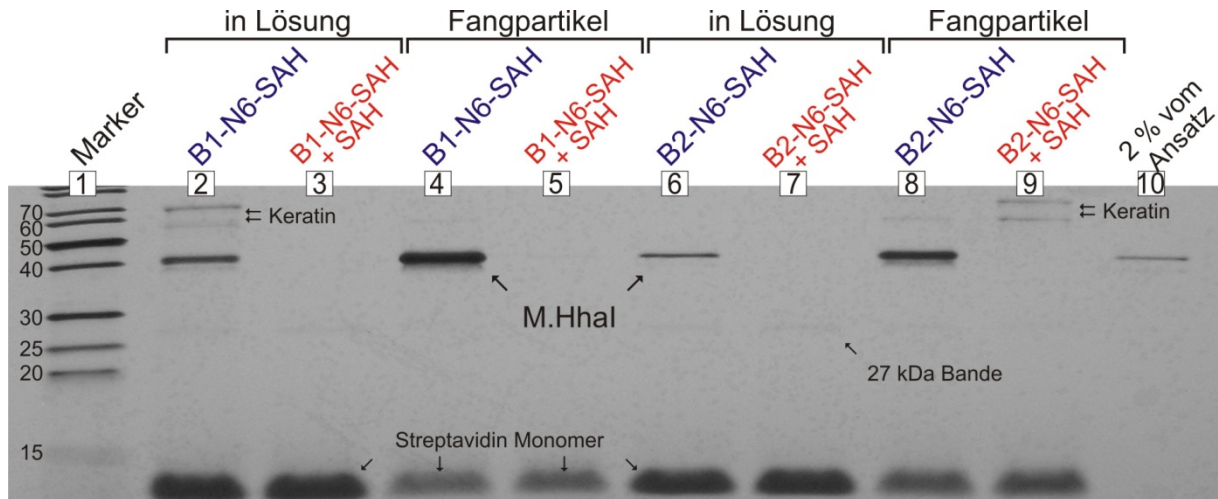


Abb. 57: Einfangen von aufgereinigter M.HhaI mit B1-N6-SAH und B2-N6-SAH in Lösung oder unter Verwendung der entsprechenden Fangpartikel. Alle Ansätze hatten ein Volumen von 100 μ l und enthielten 1 μ M M.HhaI. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich 7 mM SAH. Die Ansätze, bei denen die Fangverbindungen in Lösung eingesetzt wurden enthielten diese in einer Konzentration von 5 μ M. Die anderen Ansätze enthielten jeweils 200 μ g der entsprechenden Fangpartikel. Die Bindezeit der Fangpartikel-Ansätze betrug 80 min. Danach wurden die Ansätze mit Fangpartikeln 60mal mit der Blitzlampe bestrahlt, die Ansätze mit gelösten Fangverbindungen nur 10mal. Alle Proben wurden gemäß dem Standardprotokoll gewaschen und durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert.

Die Menge an unspezifisch eingefangenen Protein lag in diesem Gel bei allen Kontrollansätzen unterhalb der Nachweisgrenze (Spuren 3, 5, 7 und 9). Auffallend ist, dass mit Fangpartikeln sehr viel höhere Ausbeuten erzielt wurden als mit den frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen (vgl. Spuren 4 und 8 mit den Spuren 2 und 6). Die Ausbeuten sind aus diesem Gel zwar schwer abzuschätzen, liegen aber vermutlich zwischen 20 % und 50 %.

In dem Gel ist desweiteren ein Phänomen zu beobachten, welches im Zusammenhang mit einer totalen Beladung der MyOneTM Streptavidin C1 Magnetpartikel schon zweimal beobachtet werden konnte (siehe Abb. 5 und 26, jeweils in Spur 8). In diesen Experimenten waren alle Biotin-Bindestellen auf den Magnetpartikel durch freies Biotin blockiert, was dann auf dem Gel eine Abschwächung der Streptavidinbande zur Folge hatte. Offensichtlich tritt dieses bislang unerklärliche Phänomen auch dann auf, wenn die Magnetpartikel mit einer Fangverbindung beladen sind.

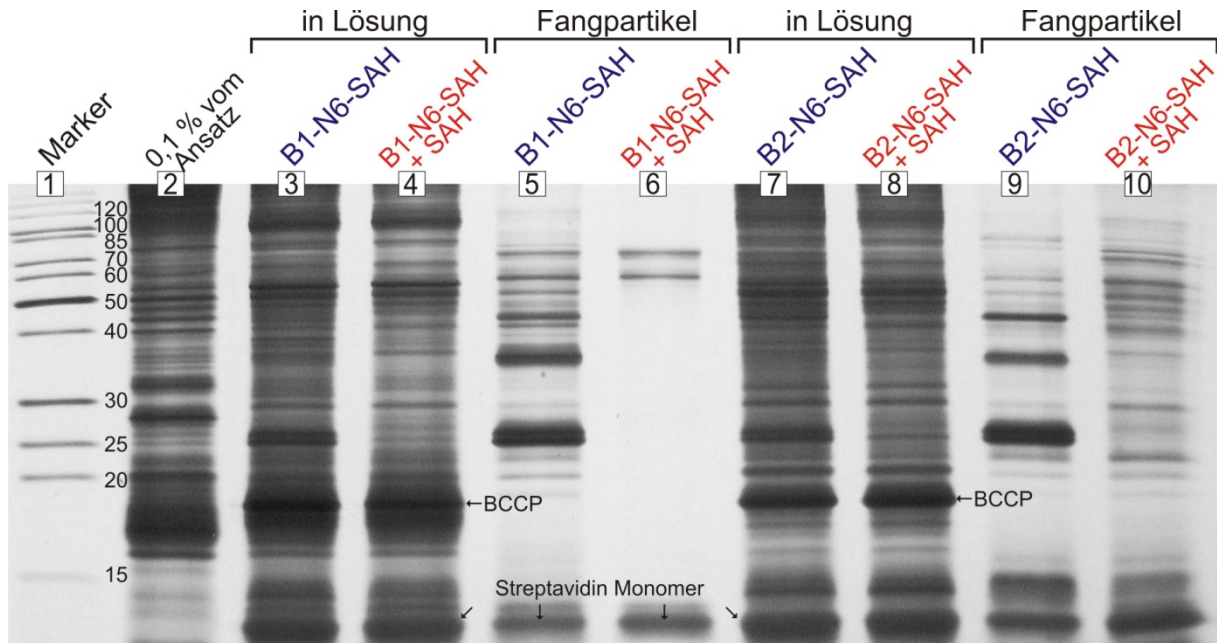


Abb. 58: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit B1-N6-SAH und B2-N6-SAH in Lösung oder unter Verwendung der entsprechenden Fangpartikel. Alle Ansätze hatten ein Volumen von 100 μ l und enthielten Zelllysat von *E. coli* DH5 α (7 mg/ml). Die Ansätze, bei denen die Fangverbindungen in Lösung eingesetzt wurden enthielten diese in einer Konzentration von 5 μ M. Die anderen Ansätze enthielten jeweils 200 μ g der entsprechenden Fangpartikel. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich 5 mM SAH. Die Bindezeit der Fangpartikel-Ansätze betrug 1 h. Danach wurden die Ansätze mit Fangpartikeln 60mal mit der Blitzlampe bestrahlt, die Ansätze mit gelösten Fangverbindungen nur 10mal. Alle Proben wurden gemäß dem Standardprotokoll gewaschen und durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert.

Im nächsten aufgeführten Experiment diente Zelllysat von *E. coli* als Substrat (Abb. 58 und 59). Bei einem direkten Vergleich zwischen dem partikelgebundenen Einfangverfahren mit dem Ergebnis bei Verwendung von frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen fällt sofort auf, dass mit Fangpartikeln nicht nur deutlich größere Ausbeuten an spezifisch eingefangenen Protein erzielt werden, sondern dass auch viel weniger Proteine unspezifisch eingefangen werden. Besonders bei Verwendung von B1-N6-SAH-Fangpartikeln waren fast alle Proteine spezifisch eingefangen (vgl. Spuren 5 und 6), während mit der gleichen Fangverbindung eingesetzt in Lösung der überwiegende Teil der Proteine unspezifisch eingefangen wurde (vgl. Spuren 3 und 4). Mit der Fangverbindung B2-N6-SAH war das Ergebnis sehr ähnlich (Spuren 7 – 10). Allerdings wurden insgesamt etwas mehr Proteine unspezifisch eingefangen während einige der spezifischen Banden etwas schwächer ausfielen.

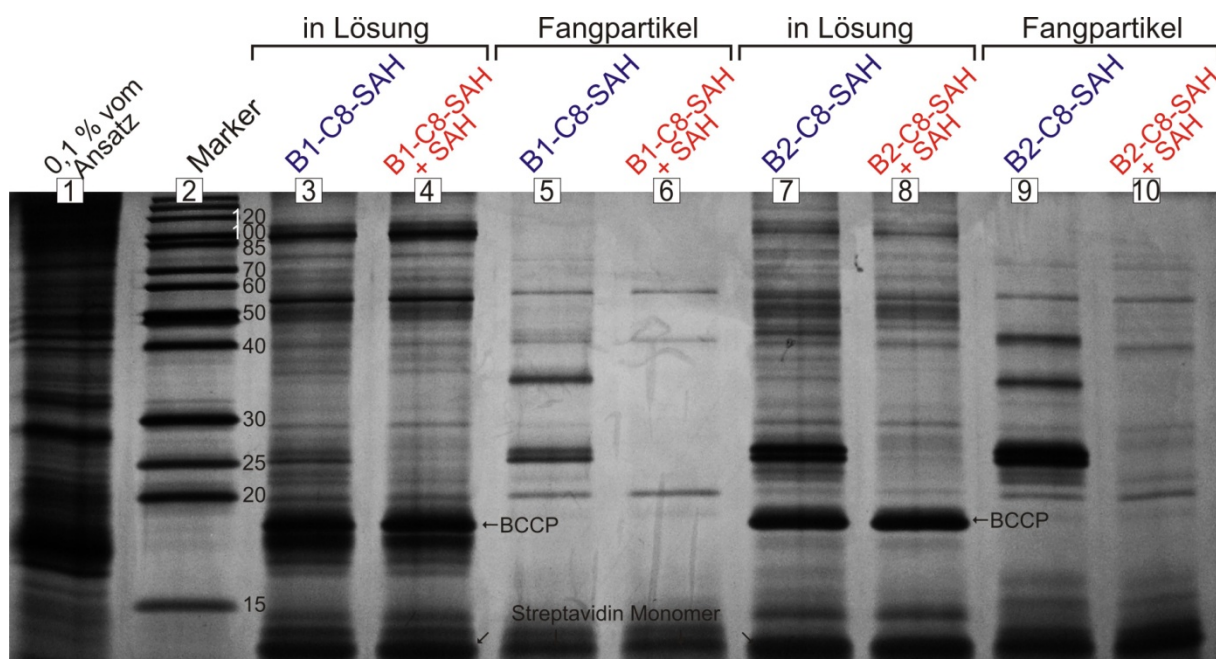


Abb. 59: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit B1-C8-SAH und B2-C8-SAH in Lösung oder unter Verwendung der entsprechenden Fangpartikel. Alle Ansätze hatten ein Volumen von 100 μ l und enthielten Zelllysat von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml). Die Ansätze, bei denen die Fangverbindungen in Lösung eingesetzt wurden, enthielten diese in einer Konzentration von 5 μ M. Die anderen Ansätze enthielten jeweils 200 μ g der entsprechenden Fangpartikel. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich 5 mM SAH. Die Bindezeit der Fangpartikel Ansätze betrug 1 h. Danach wurden die Ansätze mit Fangpartikeln 60mal mit der Blitzlampe bestrahlt, die Ansätze mit gelösten Fangverbindungen nur 10mal. Alle Proben wurden gemäß dem Standardprotokoll gewaschen und durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert.

Bei den Fangverbindungen mit einer Verknüpfung an die C8-Position des Adeninrings (Abb. 59), glich das Ergebnis dem mit B1-N6-SAH und B2-N6-SAH (Abb. 58). Allerdings war die Menge an eingefangenen Proteinen allgemein etwas geringer, da in diesem Experiment eine geringere Gesamtmenge an Zelllysat eingesetzt wurde. Vermutlich ist die verhältnismäßig geringe Menge an eingefangenen Protein in den Spuren 5 und 6 auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen, etwa durch den Verlust von Partikeln während der Waschschrte. Eine deutlich geringere Ausbeute bei Verwendung von B1-C8-SAH-Fangpartikeln im Vergleich zu B2-C8-SAH-Fangpartikeln konnte bei anderen, hier nicht aufgeführten Experimenten nicht beobachtet werden. Die generelle Tendenz, höhere Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein bei gleichzeitig drastischer Reduktion der Menge an unspezifisch eingefangenen Protein, ist bei den Ansätzen mit Fangpartikeln aber auch in diesem Gel deutlich zu erkennen. Dabei konnten auch Proteine in verhältnismäßig großen Mengen eingefangen werden, die mit in Lösung befindlichen Fangverbindungen nur in kleinen Mengen isoliert werden konnten (vgl. z.B. Spuren 7 und 9). Anhand von Gelen kann nur grob abgeschätzt werden, um wie viel sich die Ausbeute an spezifisch eingefangenen

Protein durch den Einsatz von Fangpartikeln erhöht, zumal dies bei den einzelnen Proteinen ganz unterschiedlich ausfällt. Anhand der aufgeführten Ergebnisse und unter Berücksichtigung vieler, hier nicht aufgeführter Experimente kann diese Erhöhung der Ausbeute jedoch um mindestens den Faktor 2, im Extremfall sogar um den Faktor 20 beziffert werden.

Fangpartikel bieten aber noch einen weiteren Vorteil, der bislang noch nicht erwähnt wurde. Da sie keine freie Biotin-Bindestelle mehr aufweisen, können sie auch keine Proteine mehr binden, die im Zelllysate bereits natürlicherweise biotinyliert vorliegen, wie z.B. BCCP. Bei *E. coli* betrifft dies zwar nur ein Protein (eventuell auch zwei Proteine), aber in höheren Organismen ist deren Zahl deutlich größer. Bei einer massenspektrometrischen Analyse der eingefangenen Proteine könnten Proteine, die natürlicherweise biotinyliert vorliegen stören. Dieser Nachteil ist bei Verwendung von Fangpartikeln nicht zu befürchten.

3.4.9 Verwendung unterschiedlicher Träger-Magnetpartikel zur Herstellung von Fangpartikeln

Mittlerweile ist eine große Auswahl unterschiedlichster streptavidinbeschichteter Magnetpartikel kommerziell erhältlich. Die MyOne™ Streptavidin Magnetpartikel (von Dynal®, Vertrieb über Invitrogen) haben sich als besonders geeignet erwiesen. Sie sind im Gegensatz zu einigen Konkurrenzprodukten rund, haben eine sehr einheitliche Größe und besitzen eine verhältnismäßig glatte Oberfläche (laut Produktbeschreibung des Vertreibers Invitrogen). Von den MyOne™ Streptavidin Magnetpartikeln gibt es zwei Varianten, die MyOne™ Streptavidin **C1** Magnetpartikel und die MyOne™ Streptavidin **T1** Magnetpartikel. Erstere basieren auf carboxylaktivierte Partikeln, sind relativ hydrophil und haben beim pH-Wert des *E. coli*-Einfangpuffers (pH 7,9) ein Zetapotential von ca. -50 mV, während letztere auf tosylaktivierte Partikeln basieren, hydrophober sind und beim pH-Wert des *E. coli*-Einfangpuffers ein Zetapotential von ca. -20 mV aufweisen (Herstellerangaben). Die MyOne™ Streptavidin **C1** Magnetpartikel haben 0,01 % Tween20 im Lagerpuffer während die MyOne™ Streptavidin **T1** Magnetpartikel 0,1 % BSA im Lagerpuffer aufweisen.

Für fast alle Experimente wurden die MyOne™ Streptavidin **C1** Magnetpartikel benutzt, da diese kein störendes BSA aufweisen. Mit der Einführung der partikelgebundenen Einfangmethode stellte sich jedoch die Frage, ob auf MyOne™ Streptavidin **T1** Magnetpartikeln basierende Fangpartikel eventuell auch Vorteile aufweisen. Dieser Fragestellung wurde in einem vergleichenden Experiment nachgegangen.

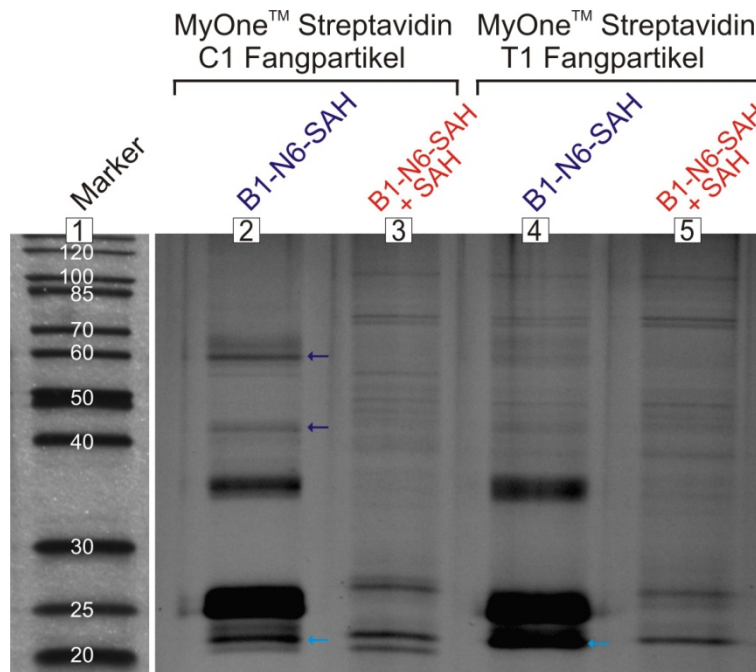


Abb. 60: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln, die auf MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikeln oder MyOne™ Streptavidin T1 Magnetpartikeln basieren. Jeder Ansatz enthielt *E. coli* DH5α Zelllysate (3,5 mg/ml), 200 µg der B1-N6-SAH-Fangpartikel und hatte ein Volumen von 100 µl. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (6 mM). Alle Ansätze wurden 1,5 h vorinkubiert und 33mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach dem Waschen der Partikel erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erläuterungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Aus Abb. 60 ist ersichtlich, dass die Wahl der Magnetpartikel keinen sehr großen Einfluss auf das Ergebnis beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* hat. Allerdings konnten mit den verschiedenen Magnetpartikeln doch einige Unterschiede beobachtet werden. So konnten zwei der mit MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikeln spezifisch eingefangenen Proteine mit MyOne™ Streptavidin T1 Magnetpartikeln kaum eingefangen werden (dunkelblaue Pfeile). Auch scheint die Gesamtmenge der unspezifisch eingefangenen Proteine bei den MyOne™ Streptavidin T1 Magnetpartikeln etwas höher. In Spur 4 ist eine Bande zu sehen, die bei MyOne™ Streptavidin T1 Magnetpartikeln deutlich stärker ausgeprägt ist, jedoch nicht eindeutig als spezifisch oder unspezifisch einzuordnen ist (hellblauer Pfeil).

Die Wahl der zur Herstellung der Fangpartikel verwendeten Magnetpartikel hat also einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf das Ergebnis beim Einfangen des Methyloms von *E. coli*. Insgesamt haben sich die MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel als etwas geeigneter herausgestellt. Es kann aber nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass es auch Anwendungen gibt (z.B. bei Zelllysaten von Eukaryonten), bei denen die Benutzung von MyOne™ Streptavidin T1 Magnetpartikel vorteilhafter sein mag.

3.4.10 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Spezifität beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit Fangpartikeln

Zweiwertige Kationen, insbesondere Mg^{2+} , sind an sehr vielen enzymatischen Prozessen beteiligt. Sie sind dabei nicht nur für die korrekte Faltung der Proteine erforderlich, sondern befinden sich häufig in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums von Enzymen, wo sie direkt an der Katalyse beteiligt sind.

Viele der in der Molekularbiologie verwendeten Puffer enthalten den Komplexbildner EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), um Mg^{2+} zu komplexieren und es den Mg^{2+} -abhängigen Enzymen zu entziehen. Bei Arbeiten mit DNA ist dies auch durchaus sinnvoll, da Nukleasen, die DNA fragmentieren würden, normalerweise auf die Anwesenheit von Mg^{2+} angewiesen sind. Beim spezifischen Einfangen funktioneller Subproteome sollten jedoch möglichst physiologische Bedingungen herrschen, da die Zielproteine zumindest in der Lage sein müssen, an die Selektivitätsfunktion der verwendeten Fangverbindung zu binden. In einem Experiment wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss das Komplexbieren zweiwertiger Kationen durch EDTA auf Ausbeute und Spezifität beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* durch Fangpartikel hat.

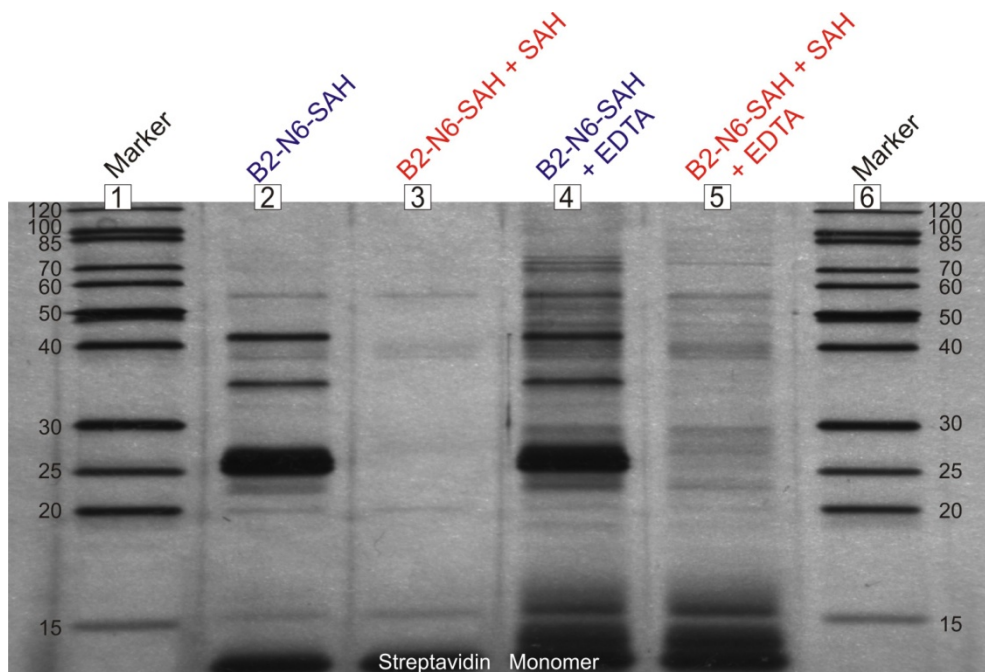


Abb. 61: Einfangen des Methyloms von *E. coli* in Abwesenheit von freiem Mg^{2+} . Jeder Ansatz enthielt 3,5 mg/ml *E. coli* DH5 α -Zelllysate, 200 μ g der B2-N6-SAH-Fangpartikel und hatte ein Volumen von 100 μ l. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (6 mM). Zwei Ansätze wurden mit *E. coli*-Einfangpuffer durchgeführt (enthält u. A. 10 mM Mg^{2+}), die anderen zwei Ansätze enthielten zusätzlich 30 mM EDTA. Alle Ansätze wurden 1 h vorinkubiert und 25mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach dem Waschen der Partikel erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Aus Abb. 61 ist ersichtlich, dass sehr viele Proteine unspezifisch eingefangen wurden, wenn der verwendete Puffer im Verhältnis zum vorhandenen Mg^{2+} einen dreifachen Überschuss an EDTA aufwies (Spur 6). Fehlte das EDTA, so wurden unter ansonsten identischen Bedingungen nur sehr wenige Proteine unspezifisch eingefangen (Spur 3).

Das vorliegende Ergebnis könnte natürlich auch auf die Anwesenheit von EDTA und nicht auf die Abwesenheit von freiem Mg^{2+} zurückzuführen sein. In einem weiteren Experiment wurde deshalb ein Einfangpuffer ohne Mg^{2+} und ohne EDTA verwendet. Verschiedenen Ansätzen wurden dann unterschiedliche zweiwertige Kationen zugesetzt.

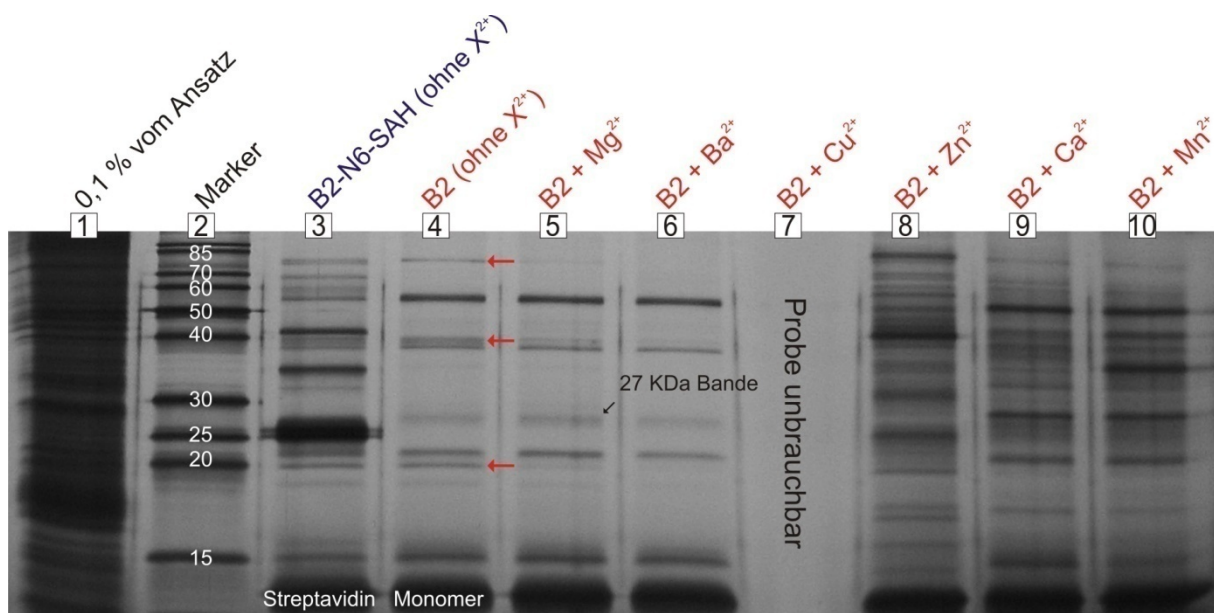


Abb. 62: Einfluss unterschiedlicher zweiwertiger Kationen auf unspezifische Nebenreaktionen zwischen B2-Fangpartikeln und Zelllysate von *E. coli*. Die Ansätze enthielten 200 μg B2-Fangpartikel. Ein Ansatz mit 200 μg B2-N6-SAH-Fangpartikeln diente als Positivkontrolle. Alle Ansätze enthielten jeweils Zelllysate von *E. coli* DH5 α (3,5 mg/ml) und hatten ein Volumen von 100 μl . Die Pufferbedingungen waren 20 mM HEPES, 50 mM KOAc und 10 % Glycerin, bei pH 7,9. Einige Ansätze enthielten zusätzlich 10 mM MgCl_2 , 10 mM BaCl_2 , 10 mM CuCl_2 , 10 mM $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, 10 mM CaCl_2 oder 10 mM MnCl_2 . Alle Ansätze wurden 1 h vorinkubiert und 33mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach dem Waschen der Partikel erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erläuterungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text. Bei dem Ansatz mit CuCl_2 kam es gleich nach der Zugabe des CuCl_2 zu einem extrem starken Ausfällen von Protein, so dass die Probe nicht weiter bearbeitet werden konnte.

Aus Abb. 62 ist ersichtlich, dass bei Anwesenheit von Mg^{2+} oder Ba^{2+} im Einfangpuffer das Ausmaß unspezifischer Nebenreaktionen am geringsten war (Spuren 5 und 6). Bei Abwesenheit zweiwertiger Kationen konnten im Vergleich dazu drei zusätzliche unspezifische Banden beobachtet werden (Spur 4, rote Pfeile). Bei Anwesenheit von Zn^{2+} ,

Ca^{2+} und Mn^{2+} kam es zu einem drastischen Anstieg unspezifischer Nebenreaktionen (Spuren 8, 9 und 10). Interessanterweise unterscheiden sich die Bandenmuster in diesen drei Spuren deutlich voneinander. Zn^{2+} , Ca^{2+} und Mn^{2+} bewirken also, dass ganz unterschiedlich Proteine unspezifisch eingefangen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Mg^{2+} beim spezifischen Einfangen von Proteinen unter Verwendung von Fangpartikeln eine wichtige Rolle spielt. Bei Abwesenheit von Mg^{2+} kommt es zu einer deutlichen Erhöhung unspezifischer Nebenreaktionen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass viele Proteine unter diesen „unphysiologischen“ Bedingungen keine korrekte Faltung aufweisen und dadurch eventuell zu ungewollten Wechselwirkungen mit der Oberfläche der Fangpartikel neigen.

Auch größere Mengen von Ca^{2+} oder der Schwermetallionen Zn^{2+} und Mn^{2+} bewirken wahrscheinlich eine unphysiologische Faltung vieler Proteine. Ein Zusammenhang zwischen einer falschen Tertiärstruktur von Proteinen und unspezifischen Nebenreaktionen ist zwar durchaus denkbar, kann durch die vorliegenden Ergebnisse aber nicht eindeutig bewiesen werden.

3.4.11 Einfluss des Abstands zwischen Selektivitätsfunktion und Reaktivitätsfunktion beim partikelgebundenen Einfangen des Methyloms von *E. coli*

In Abschnitt 3.3.17 wurde gezeigt, dass eine Vergrößerung des Abstands Selektivitätsfunktion-Reaktivitätsfunktion bei trifunktionellen Fangverbindungen keinen positiven Einfluss auf die Ausbeute beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* hat. Bei größerem Abstand war die Ausbeute sogar etwas geringer (vgl. Abb. 44). Allerdings wurden die Fangverbindungen bei dem betreffenden Experiment in Lösung eingesetzt. In einem analogen Experiment wurde deshalb B1-N6-SAH-Fangpartikel mit B1-N6-SAH-lang-Fangpartikeln verglichen.

Aus Abb. 63 (nächste Seite) ist klar ersichtlich, dass mit den B1-N6-SAH-lang-Fangpartikeln von den meisten spezifisch eingefangenen Proteinen weniger eingefangen wurde als mit den B1-N6-SAH-Fangpartikeln. (vgl. Spuren 3 und 5). Außerdem wurden dabei deutlich mehr Proteine unspezifisch eingefangen (vgl. Spuren 4 und 6).

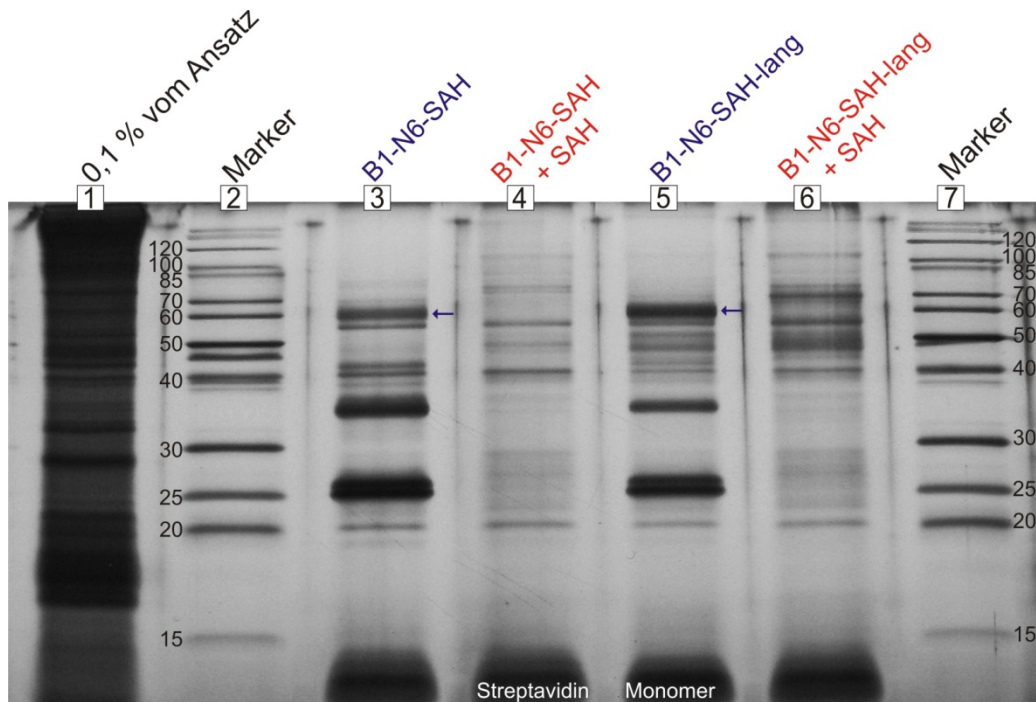


Abb. 63: Einfangen des Methyloms von *E. coli* mit Fangpartikeln der Fangverbindungen B1-N6-SAH und B1-N6-SAH-lang im Vergleich. Von den B1-N6-SAH-Fangpartikeln und den B1-N6-SAH-lang-Fangpartikeln wurden jeweils 200 µg verwendet. Die Ansätze enthielten 3,5 mg/ml *E. coli* DH5α-Zellysat und hatten ein Volumen von 100 µl. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (6 mM). Alle Ansätze wurden 2,5 h vorinkubiert und 25mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach dem Waschen der Partikel erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Somit hat eine Vergrößerung des Abstands zwischen Selektivitätsfunktion und Reaktivitätsfunktion bei Verwendung von Fangpartikeln im Wesentlichen eine Verschlechterung der Ausbeute und eine Verminderung der Spezifität zur Folge. Allerdings gab es bei dem oben aufgeführten Experiment auch eine Ausnahme. Von dem mit blauen Pfeilen markierten Protein wurde mit B1-N6-SAH-lang-Fangpartikeln etwa doppelt so viel eingefangen wie mit den B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Interessanterweise ist dies vermutlich genau das Protein, welches beim fraktionierten Einfangen des Methyloms von *E. coli* durch mehrmaligen Zusatz kleiner Mengen an Fangpartikeln erst in den späteren Fraktionen eingefangen wurde (Abb. 55). Dies weist darauf hin, dass dieses Protein an B1-N6-SAH-Fangpartikel nur schlecht bindet, an B1-N6-SAH-lang-Fangpartikel aber deutlich besser.

Für das Einfangen der meisten Proteine ist ein kurzer Abstand zwischen Selektivitätsfunktion und Reaktivitätsfunktion bei der verwendeten Fangverbindung also günstiger. Wenn die Fangverbindung partikelgebunden eingesetzt wird, so kann es für einige Proteine aber auch von Vorteil sein, wenn die verwendete Fangverbindung einen größeren Abstand zwischen Selektivitätsfunktion und Reaktivitätsfunktion aufweist.

3.4.12 Differentielles Einfangen funktioneller Subproteome

Die Menge eines Proteins, welche mit einer trifunktionellen Fangverbindung oder den entsprechenden Fangpartikeln eingefangen werden hängt mit der in der Probe vorhandenen Menge des betreffenden Proteins zusammen. Voraussetzung ist allerdings, dass die Fangverbindung bzw. die entsprechenden Fangpartikel im Vergleich zur vorhanden Proteinmenge im Überschuss vorliegen und nicht der limitierende Faktor sind. Somit ist es durchaus möglich beim Isolieren funktioneller Subproteome aus Zelllysaten auch Informationen über die im Zelllysate vorhandene Menge einzelner Proteine zu gewinnen. Eine absolute Quantifizierung ist dabei aber schwierig, da sich die Ausbeuten von Protein zu Protein stark unterscheiden. Ein direkter Vergleich unterschiedlicher Zelllysate ist jedoch trotzdem möglich, da sich solche Ausbeutenunterschiede in allen Proben gleichermaßen auswirken.

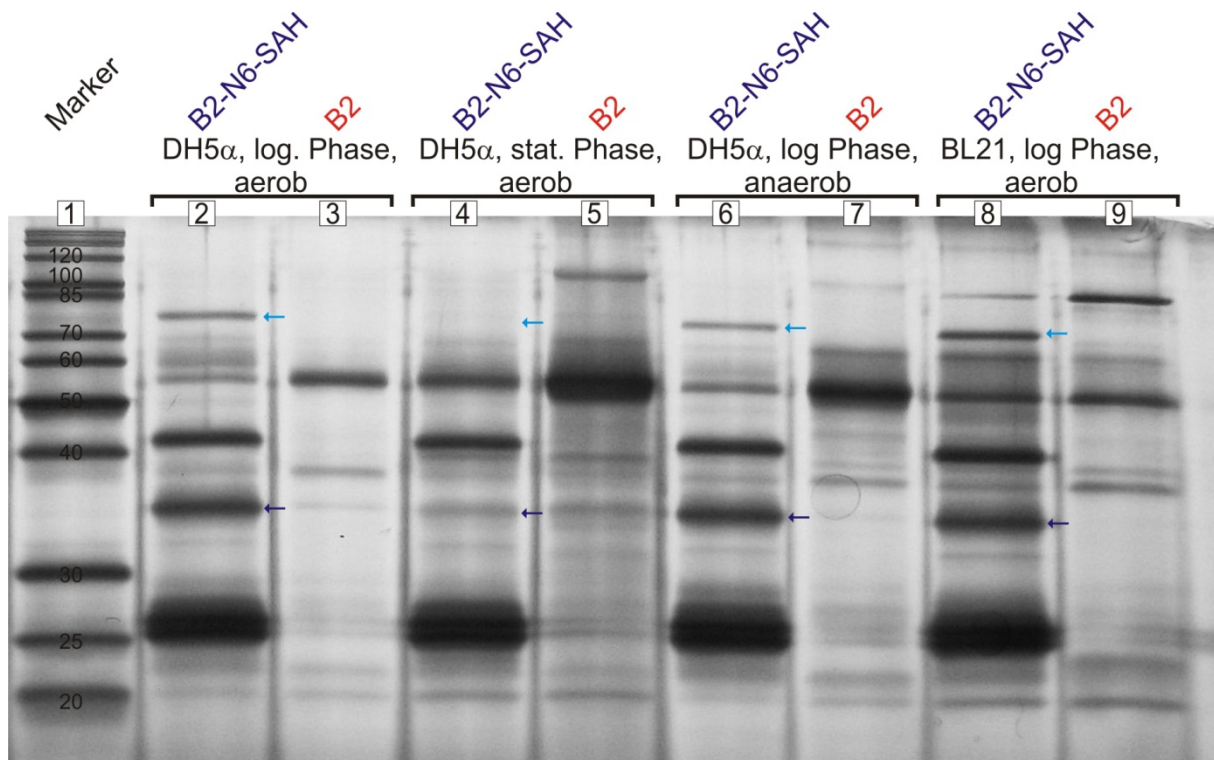


Abb. 64: Einfangen des Methyloms aus unterschiedlichen *E. coli*-Zelllysaten mit B2-N6-SAH-Fangpartikeln. Zur Herstellung der Zelllysate dienten Zellen von *E. coli* DH5 α (logarithmische Wachstumsphase, aerob gewachsen), von *E. coli* DH5 α (stationäre Wachstumsphase, aerob gewachsen), von *E. coli* DH5 α (logarithmische Wachstumsphase, anaerob gewachsen), sowie von *E. coli* BL21 (logarithmische Wachstumsphase, aerob gewachsen). Die Ansätze enthielten jeweils 200 μ g B2-N6-SAH-Fangpartikel bzw. B2-Fangpartikel, sowie 5 mg/ml Zelllysate und hatten ein Volumen von 100 μ l. Alle Ansätze wurden 1 h vorinkubiert und 25mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach dem Waschen der Partikel erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Zur Demonstration dieser Möglichkeiten wurden verschiedene Zelllysate von *E. coli* unter ansonsten identischen Bedingungen untersucht. Die verwendeten *E. coli*-Zellen waren zuvor unter unterschiedlichen Bedingungen gewachsen. Auch ein bisher nicht verwendeter Stamm (*E. coli* BL21) wurde untersucht und mit *E. coli* DH5 α verglichen.

Aus Abb. 64 ist ersichtlich, dass sich die aus den verschiedenen Zelllysaten isolierten Methylome zwar ähnelten aber auch merklich unterschieden. So ist z.B. die spezifische Bande oberhalb von 40 kDa oder die Doppelbande oberhalb von 25 kDa bei allen Zelllysaten gleich stark ausgeprägt (vgl. Spuren 2, 4, 6 und 8). Eine andere spezifische Bande zwischen 30 kDa und 40 kDa ist aber nur bei drei der getesteten Zelllysate gleich stark ausgeprägt, während das betreffende Protein in den in der stationären Wachstumsphase geernteten Zellen anscheinend deutlich schwächer expremiert war (vgl. dunkelblaue Pfeile). Das betreffende Protein konnte später als die Protein-MTase PrmB identifiziert werden, welche Gln 150 des ribosomalen L3-Proteins in der 50S Untereinheit methyliert (Colson *et al.*, 1979). Es macht durchaus Sinn, dass die Expression einer Ribosomen-MTase in der stationären Phase abnimmt, da die Zellen dann auch kaum noch neue Ribosomen produzieren.

Eine andere Bande zwischen 70 kDa und 85 kDa ist bei *E. coli* BL21 besonders stark ausgeprägt, während das entsprechende Protein bei *E. coli* DH5 α deutlich schwächer, bzw. in der stationären Wachstumsphase fast gar nicht expremiert wurde (vgl. hellblaue Pfeile).

Auch bei den unspezifisch eingefangenen Proteinen sind Unterschiede zu beobachten. Auffallend ist, dass aus den Zellen in der stationären Wachstumsphase besonders viele Proteine unspezifisch eingefangen wurden (Spur 5). Dies könnte damit zu erklären sein, dass in den eingesetzten Zelllysaten sehr viele Proteine bereits denaturiert vorlagen. Die verwendeten Zellen stammten aus einer ca. 20 h lang gewachsenen und sehr dichten Übernacht-Kultur und waren eventuell schon teilweise abgestorben. Unter diesen Bedingungen würde die gemachte Beobachtung zu der Annahme passen, dass zumindest ein Teil der unspezifischen Nebenreaktionen auf das Vorhandensein von Proteinen mit defekter Tertiärstruktur zurückzuführen ist.

Das Experiment hat gezeigt, dass durch Isolieren funktioneller Subproteome mit trifunktionellen Fangverbindungen auch Informationen über das Expressionslevel der betreffenden Proteine gewonnen werden können. Eine absolute Quantifizierung ist dabei nicht möglich. Differenzen zwischen den Expressionsleveln der Proteine unterschiedlicher Proben sind aber sehr gut feststellbar. Diese Möglichkeit könnte in Zukunft besonders bei der Erforschung regulatorischer Vorgänge oder in der medizinischen Diagnostik sehr nützlich sein.

3.4.13 Fortschritte bei der Analyse des Methyloms von *E. coli*

Das ungefähr 4400 Proteine umfassende Proteom von *E. coli* K12 beinhaltet nach derzeitigem Wissensstand 45 nachgewiesene MTasen. Bei 16 weiteren Proteinen handelt es sich aufgrund von Sequenzhomologien sehr wahrscheinlich ebenfalls um MTasen, ein biochemischer Beweis steht aber noch aus (Brian Anton, persönliche Mitteilung). Neben diesen MTasen gibt es noch ein Protein, welches am SAH-Abbau beteiligt ist und deshalb ebenfalls SAH binden sollte. Somit beläuft sich die Anzahl der Proteine, die mit trifunktionellen SAH-Fangverbindungen aus *E. coli*-Zelllysate theoretisch eingefangen werden können auf mindestens 62 – vorausgesetzt jedes der Proteine wird auch expremiert. Zumindest auf Transkriptionsebene konnte aber nachgewiesen werden, dass 97 % der bei *E. coli* bekannten offenen Leseraster auch transkribiert werden (Selinger *et al.*, 2000).

Nach dem Einfangen von Proteinen mit Fangverbindungen oder Fangpartikeln erfolgte im Zuge dieser Arbeit in der Regel eine Analyse der Proben durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. Diese Analytik liefert lediglich Information über das ungefähre Molekulargewicht und die ungefähre Menge der eingefangenen Proteine. Ein Vergleich mit einem Kontrollansatz gibt außerdem Auskunft darüber, ob das der betreffenden Gelbande zugrundeliegende Protein spezifisch an die Selektivitätsfunktion SAH binden kann. Eine Zuordnung der betreffenden Gelbande zu einem bestimmten Protein ist aber nicht möglich.

Durch 2DE (oft auch als 2D-PAGE bezeichnet) könnte eine solche Zuordnung bedingt möglich sein, wenn das betreffende Protein in einer 2DE Datenbank erfasst ist (Appel *et al.*, 1996). Allerdings ist die 2DE teilweise schwer reproduzierbar und eine genaue Zuordnung bestimmter Spots nicht immer möglich. Auch ermöglicht dies nicht eine Identifizierung unbekannter Proteine.

Durch die Kupplung elektrophoretischer und massenspektrometrischer Verfahren ist auch die Identifizierung völlig unbekannter Proteine möglich (Henzel *et al.*, 1993). Aus einigen der im Zuge dieser Arbeit zur Analyse der Proben verwendeten SDS-Gele wurden nach der photographischen Dokumentation einige Banden ausgeschnitten und zur weiteren Analyse an unterschiedliche Kooperationspartner verschickt. Nach dem Extrahieren der Proteine aus den Gelstücken und tryptischer Fragmentierung erfolgte eine Analyse durch MALDI-MS/MS (durchgeführt von Eckhard Nordhoff, Ruhr-Universität Bochum) oder LC-ESI-MS/MS (durchgeführt von Olivia Baesler und Mirko Glinski, caprotecTM bioanalytics GmbH, Berlin). Hierdurch konnten einige der in vielen Gelen sichtbaren Banden bestimmten Proteinen zugeordnet werden.

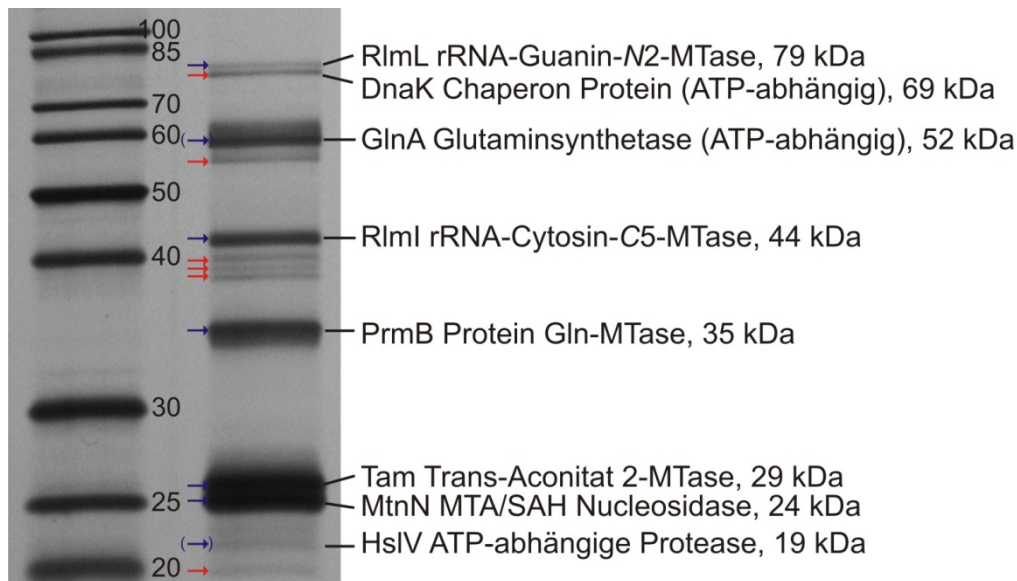


Abb. 65: Typisches Bandenmuster beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* DH5 α mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einem 15 %igen SDS-PAA-Gel. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Silberfärbung. Die Identifizierung der aufgeführten Proteine erfolgte nicht aus dem hier abgebildeten Gel, sondern aus mehreren hier nicht weiter aufgeführten Gelen. Dazu wurden die Banden ausgeschnitten, die Proteine herausgewaschen und nach tryptischer Fragmentierung durch unterschiedliche massenspektrometrische Verfahren identifiziert. Banden, die nach einer visuellen Auswertung einer Vielzahl anderer Gele als spezifisch eingeordnet werden können, sind mit blauen Pfeilen markiert, unspezifische Banden mit roten Pfeilen.

In Abb. 65 sind die Ergebnisse zusammengefasst, die bislang durch massenspektrometrische Analyse ausgeschnittener Gelbanden erzielt werden konnten.

Bei den so identifizierten Proteinen handelt es sich um die Proteine, welche bei den meisten der durchgeführten Experimente in verhältnismäßig großen Mengen isoliert werden konnten und nach erfolgter Gelelektrophorese ein charakteristisches Bandenmuster ergeben.

Von besonders hohem Wiedererkennungswert ist eine deutliche Doppelbande auf Höhe der 25 kDa Markerbande. Hierbei handelt es sich um die 24 kDa große MTA/SAH Nucleosidase (MtnN, Cornell und Riscoe, 1998) und die 29 kDa große Trans-Aconitat 2-MTase (Tam, Cai und Clarke, 1999). Die MTA/SAH Nucleosidase bindet an SAH, da sie an dessen Abbau beteiligt ist.

Darüber befindet sich die Bande der 35 kDa großen Protein-MTase PrmB, welche Gln150 des Proteins L3 der ribosomalen 50S Untereinheit methyliert (Heurgué-Hamard *et al.*, 2002).

Etwas oberhalb der 40 kDa Markerbande ist die 44 kDa große rRNA-Cytosin-C5-MTase RlmI zu erkennen, die C1962 in der 23S rRNA methyliert. Als dieses Protein im Juli 2007 nach dem Einfangen mit der Fangverbindung B1-N6-SAH zum ersten Mal massenspektrometrisch identifiziert wurde, war es in den Proteindatenbanken noch als YccW

aufgeführt und seine MTase-Aktivität wurde lediglich aufgrund von Sequenzhomologien vermutet. Seine Funktion wurde mittlerweile aufgeklärt (Purta *et al.*, 2008).

Oberhalb dieser Bande ist bei ca. 60 kDa eine Bande zu erkennen, die bei den meisten Experimenten als relativ spezifisch eingestuft werden musste, jedoch bei Kontrollexperimenten in Gegenwart des Kompetitors SAH häufig ebenfalls eingefangen werden konnte. Dies geschah allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als in dem entsprechenden Ansatz ohne Kompetitor. In Kontrollansätzen, die unter Verwendung des entsprechenden Fangverbindungsgrundgerüsts durchgeführt wurden, wurde dieses Protein praktisch gar nicht eingefangen. Zudem konnte festgestellt werden, dass dieses Protein in Gegenwart millimolarer Konzentrationen von ATP ebenfalls nicht mehr eingefangen wird. Das betreffende Protein konnte als Glutaminsynthetase identifiziert werden (GlnA, Heinrikson und Kingdon, 1971). Die oben beschriebenen Beobachtungen können alle damit erklärt werden, dass die Glutaminsynthetase neben ATP auch SAH bindet, da beide Verbindungen einen Adenosylrest aufweisen. In Abschnitt 3.4.5 konnte gezeigt werden, dass die Glutaminsynthetase mit B2-N6-SAH-Fangpartikeln nur dann gut eingefangen werden kann, wenn die anderen spezifisch bindenden Proteine nicht die Kapazitätsgrenze der Fangpartikel überschreiten (vgl. Abb. 51). Neben der Glutaminsynthetase konnte noch zwei weitere ATP-abhängige Proteine eingefangen werden, die 19 kDa große Protease HslV (Bochtler *et al.*, 2000) und das 69 kDa große Chaperon Protein DnaK, welches auch als Hsp70 bekannt ist (Pellecchia *et al.*, 2000).

Eine weitere Bande konnte als die 79 kDa große rRNA-Guanin-N2-MTase RlmL identifiziert werden, welche G2445 in der 23S rRNA methyliert (Lesnyak *et al.*, 2006). Die betreffende Bande trat jedoch immer nur sehr schwach auf.

Durch massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen aus ausgeschnittenen Gelbanden konnten somit fünf spezifisch an die Selektivitätsfunktion SAH bindende Proteine identifiziert werden. Das sind aber nur 8 % der theoretisch zu erwartenden Proteine (62). Ein Grund hierfür besteht in der relativ geringen Empfindlichkeit der angewandten Analytik, die besonders dadurch bedingt ist, dass eine massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen, nach vorangegangener gelelektrophoretischer Trennung mit nachfolgender Silberfärbung sehr erschwert ist. Diese Vorgehensweise hat außerdem den Nachteil, dass die für die Massenspektrometrie erforderliche Aufarbeitung der Proben sehr aufwendig ist und dass immer nur ein einzelnes Protein untersucht werden kann. Deshalb ist solchen Vorgehensweisen Vorzug zu geben, bei denen die Gesamtheit der isolierten Proteine ohne vorherige gelelektrophoretische Trennung analysiert wird. Dank der großen Fortschritte im

Bereich massenspektrometrischer Analytik komplexer Proteingemische ist dies mittlerweile durchaus möglich (z.B. Corbin *et al.*, 2003).

Tab. 3: Methylohm von *E. coli* (+ MTA/SAH Nucleosidase). Proteine, die durch die CCMS Technologie identifiziert wurden, sind grün hinterlegt. Die letzten 16 aufgeführten Proteine sind bislang noch nicht eindeutig als MTasen identifiziert, gelten aber aufgrund von Sequenzhomologien als mutmaßliche MTasen. In der Tabelle werden folgende Abkürzungen benutzt: cmo5U: 5-Carboxymethoxyuridin, ho5U: 5-Hydroxyuridin, mnm5s2U: 5-Methylaminomethyl-2-thiouridin, cmnm5s2U: 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, mo5U: 5-Methoxyuridin, DMKH2: Demethyl Menaquinon, MTA: 5'-Methylthioadenosin, DDMQH2: 2-Polyprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol, DMQH2: 2-Polyprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol, DHHB: 3,4-Dihydroxy-5-hexaprenyl-benzoat, m1G: N1-Methylguanosin, Gm: Methylguanosin (methyliert am Ribosylteil), Cm: Methylcytosin (methyliert am Ribosylteil), m5U: C5-Methyluridin, m3U: N3-Methyluridin, Um: Methyluridin (methyliert am Ribosylteil), m6A: N6-Methyladenosin, m2G: N2-Methylguanosin, m3Ψ: N3-Methylpseudouridin, m5C: C5-Methylcytosin, m2A: C2-Methyladenosin, m7G: N7-Methylguanosin, m4C: N4-Methylcytosin, Hcy: L-Homocystein.

Nr.	Name	Gen	Substrat / Produkt	Funktion bzw. vermutete Funktion	Literatur
1	Dam	b3387	DNA (m6A)	methyliert GA*TC (A* in N6 Position), Steuerung der DNA Replikation und Reparatur	Geier & Modrich, 1979
2	Dcm	b1961	DNA (m5C)	methyliert CC*WGG (C* C5 Position), beteiligt an Steuerung der DNA Reparatur	Bhagwat <i>et al.</i> , 1986
3	HsdM	b4349	DNA (m6A)	MTaseinheit des R-M Komplexes EcoKI	Sain und Murray, 1980
4	YhdJ	b3262	DNA (m6A)	mutmaßliche DNA (m6A) MTase, analog zu	Broadbent <i>et al.</i> , 2007
5	CheR	b1884	Protein (Glu)	methyliert MCPs (<i>methyl accepting chemotaxis prot.</i>), ermöglicht Adaption bei Chemotaxis	Springer & Cosland, 1977
6	Pcm	b2743	Protein (isoAsp)	L-Isoaspartylreste beschädigter Proteine an der Carboxylgruppe	Fu <i>et al.</i> , 1999
7	PrmA	b3259	Protein (Lys, Ala)	Trimethylierung von Ala1, Lys3 und Lys39 des Proteins L11 (50S Untereinheit, Ribosom)	Vanet <i>et al.</i> , 1994
8	PrmB	b2330	Protein (Gln)	Methylierung von Gln150 des Proteins L3 (50S Untereinheit, Ribosom)	Colson <i>et al.</i> , 1979
9	PrmC	b1212	Protein (Gln)	Methylierung der ribosomalen Terminierungsfaktoren RF1 (Gln235) und RF2 (Gln252)	Heurgue-Hamard <i>et al.</i> , 2002
10	HoD	b3335	Peptide	spaltet bestimmte Leaderpeptide ab und methyliert sie N-terminal	Whitchurch & Mattick, 1994
11	CmoA	b1870	tRNA (cmo5U)	methyliert 5-Carboxymethoxyuridin (cmo5U) oder 5-Methoxyuridin (mo5U) in tRNA (U34)	Lim <i>et al.</i> , 2001
12	CmoB	b1871	tRNA (mo5U)	methyliert 5-Hydroxyuridin (ho5U) zu 5-Methoxyuridin (mo5U) in tRNA (U34)	Nasvall <i>et al.</i> , 2004
13	MnmC	b2324	tRNA (mnm5s2U)	Synthese von 5-Methylaminomethyl-2-thiouridin (mnm5s2U) in tRNA, MTase und Reduktase	Bujnicki <i>et al.</i> , 2004
14	RlmA	b1822	rRNA (m1G)	methyliert 23S rRNA G745 in N1-Position	Gustafsson & Persson 1998
15	RlmB	b4180	rRNA (Gm)	methyliert 23S rRNA G2251 mehrfach an der Riboseinheit	Michel <i>et al.</i> , 2002
16	RumB	b0859	rRNA (m5U)	methyliert 23S rRNA U747 in C5-Position	Madsen <i>et al.</i> , 2003
17	RumA	b2785	rRNA (m5U)	methyliert 23S rRNA U1939 in C5-Position	Lee <i>et al.</i> , 2004
18	RrmJ	b3179	rRNA (Um)	methyliert 23S rRNA U2552 in an der Riboseinheit (in 2'Position)	Caldas <i>et al.</i> , 2000
19	RlmF	b0807	rRNA (m6A)	methyliert 23S rRNA A1618 in N6-Position	Sergiev <i>et al.</i> , 2008
20	RlmG	b3084	rRNA (m2G)	methyliert 23S rRNA G1835 in N2-Position	Sergiev <i>et al.</i> , 2006
21	RlmH	b0636	rRNA (m3Ψ)	methyliert 23S rRNA Ψ1915 in N3-Position	Purta <i>et al.</i> , 2008
22	RlmI	b0967	rRNA (m5C)	methyliert 23S rRNA C1962 in C5-Position	Purta <i>et al.</i> , 2008
23	RlmL	b0948	rRNA (m2G)	methyliert 23S rRNA G2445 in N2-Position	Lesnyak <i>et al.</i> , 2006
24	RsmA	b0051	rRNA (m6A, m2A)	methyliert 16S rRNA A1518 und A1519 in N6-Position und C2-Position	O'Farrell <i>et al.</i> , 2004
25	RsmB	b3289	rRNA (m5C)	methyliert 16S rRNA C967 in C5-Position	Gu <i>et al.</i> , 1999
26	RsmC	b4371	rRNA (m2G)	methyliert 16S rRNA G1207 in N2-Position	Tscherne <i>et al.</i> , 1999
27	RsmD	b3465	rRNA (m2G)	methyliert 16S rRNA G966 in N2-Position	Lesnyak <i>et al.</i> , 2007
28	RsmE	b2946	rRNA (m3U)	methyliert 16S rRNA U1498 in N3-Position	Basturea <i>et al.</i> , 2006
29	RsmF	b1835	rRNA (m5C)	methyliert 16S rRNA C1407 in C5-Position	Andersen & Douthwaite, 2006
30	RsmH	b0082	rRNA (m4C)	methyliert 16S rRNA C1402 in N4-Position	Carroll <i>et al.</i> , 1999
31	RsmL	b3146	rRNA (Cm)	methyliert 16S rRNA C1402 an der Riboseinheit (in 2'Position)	Kimura & Suzuki, 2001
32	RsmG	b3740	rRNA (m7G)	methyliert 16S rRNA G527 in N7-Position	Romanowski <i>et al.</i> , 2002
33	TrmA	b3965	tRNA (m5U)	methyliert U54 in allen tRNAs in C5-Position	Gu <i>et al.</i> , 1994
34	TrmB	b2960	tRNA (m7G)	methyliert G46 mindestens bei Met tRNAs in N7-Position	De Bie <i>et al.</i> , 2002
35	TrmD	b2607	tRNA (m1G)	methyliert G37 bei Leu tRNA in N1-Position	Elkins <i>et al.</i> , 2003
36	TrmH	b3651	tRNA (Gm)	methyliert G18 zu 2'-O-Methylguanosin (2'Positio an der Riboseinheit) bei versch. tRNAs	Persson <i>et al.</i> , 1997
37	TrmJ	b2532	tRNA (Gm)	methyliert bei Ser1 tRNA C32 und bei Gln2 tRNA U32 an der Riboseinheit (in 2'Position)	Purta <i>et al.</i> , 2006
38	Cfa	b1661	unges. Fettsäuren	Bildung von Zyklopropangruppen aus Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren	Iwig <i>et al.</i> , 2004
39	CysG	b3368	Uroporphyrin III	methyliert Uroporphyrin III an C2 und C7, hat Dehydrogenase- und Ferrochelataseaktivität	Warren <i>et al.</i> , 1994
40	MetH	b4019	Homocystein	methyliert Hcy zu Met (Kofaktoren Methyl-cobalamin und Methyltetrahydrofolat)	Goulding <i>et al.</i> , 1997
41	MmuM	b0261	Homocystein	methyliert Hcy zu Met (SAM oder S-Methylmethionin als Kofaktor)	Thanbichler <i>et al.</i> , 1999
42	Tam	b1519	trans-Aconitat	methyliert trans-Aconitat zu (E)-3-(Methoxycarbonyl)pent-2-enedioat	Cai & Clarke, 1999
43	UbiE	b3833	DMKH2, DDMQH2	methyliert DMKH2 zu Menaquinon und DDMQH2 zu DMQH2	Lee <i>et al.</i> , 1997
44	UbiG	b2232	DHBB	methyliert 3-Demethylubiquinol-9 (DHBB) zu Ubiquinol-9	Leppik <i>et al.</i> , 1976
45	MtnN	b0159	SAH / MTA	5'-Methylthioadenosin/SAH Nucleosidase, keine MTase aber bindet SAH	Della Ragione <i>et al.</i> , 1985
46	YfiF	b2581	RNA (Ribose) ?	mutmaßliche 2'-O-Ribose MTase für RNA (Ähnlichkeit zu RlmB und TrmH)	Butland <i>et al.</i> , 2005
47	YgdE	b2806	RNA an Ribose ?	mutmaßliche 2'-O-Ribose MTase für RNA (Ähnlichkeit zu RrmJ)	Bujnicki & Rychlewski, 2000
48	YibK	b3606	RNA an Ribose ?	mutmaßliche 2'-O-Ribose MTase für RNA (Ähnlichkeit zu TrmH)	Koonin & Rudd, 1993
49	YjtD	b4403	RNA an Ribose ?	mutmaßliche 2'-O-Ribose MTase für RNA (Ähnlichkeit zu TrmH)	Burland <i>et al.</i> , 1995
50	PppA	b2972	Protein ?	vermutlich Leaderpeptidase mit MTaseaktivität, ähnelt PilD aus <i>Vibrio spec.</i>	Francetic <i>et al.</i> , 1998
51	BioC	b0777	?	beteiligt an Biotinsynthese	
52	TehB	b1430	?	vermittelt Tellurresistenz, zeigt Sequenzhomologie zu MTasen, bindet SAM	Liu <i>et al.</i> , 2000
53	SmtA	b0921	?	ähnelt UbiG	Yamanake <i>et al.</i> , 1995
54	YafE	b0210	(?)	ähnelt UbiE	
55	YafS	b0213	(?)	ähnelt UbiE	
56	YbcY	b0562	(?)	leichte Ähnlichkeit zu O-MTasen	
57	YfiC	b2575	(?)	leichte Ähnlichkeit zu RsmC	
58	YhiQ	b3497	(?)	Sequenz und Kristallstruktur weisen auf eine MTase hin	Forouhar <i>et al.</i> , pdb 2PGX
59	YhiR	b3499	(?)	weist deutlich N6A MTasen Motive I und IV auf, könnte an DNA-Katabolismus beteiligt sein	Finkel & Kolter, 2001
60	YjhP	b4306	(?)	Kristallstruktur weist auf eine MTase hin	Kuzin <i>et al.</i> , pdb 1NKV
61	YmfD	b1137	(?)	mutmaßliche MTase aufgrund konservierter Motive	
62	YnbC	b1410	(?)	mutmaßliche MTase aufgrund von Sequenzhomologien	

Von der caprotec™ bioanalytics GmbH wurden verschiedene Proben der mit SAH-Fangverbindungen eingefangenen Proteine aus *E. coli* nach tryptischer Fragmentierung massenspektrometrisch analysiert. Die tryptische Fragmentierung erfolgte dabei entweder direkt bei den auf den Magnetpartikeln immobilisierten Proteinen oder nach vorheriger Elution der Proteine von den Magnetpartikeln (mit Wasser/Acetonitril/TFA 69/30/1 (v/v)). Da bei dieser Vorgehensweise im Gegensatz zu gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben ein verhältnismäßig komplexes Proteingemisch analysiert wird, werden solche Proben als „Komplexproben“ bezeichnet.

Tab. 3 gibt einen Überblick über die theoretisch zu erwartenden und über die mittlerweile mit Hilfe von SAH-Fangverbindungen und anschließender MS-Analytik identifizierten SAH-bindenden Proteine. Diejenigen Proteine, die spezifisch eingefangen und nachgewiesen werden konnten, sind grün hinterlegt. Insgesamt wurden 29 der theoretisch zu erwartenden 62 Proteine nachgewiesen.

Um nun die Möglichkeiten, sowie die Vor- und Nachteile der neuen, auf trifunktionellen Fangverbindungen beruhenden Methode zur Proteomanalyse abschätzen zu können, ist ein Vergleich mit anderen aktuellen Verfahren nötig. Der bislang aufwendigste Ansatz zur Erfassung des *E. coli* Proteoms basierte auf einer Kombination aus unterschiedlichen Protein- und Peptidfraktionierungsmethoden, gefolgt von LC-MS/MS Analytik (Ishihama *et al.*, 2008). Unter den 1103 dabei identifizierten Proteine befanden sich auch 22 der in Tab. 3 aufgeführten MTasen und die MTA/SAH Nucleosidase. 15 dieser Proteine konnten mit auch Hilfe von SAH-Fangverbindungen isoliert werden. Darüber hinaus wurden mit SAH-Fangverbindungen aber noch 14 weitere MTasen eingefangen, die bei dem Gesamtproteomansatz nicht erfasst wurden. Dies verdeutlicht den Vorteil der Anreicherung funktioneller Subproteome mit Hilfe der Fangverbindungen.

Ein weiterer Ansatz zur möglichst umfassenden Identifizierung des *E. coli* Proteoms beruht auf einer Kombination von 2D-Gelelektrophorese und anschließender MS-Analytik. Eine Zuordnung zwischen bestimmten *spots* auf einem 2D-Gel und dem daraus identifizierten Protein ist mittlerweile unterschiedlichen Datenbanken zu entnehmen (z.B. SWISS-2D-PAGE). Eine gute Zusammenfassung aller auf diese Weise identifizierten Proteine aus *E. coli* wurde von Han und Lee 2006 veröffentlicht. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung umfasste die Liste 714 Proteine, inklusive elf MTasen und die MTA/SAH Nucleosidase. Zehn dieser Proteine konnten mit Hilfe der SAH-Fangverbindungen ebenfalls isoliert werden.

Da die zwei oben aufgeführten Verfahren zur Erfassung des *E. coli* Proteoms sehr aufwendig sind, wird ebenfalls versucht Proteine aus nicht weiter fraktionierten Zelllysaten mittels LC-

MS-Analytik nachzuweisen. Mit dieser als „Schrotschuss-Verfahren“ bezeichneten Vorgehensweise können mittlerweile immerhin vier MTasen aus unfractioniertem Zelllysat von *E. coli* nachgewiesen werden (Lu *et al.*, 2007).

Ein Vergleich zwischen den drei aufgeführten Ansätzen und der auf trifunktionellen Fangverbindungen beruhenden Methodik ist natürlich nur begrenzt möglich, da mit Fangverbindungen funktionelle Subproteome isoliert werden können, während die oben genannten Methoden die Analyse des ganzen Proteoms zum Ziel haben. Mit trifunktionellen Fangverbindungen kann immer nur ein bestimmter Ausschnitt des Proteoms untersucht werden. Dieser scheinbare Nachteil stellt für sehr viele Anwendungen jedoch einen unschätzbaren Vorteil dar, da diese Reduktion auf ein Subproteom mit einem Erkenntnisgewinn um die Funktion der betreffenden Proteine einhergeht.

Betrachtet man die Isolierung des Methyloms von *E. coli* als Primärziel, so erweist sich die Kombination aus trifunktioneller Fangverbindung und MS-Analytik als die erfolgreichste Technologie. Mit ihr konnten von den 62 potentiellen Zielproteinen 29 nachgewiesen werden, während mit eine Kombination aus unterschiedlichen Protein- und Peptidfraktionierungsmethoden, gefolgt von LC-MS/MS Analytik nur 23 nachgewiesen wurden, durch die Analyse von *spots* aus 2D-Gelen zwölf und mit der Schrotschussmethode nur vier. Als ein weiterer großer Vorteil erweist sich der geringe materielle Aufwand, da die mit Fangverbindungen isolierten Proteine ähnlich wie bei der Schrotschussmethode mit nur wenigen MS-Messungen analysiert werden können, während bei den zwei anderen Vorgehensweisen hunderte Messungen nötig sind. Sehr wertvoll ist außerdem die Information, dass die eingefangenen Proteine die Selektivitätsfunktion der verwendeten Fangverbindung tatsächlich spezifisch binden. Unter den mit SAH-Fangverbindungen isolierten Proteinen befinden sich auch fünf, bei denen eine MTase-Aktivität bislang lediglich vermutet wird. Die Tatsache, dass diese Proteine spezifisch an SAH binden macht eine MTasen-Aktivität nun sehr wahrscheinlich.

3.5 Eukaryontische Zelllysate

Mittels trifunktioneller Fangverbindungen mit der Selektivitätsfunktion SAH ist es gelungen aus Zelllysaten von *E. coli* nahezu die Hälfte des Methyloms zu isolieren. Verglichen mit *E. coli* stellt die Untersuchung eukaryontischer Proteome jedoch eine erheblich größere Herausforderung dar. In einigen Fällen hat dies rein praktische Gründe. So ist es z.B. sehr aufwendig an eine brauchbare Menge von Nervengewebe aus *Drosophila melanogaster* zu gelangen, während *E. coli* ohne größeren Aufwand im kg-Maßstab kultiviert werden kann.

Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass eukaryontische Zellen deutlich stärker kompartimentiert sind und dass viele Proteine membranassoziiert, membrangebunden oder gar als Transmembranproteine vorliegen. Membranen bilden z.B. den Zellkern, das endoplasmatische Reticulum, die Mitochondrien und bei Pflanzen zusätzlich Chloroplasten und Vakuolen. Hinzu kommen noch verschiedene visikuläre Systeme, wie z.B. Golgi-Apparat, Lysosomen etc..

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Proteomen von Prokaryonten und Eukaryonten betrifft deren Komplexität. Besteht das Proteom von *E. coli* aus ca. 4400 unterschiedlichen Proteinen, so umfasst das menschliche Proteom mindestens 20 000 Proteine (Clamp *et al.*, 2007) und ist damit ungefähr fünfmal komplexer als das Proteom von *E. coli*. Da viele Proteine in unterschiedlichen Spleißvarianten vorliegen können, ist der Unterschied vermutlich sogar noch deutlich größer. Dies hat nicht nur zur Folge, dass innerhalb einer bestimmten Klasse von Proteinen bei Eukaryonten mit deutlich mehr Vertretern zu rechnen ist als bei Prokaryonten, sondern dass für ein Experiment auch eine deutlich höhere Menge an Ausgangsmaterial veranschlagt werden muss, damit von den einzelnen Proteinen eine hinreichende Stoffmenge eingesetzt wird.

Bei *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der kodierenden Gene auch transkribiert wird (Selinger *et al.*, 2000). Bei höheren Organismen mit differenzierten Geweben kann natürlich nicht mit einer zeitgleichen Transkription aller Gene gerechnet werden.

Im Folgenden soll gezeigt werden, dass der Einsatz trifunktioneller Fangverbindungen zur Isolierung funktioneller Subproteome auch bei eukaryontischen Zelllysaten durchaus möglich ist, welche Probleme dabei entstehen können und welche Lösungsansätze sich für diese Probleme anbieten. Als Modellorganismen für Experimente mit Zelllysaten von Eukaryonten dienen *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), *Glycine max* (Soja), *Nicotiana tabacum* (Tabak) und *Sus scrofa domestica* (Hausschwein).

3.5.1 Einfluss des verwendeten Puffers auf die Spezifität beim Einfangen pflanzlicher Subproteome mit Fangpartikeln

Bereits beim Einfangen des Methyloms von *E. coli* hatte sich gezeigt, dass die Pufferbedingungen einen wichtigen Einfluss auf Ausbeute und Spezifität haben. Diese Beobachtung wurde sogar noch ausgeprägter mit eukaryontischen Zelllysaten gemacht. Die folgenden drei Gele fassen einige der wichtigsten dabei gemachten Beobachtungen zusammen.

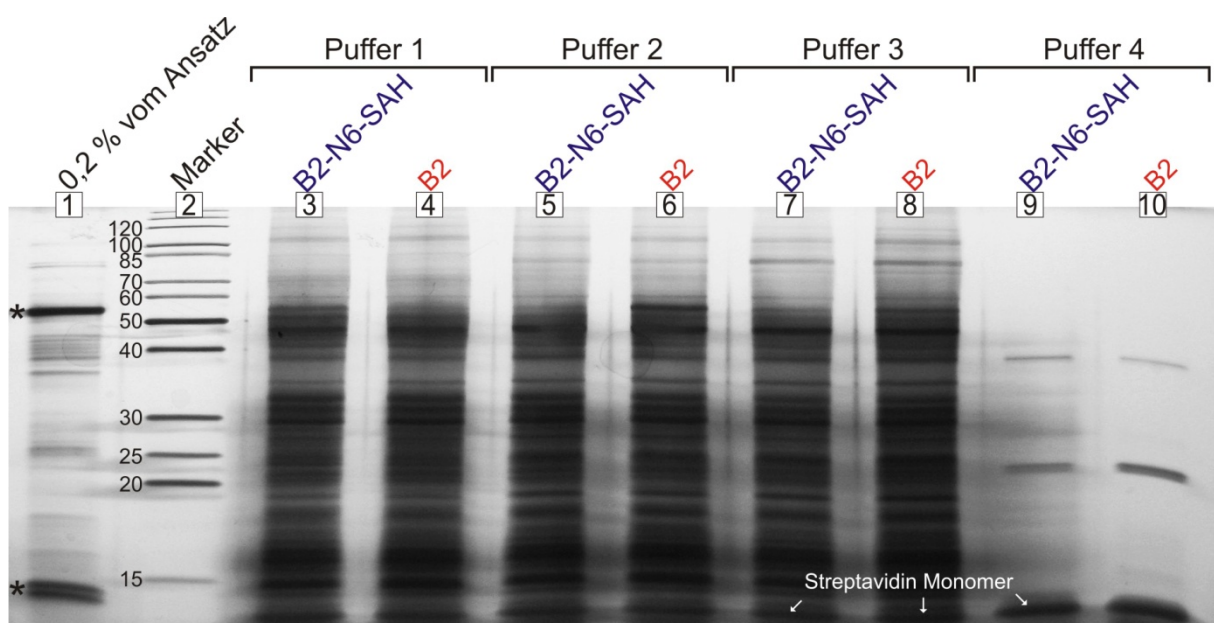


Abb. 66: Einfangen des Methyloms von *A. thaliana* mit B2-N6-SAH-Fangpartikeln bei unterschiedlichen Pufferbedingungen. Alle Ansätze enthielten 200 µg B2-N6-SAH-Fangpartikel (bzw. B2-Fangpartikel bei den Kontrollansätzen), hatten ein Volumen von 100 µl und einen Proteingehalt von ca. 2,5 mg/ml (grob geschätzt auf Grundlage von Erfahrungswerten aus anderen Experimenten). Die eingesetzten Zelllysate wurde jeweils frisch unter Verwendung der verschiedenen Puffer hergestellt (vgl. Kapitel Material und Methoden). Alle Ansätze wurden 1 h vorinkubiert und 25mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Folgende Puffer wurden verwendet: Puffer 1: HEPES (50 mM), EDTA (5 mM), EGTA (5 mM), Na-Ascorbat (10 mM), Glycerin (20 %), pH 7,5; Puffer 2: HEPES (10 mM), Na-Acetat (10 mM), MES (10 mM), EDTA (5 mM), EGTA (5 mM), Na-Ascorbat (10 mM), Glycerin (20 %), pH 7,5; Puffer 3: HEPES (10 mM), Na-Acetat (10 mM), MES (10 mM), EDTA (5 mM), EGTA (5 mM), Na-Ascorbat (10 mM), Glycerin (10 %), pH 7,5; Puffer 4: HEPES (10 mM), Na-Acetat (10 mM), MES (10 mM), MgCl₂ (10 mM), Na-Ascorbat (10 mM), Glycerin (10 %), pH 7,5. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Die wichtigste Erkenntnis betrifft dabei die Bedeutung von Mg²⁺ im Puffer. Das Gel in Abb. 66 ist das Resultat eines Experiments, bei dem mehrere unterschiedliche Puffer beim Einfangen des Methyloms von *A. thaliana* verwendet wurden. Jedoch enthielt nur einer dieser

Puffer freie Mg^{2+} Ionen. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit den Puffern 1, 2 und 3 und B2-N6-SAH-Fangpartikeln bzw. B2-Fangpartikeln eine sehr große Menge Protein unspezifisch eingefangen wurde (Spuren 3 bis 8). Vergleicht man das Bandenmuster dieser unspezifisch eingefangenen Proteine mit dem Bandenmuster des eingesetzten Zelllysats (Spur 1), so fällt auf, dass die Menge der unspezifisch eingefangenen Proteine nicht mit deren Häufigkeit im Zelllysats korreliert. Die mit Sternchen markierten Proteine sind vermutlich die große (55 kDa) und die kleine (14 kDa) Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase (Rubisco, Andrews und Lorimer, 1987). Dieses Enzym besteht in seiner aktiven Form aus acht großen und acht kleinen Untereinheiten und katalysiert bei der Photosynthese den CO_2 -Fixierungsschritt; die Übertragung von CO_2 auf Ribulose-1,5-bisphosphat. In photosynthetisch aktivem Pflanzengewebe macht dieses Enzym oft einen Großteil der Trockenmasse aus. Trotzdem tritt die entsprechende Proteinbande bei den großen Mengen unspezifisch eingefangenen Proteins nur verhältnismäßig schwach auf.

Alle getesteten Puffer enthalten relativ wenig Salze (50 – 70 mM), zwischen 10 und 20 % Glycerin und haben einen pH Wert von 7,5. Da die getesteten Puffer sich sehr ähneln ist es zunächst verwunderlich, dass mit Puffer 4 kaum Proteine unspezifisch eingefangen wurden. (Spuren 9 und 10). Im Unterschied zu Puffer 3 enthält Puffer 4 keine Chelatliganden, dafür jedoch 10 mM $MgCl_2$. Bei Verwendung von Fangpartikeln in pflanzlichen Zelllysaten ist die Verfügbarkeit von freiem Mg^{2+} also von besonderer Wichtigkeit, wie die vorliegenden Ergebnisse deutlich zeigen.

Allerdings ist die Reduktion unspezifischer Nebenreaktionen nur eine der Herausforderungen, die sich beim Isolieren funktioneller Subproteome stellen. Hauptziel ist es Proteine spezifisch einzufangen, was in diesem Experiment nicht gelungen ist. Der Grund hierfür könnte die relativ kleine Menge an pflanzlichem Zelllysats sein, die für dieses Experiment eingesetzt wurde. Das Proteom von *A. thaliana* umfasst ca. 25 500 Proteine (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) und ist damit fast sechsmal komplexer als das Proteom von *E. coli*. Folglich sollte die eingesetzte Proteinmenge auch sechsmal größer sein als bei vergleichbaren Experimenten mit *E. coli*-Zelllysats.

Für die im Folgenden aufgeführten Experimente wurden deutlich größere Mengen Zelllysats eingesetzt und die verwendeten Puffer enthielten keine Chelatliganden, sondern Mg^{2+} .

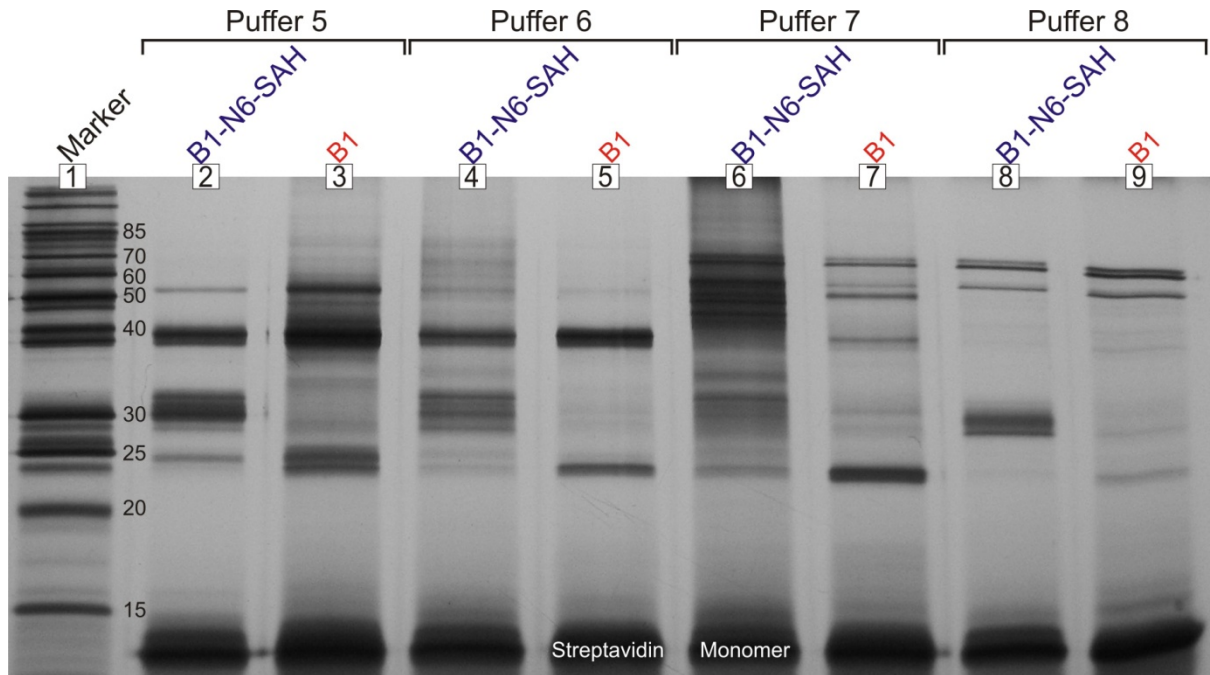


Abb. 67: Einfangen des Methyloms von *A. thaliana* mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln bei unterschiedlichen Pufferbedingungen. Alle Ansätze enthielten 200 µg B1-N6-SAH-Fangpartikel (bzw. B1-Fangpartikel bei den Kontrollansätzen) und hatten ein Volumen von 300 µl. Folgende Puffer wurden verwendet: Puffer 5: HEPES (20 mM), KOAc (50 mM), MgCl₂ (10 mM) Glycerin 10 %, pH 7,9 ; Puffer 6: MES (10 mM), NaOAc (10 mM), HEPES (10 mM), MgCl₂ (10 mM), KOAc (10 mM), NaCl (3,8 mM), PMSF (0,1 mM) CHAPS (0,25 %) Glycerin (10 %) pH 7,9; Puffer 7: MES (10 mM), NaOAc (10 mM), HEPES (10 mM), MgCl₂ (10 mM), NaCl (150 mM), CHAPS (0,25 %), Glycerin (10 %) pH 7,5; Puffer 8: MES (10 mM), NaOAc (10 mM), HEPES (10 mM), MgOAc (10 mM), β-Mercaptoethanol (10 mM), NaCl (200 mM), PMSF (0,2 mM), Glycerin (10 %), pH 7,5. Die Zelllysate wurden mit unterschiedlichen Puffern aus 1 g tiefgefrorenem Pflanzenmaterial pro Ansatz frisch hergestellt und hatten eine Proteinkonzentration von ca. 10 mg/ml. Alle Proben wurden 16 h vorinkubiert und 30mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Abb. 67 zeigt das Ergebnis eines Experiments, bei dem vier weitere Puffer für das Herstellen von *A. thaliana* Zelllysaten und das anschließende Isolieren des Methyloms mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln verwendet wurden. Bei diesem Experiment wurden im Vergleich zu allen bislang aufgeführten Experimenten auch sehr große Proteinmengen eingesetzt (ca. 2 mg pro Ansatz).

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit den unterschiedlichen Puffern auch sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Mit Puffer 5, der dem *E. coli*-Einfangpuffer entspricht, wurden zwar einige Proteine spezifisch, jedoch auch viele Proteine unspezifisch eingefangen (Spuren 2 und 3). Mit Puffer 8 wurden im Vergleich zwar weniger Proteine unspezifisch, aber es wurden auch weniger Proteine spezifisch eingefangen (Spuren 8 und 9). Deutlich bessere Ergebnisse wurden mit den Puffern 6 und 7 erzielt, wobei mit Puffer 7 am meisten Proteine

spezifisch eingefangen wurden, allerdings um den Preis, dass im Vergleich zu Puffer 6 auch etwas mehr Proteine unspezifisch eingefangen wurden (Spuren 4 – 7).

Eine eindeutige Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist wegen der großen Unterschiedlichkeit der getesteten Puffer kaum möglich, aber einige wichtige Tendenzen sind trotzdem zu erkennen. So ähneln sich Puffer 7 und Puffer 8. Ein wichtiger Unterschied ist jedoch die Anwesenheit des Detergenzes 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS) in Puffer 7. Es ist also anzunehmen, dass CHAPS die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein beim Arbeiten mit pflanzlichen Zelllysaten erhöht. An dieser Stelle sei außerdem erwähnt, dass bei diesem Experiment die der Photoverknüpfung vorangehende Vorinkubation der Proben über Nacht erfolgte und die Ansätze ohne Detergenz zum Zeitpunkt der Bestrahlung schon deutlich getrübt waren. CHAPS trägt bei pflanzlichen Zelllysaten also deutlich zu einer Stabilisierung der Proteine bei. Allerdings kann unspezifisches Einfangen von Proteinen nicht mit deren Ausfällen erklärt werden, da die Ansätze mit Puffer 8 zwar trübe waren, aber nur wenige Proteine unspezifisch eingefangen wurden.

Der Einfluss der NaCl-Konzentration im Puffer ist ebenfalls nicht einfach zu beschreiben. Die NaCl-Konzentration stellt den wichtigsten Unterschied zwischen Puffer 6 und Puffer 7 dar, die sich ansonsten stark ähneln. Die deutlich unterschiedlichen Ergebnisse (vgl. Spuren 4 – 7) legen den Schluss nahe, dass die NaCl-Konzentration einen Einfluss auf Ausbeute und Spezifität hat, dass dieser aber nicht alle Proteine gleichermaßen betrifft. Eine generelle Aussage, ob viel NaCl nun „gut“ oder „schlecht“ ist, kann bislang aber nicht getroffen werden. Mit M.TaqI konnte jedoch gezeigt werden, dass 250 mM NaCl die Spezifität bei Verwendung von B1-N6-SAH-Fangpartikeln deutlich erhöht. Allerdings sinkt oberhalb von 200 mM NaCl die Ausbeute wieder (in dieser Arbeit nicht aufgeführt).

Abschließend soll noch ein Experiment aufgeführt sein, welches die Bedeutung des Gelfiltrationsschritts während der Herstellung der Zelllysate verdeutlicht.

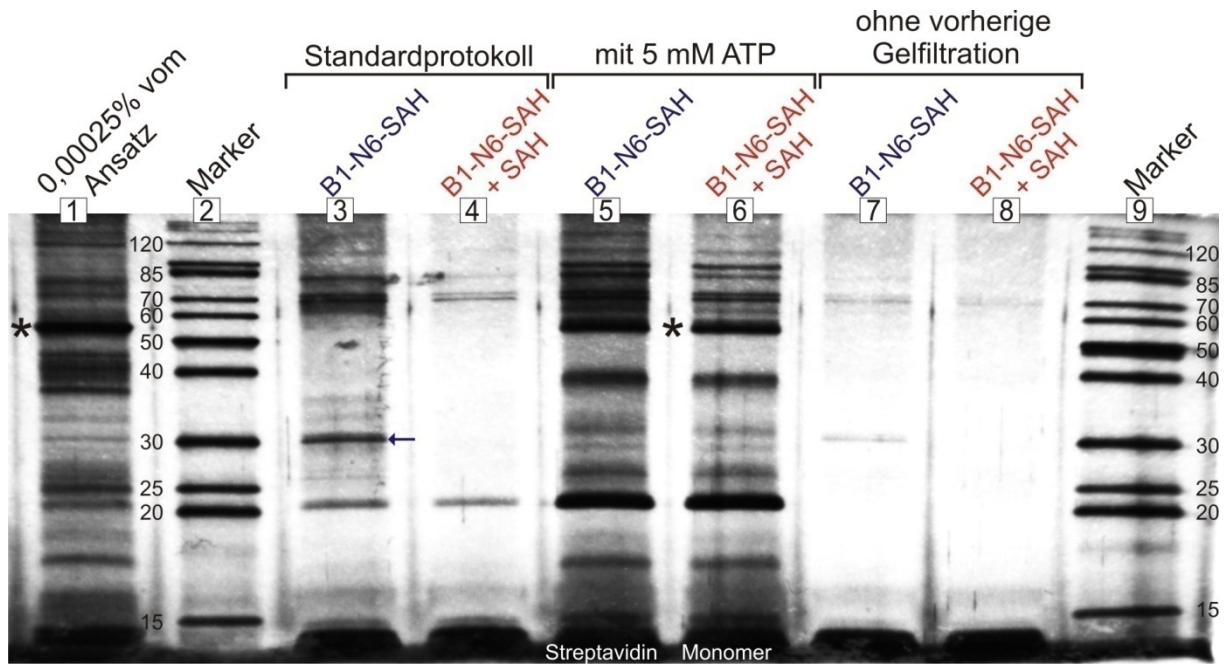


Abb. 68: Einfangen des Methyloms von *A. thaliana* mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln bei unterschiedlichen Bedingungen. Alle Ansätze enthielten 400 µg B1-N6-SAH-Fangpartikel, hatten ein Volumen von 2 ml und einen Proteingehalt von 4 mg/ml. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (5 mM). Dabei wurde folgender Puffer verwendet: MES (10 mM), NaOAc (10 mM), HEPES (10 mM), MgCl₂ (10 mM), NaCl (150 mM) CHAPS (0,25 %) Glycerin (10 %) β-Mercaptoethanol (5 mM), PMSF (0,2 mM), cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tab. EDTA-free (1 Tab./10 ml), pH 7,5. Die Zelllysate wurden für dieses Experiment frisch hergestellt und nicht zwischenzeitlich bei -80°C gelagert. Ein Teil des verwendeten Zelllysats wurde eingesetzt, ohne zuvor einem Gelfiltrationsschritt mittels Zeba™ Desalt Column unterzogen worden zu sein. Alle Ansätze wurden 3 h vorinkubiert und 40mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Für die Analyse der Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden von jedem Ansatz 50 % der Magnetpartikel verwendet. Erklärungen zu den mit Sternchen oder Pfeil markierten Banden finden sich im Text.

In Abb. 68 ist das Ergebnis eines Experiments zu sehen, bei dem sehr große Mengen an Gesamtprotein eingesetzt wurden (8 mg pro Ansatz). Dabei wurde ein Teil des eingesetzten Zelllysats während seiner Herstellung nicht einem Gelfiltrationsschritt unterzogen. Dies hatte zur Folge, dass mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln aus diesem Lysat kaum Proteine isoliert wurden, weder spezifisch, noch unspezifisch (Spuren 7 und 8). Aus Zelllysat, bei dessen Herstellung ein Gelfiltrationsschritt erfolgt war, konnten hingegen mehrere Proteine spezifisch eingefangen werden, wenngleich auch eine geringe Menge an Protein unspezifisch eingefangen wurde (Spuren 3 und 4). Eine der spezifischen Banden konnte als Caffeoyle-CoA-O-Methyltransferase identifiziert werden (blauer Pfeil). Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, dass bei der Gelfiltration kleine Moleküle abgetrennt werden, die beim Binden der Zielproteine an die Selektivitätsfunktion der Fangverbindung als Kompetitoren dienen. Möglich ist aber auch ein Quenchen der Photoreaktion durch

Kleinmoleküle wie z.B. Thiole. Die geringere Menge an unspezifisch eingefangenen Protein würde zu dieser Erklärung passen.

In den Spuren 5 und 6 ist zu erkennen, welchen Einfluss die Anwesenheit von 5 mM ATP auf das Ergebnis des Experiments hatte. Ähnlich wie beim Einfangen des Methyloms aus *E. coli* führte das ATP zu einer deutlichen Steigerung unspezifischer Nebenreaktionen. Besonders die Rubisco ist hiervon betroffen (Sternchen). Die unspezifischen Banden sind im vorliegenden Fall so stark ausgeprägt, dass praktisch keine spezifischen Banden mehr zu erkennen sind. Bedenkt man, dass ATP mit Mg^{2+} einen sehr stabilen Komplex bildet, so kann die Beobachtung mit dem Fehlen von freiem Mg^{2+} erklärt werden. Diese Erklärung deckt sich auch mit dem Befund, dass Puffer ohne Mg^{2+} zu starken unspezifischen Nebenreaktionen führen.

Die drei in diesem Abschnitt aufgeführten Experimente zeigen einige wichtige Aspekte, die berücksichtigt werden müssen, wenn Fangpartikel in Eukaryontenlysaten erfolgreich eingesetzt werden sollen:

1. Die verwendeten Puffer müssen freies Mg^{2+} in ausreichender Menge enthalten. Werden über das Probenmaterial Chelatliganden eingeschleppt, ist dies bei der Pufferwahl zu berücksichtigen. Die in dieser Arbeit standardmäßig verwendete Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM hat sich bewährt, ist aber noch nicht optimiert.
2. Der Zusatz des Detergenz CHAPS bewirkte bei pflanzlichen Zelllysaten nicht nur eine Erhöhung der Ausbeute beim Einfangen von Proteinen mit Fangpartikeln, sondern reduzierte auch merklich das Ausfallen von Proteinen. Auch für eine gute Handhabung der Fangpartikel ist der Zusatz eines Detergenz wichtig. Eine CHAPS-Konzentration von 0,25 % (w/v) hat sich bewährt. Allerdings ist die CHAPS-Konzentration bislang nicht optimiert worden. Die Verwendung anderer MS-kompatibler Detergenzien ist ebenfalls denkbar.
3. Eine genügende Salzkonzentration (z.B. von NaCl) sollte im Puffer vorhanden sein. Das Optimum scheint aber für individuelle Proteine unterschiedlich zu sein und muss im Zweifelsfall experimentell bestimmt werden.
4. Ein Gelfiltrationsschritt ist bei der Herstellung von Zelllysaten äußerst empfehlenswert. Durch das Abtrennen von potentiellen Kompetitoren oder photochemischen Quenchern wird die Ausbeute an spezifisch eingefangenen Protein erhöht. Außerdem werden dabei ausgefallene Proteine, Zelltrümmer, Membranfragmente usw. weitestgehend abgetrennt, ein Aspekt, der besonders bei der im nächsten Kapitel erwähnten Herstellung von Zelllysaten aus Schweinegeweben sehr nützlich war. Am besten gelang dies mit Hilfe von ZEBTM Desalt Spin Columns (PIERCE)

5. Da Eukaryontenproteome deutlich komplexer sind als bakterielle Proteome, muss auch deutlich mehr Gesamtprotein für ein Experiment eingesetzt werden. Besonders wenn die Zielproteine nur schwach expremiert werden, ist dies zu berücksichtigen. Wenn Fangpartikel statt in Lösung befindliche Fangverbindungen verwendet werden, stellt eine Vergrößerung des Probenvolumens aber kein Problem dar.

6. Obwohl in dieser Arbeit nicht genauer darauf eingegangen wird, sei an dieser Stelle die Verwendung von Proteaseinhibitoren empfohlen. Besonders bei längerer Vorinkubation der Proben konnte ohne Proteaseinhibitoren ein Proteinabbau festgestellt werden. Als Oxidationsschutz kann β -Mercaptoethanol bis zu einer Konzentration von 5 mM zugegeben werden, ohne dass dies die Photoverknüpfung wesentlich beeinflusst.

Auf Grundlage dieser Punkte wurde ein Puffer entworfen, der sowohl bei der Herstellung eukaryontischer Zelllysate als auch bei den nachfolgenden Einfangexperimenten verwendet wurde. Dieser Eukaryonten-Einfangpuffer setzt sich zusammen aus HEPES (10 mM), KOAc (10 mM), MES (10 mM), MgCl_2 (10 mM), NaCl (150 mM), β -Mercaptoethanol (5 mM), PMSF (0,2 mM), CHAPS (0,25 % w/) cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tab. EDTA-free (1 Tab./10 ml) und Glycerin (10 % v/v), bei pH 7,5. Im Gegensatz zu Experimenten mit *E. coli*-Zelllysaten, bei denen 100 μl großen Ansätzen typischerweise nur 10 μl des Zelllysats zugesetzt werden, ist bei Experimenten mit eukaryontischen Zelllysaten der Lysatpuffer auch gleichzeitig der Einfangpuffer, da diese Zelllysate praktisch unverdünnt eingesetzt werden.

3.5.2 Einfangen des Methyloms von *A. thaliana* mit unterschiedlichen Fangpartikeln

Bereits beim Einfangen des Methyloms aus *E. coli* mit unterschiedlichen Fangpartikeln hat sich gezeigt, dass die Fangverbindung zur Herstellung der Fangpartikel einen gewissen Einfluss auf das Ergebnis hat, wenngleich der Effekt nicht sonderlich groß ist (vgl. Abschnitt 3.3.18).

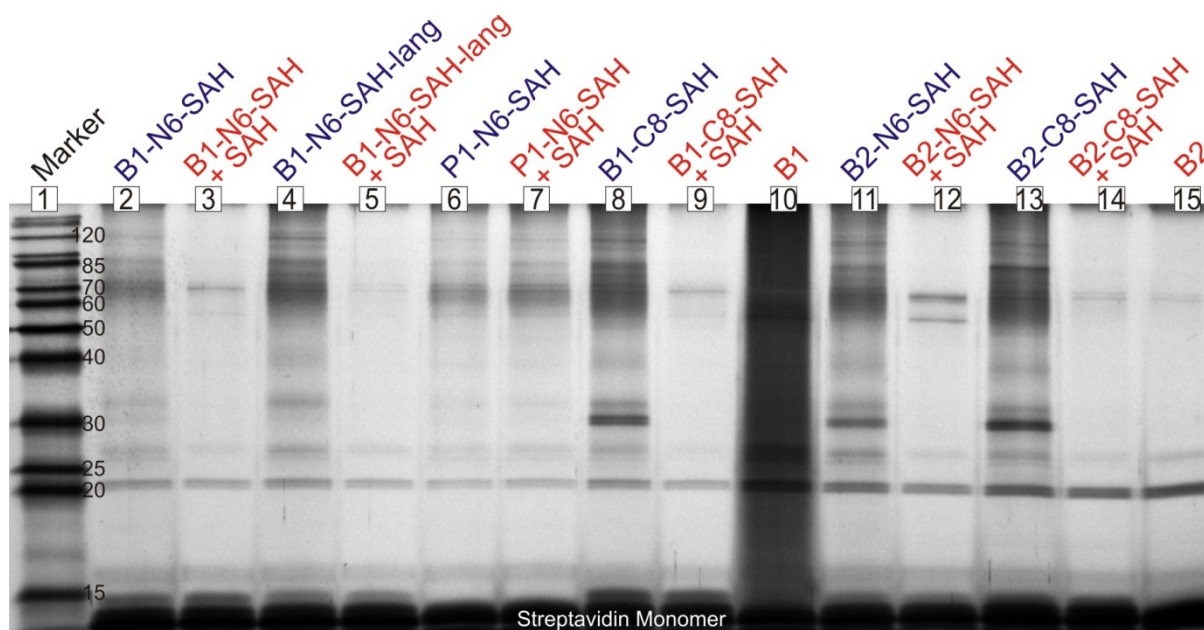


Abb. 69: Einfangen des Methyloms aus *A. thaliana* mit unterschiedlichen Fangpartikeln. Abweichend vom Standardverfahren wurden bei der Herstellung der Zelllysate PD-10 Columns (GE Healthcare) statt ZEBA™ Desalt Spin Columns verwendet. Für jeden Ansatz wurden 400 µg der entsprechenden Fangpartikel verwendet. Sechs der Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (5 mM). Das Ansatzvolumen betrug jeweils 2 ml mit einer Proteinkonzentration von 1,7 mg/ml. Alle Ansätze wurden 2,5 h vorinkubiert und 50mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Für die Analyse der Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden von jedem Ansatz 50 % der Magnetpartikel verwendet.

In Abb. 69 ist das Ergebnis eines Experiments dargestellt, bei dem alle zu diesem Zeitpunkt verfügbaren SAH-Fangverbindungen und deren Fangverbindungsgrundgerüste als Fangpartikel immobilisiert zum Einfangen des Methyloms von *A. thaliana* verwendet wurden. Dabei konnten unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden. Es wurden insgesamt nur wenige Proteine unspezifisch eingefangen. (Der Kontrollansatz mit B1-Grundgerüst ist nicht repräsentativ und dabei deshalb nicht zu berücksichtigen. Bei dem Kontrollansatz mit P1-N6-SAH-Fangpartikeln wurde eventuell der Zusatz von SAH vergessen, weshalb die Ergebnisse dieser Fangpartikel im Folgenden auch nicht weiter diskutiert werden sollen.) Die Ausbeuten an spezifisch eingefangenen Protein unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Quantität deutlich. So wurde mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln deutlich weniger Protein spezifisch eingefangen als mit B2-C8-SAH-Fangpartikeln (vgl. Spuren 2 und 13). Auch die Verteilung des Bandenmusters unterscheidet sich zwischen den einzelnen Fangpartikeln etwas. So ist die Doppelbande auf Höhe von 30 kDa bei B1-C8-SAH-Fangpartikeln und B2-C8-SAH-Fangpartikeln stärker ausgeprägt als bei B2-N6-SAH-Fangpartikeln (vgl. Spuren 8 und 13 mit Spur 11). Mit B1-N6-SAH-lang-Fangpartikeln und mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln wurden diese Proteine praktisch gar nicht eingefangen (Spuren 2 und 4). Es könnte sich hierbei um Proteine handeln, die die Selektivitätsfunktion SAH bevorzugt binden, wenn sie in C8-

Position verknüpft ist. Bei den anderen spezifisch eingefangenen Proteinen ist dieser Unterschied weniger stark ausgeprägt. Insgesamt hat sich in diesem Experiment die Fangverbindung B2-C8-SAH für partikelgebundenes Einfangen des Methyloms aus *A. thaliana* als die am besten geeignete Fangverbindung erwiesen, während die Ausbeute mit B1-N6-SAH auffallend gering war. Allerdings wurden auch vergleichbare Experimente durchgeführt, bei denen die Ausbeute mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln deutlich besser war. Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass bei der Herstellung pflanzlicher Zelllysate eine Verwendung von PD-10 Columns statt ZEBA™ Desalt Spin Columns aus bislang noch nicht geklärten Gründen zu geringeren Ausbeuten beim nachfolgenden Einfangen des Methyloms führt (persönliche Mitteilung von Nicola Huck). Die in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse sind also unter Umständen unter nicht optimalen Bedingungen erhalten worden.

3.5.3 Pflanzliche Zelllysate aus *Glycine max* (Soja) und *Nicotiana tabacum* (Tabak)

Um zu überprüfen, ob das für *A. thaliana* entwickelte Protokoll zur Herstellung von Zelllysaten für das Einfangen funktioneller Subproteome mit Fangpartikeln auch bei anderen Pflanzen anwendbar ist, wurden die Methylome von *Glycine max* und *Nicotiana tabacum* mit Hilfe von B1-N6-SAH-Fangpartikeln isoliert.

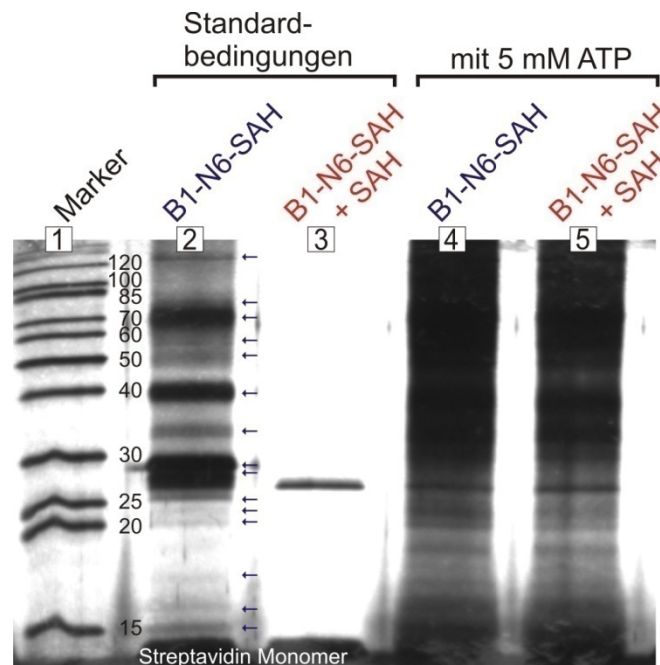


Abb. 70: Einfangen des Methyloms von *Glycine max* mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Für die Herstellung der Zelllysate wurde Blattmaterial junger Pflanzen verwendet (1 g pro Ansatz). Jeder Ansatz enthielt 400 µg B1-N6-SAH-Fangpartikel und hatte ein Volumen von 2 ml. Die Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (5 mM). Zwei der Ansätze enthielten darüber hinaus noch ATP (5 mM). Alle Ansätze wurden 3 h vorinkubiert und 40mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Für die Analyse der Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden von jedem Ansatz 50 % der Magnetpartikel verwendet.

Aus Abb. 70 ist ersichtlich, dass der verwendete Puffer und das angewandte Verfahren zur Herstellung der Zelllysate aus *Glycine max* hervorragend geeignet ist, um aus dem Zelllysate das Methylom mittels B1-N6-SAH-Fangpartikel zu isolieren. Dabei konnten 15 Proteine spezifisch eingefangen werden (blaue Pfeile), vier davon sogar in ausgesprochen großen Mengen. Unspezifisch wurde lediglich ein einziges Protein eingefangen. In Anwesenheit von ATP wurden hingegen große Mengen an Protein unspezifisch eingefangen, ein Befund, der sich mit den bereits mit *A. thaliana* Zelllysate gemachten Beobachtungen deckt (vgl. Abb. 68).

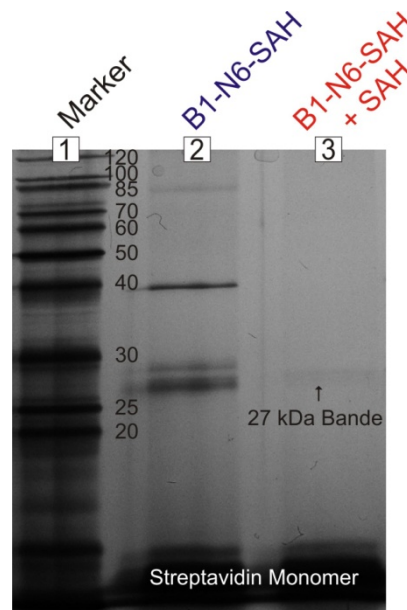


Abb. 71: Einfangen des Methyloms von *Nicotiana tabacum* mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Für die Herstellung der Zelllysate wurde Blattmaterial einer älteren, kleinen, leicht seneszenten Tabakpflanze verwendet (ca. 1 g pro Ansatz). Jeder Ansatz enthielt 400 µg B1-N6-SAH-Fangpartikel und hatte ein Volumen von 1,3 ml. Der Kontrollansatz enthielt zusätzlich SAH (5 mM). Beide Ansätze wurden 1 h vorinkubiert und 30mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Für die Analyse der Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden von jedem Ansatz 50 % der Magnetpartikel verwendet.

Auch aus Zelllysate von *Nicotiana tabacum* konnten Proteine spezifisch eingefangen werden (Abb. 71), allerdings nur vier. Die im Vergleich zu *Glycine max* deutlich geringere Ausbeute mag darauf zurück zu führen sein, dass die verwendete Tabakpflanze schon recht alt war, nur noch wenige Blätter besaß und vermutlich kurz vor dem Absterben stand.

Die zwei aufgeführten Experimente legen aber den Schluss nahe, dass der verwendete Eukaryonten-Einfangpuffer zumindest für pflanzliche Zelllysate gut geeignet ist.

3.5.4 Einfangen des Methyloms von *Sus scrofa domestica* mit unterschiedlichen Fangpartikeln

Eines der wichtigsten Anwendungsgebiete von trifunktionellen Fangverbindungen ist sicherlich die Erforschung von Wirkungen und Nebenwirkungen bioaktiver Substanzen, die als Medikamente eingesetzt werden sollen. Deshalb ist die Möglichkeit mit trifunktionellen Fangverbindungen funktionelle Subproteome aus tierischen Zelllysaten isolieren zu können von besonderer Bedeutung.

Als tierischen Modellorganismus wurde für die folgenden Experimente das Hausschwein *Sus scrofa domestica* gewählt, weil es mit dem Menschen genetisch eng verwandt ist und die Beschaffung großer Mengen Probematerial mit geringem finanziellem Aufwand möglich ist. Für die Herstellung von Zelllysaten wurde dabei Material von der Leber verwendet, da dieses Gewebe eine besonders vielfältige Stoffwechselaktivität zeigt und zudem eine relativ einfach zu homogenisieren ist. Dabei wurde der Puffer verwendet, der sich bei den Arbeiten mit pflanzlichen Zelllysaten am besten bewährt hat.

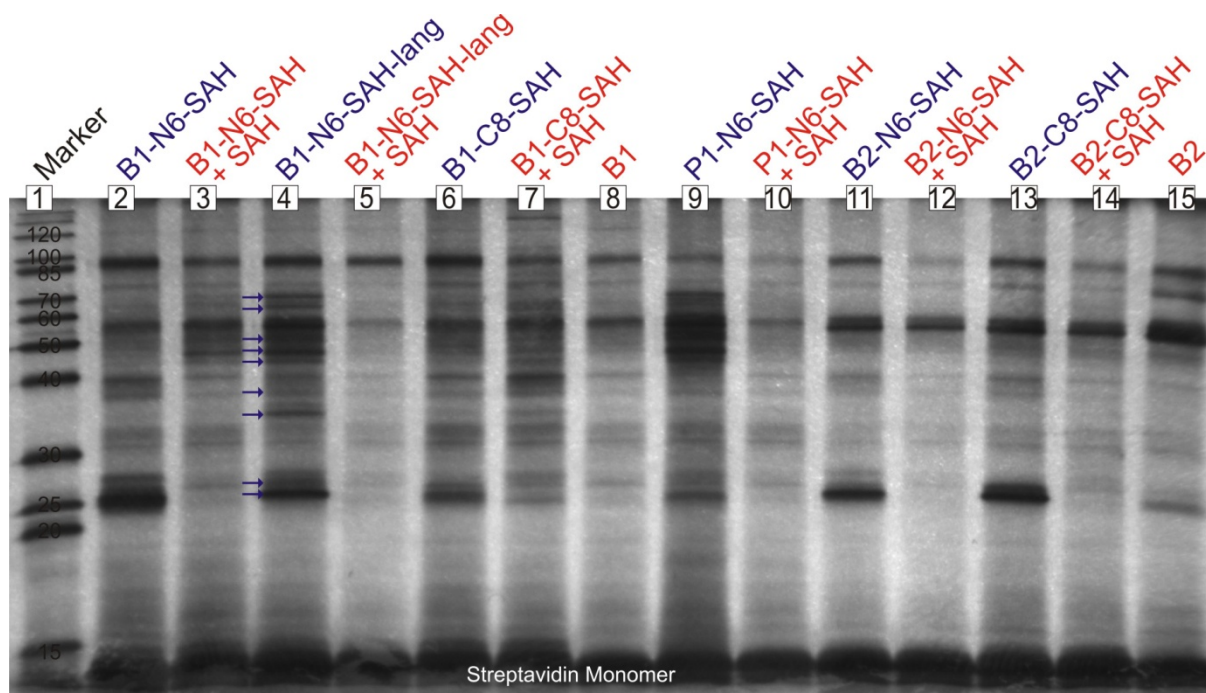


Abb. 72: Einfangen des Methyloms aus Schweineleberlysate mit unterschiedlichen Fangpartikeln. Das Ansatzvolumen betrug jeweils 400 µl bei einem Proteingehalt 15 mg/ml. Für jeden Ansatz wurden 200 µg der jeweiligen Fangpartikel eingesetzt. Sechs der Kontrollansätze enthielten zusätzlich SAH (5 mM). Die Vorinkubationszeit betrug 5 h, die Proben wurden 33mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach dem Waschen der Partikel erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Abb. 72 zeigt das Ergebnis eines Experiments, bei dem sämtliche verfügbaren SAH-Fangverbindungen und die zugrundeliegenden Fangverbindungsgrundgerüste als Fangpartikel zum Einfangen des Methyloms von *Sus scrofa domestica* verwendet wurden. Dabei konnten mindestens acht Proteine spezifisch eingefangen werden (in Spur 4 mit blauen Pfeilen markiert). Allerdings waren Ausbeute und Spezifität bei den unterschiedlichen Fangpartikeln nicht gleich. So wurden z.B. mit B1-N6-SAH-lang-Fangpartikeln besonders viele Proteine spezifisch eingefangen (Spur 4). Mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln hingegen konnte von dem spezifisch eingefangenen Protein der Größe 25 kDa mehr isoliert werden als mit allen anderen Fangpartikeln (Spur 2). Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass eine einfache Aussage, welche Fangverbindung „die Beste“ ist, nicht ohne Weiteres getroffen werden kann. In diesem Experiment konnte mit B2-C8-SAH-Fangpartikeln z.B. nur wenig Protein spezifisch eingefangen werden (Spur 13). Abb. 69 zeigt jedoch ein vergleichbares Experiment mit Zelllysaten aus *A. thaliana*, bei denen mit den gleichen Fangpartikeln mehr Protein spezifisch eingefangen wurde als mit allen anderen Fangpartikeln.

Die bislang vorliegenden Ergebnisse legen insgesamt den Schluss nahe, dass es im Interesse maximaler Ausbeuten an spezifisch eingefangenen Protein durchaus sinnvoll sein kann, in Vorversuchen die optimale Fangverbindung für das jeweilige Zelllysate experimentell zu ermitteln. Dabei ist jedoch damit zu rechnen, dass es keine Fangverbindung gibt, welche für alle Zielproteine gleichermaßen ideal ist. Die Lösung für dieses Problem könnte im Einsatz eines Gemischs unterschiedlicher Fangpartikel liegen.

3.5.5 Nachweis differentieller Expression des Methyloms von Eukaryonten

Nachweis und Quantifizierung differentieller Expression sind bei sehr vielen eukaryontischen Proteinen von ganz besonderer Bedeutung. Die veränderten Expressionsmuster in Tumoren sind nur ein Beispiel dafür. Auch für das Verständnis der Vorgänge während der Embryonalentwicklung und Gewebedifferenzierung ist der Nachweis veränderter Expressionsmuster unverzichtbar. Die Verwendung von Fangpartikeln macht es möglich, Veränderungen im Expressionsmuster funktioneller Subproteome gezielt nachzuweisen, wie die im Folgenden aufgeführten Experimente zeigen sollen.

Als erstes Beispiel soll ein Experiment dienen, bei dem Zelllysate aus unterschiedlichen Geweben von *Sus scrofa domestica* mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln untersucht wurden. Die Zelllysate wurde dabei aus der Leber und dem Gehirn hergestellt.

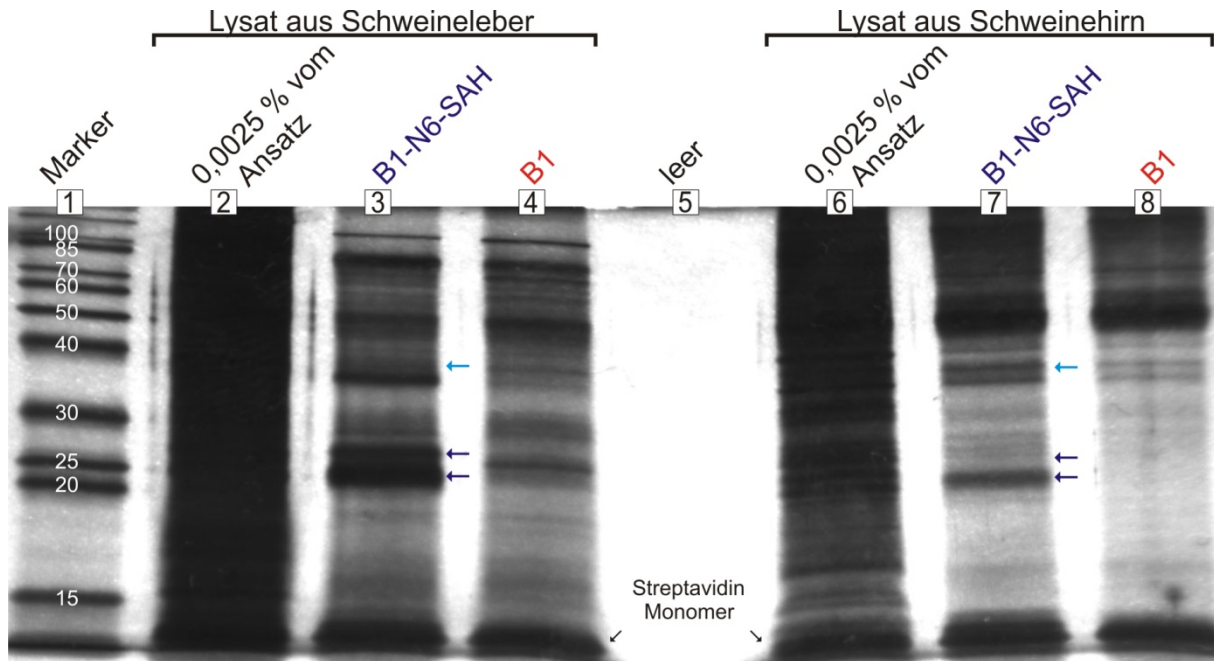


Abb. 73: Einfangen des Methyloms aus Schweineleber und Schweinehirn mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Für jeden der Ansätze wurden 2 ml Zelllysate (aus 0,6 g Ausgangsmaterial) und 400 µg B1-N6-SAH- bzw. B1-Fangpartikel verwendet. Die Ansätze wurden 16 h vorinkubiert und 60mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach dem Waschen der Partikel erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

Wie zu erwarten, unterscheidet sich das Proteinbandenmuster von Leberlysate und Gehirnllysate deutlich (in dem in Abb. 73 abgebildeten Gel wegen der großen Proteinmenge leider nicht gut zu erkennen). Aber auch die Bandenmuster der eingefangenen Proteine unterscheiden sich, sowohl bei den spezifisch eingefangenen als auch bei den unspezifisch eingefangenen Proteinen. Von den zwei Proteinen im Bereich von 25 kDa, die aus Schweineleber in großen Mengen isoliert werden konnten, ist in der entsprechenden Probe aus Schweinehirn von dem kleineren Protein deutlich weniger und von dem größeren Protein fast gar nichts isoliert worden, (vgl. Spuren 3 und 7, dunkelblaue Pfeile). Ein anderes Protein, welches aus Schweinehirn isoliert werden konnte, fehlt hingegen in der entsprechenden Probe aus Schweineleber (hellblaue Pfeile).

In einem anderen Experiment wurde untersucht, ob sich das Methylom von mit *Phakopsora pachyrhizi* (Sojarost) infizierten Sojapflanzen von dem Methylom gesunder Pflanzen unterscheidet. Dazu wurden Zelllysate aus den Blättern von gesunden und infizierten Sojapflanzen hergestellt. Aus diesen Zelllysaten wurde anschließend das Methylom mittels B1-N6-SAH isoliert. Für alle Ansätze wurde dabei die gleiche Gesamtproteinmenge verwendet.

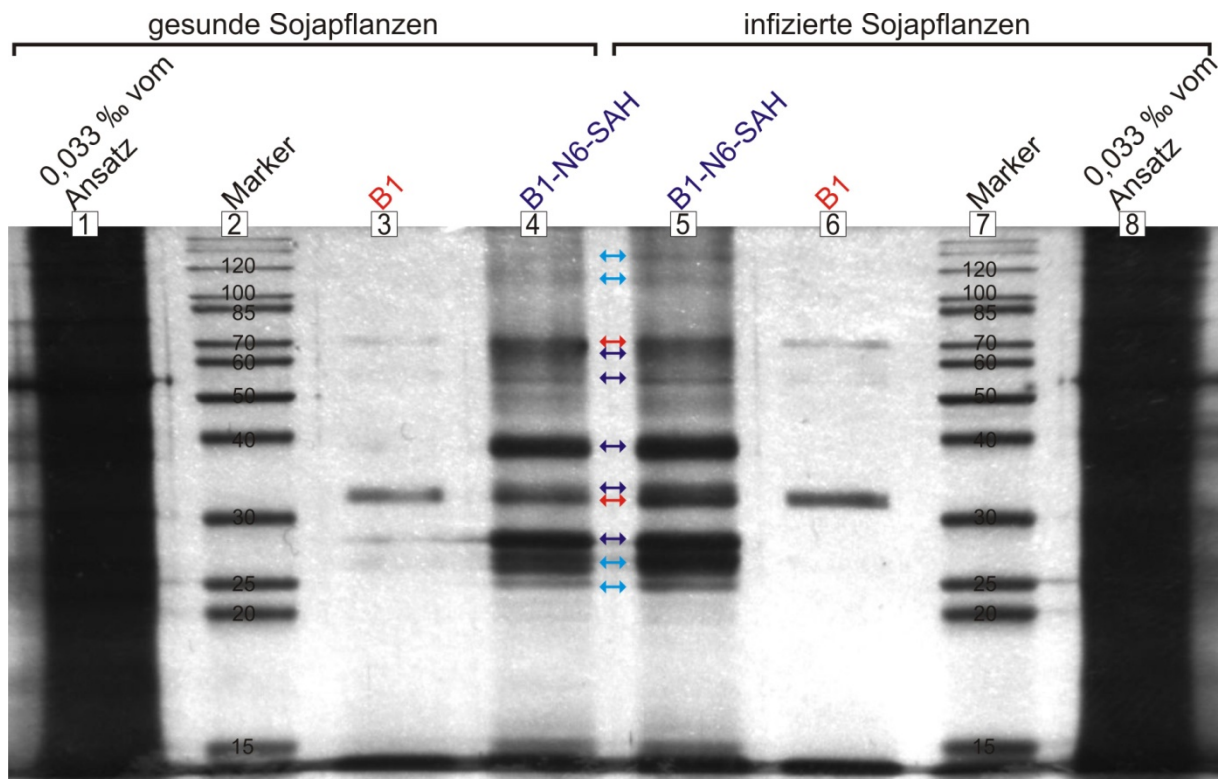


Abb. 74: Einfangen des Methyloms von gesunden und parasitierten Sojapflanzen mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln. Die parasitierten Sojapflanzen wurden 48 h vor der Ernte des Blattmaterials mit Uredosporen von *Phakopsora pachyrhizi* infiziert. Für die Einfangexperimente wurden jeweils 1,5 ml Zelllysate (Proteingehalt 20 mg/ml) und 1000 µg B1-N6-SAH- bzw. B1-Fangpartikel eingesetzt. Die Proben wurden 3 h vorinkubiert und 33mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Für die Analyse der Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden von jedem Ansatz 50 % der Fangpartikel verwendet. Erklärungen zu den mit Pfeilen markierten Banden finden sich im Text.

In Abb. 74 sind die aus gesunden und infizierten Sojapflanzen mit B1-N6-SAH-Fangpartikeln eingefangenen Proteine direkt nebeneinander zu sehen (Spuren 4 und 5). Bei diesem Experiment wurden trotz der großen eingesetzten Gesamtproteinmenge (30 mg pro Ansatz) kaum Proteine unspezifisch eingefangen (rote Doppelpfeile), jedoch wurden sehr viele Proteine spezifisch eingefangen. Einige der spezifisch eingefangenen Proteine konnten aus den unterschiedlichen Zelllysaten in gleichen Mengen isoliert werden (dunkelblaue Doppelpfeile). Es gibt jedoch auch einige Proteine, die aus den Zelllysaten infizierter Pflanzen in größeren Mengen isoliert wurden (hellblaue Doppelpfeile).

Das vorliegende Experiment hat gezeigt, dass pathogenbedingte Veränderungen im Methylom eines bestimmten eukaryontischen Gewebes mit trifunktionellen Fangverbindung und einfacher Analytik durch 1D-Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Allerdings ist dabei sicherlich nicht das gesamte Methylom erfasst worden. Auch ist auf Grundlage der vorliegenden Gels nur eine sehr grobe Quantifizierung möglich. Durch eine hochauflösende

2D-Gelelektrophorese könnten wahrscheinlich deutlich mehr Proteine nachgewiesen werden. Mit entsprechenden linearen Färbetechniken wäre auch eine bessere Quantifizierung möglich. Die Technik der Zukunft ist hier jedoch die MS-Analytik. Durch LC-MS-Analytik tryptisch fragmentierter Proteingemische können die in verschiedenen Proben enthaltenen Proteinmengen verglichen werden (z.B. durch einen Vergleich der Anzahl tryptischer Fragmente, die von einem bestimmten Protein identifiziert werden). Wird von einem bestimmten Protein ein isotope markiertes, synthetisches Peptid als interner Standard mitgeführt oder werden die beiden Proben unterschiedlich isotope markiert, so ist sogar eine sehr exakte absolute bzw. relative Quantifizierung der betreffenden Proteine möglich.

Die aufgeführten Ergebnisse haben gezeigt, dass mit trifunktionellen Fangverbindungen nicht nur funktionelle Subproteome qualitativ isoliert werden können, sondern dass dabei durch den Vergleich zweier Proben auch quantitative Informationen gewonnen werden können. Aus *E. coli* konnte bislang bereits ca. die Hälfte des theoretisch vorhandenen Methyloms isoliert werden.

Es ist nur noch eine Frage der Zeit, bis mit der sich schnell weiter entwickelnden MS-Analytik auch sehr schwach exprimierte Proteine nachgewiesen werden können. Die Analyse eines vollständigen, zu einem bestimmten Kofaktor oder Substrat passenden funktionellen Subproteoms eines Organismus wird dann in weniger als 24 h möglich sein.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit wurde demonstriert, dass trifunktionelle Fangverbindungen für die Untersuchung funktioneller Subproteome, kombiniert mit moderner MS-Analytik, ein neues und leistungsfähiges Werkzeug der Proteomik sind.

Zuerst wurden geeignete experimentelle Bedingungen etabliert, die es unter Verwendung von Fangverbindungen mit der Selektivitätsfunktion SAH ermöglichten, 13 aufgereinigte MTasen von 14 getesteten MTasen spezifisch einzufangen. Dabei handelte es sich um DNA-, RNA- und Protein-MTasen aus unterschiedlichen Organismen, was die breitgefächerte Anwendbarkeit dieser Technik zeigt. Ein zusätzlich entwickeltes, oberflächenbasiertes Verfahren, bei dem die Fangverbindungen auf sogenannten Fangpartikeln immobilisiert eingesetzt werden, ergänzt und erweitert die Anwendungsmöglichkeiten der Fangverbindungen erheblich (Abb. 75).

Die Isolierung des Methyloms aus Zelllysaten von *E. coli* stellte einen ersten Praxistest für die neue Methode dar. Dabei konnten fast 50 % der theoretisch zu erwartenden MTasen identifiziert werden. Eine solch hohe Abdeckung konnte bislang selbst in den aufwendigsten massenspektrometrischen Studien nicht erreicht werden. Unter den eingefangenen Proteinen waren auch fünf, bei denen eine MTase-Aktivität bislang nur auf Grund von Sequenzhomologien vermutet wurde.

Der Anwendungsbereich trifunktioneller Fangverbindungen beschränkt sich aber nicht nur auf Prokaryonten. Nach Entwicklung geeigneter Probenvorbereitungs- und Pufferbedingungen konnten trifunktionelle Fangverbindungen darüber hinaus auch in Zelllysaten aus Pflanzen oder Säugetieren eingesetzt werden. Besonders die Verwendung von Fangpartikeln hat sich hierbei bewährt. Durch den direkten Vergleich verschiedener Proben ließen sich sogar differentielle Expressionsmuster nachweisen. Die Verwendung trifunktioneller Fangverbindungen kann also auch quantitative Informationen liefern.

Obwohl MTasen eher schwach expremiert werden und nicht sehr stark an die Selektivitätsfunktion SAH binden, haben sich die ersten trifunktionellen Fangverbindungen bei diesen nicht ganz einfachen Testobjekten gut bewährt. Das Potential dieser Technik ist aber noch lange nicht ausgereizt. Neue Fangverbindungen mit verbesserten Reaktivitätsfunktionen und optimiertem Grundgerüst werden das Einfangen noch effizienter machen.

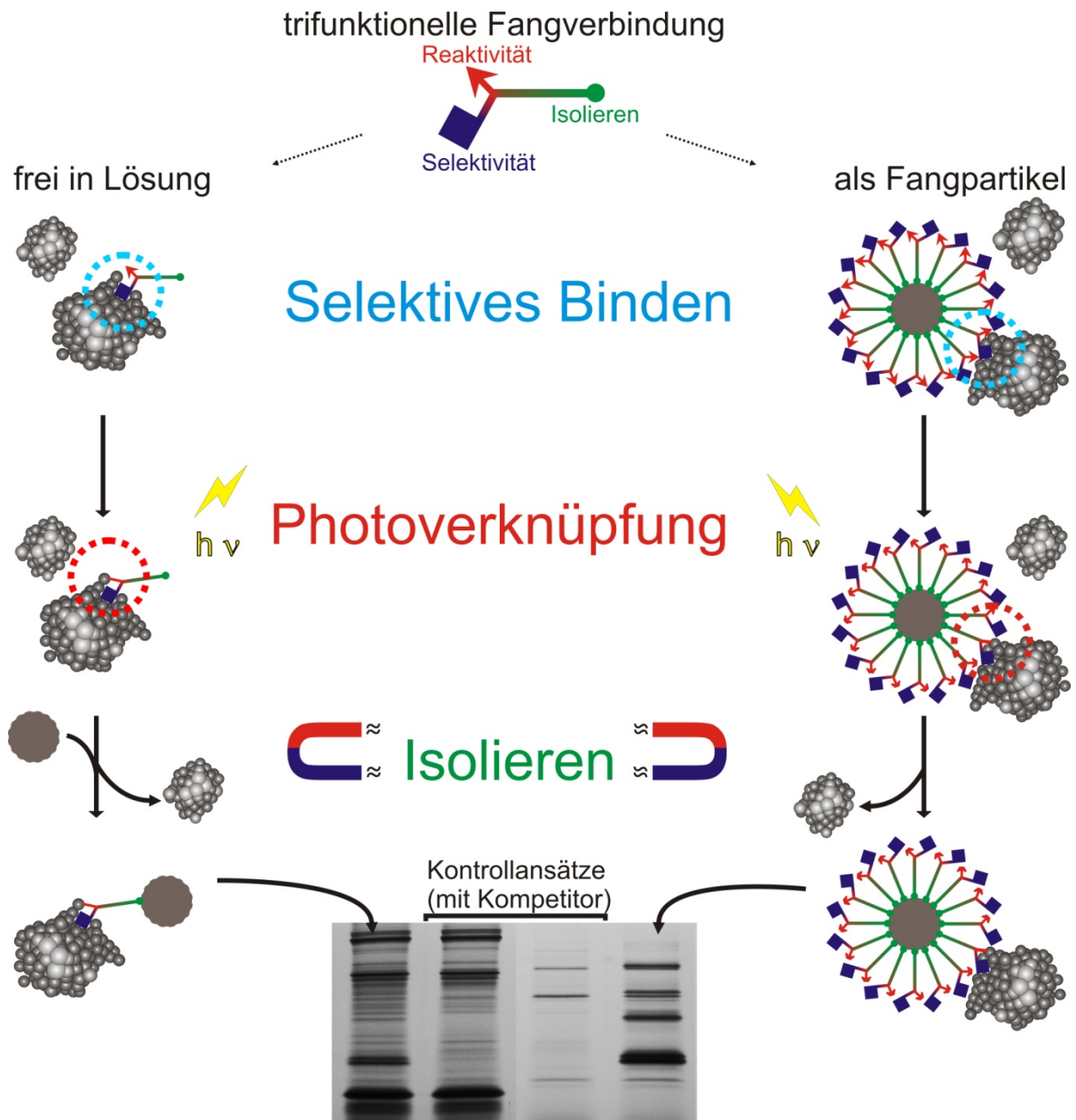


Abb. 75: Trifunktionelle Fangverbindungen können sowohl frei in Lösung (links), als auch partikelgebunden, in Form sogenannter Fangpartikel (rechts) verwendet werden. In beiden Fällen binden die Zielproteine zunächst spezifisch, aber nicht-kovalent an die Selektivitätsfunktion der Fangverbindung. Dann kommt es nach einer Photoaktivierung zur Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung zwischen der Reaktivitätsfunktion der Fangverbindung und dem Zielprotein. Am Ende erfolgt unter Ausnutzung der starken Biotin-Streptavidin Wechselwirkung eine magnetbasierte Isolierung der eingefangenen Proteine. Das abgebildete Gel zeigt das mit der Fangverbindung B1-N6-SAH aus Zelllysate isolierte Methylom von *E. coli*. Kontrollansätze, die in Gegenwart eines großen Überschusses SAH als Kompetitor durchgeführt wurden zeigen, dass besonders bei Verwendung von Fangpartikeln eine sehr hohe Spezifität erzielt werden kann.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen Detektierfunktionen, wie z.B. Fluorophoren, werden sich zusätzliche Anwendungsgebiete erschließen. Und da die Selektivitätsfunktion prinzipiell frei wählbar ist, sind die Anwendungsmöglichkeiten von dieser Seite aus betrachtet fast unbegrenzt, was besonders für die pharmazeutische Industrie von besonderem Interesse

sein sollte. Denn mit wenigen, kostengünstigen Experimenten lassen sich jetzt nicht nur die Zielproteine einer pharmakologisch aktiven Substanz ermitteln, sondern gleichzeitig auch unerwünschte, zu Nebenwirkungen führende Wechselwirkungen analysieren.

Für biotechnologische Anwendungen könnten trifunktionelle Fangverbindungen in Zukunft an Bedeutung gewinnen. Sie könnten nach Zufallsmutagenese zur Isolierung von besonders gut an ein bestimmtes Substrat bindenden Enzymvarianten benutzt werden und z.B. in Kombination mit der Phagen-Display-Technik eine gerichtete Evolution ermöglichen.

Aber auch in der Grundlagenforschung sollten trifunktionelle Fangverbindungen ein nützliches Werkzeug darstellen, da sie nicht nur zum funktionsbasierten Isolieren und Identifizieren von Subproteomen benutzt werden können, sondern in gewissem Umfang auch eine Quantifizierung der Proteine ermöglichen. Dies ist besonders für das Verständnis komplexer regulatorischer Mechanismen unabdingbar.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Blitzlampe B1600	AlienBees
Blitzröhre AWFT14MMUV	Paul C. Buff Inc.
caproBox TM	caprotec bioanalytics
Chromatographieschrank	Nalge Nunc International
Dampfsterilisator Varioklav	H + P Labortechnik
Digitalkamera PowerShot A410 (3,2 MPixel)	Canon
Gel iX Imager System (mit 8 bit CCD Kamera)	Intas
Gelkammer Mini Sub Gel GT	Bio-Rad
Geltrockner Gel Dryer Model 583	Bio-Rad
Heizblock HBT 130	Hoefer Scientific Instr.
Hochspannungsnetzgerät Power Pac 300	Bio-Rad
Hochspannungsnetzgerät Power Pac 3000	Bio-Rad
Hybridisierungssofen Mini 10	MWG-Biotech
Inkubator Typ B6 (für Inkubation bei 37°C)	Heraeus
Kamera Polaroid MP4	Polariod
Kühlfalle RVT 100	Savant
Kolbenhub-Luftposterpipetten (Typ Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000 und P5000)	Gilson
Magnetrührer Ikamag RET-G	Janke und Kunkel
Neodymmagnet (aus Festplatte, vermutlich N50)	Quantum
Photometer UV-Visible-Spectrophotometer Cary 3E	Varian
pH-Glaselektrode GΔ Tinode	Gamma Analysen Technik
pH-Meter Calimatic 766 Knick	Gamma Analysen Technik
Polaroid-Film 6667	Polaroid
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore
Rotor JA-17	Beckman
Rotor JS-4.3	Beckman
Schüttel-Heizblock Thermomixer 5433	Eppendorf

Schüttelinkubator innova 4330	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Typ 3031	Gesellschaft für Labortechnik
Schüttler G 10 Gyrotory Shaker	New Brunswick Scientific
SDS-PAGE Minigelkammer Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad
Spülmaschine Mielabor G 7783	Miele
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf
Ultraschalldesintegrator Sonifier 250	Brason
UV-Transilluminator 312 nm	Intas
UV-Transilluminator Nu72	Benda
Vakuumfiltrationsaufsatz	H+P Labortechnik
Vakuumpumpe Rz5	Vakuubrand
Vakuumzentrifuge Speed Vac Plus SC 110A	Savant
Vortex-Genie2	Scientific Industrie
Wasserentionisierungsanlage Elix 3	Millipore
Weißlichttransilluminator	Roth
Zentrifuge Avanti J-20	Beckman

5.1.2 Verbrauchsmaterial

PP-Schraubverschlußröhrchen (15 ml, 50 ml) konischer Boden	Greiner
Centriprep YM-10	Millipore
Coomassie Plus Bradford TM Assay Kit	Pierce
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen
Dynabeads® MyOne TM Streptavidin C1	Invitrogen
Dynabeads® MyOne TM Streptavidin T1	Invitrogen
Einwegküvetten Plastibrand® (Polystyrol)	Brand
Jumbosep TM mit 10K Membran	Pall
Kunststoff-Kleinstreaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
NAP-5 TM Säulen	Amersham Biosciences
Papier für Gel Trocknung	Whatman
PCR-Röhrchen 0,2 ml	Eppendorf
PCR-Röhrchen 0,5 ml	Eppendorf
PD-10 Desalting column	Amersham Biosciences
Petrischalen Plastibrand® (Polystyrol)	Greiner

Pipettenspitzen (D10, D200, D1000, D5000)	Gilson
Proteosilver™ Plus Silver Stain Kit	Sigma
Rundfilter (0,22 µm)	Pall
SoftLink™ Soft Release Avidin Resin	Promega
Spritzenaufsatzfilter FP 30/0,2 CA-S (0,22 µm)	Schleicher u. Schuell
Precision Wipes (fusselfreie Papiertücher)	Kimberley-Clark
Zeba™ Desalt Spin Columns, (0.5 ml, 2 ml oder 10 ml)	Pierce

5.1.3 Chemikalien

Technisches Ethanol wurde für die Herstellung der Coomassie Färbe- und Entfärbelösungen mit einem Rotationsverdampfer destilliert. Es wurde ausschließlich Wasser verwendet, welches über eine Elix 3 Wasserentionisierungsanlage, gefolgt von einer Milli-Q Reinstwasseranlage gereinigt wurde (Milli-Q *grade*). Für alle anderen Arbeiten wurden die folgenden Chemikalien der Reinheitsgrade p. a. bzw. puriss p. a. verwendet:

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30 % w/v, 37,5:1)	Serva
Agarose (für die Elektrophorese)	Invitrogen
Agarose (für Medien)	Serva
Ampicillin	AppliChem
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva
β-Mercaptoethanol	Serva
Borsäure	Gerbu
Bromphenolblau Natriumsalz	Serva
Calciumchlorid Dihydrat	Fluka
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat)	Gerbu
cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tab. EDTA-free	Roche
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
CTAB (<i>N,N,N</i> -Trimethylhexadecylammoniumbromid)	Roth
DDM (Dodecyl-β-D-maltosid)	Gerbu
DTT (1,4-Dithio-D,L-threitol)	Gerbu
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Gerbu
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck

Ethidiumbromid	Sigma
Glycerin (für die Lagerung von Enzymen bei -20°C)	Sigma
Glycerin (für die Zellaufzucht)	Gerbu
Glycin	Gerbu
HABA/Avidin Reagent	Sigma
Hefeextrakt (für die Zellaufzucht zur Enzympräparation)	BD Biosciences
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)	Gerbu
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat	J.T. Baker
Magnesiumsulfat	Fluka
MES (2-Morpholinoethansulfonsäure)	Gerbu
Methanol	Roth
Methylenblau für die Mikroskopie	Merck
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Roth
Natriumacetat Trihydrat	Roth
Natriumchlorid	Gerbu
Natriumhydroxid	J.T. Baker
Plasmid-DNA pBR322	New England Biolabs
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Polyethylenglycol 8000	Fluka
SAH (S-Adenosyl-L-homocystein)	Sigma
Salzsäure, 37 %	Merck
SAM (S-Adenosyl-L-methionin) Butandisulfonat	Knoll
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Gerbu
Sulfo-SBED Label Transfer Interaction Reagent	Pierce
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Acros
Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Gerbu
Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid)	Gerbu
Triton X-100 (Polyethylen(9-10)-glycol-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether)	Sigma
Trypton (für die Zellaufzucht zur Enzympräparation)	BD Biosciences
Az	Dr. Falk Schmidt
6-BAz	Dr. Falk Schmidt

6-BdFlAz	Dr. Michael Hüben
B0	Sabrina Otto
B1	Dr. Christian Dalhoff
B1-N6-SAH	Dr. Michael Hüben
B1-N6-SAH-lang	Dr. Michael Hüben
B1-C8-SAH	Dr. Michael Hüben
B2	Dr. Christian Dalhoff
B2-N6-SAH	Dr. Michael Hüben
B2-C8-SAH	Dr. Michael Hüben
P1-N6-SAH	Samir Charrak
14-TCGA (5'-CGGCATCGAGCGGC-3')	AK Weinhold
14+TCGA-Bio (5'-GCCGCTCGATGCCG-3'-Biotin)	Invitrogen

5.1.4 Proteine, Bakterienstämme und Probenmaterialien

<i>E. coli</i> DH5α	
<i>E. coli</i> BL21	Stratagen
<i>E. coli</i> ER2267/pA1	New England Biolabs
M.TaqI	Kerstin Glensk
M.HhaI	Kerstin Glensk
EcoDam	Dr. Lilianna Wielitzek
M.SssI	Dr. Amélie J. Monami
SspDam	Peter Poot
Trm4	Dr. Mark Helen
M.BcnIB	Dr. Saulius Klimasauskas
M.MvaI	Dr. Saulius Klimasauskas
Trm1	Dr. Mark Helen
Clr4	Dr. Wibke Peters
Dim5	Dr. Wibke Peters
M.BseCI	Dr. Mike Kokkinidis
ErmC	Dr. Goran Pljevaljcic
TrmI	Dr. Mark Helen
R.TaqI (20 U/μl)	New England Biolabs
<i>A. thaliana</i>	Sabine Gawlik
<i>Nicotiana tabacum</i>	Dorothea Glowa

<i>Glycine max</i>	Marco Löhner
<i>Glycine max</i> (infiziert mit <i>Phakopsora pachyrhizi</i>)	Marco Löhner
<i>Sus scrofa</i> (Leber und Gehirn)	Metzgerei Schroeder

5.1.5 Puffer und Medien

LB-Medium	Trypton (10 g/l), NaCl (10 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), 20 min bei 121°C im Dampfsterilisator autoklaviert
LBA-Medium	Trypton (10 g/l), NaCl (10 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), 20 min bei 121°C im Dampfsterilisator autoklaviert und danach mit Ampicillin (100 mg/l) versetzt
Festmedien	LB-Medium oder LBA-Medium mit Agarose (1,5 %), 20 min bei 121°C im Dampfsterilisator autoklaviert
TB-Medium	Trypton (12 g/l), Hefeextrakt (24 g/l), Glycerin (0,4 % v/v), KH ₂ PO ₄ (17 mM), K ₂ HPO ₄ (72 mM), 20 min bei 121°C im Dampfsterilisator autoklaviert
5 × TBE-Puffer	Tris-Base (444 mM), Borsäure (444 mM), EDTA (10 mM)
0,5 × TBE-Puffer + EtBr	Tris-Base (44,4 mM), Borsäure (44,4 mM), EDTA (1 mM), Ethidiumbromid (0,5 mg/l)
6 × Probenpuffer	Glycerin (67 % v/v), Bromphenolblau (1 mg/ml)
4 × Trenngel-Puffer	Tris-Base (1,5 M), SDS (0,4 %, w/v), pH 8,8 (mit HCl), über 0,22 µm Filter filtriert
4 × Sammelgel-Puffer	Tris-Base (0,5 M), SDS (0,4 %, w/v), pH 6,8 (mit HCl), über 0,22 µm Filter filtriert
5 × SDS-PAGE-Laufpuffer	Tris-Base (125 mM), Glycin (1 M), SDS (0,5 %, w/v), pH 8,3
SDS-PAGE-Probenpuffer	SDS (2,5 %, w/v), Glycerin (10 %, v/v), β-Mercaptoethanol (320 mM), Tris-HCl (50 mM), Bromphenolblau (0,05 %, w/v), pH 6,8
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 %, w/v), Ethanol (40 %, v/v), Essigsäure (10 %, v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	Ethanol (8 %, v/v), Essigsäure (10 %, v/v)

Enzymverdünnungspuffer	NaCl (50 mM), KCl (50 mM), Tris-HCl (10 mM), KOAc (10 mM), HEPES (10 mM), β -Mercaptoethanol (5 mM), EDTA (1 mM), cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tab. EDTA-free (1/3 Tab./ml), Glycerin (50 % v/v), pH 7,5; Anmerkung: Wurde zum Verdünnen der bei -20°C gelagerten Enzyme verwendet.
<i>E. coli</i> -Zellaufschlußpuffer	MES (6,7 mM), NaOAc 6,7 (mM), HEPES (6,7 mM), EDTA (1 mM), β -Mercaptoethanol (10 mM), NaCl (200 mM), PMSF (0,2 mM), Glycerin (10 % v/v), pH 7,5, über 0,22 μ m Filter filtriert
<i>E. coli</i> -Einfangpuffer	HEPES (20 mM), KOAc (50 mM), $Mg(OAc)_2$ (10 mM), Glycerin (10 % v/v), pH 7,9, über 0,22 μ m Filter filtriert
5 $\times$ <i>E. coli</i> -Einfangpuffer	HEPES (100 mM), KOAc (250 mM), $Mg(OAc)_2$ (50 mM), Glycerin (50 % v/v), pH 7,9
10 $\times$ <i>E. coli</i> -Einfangpuffer	HEPES (200 mM), KOAc (500 mM), $Mg(OAc)_2$ (100 mM), pH 7,9, über 0,22 μ m Filter filtriert (Anmerkung: Dieser Puffer enthält kein Glycerin und wurde verwendet, wenn aus anderer Quelle bereits mehr als 10 % Glycerin im Ansatz vorhanden war.)
Eukaryonten-Einfangpuffer	MES (10 mM), NaOAc (10 mM), HEPES (10 mM), $MgCl_2$ (10 mM), NaCl (150 mM), CHAPS (0,25 %), Glycerin (10 %), β -Mercaptoethanol (5 mM), PMSF (0,2 mM), cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tab. EDTA-free (1 Tab./10 ml), pH 7,5, über 0,22 μ m Filter filtriert
Waschpuffer 1	Tris-HCl (50 mM), NaCl (1 M), EDTA (1 mM), SAH (100 μ M), Octyl- β -D-glucopyranosid (0,05 % w/v), pH 7,5, über 0,22 μ m Filter filtriert (Anmerkung: mittlerweile wird statt Octyl- β -D-glucopyranosid 0,1 % CHAPS verwendet)
Waschpuffer 2	Ammoniumacetat (50 mM), Octyl- β -D-glucopyranosid (0,05 % w/v), pH 7,5, über 0,22 μ m Filter filtriert
Ex-Vivo-SMILing-Puffer	Tris-OAc (20 mM), KOAc (50 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (0,01 % v/v), pH 5,95

5.2 Allgemeine Methoden

5.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Mini Sub Gel GT Gelkammern mit dem dazugehörigen Hochspannungsnetzteil Power Pac 300 durchgeführt. Zum Herstellen der 1 %igen Gele wurden 0,35 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben (250 ml) mit $0,5 \times$ TBE-Puffer + EtBr (35 ml) versetzt und in einem handelsüblichen Haushalts-Mikrowellenherd bis zum Sieden erhitzt. Nachdem sich die Agarose unter vorsichtigem Schwenken vollständig gelöst hatte, wurde nochmals bis zu Sieden erhitzt. Danach wurde die flüssige Mischung in die vorbereitete, bereits mit einem Kamm versehene Gelkammer gegossen und bis zur Verfestigung des Gels bei Raumtemperatur auf einer ebenen Fläche belassen. Nun wurden Kamm und Gießhilfen entfernt und das Gel, sowie ca. $0,5 \times$ TBE-Puffer + EtBr (1 l) auf 4°C temperiert. Die Elektrophoreseapparatur wurde mit dem kalten $0,5 \times$ TBE-Puffer + EtBr befüllt, die vorbereiteten Proben (jeweils 10 µl Probe mit 2 µl $6 \times$ Probenpuffer) in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese ohne weitere Kühlung bei 66 V durchgeführt (ca. 40 min).

5.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit einer Mini Protean 3 Cell Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Zur Herstellung des Trenngels (2/3 des gesamten Gels) wurden $4 \times$ Trenngel-Puffer (1200 µl), H₂O (1250 µl), Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (2500 µl), APS-Lösung (50 µl, 10 % in H₂O) und TEMED (2 µl) gemischt, in den aus zwei Glasplatten mit 1 mm Abstand bestehenden Gelträger gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min wurde das Isopropanol durch Spülen mit H₂O entfernt und das Sammelgel (oberes Drittel des gesamten Gels) gegossen. Hierzu wurden $4 \times$ Sammelgel-Puffer (375 µl), H₂O (860 µl), Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (250 µl), APS-Lösung (15 µl, 10 % in H₂O) und TEMED (1,5 µl) gemischt und in den Gelträger gefüllt. Direkt im Anschluss daran wurde ein Kamm zwischen die beiden Glasplatten geschoben. Nach ca. 30 min war die Polymerisation beendet und die mit dem Gel gefüllten Glasplatten wurden in eine Gelkammer eingesetzt. Die Gelkammer wurde mit eiskaltem SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt und das Gel mit den Proben beschickt. Zuvor wurden die Proben mit SDS-PAGE-Probenpuffer (15 µl) versetzt (flüssige Proben wurden 1:1 mit doppelt konzentriertem SDS-PAGE-Probenpuffer gemischt und mit SDS-PAGE-Probenpuffer auf 15 µl aufgefüllt) gemischt, 5 min bei 95°C inkubiert und

anschließend auf Eis gelagert. Nicht verwendete Geltaschen wurden mit SDS-PAGE-Probenpuffer (15 µl) befüllt. Während der Elektrophorese bei konstanter Spannung (111 V) wurde die Elektrophoresekammer mit Eiswasser gekühlt.

Es wurden ausschließlich frisch hergestellte Gele verwendet. Die Gelträger wurden vor Gebrauch gründlich mit VE-Wasser gespült, unter fließendem Milli-Q Wasser abgespült und in einem 37°C Inkubator staubgeschützt luftgetrocknet.

5.2.3 Coomassie-Färbung

Zur Sichtbarmachung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden die Gele mindestens für 2 h (z.T. bis zu 2 d) unter leichtem Schütteln mit Coomassie-Färbelösung behandelt und anschließend in Coomassie-Entfärbelösung für 1–5 h inkubiert. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Gele mehrere Tage gewässert und anschließend entweder direkt oder nach Trocknung mit einem Geltrockner digital photographiert.

5.2.4 Silberfärbung

Für die Silberfärbung von SDS-Gelen wurden die Gele über Nacht unter leichtem Schütteln in Fixierlösung (100 ml, Ethanol/Essigsäure/Wasser, 5/1/4, v/v/v) inkubiert. Danach wurden die Gele mit ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit (Sigma) gefärbt. Abweichend von der Anleitung des Herstellers wurden von allen Lösungen (außer H₂O) 50 ml statt 100 ml verwendet und im Anschluss an den Sensibilisierungsschritt wurde ein zusätzlicher Waschschrift mit H₂O durchgeführt.

Für die Dokumentation der Gele wurden diese unmittelbar nach dem Färben auf einen Weißlichttransilluminator gelegt und mit einer Digitalkamera vom Typ PowerShot A410 (Canon) photographiert oder mit einem Photodokumentationssystem der Firma Intas digitalisiert. Anschließend wurden die Gele mit einem Geltrockner (Gel Dryer Model 583, Bio-Rad) auf Whatman-Papier getrocknet.

5.2.5 Photometrische Messungen

Alle photometrischen Messungen wurden mit einem Cary E3 UV-Vis Photospektrometer der Firma Varian im Zweistrahlmodus durchgeführt. Die Spaltbreite des Geräts war dabei so eingestellt, dass 90 % der für die Messung verwendeten Lichtenergie auf einem 2 nm Ausschnitt des Spektrums entfiel. Die Signalglättungszeit betrug während aller Messungen 5 s und die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt.

Für die Ermittlung der OD₆₀₀ von Bakterienkulturen wurden Einwegküvetten aus Polystyrol verwendet. Alle anderen Messungen wurden in Quarzküvetten durchgeführt. Die Quarzküvetten wurden in 10%igem H₂O₂ gelagert, vor Gebrauch mit Wasser gespült und in einer Küvettenschleuder getrocknet.

5.2.6 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford wurde das *Coomassie Protein Assay Reagent Kit* verwendet. 1–10 µg Protein (mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt) wurden in 1 cm Einwegküvetten vorgelegt, mit Bradford-Reagenz (900 µl) versetzt, gründlich durchmischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD₅₉₅ gegen eine identisch behandelte, aber proteinfreie Lösung als Blindwert gemessen. Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte anhand einer Eichkurve (erstellt mit Rinderserumalbumin).

5.2.7 Konzentrationsbestimmung bei Fangverbindungen

Die Konzentrationen der Fangverbindungen wurden über ihren Biotin-Rest bestimmt. Dazu wurde das kommerziell erhältliche HABA/Avidin Reagenz (Sigma) verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde nur mit 1/10 des vorgeschlagenen Volumens gearbeitet. Das Reagenz (90 µl) wurde in eine Quarzküvette (70 µl) gefüllt und die OD₅₀₀ bestimmt (X). Danach wurde die Lösung in der Küvette mit der zu untersuchenden Fangverbindung in wässriger Lösung (10 µl) gemischt und erneut die OD₅₀₀ bestimmt (Y). Die Fangverbindungs-Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{Fangverbindung}} \text{ (mM)} = [Y - 0,9 \times X] / 3,4$$

Aliquots (100 nmol) der Fangverbindung wurden in Eppendorfgefäßen (1,5 ml) mit einer Vakuumzentrifuge getrocknet und danach bei -80°C gelagert. Zum Herstellen der typischen Gebrauchslösungen mit 100 µM oder 1000 µM Fangverbindung wurden 1 ml bzw. 100 µl Wasser zugegeben und die Fangverbindung darin gelöst. Die Gebrauchslösungen wurden bei -20°C gelagert.

5.2.8 Gelfiltration

Für die meisten Anwendungen wurden ZebaTM Desalt Spin Columns (0,5 ml, 2 ml oder 10 ml) verwendet. Diese wurde vor Gebrauch mindestens sechsmal mit dem gewünschten Puffer gespült (Zugabe des Puffers mit einer Pipette, nachfolgend zweiminütige Zentrifugation bei 1000 g) und dann mit dem entsprechenden Puffer versetzt bei 4°C gelagert. Erst unmittelbar vor Gebrauch wurde der Puffer durch Zentrifugation entfernt (2 min, 1000 g,

4°C) und die Proben aufgetragen (100 µl bei den 0,5 ml Säulen, 700 µl bei den 2 ml Säulen und 4 ml bei den 10 ml Säulen). Unmittelbar danach erfolgte die Elution in frische Auffanggefäße (2 ml Eppendorfgefäße für 0,5 ml Säulen, 15 ml Kunststoffgefäße für 2 ml Säulen und 50 ml Kunststoffgefäße für 10 ml Säulen) durch erneute Zentrifugation (2 min, 1000 g, 4°C).

Für die Zentrifugation der 2 ml und 10 ml Säulen wurde ein JS-4.3 Ausschwenkrotor verwendet, so dass auf die Orientierung der Säulen nicht geachtet werden musste. Die 0,5 ml Säulen wurden in Tischzentrifugen mit Festwinkelrotor zentrifugiert und die Säulen wurden immer mit der gleichen Orientierung in den Rotor gestellt.

Während der Herstellung von Zelllysaten wurden teilweise auch NAP-5 und PD-10 Säulen verwendet. Die PD-10 Säulen wurden bei 0°C exakt nach Herstellerangaben verwendet. Die NAP-5 Säulen wurden bei 4°C verwendet und vor dem Auftragen der Proben mit dem gewünschten Puffer (10 ml) gespült. Unmittelbar danach wurde die Probe (0,5 ml) aufgetragen und nach dem vollständigen Einsickern der Probe in das Säulenmaterial mit dem betreffenden Puffer (200 µl) nachgespült. Danach wurden die Proteine mit Puffer (650 µl) eluiert.

5.3 Herstellung von Zelllysaten

5.3.1 Herstellung von Zelllysaten aus *E. coli*

Für die Herstellung des bei den meisten mit *E. coli*-Zelllysaten durchgeführten Experimenten verwendeten Lysats wurden LB-Medium (2 ml) in einem Reagenzglas direkt aus dem bei -80°C (mit 50 % Glycerin) gelagerten Bestand angeimpft und 8 h unter Schütteln (250 rpm) bei 37°C inkubiert. Danach wurde LB-Medium (250 ml) in einem Schikanekolben (1 l) mit dieser Vorkultur angeimpft und 12 h unter Schütteln (166 rpm) bei 37°C inkubiert. Vier Erlenmeyerkolben (5 l) mit LB-Medium (jeweils 1 l) wurden auf 37°C vortemperierte, mit der Vorkultur angeimpft (jeweils 50 ml) und unter Schütteln (166 rpm) bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (30 min, 4200 rpm, 4°C). Hierfür wurde ein Ausschwenkrotor vom Typ JS-4.3 mit vier Zentrifugenbechern (700 ml) verwendet, so dass insgesamt vier Durchläufe nötig waren, um das Zellmaterial zu ernten. Während der Zentrifugation wurde die Restmenge der Zellkulturen weiter unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am Ende wurden die in den vier Zentrifugenbechern befindlichen Zellen in eiskaltem Wasser resuspendiert (jeweils in 100 ml), in einem der Zentrifugenbecher vereinigt und nochmals durch Zentrifugation

pelletiert (30 min, 4200 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das resultierende frische Zellmaterial (ca. 25 g) bei -80°C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurde das Zellmaterial auf Eis aufgetaut und in eiskaltem *E. coli*-Zellaufschlußpuffer (100 ml) resuspendiert. Es wurden jeweils 40 ml dieser Suspension in einem speziellen, mit vier Kühlschleifen versehenen Zellaufschlußgefäß mit einem Sonifier 250 Ultraschalldesintegrator behandelt (10 min, *dutycycle* 15 %, *output control* 10, mit großer Ultraschallspitze und bei Kühlung durch Eiswasser). Danach wurden die Zelltrümmer mit einem JA-17 Festwinkelrotor in SS-34 Zentrifugenröhrchen pelletiert (60 min, 35 000 g, 4°C). Die klaren Überstände wurden anschließend in zwei JumbosepTM Konzentratoren mit 10 K Membranen durch Membran-Ultrafiltration aufkonzentriert (12 h, 500 g, 4°C, JS-4.3 Ausschwenkrotor).

Das aufkonzentrierte Zelllysate (17,5 ml) wurde einer Gelfiltration mit NAP-5 Säulen unterzogen. Hierbei wurden die Säulen mit *E. coli*-Zellaufschlußpuffer equilibriert, Zelllysate (500 µl pro Säule) aufgetragen und mit *E. coli*-Zellaufschlußpuffer (200 µl) nachgespült. Danach wurden die Proteine mit *E. coli*-Zellaufschlußpuffer (650 µl) eluiert. (Anmerkung: Für diesen Gelfiltrationsschritt sollten keine PD-10 Säulen verwendet werden. Am günstigsten wäre vermutlich die Verwendung von ZebaTM Desalt Spin Columns).

Nach der Gelfiltration wurde das resultierende Eluat (23 ml) mit *E. coli*-Zellaufschlußpuffer verdünnt (auf 60 ml) und mit einem JumbosepTM Konzentrator mit 10 K Membran wieder eingengt (auf 11 ml, 12 h, 350 g, 4°C). Für die Lagerung bei -20°C wurde Glycerin (9 ml) zugesetzt. Bis zu ihrer Verwendung wurden Zelllysate durchgängig bei -20°C aufbewahrt (und nicht zwischendurch zur Entnahme von Material auf Eis gelagert).

Alle verwendeten *E. coli*-Zelllysate wurden nach dem oben aufgeführten Schema hergestellt. Lediglich die verwendeten Mengen an Zellmaterial variierten. Die Volumina der Lösungen während der einzelnen Arbeitsschritte wurden dem angepasst.

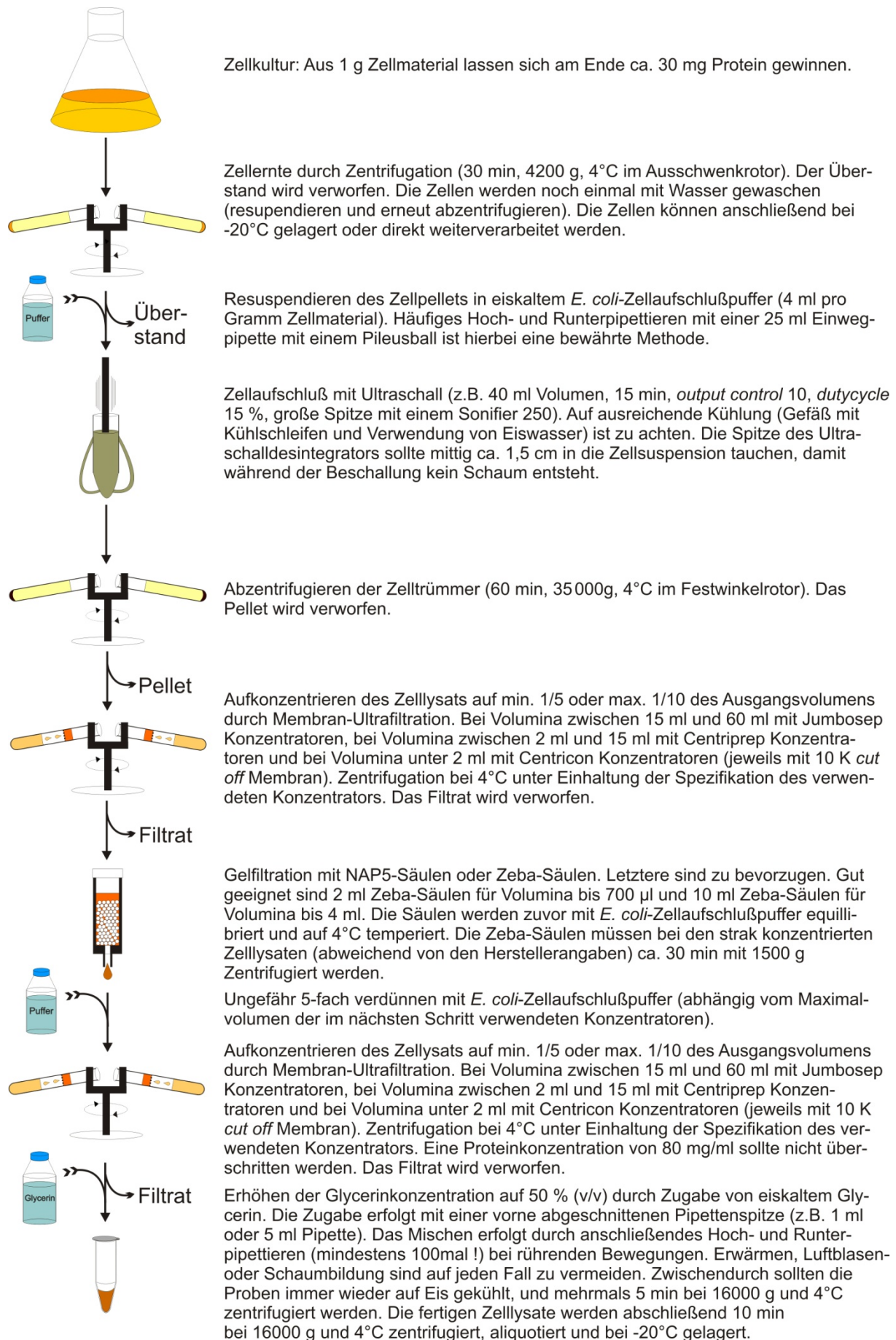
Einige *E. coli*-Zelllysate wurden aus *E. coli* Zellen hergestellt, die unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in TB-Medium angezogen wurden. Das Kulturvolumen betrug dabei jeweils 1 l. Es wurden Erlenmeyerkolben (5 l) verwendet, die mit 200 rpm bei 37°C geschüttelt wurden. Die Zellen zweier Ansätze (einer mit *E. coli* DH5α und einer mit *E. coli* BL21) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von ca. 4 geerntet, während die Zellen eines anderen *E. coli* DH5α-Ansatzes erst 12 h später bei einer OD₆₀₀ von ca. 30 geerntet wurden (stationäre Wachstumsphase). Ein weiterer, bei einer OD₆₀₀ von 4 geernteter *E. coli* DH5α-Ansatz wurde mit einem Stopfen verschlossen unter anaeroben Bedingungen kultiviert.

Vom M.TaqI-exprimierenden *E. coli* Stamm ER2267-pA1 wurden 1 l-Kulturen in Erlenmeyerkolben (5 l) bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 in LBA-Medium inkubiert, dann mit 0,1 mM IPTG versetzt und bis zur Zellernte noch 30 min weiter inkubiert.

Nach der Ernte der Zellen wurde auf eine durchgängige Kühlung entweder durch Lagerung auf Eis oder durch die Verwendung von auf 4°C temperierbaren Geräten (Kühlschrank oder Zentrifuge) geachtet. Die verwendeten Gerätschaften (z.B. Gelfiltrationssäulen, Zentrifugenröhrchen etc.) waren vorgekühlt. Desweiteren galt der Vermeidung von Luftblasen während der Aufarbeitung der Proben besonderes Augenmerk.

Schema 7 (siehe unten) gibt einen schematischen Überblick über die Herstellung von Zelllysaten aus Prokaryonten. Da die verwendeten Gelfiltrationssäulen und Konzentratoren in unterschiedlichen Größen verfügbar sind, können relativ flexibel kleinere oder größere Mengen Zelllysate hergestellt werden. Auch der zeitliche Ablauf ermöglicht eine gewisse Flexibilität, da das Aufkonzentrieren der Zelllysate durch Ultra-Membranfiltration schwerefeldgetrieben in einer Zentrifuge erfolgt. Wenn die Zelllysatherstellung nach der Zellöffnung nicht an einem Tag abgeschlossen wird, so kann das Aufkonzentrieren bei niedrigen g-Werten über Nacht erfolgen.

Die in Schema 7 aufgeführte Vorgehensweise hat sich bewährt und liefert hochkonzentrierte Zelllysate, die bei -20°C mehrere Jahre gelagert werden können.



Schema 7 : Herstellung von Zelllysaten aus *E. coli*.

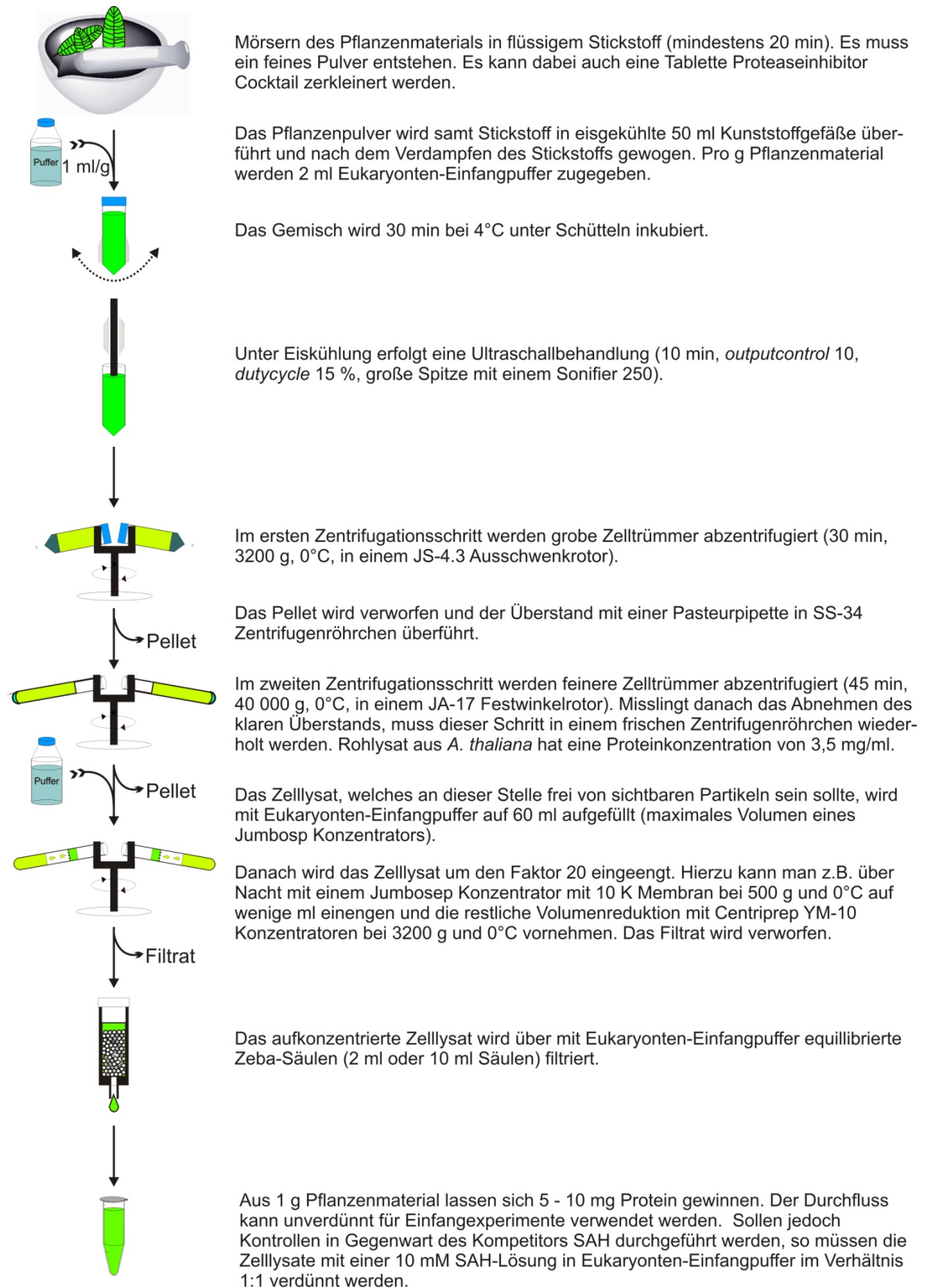
5.3.2 Herstellung von Zelllysaten aus Pflanzen

Für die Herstellung pflanzlicher Zelllysate wurden die verwendeten Pflanzen oder Pflanzenteile mit einer Schere abgetrennt und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial bei -80°C gelagert.

Ungefähr 10 g gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vortemperierten Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben, wobei immer flüssiger Stickstoff vorhanden war. Danach wurde das Pflanzenmaterial zusammen mit etwas flüssigem Stickstoff in ein Kunststoffgefäß (50 ml) überführt, nach dem Verdampfen des Stickstoffs mit Eukaryonten-Einfangpuffer versetzt (2 ml pro g Pflanzenmaterial) und 30 min bei 4°C in einem Thermomixer 5433 geschüttelt. Im Anschluss erfolgte eine zehnminütige Behandlung mit Ultraschall (mit einem Sonifier 250 mit großer Spitze, *dutycycle* 10 %, *output control* 10, im 50 ml Kunststoffgefäß bei Kühlung mit Eiswasser). Danach wurden grobe Zelltrümmer durch eine erste Zentrifugation pelletiert (30 min, 3200 g, 0°C, in einem JS-4.3 Ausschwenkrotor) und feinere Zelltrümmer durch eine zweite Zentrifugation nach Überführung in SS-34 Zentrifugenröhrchen abgetrennt (45 min, 40 000 g, 0°C, in einem JA-17 Festwinkelrotor). Der klare Überstand wurde mit Eukaryonten-Einfangpuffer auf 60 ml verdünnt und über Nacht mit einem JumbosepTM Konzentrator mit 10 K Membran wieder eingengt (auf ca. 6 ml, 12 h, 500 g, 4°C). Danach wurde das Lysat unter Verwendung eines Centriprep YM-10 Konzentrator weiter eingengt (auf ca. 3 ml) und durch vier mit Eukaryonten-Einfangpuffer equilibrierte ZebaTM Desalt Spin Columns (2 ml) einer Gelfiltration unterzogen. Unmittelbar nach der Gelfiltration wurde das Zelllysate für Einfangexperimente unter Verwendung von Fangpartikeln verwendet. Bei Experimenten, die in Anwesenheit des Kompetitors SAH durchgeführt wurden, erfolgte eine 1:1-Verdünnung mit einer SAH-Lösung (10 mM) in Eukaryonten-Einfangpuffer.

Für die meisten Experimente mit *A. thaliana* wurde 1 g Pflanzenmaterial pro Ansatz eingesetzt. Aus dieser Menge ließen sich ungefähr 5 mg Gesamtprotein gewinnen.

Schema 8 gibt einen Überblick über die Herstellung pflanzlicher Zelllysate. Die vorgeschlagenen Mengen beziehen sich auf Blattmaterial von *A. thaliana* und müssen bei Pflanzenmaterial mit geringerem Proteingehalt eventuell deutlich erhöht werden.



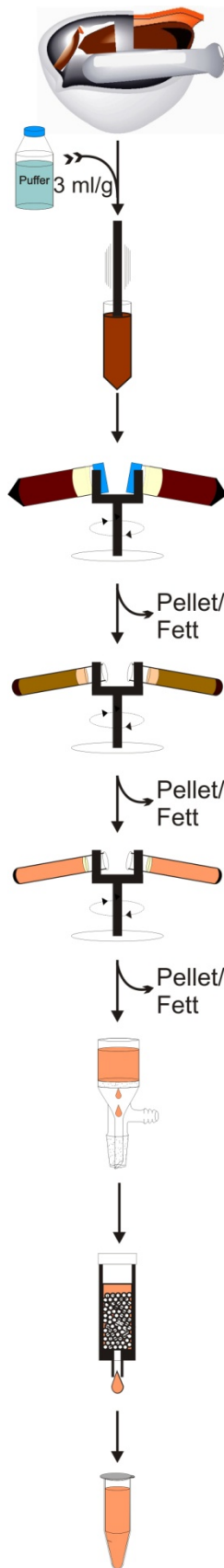
Schema 8: Herstellung pflanzlicher Zelllysate.

5.3.3 Herstellung von Zelllysaten aus *Sus scrofa*

Ein ca. 1 Jahr altes Hausschwein wurde durch einen mit einer Elektrozange verabreichten Stromschlag betäubt und durch herznahes Anstechen der Hauptschlagader getötet. Nach 5 min wurde das Schwein für ca. 5 min in einer Enthaarungsmaschine inkubiert. Unmittelbar danach wurde der Bauch- und Brustraum geöffnet, ein Stück der Leber entnommen, in fingerdicke Streifen geschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. 5 min später wurde auch das Gehirn entnommen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurden die Gewebeproben bei -80°C gelagert.

Für die Herstellung der Zelllysate wurden mehrere Gramm der Gewebeproben zusammen mit einer cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tab. EDTA-free in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zu einem feinen Pulver verarbeitet. Dieses Pulver wurde zusammen mit etwas flüssigem Stickstoff in Kunststoffgefäße (50 ml) überführt. Nach dem Verdampfen des Stickstoffs wurden die Proben gewogen und mit Eukaryonten-Einfangpuffer (3 ml pro Gramm) versetzt. Die Proben wurden unter gelegentlichem, leichtem Schwenken so lange auf Eis inkubiert, bis sie völlig aufgetaut waren und eine relativ homogene, breiartige Konsistenz hatten. Dann erfolgte eine zehnminütige Behandlung mit Ultraschall (mit einem Sonifier 250 mit großer Spitze, *dutycycle* 10 %, *output control* 10, im 50 ml Kunststoffgefäß bei Kühlung mit Eiswasser).

Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Proben einer ersten Zentrifugation unterzogen (10 min, 3200 g, 0°C, in einem JS-4.3 Ausschwenkrotor), wobei sich ein schleimiges Pellet bildete und sich außerdem größere Mengen fettigen Materials auf der Oberfläche abschieden. Mit einer Pasteurpipette wurde das Lysat in vorgekühlte SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt und 60 min bei 0°C und 40 000 g in einem JA-17 Festwinkelrotor zentrifugiert. Danach hatte sich wieder ein schleimiges Pellet gebildet und fettige Substanz auf der Oberfläche abgeschieden. Das Lysat wurde mit einer Pasteurpipette in ein sauberes SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Hierbei bildete sich nur noch ein kleines, glasiges Pellet und es schied sich nur wenig fettige Substanz an der Oberfläche ab. Das klare Lysat wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und einer Vakuumfiltration unterzogen. Hierzu wurde eine entleerte NAP-5 Säule bei mittelstarkem Wasserstrahlvakuum verwendet. Danach wurde das Lysat einer Gelfiltration mit einer mit Eukaryonten-Einfangpuffer equilibrierten ZebaTM Desalt Spin Column Gelfiltrationssäule (2 ml) unterzogen und direkt für Einfangexperimente verwendet.



Das verwendete tierische Probenmaterial muss sehr frisch sein, sollte unmittelbar nach der Probenentnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei -80°C gelagert werden. Für die Lysatherstellung wird eine angemessene Menge des zu untersuchenden Probenmaterials in einem vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Es kann dabei auch eine Tablette Proteaseinhibitor Cocktail mit zerkleinert werden. Aus 1 g Leber lassen sich am Ende ca. 50 mg Gesamtprotein gewinnen.

Das Pulver wird samt flüssigem Stickstoff in ein 50 ml Kunststoffgefäß überführt und nach dem Verdampfen des Stickstoffs gewogen. Pro g Probenmaterial werden 3 ml Eukaryonten-Ausflußpuffer zugegeben. Das Gemisch muss danach so lange auf Eis auftauen, bis beim Schütteln eine homogene Suspension zu erkennen ist.

Unter Eiskühlung erfolgt eine Ultraschallbehandlung (10 min, *output control* 10, *dutycycle* 15 %, große Spitze mit einem Sonifier 250).

In einem ersten Zentrifugationsschritt werden grobe Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 3200 g, 0°C , in einem JS-4.3 Ausschwenkrotor). Dabei setzen sich auch große Mengen Fett an der Oberfläche ab.

Mit einer Pasteurpipette kann das noch nicht völlig klare Zelllysats grob vom Pellet und dem Fett getrennt und in ein vorgekühltes SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt werden.

Im zweiten Zentrifugationsschritt werden feinere Zelltrümmer abzentrifugiert (60 min, 40 000 g, 0°C , in einem JA-17 Festwinkelrotor). Dabei setzt sich auch wieder Fett an der Oberfläche ab.

Mit einer Pasteurpipette wird das Lysat von dem schleimigen Pellet und dem Fett getrennt und in ein neues SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt

Im dritten Zentrifugationsschritt werden erneut feine Zelltrümmer abzentrifugiert (60 min, 40 000 g, 0°C , in einem JA-17 Festwinkelrotor). Es kann sich auch nochmals eine geringe Menge Fett abscheiden.

Bei manchen Gewebetypen gelingt es auch nach dem dritten Zentrifugationsschritt oftmals nicht, das Lysat mit einer Pasteurpipette völlig sauber von Pellet und Fett zu trennen. In diesem Fall kann eine Filtration über eine feine PET-Fritte erfolgen.

Zum Filtrieren des Lysats kann dieses z.B. durch die Fritte einer vom Chromatographie-medium befreiten Zebra-Säule zentrifugiert werden. Auch entleerte NAP-5 Säulen können hierzu verwendet werden, wenn eine geeignete Vakuumanlage zur Verfügung steht.

Spätestens nach der Filtration ist das Lysat so sauber, dass es bei 0°C über mit Eukaryonten-Einfangpuffer equilibrierte Zebra-Säulen (2 ml oder 10 ml Säulen) filtriert werden kann. Abweichend von den Herstellerangaben können hierbei allerdings längere Zentrifugationszeiten (15 min) und bis zu 1500 g erforderlich sein.

Das fertige Zelllysats hat eine Gesamtprotein-Konzentration von 10 - 15 mg/ml und kann unverdünnt für Empfangsexperimente eingesetzt werden. Auch eine Lagerung bei -80°C ist nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff möglich.

Schema 9: Herstellung von Zelllysaten aus tierischen Gewebeproben.

5.4 Einfangen von Proteinen mit Fangverbindungen

5.4.1 Einfangen von Proteinen mit gelösten Fangverbindungen

Die folgenden Beschreibungen sollen einen generellen Überblick über die Vorgehensweise beim Einfangen von Proteinen mit trifunktionellen Fangverbindungen geben. Alle Experimente wurden nach dem aufgeführten Schema durchgeführt. Eventuelle Abweichungen, sowie die Probenvolumina und die Konzentrationen der verwendeten Komponenten bei den unterschiedlichen Experimenten sind im Abschnitt Ergebnisse und Diskussion zusammen mit den Ergebnissen aufgeführt.

Beim Einfangen von Proteinen mit frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen betrug das Ansatzvolumen grundsätzlich 100 µl. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter konsequenter Kühlung auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

Die Ansätze wurden in folgender Reihenfolge in 0,5 ml PCR-Eppendorfgefäßen zusammengefügt:

Wasser

5 × (mit Glycerin) oder 10 × (ohne Glycerin) *E. coli*-Einfangpuffer

eventuelle Zusätze (SAH-Lösung etc.)

Zelllysate oder aufgereinigte MTase (mit 50 % Glycerin)

Fangverbindung (wässrige Lösung)

(Anmerkung: Alternativ können die Proteine auch an letzter Stelle zugegeben werden, was bei empfindlichen Proteinen von Vorteil sein könnte). Die Wahl des Puffers richtete sich nach dem Volumen der zugefügten Proteinlösung und der damit zugefügten Menge an Glycerin. Im Ansatz wurde ein Glyceringehalt zwischen 10 % und 20 % angestrebt. Zelllysate oder aufgereinigte MTasen wurden mit 50 % Glycerin bei -20°C gelagert. Bei weniger als 20 µl zugefügter Proteinlösung wurden 20 µl des 5 × *E. coli*-Einfangpuffers (enthält 50 % v/v Glycerin) verwendet, bei mehr als 20 µl zugefügter Proteinlösung wurden 10 µl des 10 × *E. coli*-Einfangpuffers (enthält kein Glycerin) verwendet.

Vor und nach Zugabe der zu untersuchenden Proteinlösung wurden die Ansätze gründlich gemischt. Das Mischen nach Zugabe der Proteinlösung erfolgte durch mehrfaches Hoch- und Runterpipettieren. Nach Zugabe der Fangverbindung wurden die Ansätze nochmals gründlich gemischt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Flüssigkeit in den Deckel des Probengefäßes geriet. Die komplettierten Proben wurden für 5 min auf Eis inkubiert und danach in einem mit Eiswasser gefüllten Parabolspiegel aus Aluminiumfolie (Durchmesser 8,5 cm) so platziert, dass die Probengefäße mit dem konischen Ende zum Mittelpunkt des Parabolspiegels orientiert waren (vgl. Abb. 76). Die Proben wurden dreimal mit einer

AlienBees B1600 Studioblitzlampe bestrahlt und nach jedem Blitz durch Anschnippen des Probengefäßes kurz gemischt. (Anmerkung: Ein Spritzen in den Deckel des Probengefäßes wurde dabei vermieden. Gegebenenfalls wurden die Proben kurz bei 4°C und mindestens 1000 g zentrifugiert).

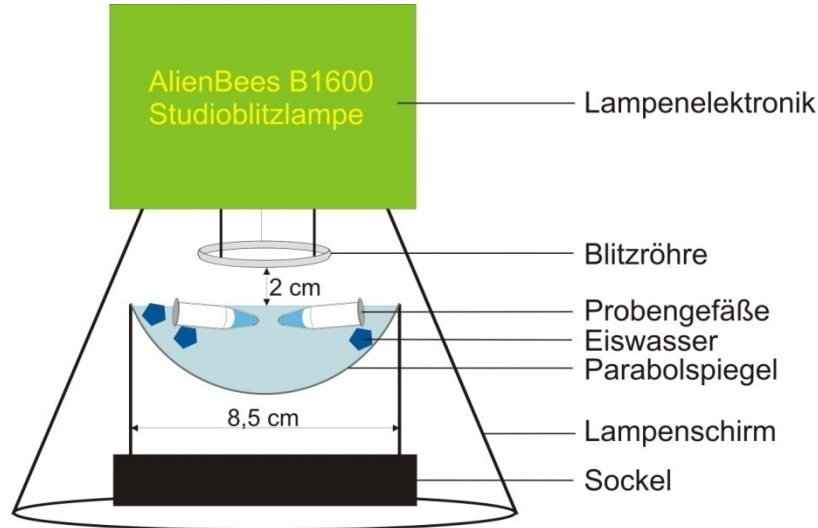
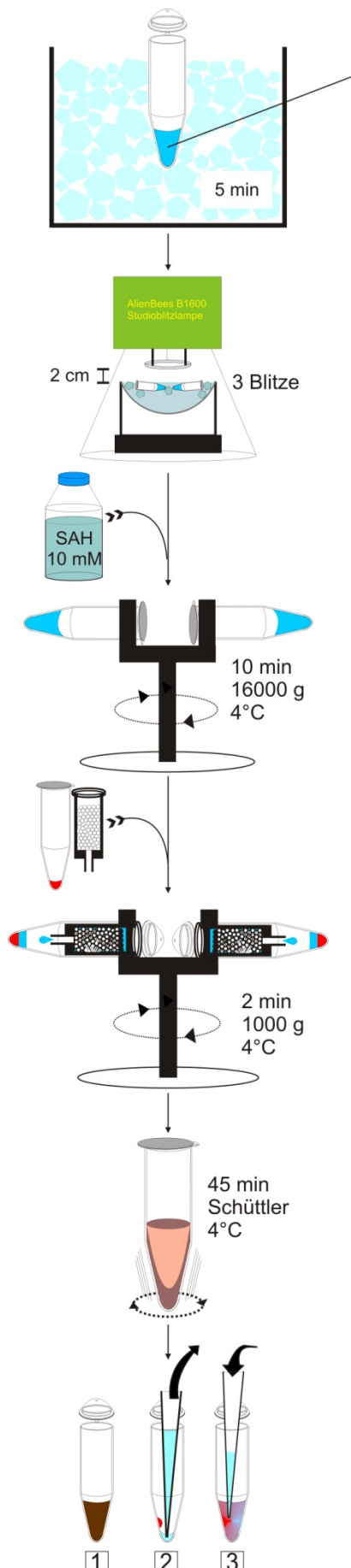


Abb. 76: Vorrichtung zur Bestrahlung der Proben mit einer Hochleistungs-Studioblitzlampe. Proben mit in Lösung befindlichen Fangverbindungen wurden dreimal bestrahlt, Proben mit Fangpartikeln bis zu 60mal. Die Proben wurden zwischendurch mehrfach durch vorsichtiges Anschnippen der Probengefäße gemischt, wobei jedoch ein Spritzen der Proben in den Deckel des Gefäßes vermieden wurde. Gegebenenfalls wurde das Eis im Eiswasser ergänzt. (Anmerkung: Es sei ausdrücklich vor der extremen Helligkeit der verwendeten Blitzlampe gewarnt. Beim direkten Hineinsehen in das Blitzlicht ist eine bleibende Schädigung der Augen möglich!!!)

Nach der Bestrahlung wurden die Proben mit SAH (10 µl, 10 mM in H₂O) versetzt, gemischt und für 10 min bei 16 000 g und 4°C zentrifugiert. Die SAH-Lösung wurde unter Zugabe einer geringen Menge NaOH (ca. 3 µl 1 M NaOH pro ml) hergestellt, da das SAH die Lösung ansonsten ansäuert und sich nicht ausreichend löst. Eingefrorene SAH-Lösungen wurden zum Lösen von ausgefallenem SAH kurz auf ca. 50°C erwärmt und anschließend sofort wieder auf 0°C temperiert.

Die Proben wurden über mit Waschpuffer 1 equilibrierte 0,5 ml Zeba™ Desalt Spin Columns gereinigt (vgl. Abschnitt 5.2.8), um überschüssige Fangverbindung abzutrennen. (Anmerkung: Dieser Schritt ist besonders bei hohen Fangverbindungskonzentrationen erforderlich, da Fangverbindungsmoleküle, die nicht mit einem Protein reagiert haben, später Bindungsstellen auf den zur Isolierung benutzten Magnetpartikel blockieren). Dabei wurden die Proben bei der Elution (2 min, 1000 g, 4°C) direkt auf streptavidinbeschichtete Magnetpartikel (in der Regel 200 µg Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) zentrifugiert. Die Magnetpartikel waren zuvor zweimal mit Waschpuffer 1 gewaschen worden und wurden

zusammen mit Waschpuffer 1 (10 µl) in den für die Elution vorgesehenen 1,5 ml Eppendorfgefäßen vorgelegt und auf 4°C temperiert. Die Proben mit den Magnetpartikeln wurden unter Schütteln inkubiert (45 min, 4°C, in einem Thermomixer 5433). Danach wurden die Magnetpartikel auf Eis mit einem starken Magneten präzipitiert und der Überstand mit einer Pipette vollständig abgenommen und verworfen. Die Magnetpartikel wurden sofort in 180 µl eiskaltem Waschpuffer 1 resuspendiert. Schema 10 gibt einen Überblick über den geschilderten Ablauf.



Wasser	[] µl		Wasser	[] µl
10 x <i>E. coli</i> -Einfangpuffer	10 µl		5 x <i>E. coli</i> -Einfangpuffer	10 µl
(SAH (10 mM))	50 µl	oder	(SAH (10 mM))	50 µl
<i>E. coli</i> -Lysat oder MTase	[> 10] µl		<i>E. coli</i> -Lysat oder MTase	[< 10] µl
Fangverbindung	[] µl		Fangverbindung	[] µl
	100 µl			100 µl

Wasser	[] µl
5 x <i>E. coli</i> -Einfangpuffer	10 µl
(SAH (10 mM))	50 µl
<i>E. coli</i> -Lysat oder MTase	[< 10] µl
Fangverbindung	[] µl
	100 µl

Abhängig von Menge und Glyciergehalt der zu untersuchenden Proteinlösung werden die Ansätze auf Eis unter Verwendung von 5 x oder 10 x *E. coli*-Einfangpuffer zusammengestellt. Nach jeder Zugabe wird erneut gründlich gemischt. Kontrollansätzen kann zusätzlich Kompetitor zugesetzt werden (z.B. SAH). Bei Verwendung von eukaryontischen Zelllysaten werden diese mit Eukaryonteneinfangpuffer (eventuell mit 10 mM SAH) auf die gewünschte Konzentration verdünnt und dann mit der Fangverbindung versetzt.

Die Proben werden dreimal mit einer AlienBees B1600 Studioblitzlampe aus einer Entfernung von 2 cm bestrahlt, wobei die Proben in einem mit Eiswasser gefüllten Aluminiumreflektor schwimmen (siehe Skizze). Nach jedem Blitz wird durch leichtes Anschnippen der Probengefäße gemischt. Ein Spritzen der Flüssigkeit in den Gefäßdeckel ist dabei zu vermeiden, auf konsequente Kühlung ist zu achten.

Nach der Bestrahlung mit der Blitzlampe werden alle Proben mit 10 µl einer hochkonzentrierten Kompetitorlösung (bei SAH-Fangverbindungen 100 mM SAH) versetzt und sofort gemischt.

Danach erfolgt eine zehnmündige Zentrifugation bei 16000 g und 4°C. Falls Protein ausgefallen sein sollte, würde dieses dabei pelletiert werden.

Es werden mit Waschpuffer 1 (oder Eukaryonten-Einfangpuffer) equilibrierte, auf 4°C temperierte 0,5 ml Zeba-Säulen bereitgehalten. Der Equilibrierungspuffer wird erst unmittelbar vor Gebrauch durch Zentrifugation (1 min, 1000 g, 4°C) entfernt. In 1,5 ml Eppendorfgefäßen werden streptavidinbeschichtete Magnetpartikel (z.B. 200 µg Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) in 10 µl Waschpuffer 1 (bzw. Eukaryonten-Einfangpuffer) vorgelegt.

Die Proben werden über die Zeba-Säulen direkt auf die Magnetpartikel eluiert (2 min, 1000 g, 4°C). Während der Elution müssen die Zeba-Säulen die gleiche Orientierung aufweisen wie zuvor beim Equilibrieren.

Die Proben mit den Magnetpartikeln werden anschließend 45 min bei 4°C in einem schnell rotierenden Schüttler wie z.B. einem Thermomixer 5433 inkubiert. Das Schütteln muss so erfolgen, dass eine Schaum- oder Blasenbildung vermieden wird. Die Magnetpartikel dürfen sich in dieser Zeit nicht absetzen.

Nach dem Schütteln werden die Magnetpartikel auf Eis mit einem starken Magneten präzipitiert und der Überstand verworfen. Die Partikel werden in 180 µl des gleichen Puffers aufgenommen, in dem sie sich zuvor befunden haben (Waschpuffer 1 im Falle von *E. coli*-Zelllysaten oder aufgereinigten Proteinen, Eukaryonten-Einfangpuffer im Falle von eukaryontischen Zelllysaten). Danach erfolgt das Waschen der Magnetpartikel, wie es in Abschnitt 5.4.3 beschrieben ist.

Schema 10: Einfangen von Proteinen durch frei in Lösung befindliche Fangverbindung.

5.4.2 Einfangen von Proteinen mit Fangpartikeln

Für die Herstellung von Fangpartikeln wurde die benötigte Menge Magnetpartikel (in der Regel $20\ \mu\text{l} = 200\ \mu\text{g}$ Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Magnetpartikel pro Ansatz) mit der gewünschten Fangverbindung versetzt. Dazu wurden die Magnetpartikel in ihrer Vorratsflasche durch intensives Vortexen vollständig suspendiert, die benötigte Menge in eine $0,5\ \text{ml}$ Eppendorfgefäß überführt und dort mit der Fangverbindung versetzt ($2\ \text{nmol}$ Fangverbindung pro $200\ \mu\text{g}$ Magnetpartikel, zugegeben als $1\ \text{mM}$ wässrige Lösung. Waschen der Magnetpartikel vor Zugabe der Fangverbindung ist nicht erforderlich) und gemischt. Nach $5\ \text{min}$ wurden die Fangpartikel mit einem starken Magnet (N50 oder N52 Neodym-Magnet aus einer alten Festplatte) präzipitiert und der Überstand abgenommen. Die Fangpartikel wurden in $180\ \mu\text{l}$ Wasser resuspendiert, erneut mit dem Magnet präzipitiert und nach dem Abnehmen des Wassers mit dem für die folgende Anwendung benötigten Puffer resuspendiert (für Experimente mit *E. coli*-Zelllysate oder aufgereinigte MTasen *E. coli*-Einfangpuffer, für Lysate aus Eukaryonten Eukaryonten-Einfangpuffer, $10\ \mu\text{l}$ Puffer pro $200\ \mu\text{g}$ Fangpartikel). Anders als bei der Verwendung frei in Lösung befindlicher Fangverbindungen, gibt es bei der Verwendung von Fangpartikeln keine Begrenzung des Ansatzvolumens, da kein volumenbegrenzender Gelfiltrationsschritt erforderlich ist. Für das Einfangen aufgereinigter MTasen oder des Methyloms von *E. coli* wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, trotzdem immer mit einem Volumen von $100\ \mu\text{l}$ gearbeitet. Für das Einfangen von Eukaryontenmethylomen wurden teilweise erheblich größere Ansätze benutzt (bis zu $2\ \text{ml}$). Auch bei der Zusammensetzung der Ansätze gab es einige Unterschiede. Beim Einfangen aufgereinigter MTasen oder des Methyloms von *E. coli* wurden die Ansätze in der folgenden Reihenfolge zusammengegeben:

Wasser

$5 \times$ (mit Glycerin) oder $10 \times$ (ohne Glycerin) *E. coli*-Einfangpuffer

eventuelle Zusätze (SAH-Lösung etc.)

Zelllysate oder aufgereinigte MTase (mit $50\ \%$ Glycerin)

Fangpartikel (in $10\ \mu\text{l}$ *E. coli*-Einfangpuffer)

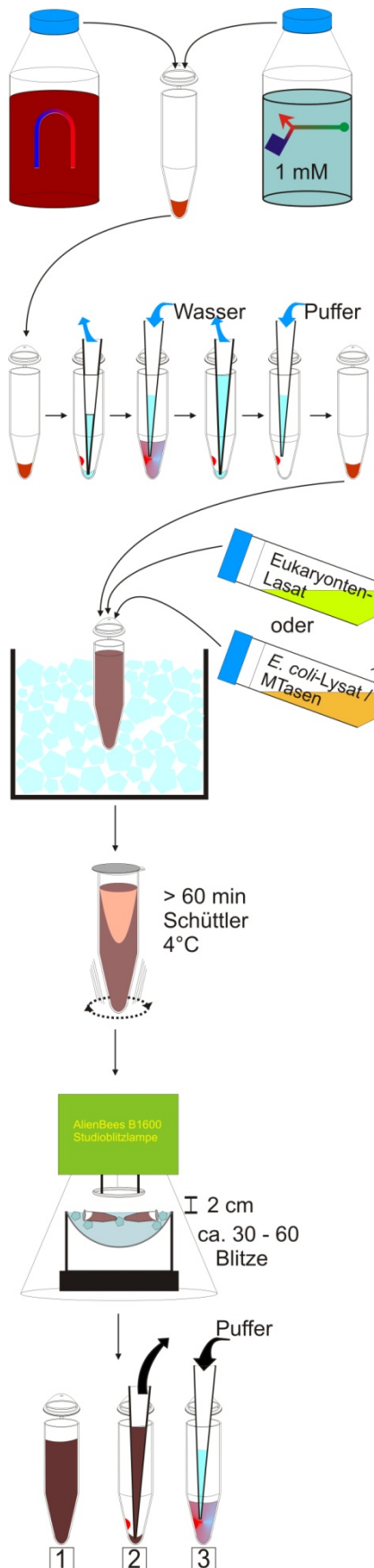
Die Wahl des Puffers richtete sich nach der Menge der zugefügten Proteinlösung und der damit zugefügten Menge an Glycerin. Im Ansatz wurde ein Glyceringehalt zwischen $10\ \%$ und $20\ \%$ angestrebt. Zelllysate oder aufgereinigte MTasen wurden mit $50\ \%$ Glycerin bei -20°C gelagert. Bei weniger als $20\ \mu\text{l}$ zugefügter Proteinlösung wurden $20\ \mu\text{l}$ des $5 \times$ *E. coli*-Einfangpuffers verwendet, bei mehr als $20\ \mu\text{l}$ zugefügter Proteinlösung wurden $10\ \mu\text{l}$ des $10 \times$ *E. coli*-Einfangpuffers (enthält kein Glycerin) verwendet.

Vor und nach Zugabe der zu untersuchenden Proteinlösung wurden die Ansätze gründlich gemischt. Das Mischen nach Zugabe der Proteinlösung erfolgte durch mehrfaches Hoch- und Runterpipettieren.

Da für das Einfangen eukaryontischer Methylome sehr viel mehr Gesamtprotein erforderlich war, die untersuchten Zelllysate nur 10 % Glycerin enthielten und in der Regel direkt nach ihrer Herstellung verwendet wurden, konnten die Lysate unverdünnt verwendet und direkt mit den Fangpartikeln versetzt werden (suspendiert in 10 µl Eukaryonten-Einfangpuffer). Wenn weitere Zusätze wie z.B. SAH im Ansatz erwünscht waren, wurden diese in Eukaryonten-Einfangpuffer gelöst und im Verhältnis 1:1 mit den Ansätzen gemischt. Für Probenvolumina bis 700 µl wurden 0,5 ml PCR-Eppendorfgefäße, bei Probenvolumina von mehr als 700 µl wurden 1,5 ml oder 2 ml Eppendorfgefäße verwendet.

Unmittelbar nach Zugabe der Fangpartikel wurden die Ansätze für mindestens 1 h unter Schütteln bei 4°C, in einem Thermomixer 5433 inkubiert. Einige Ansätze wurden jedoch auch deutlich länger inkubiert (siehe Beschreibung unter den entsprechenden Abbildungen im Ergebnisteil). Danach erfolgte die Photoaktivierung mit einer AlienBees B1600 Studioblitzlampe. Dazu wurden die Proben in einem mit Eiswasser gefüllten Parabolspiegel aus Aluminiumfolie (Durchmesser 8,5 cm) so platziert, dass die Probengefäße mit dem konischen bzw. runden Ende zum Mittelpunkt des Parabolspiegels orientiert waren (vgl. Abb. 76). Dort wurden die Proben 30 – 60mal mit der Blitzlampe bestrahlt. Nach jeweils fünf Blitzen wurden die Proben gemischt (kleine Proben mit 100 µl durch vorsichtiges Anschnippen des Probengefäßes, Proben mit mehr als 200 µl durch Schütteln des Probengefäßes).

Nach der Photoaktivierung wurden die Fangpartikel mit einem starken Magnet präzipitiert, der Überstand entfernt und die Fangpartikel wieder in 180 µl des jeweiligen Puffers aufgenommen (für *E. coli*-Zelllysate oder aufgereinigte MTasen *E. coli*-Einfangpuffer, für Lysate aus Eukaryonten Eukaryonten-Einfangpuffer).



Die benötigte Menge streptavidinbeschichteter Magnetpartikel (z.B. 200 µg Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) wird aus der Vorratsflasche entnommen und mit Fangverbindung (2 nmol pro 200 µg Magnetpartikel) versetzt und gemischt. Zum Binden der Fangverbindung an die Magnetpartikel wird das Gemisch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mehrfach durch leichtes Anschnippen gemischt.

Dabei werden die Magnetpartikel durch die Beladung mit der Fangverbindung zu sogenannten Fangpartikeln.

Die Fangpartikel werden mit einem Magneten präzipitiert, einmal mit 180 µl Wasser gewaschen und danach in einer kleinen Menge des später benötigten Puffers (*E. coli*-Einfangpuffer oder Eukaryonten-Einfangpuffer, ca. 10 µl pro 200 µg Fangpartikel) aufgenommen.

Die Fangpartikel werden in geeigneten Probengefäßen (beabsichtigtes Endvolumen beachten) auf Eis vorgelegt und mit den zu untersuchenden Proben versetzt.

Eukaryontische Zellschüttellösungen werden in der Regel unverdünnt verwendet. Es sollte eine Gesamtproteinmenge von 5 - 10 mg pro Ansatz kalkuliert werden. Das Ansatzvolumen kann dabei bis zu 2 ml betragen.

Zellschüttellösungen aus *E. coli* oder aufgereinigte MTasen werden mit *E. coli*-Einfangpuffer verdünnt. Ansätze mit *E. coli*-Zellschüttellösungen sollten eine Proteinkonzentration von 3,5 - 5 mg/ml bei einer Gesamtproteinmenge von 0,35 - 0,5 mg besitzen. Zum Einfangen gereinigter MTasen haben sich Stoffmengen von 100-500 pmol bewährt.

Für eventuelle Verdrängungskontrollen müssen die Ansätze im Verhältnis 1:1 mit einer SAH-Lösung (10 mM, im verwendeten Puffer) gemischt werden.

Die Ansätze müssen vor der Photoaktivierung eine gewisse Zeit lang bei 4°C unter Schütteln inkubiert werden. Dabei stellen 60 min das Minimum dar, günstiger sind Inkubationszeiten im Bereich von einigen Stunden. Im Extremfall kann auch über Nacht inkubiert werden. Das Schütteln muss so erfolgen, dass sich die Fangpartikel nicht absetzen. Es dürfen dabei aber keine Blasen oder Schaum entstehen. 1,5 ml Eppendorfgefäße in Kombination mit einem Thermomixer 5433 haben sich dabei bewährt. 0,5 ml Eppendorfgefäße sind ungeeignet.

Die Proben werden ca. 30 - 60mal mit einer AlienBees B1600 Studio-Blitzlampe aus einer Entfernung von 2 cm bestrahlt, wobei die Proben in einem mit Eiswasser gefüllten Aluminiumreflektor schwimmen (siehe Skizze). Nach jeweils 5 Blitzen wird durch leichtes Anschnippen der Probengefäße gemischt. Bei kleineren Proben sollte dabei keine Flüssigkeit in den Deckel spritzen. Nach jedem Blitz werden die Probengefäße zur besseren Kühlung sofort kurz vollständig im Eiswasser untergetaucht.

Nach der Photoaktivierung werden die Fangpartikel auf Eis mit einem starken Magneten präzipitiert und der Überstand verworfen. Die Partikel werden in 180 µl des gleichen Puffers aufgenommen, in dem sie sich zuvor befunden haben (*E. coli*-Einfangpuffer im Fall von *E. coli*-Zellschüttellösungen oder aufgereinigten Proteinen, Eukaryonten-Einfangpuffer im Falle von eukaryontischen Zellschüttellösungen). Danach erfolgt das Waschen der Fangpartikel, wie es in Abschnitt 5.4.3 beschrieben ist.

Schema 11: Einfangen von Proteinen mit Fangpartikeln.

5.4.3 Waschen der auf Magnetpartikel immobilisierten Proteine

Nach dem Einfangen von Proteinen mit frei in Lösung befindlichen Fangverbindungen oder mit Fangpartikeln sind die eingefangenen Proteine letztendlich kovalent mit Fangverbindungsmolekülen verknüpft, die wiederum über die extrem stabile Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an streptavidinbeschichtete Magnetpartikel gebunden sind.

Zum Abtrennen der nicht-kovalent verknüpften Proteine wurde eine umfangreiche Waschprozedur mit bis zu zwölf Waschschritten durchgeführt.

Ein einzelner Waschschrift setzt sich zusammen aus dem Präzipitieren der Magnetpartikel, dem Abnehmen des Überstands und dem anschließenden Resuspendieren der Magnetpartikel. Alle Waschschriffe wurden mit einer 200 µl Kolbenhub-Luftpolsterpipette vom Typ Pipetman P200 und den dazugehörigen D200 Kunststoffspitzen durchgeführt. Zum Waschen wurden jeweils 180 µl der unterschiedlichen Waschlösungen verwendet.

Abb. 77 gibt einen Überblick über den Ablauf eines Waschschriffes.

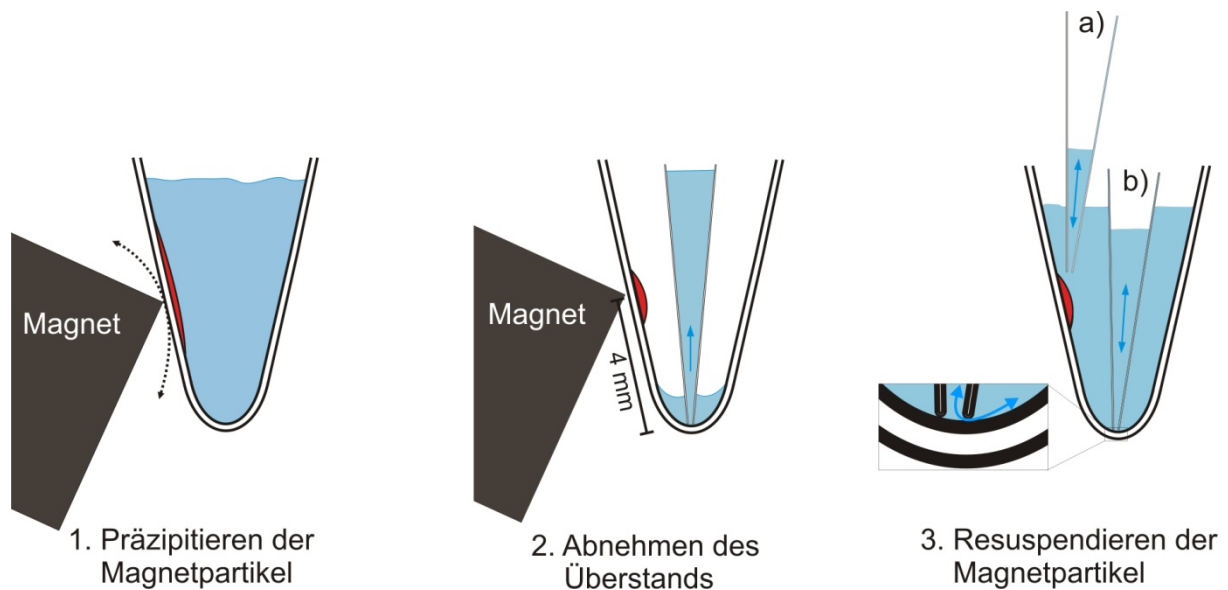


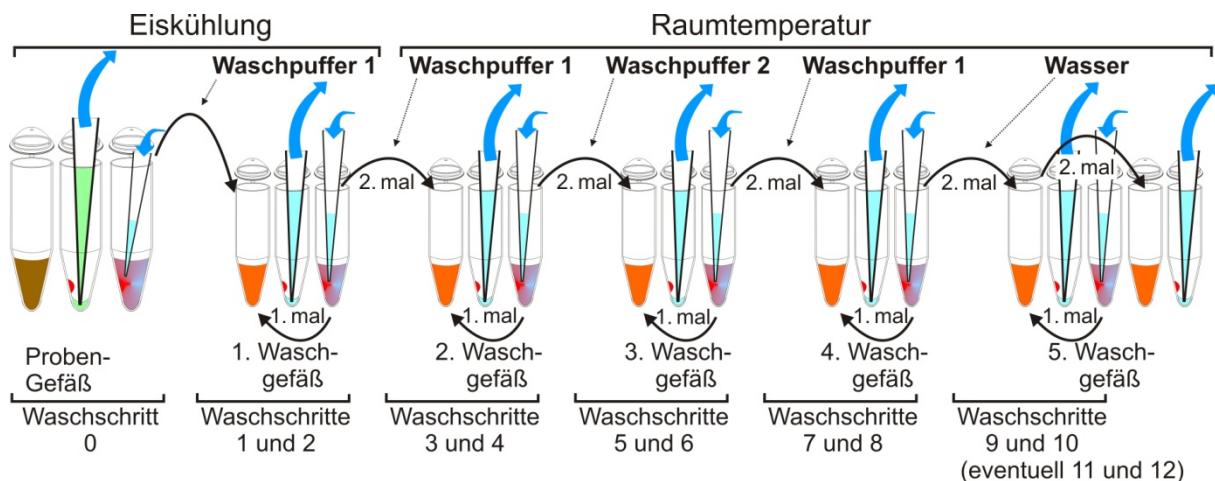
Abb. 77: Durchführung eines einzelnen Waschschriffes. Nähere Erklärungen zu dieser Abbildung finden sich im Text.

Ein einzelner Waschschrift beginnt mit der Magnetopräzipitation der Magnetpartikel und endet mit deren Resuspendierung in frischer Waschlösung. Zuerst wurden die Magnetpartikel grob an die untere Gefäßwandung des verwendeten Probengefäßes (wenn möglich 0,5 ml Eppendorfgefäße) präzipitiert. Hierzu wurden die Probengefäße für ca. 3 min in seitlich am verwendeten Magneten angebrachte Halterungen platziert. Danach wurde das Probengefäß so lange mit Auf- und Abbewegungen an einer stark magnetischen Kante des Magneten vorbeigeführt, bis die zuvor auf der Gefäßwandung verteilten Magnetpartikel an einer Stelle konzentriert waren (vgl. Punkt 1 in Abb. 77). Die auf diese Weise konzentrierten, der Kante

des Magneten folgenden Magnetpartikel wurden ca. 4 mm von der „Spitze“ des Eppendorfgefäßes mit dem Magneten festgehalten und die partikelfreie Lösung mit der Pipette vollständig abgenommen (vgl. Punkt 2 in Abb. 76). Wenn dabei sichtbare Mengen der Magnetpartikel mit in die Pipettenspitze gerieten, wurden die Magnetpartikel wieder vollständig resuspendiert und der gesamte Vorgang wiederholt. Für die Entnahme des Überstands wurde die verwendete Pipette auf 190 µl umgestellt oder etwas über den ersten Druckpunkt hinaus betätigt, damit die Flüssigkeit möglichst vollständig abgenommen werden konnte. Danach erfolgte zuerst die Entleerung der Pipettenspitze in ein Abfallgefäß, dann erst wurde auch die Pipettenspitze verworfen (wird die Pipettenspitze zusammen mit der darin befindlichen Lösung abgeworfen, kommt es zu Kontaminationen des Pipettenschäfts). Unmittelbar darauf wurden mit einer frischen, nach optischer Kontrolle völlig staubfreien Pipettenspitze 180 µl der für den nächsten Schritt vorgesehenen Waschlösung in das Probengefäß pipettiert. Unter Vermeidung von direktem Kontakt zwischen Magnetpartikelpellet und Pipettenspitze wurden die Magnetpartikel durch mehrfaches Rauf- und Runterpipettieren resuspendiert (vgl. Punkt 3 a) in Abb. 76). Danach wurde die Pipettenspitze auf dem Boden des Probengefäßes platziert und die Suspension nochmals 15mal hoch- und runterpipettiert. Dies geschah so, dass die Suspension nur schwer durch einen engen Spalt zwischen Gefäßboden und Pipettenspitze gepresst werden konnte und starke Scherkräfte auftraten (vgl. Punkt 3 b und Vergrößerung in Abb. 76). Nach jedem zweiten Waschschrift erfolgte danach eine Überführung in ein neues Probengefäß.

Nach dem Immobilisieren der kovalent an eine Fangverbindung verknüpften Proteine auf streptavidinbeschichteten Magnetpartikel bzw. der kovalenten Verknüpfung von Proteinen an Fangpartikeln wurden die Partikel präzipitiert (Eiskühlung), der Überstand verworfen und die Partikel wieder im gleichen Puffer aufgenommen, in dem sie zuvor vorgelegen haben (nullter Waschschrift). Nach erneuter Magnetpräzipitation wurden die Magnetpartikel in 180 µl Waschpuffer 1 resuspendiert (erster Waschschrift), in frische 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt und dort nochmal mit Waschpuffer 1 gewaschen (zweiter Waschschrift). Von diesem Moment an erfolgten die restlichen Waschschriffe bei Raumtemperatur. Nach der zweiten Magnetpräzipitation in diesen Gefäßen wurden die Magnetpartikel in 180 µl Waschpuffer 1 resuspendiert (dritter Waschschrift), in frische 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt und dort nochmals mit Waschpuffer 1 gewaschen (vierter Waschschrift). Nach der zweiten Magnetpräzipitation in diesen Gefäßen wurden die Magnetpartikel in 180 µl Waschpuffer 2 resuspendiert, in frische 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt (fünfter Waschschrift) und dort erneut mit Waschpuffer 2 gewaschen (sechster Waschschrift). Nach

der zweiten Magnetpräzipitation in diesen Gefäßen wurden die Proben wieder in 180 µl Waschpuffer 1 resuspendiert (siebter Waschschrift), in frische 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt und dort nochmal mit Waschpuffer 1 gewaschen (achter Waschschrift). Nach der zweiten Magnetpräzipitation in diesen Gefäßen wurden die Proben dann in 180 µl Wasser resuspendiert (neunter Waschschrift), ein letztes Mal in frische 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt und dort nochmals mit Wasser gewaschen (zehnter Waschschrift). War eine Analyse durch SDS-PAGE beabsichtigt, wurden die Magnetpartikel danach mit 15 µl des entsprechenden Probenpuffers versetzt. Die für eine MS-Analyse vorgesehenen Proben wurden stattdessen noch zwei weitere Male im gleichen Gefäß mit Wasser gewaschen (elfter und zwölfter Waschschrift) und danach in 20 µl Wasser aufgenommen. Einen schematischen Überblick über die Abfolge der Waschschriffe gibt Schema 11.



Schema 11: Abfolge der Waschschriffe beim Waschen der Magnetpartikel. Der zunächst sehr kompliziert anmutende Vorgang ist bei näherer Betrachtung recht simpel. Zum Waschen der Magnetpartikel werden fünf Waschgefäße bereitgestellt. In jedem dieser Waschgefäße werden die Magnetpartikel zweimal präzipitiert und anschließend wieder in 180 µl Puffer resuspendiert. Das zweite Resuspendieren erfolgt jeweils in dem Puffer, der für die nächsten zwei Waschschriffe im nächsten Waschgefäß verwendet werden soll. Vor Beginn der eigentlichen Waschprozedur wird im Probengefäß die proteinhaltige Probenlösung entfernt und durch 180 µl des gleichen Puffers ersetzt (Waschpuffer 1, wenn mit gelöster Fangverbindung gearbeitet wurde, *E. coli*-Einfangpuffer bzw. Eukaryonten-Einfangpuffer, wenn mit Fangpartikeln gearbeitet wurde). Am Ende werden die Magnetpartikel in 15 µl Probenpuffer für SDS-PAGE aufgenommen. Ist jedoch eine MS-Analyse beabsichtigt, werden die Magnetpartikel statt dessen zwei zusätzliche Male mit Wasser gewaschen und danach in 20 µl Wasser aufgenommen.

6 Literatur

- Aebersold, R. H., Leavitt, J., Saavedra, R. A., Hood, L. E. und Kent, S. B. H. (1987). Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6970–6974.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Andersen, N. M. und Douthwaite, S. (2006). YebU is a m⁵C methyltransferase specific for 16 S rRNA nucleotide 1407. *J. Mol. Biol.* **359**, 777–786.
- Andrews, T. J und Lorimer, G. H. (1987). Rubisco: Structure mechanism and prospects for improvement. In Hatch, M. D. und Boardman, N. K. (Hrsg.) *The Biochemistry of Plants. Aufl. 10: Photosynthesis*. San Diego (Academic Press) 131–218.
- Appel, R. D., Sanchez, J. C., Bairoch, A., Golaz, O., Ravier, F., Pasquali, C., Hughes, G. J. und Hochstrasser, D. F. (1996). The SWISS-2DPAGE database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, its status in 1995. *Nucleic Acids Res.* **24**, 180–181.
- Argarana, C. E., Kuntz, I. D., Birken, S., Axel, R. und Cantor, C. R. (1986). Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1871–1882.
- Avery, O., MacLeod, C. und McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137–158.
- Barglow, K. T. und Cravatt, B. F. (2007). Activity-based protein profiling for the functional annotation of enzymes. *Nat. Methods* **4**, 822–827.
- Basturea, G. N., Rudd, K. E. und Deutscher, M. P. (2006). Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family. *RNA* **12**, 426–434.

- Bayley, H. und Staros, J. V. (1984). Photoaffinity labeling and related techniques. *Azides and Nitrenes*, Academic Press, Orlando, S. 433–490.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhoud, R., Van Dien, S. J., und Rabinowitz, J. D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. chem. biol.* **5**, 593–599.
- Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J. T., Jarrett, J. T. und Drennan, C. L. (2004). Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science* **303**, 76–79.
- Bhagwat, A. S., Sohail, A. und Roberts R. J. (1986). Cloning and characterization of the dcm locus of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **166**, 751–755.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. III, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Shao, Y. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453–1462.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D. und Huber, R. (2000). The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature* **408**, 667–668.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. und Boyer, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. *Gene* **2**, 95–113.
- Bradbury, A., und Cattaneo, A. (1995). The use of phage display in neurobiology. *Trends Neurosci.* **18**, 243–249.
- Broadbent, S. E., Balbontin, R., Casadesus, J., Marinus, M. G. und van der Woude, M. (2007). YhdJ, a nonessential CcrM-like DNA methyltransferase of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **189**, 4325–4327.
- Bujnicki, J. M., Oudjama, Y., Roovers, M., Owczarek, S., Caillet, J. und Droogmans, L. (2004). Identification of a bifunctional enzyme MnmC involved in the biosynthesis of a hypermodified uridine in the wobble position of tRNA. *RNA* **10**, 1236–1242.
- Bujnicki, J. M. und Rychlewski, L. (2000). Prediction of a novel RNA 2'-O-ribose methyltransferase subfamily encoded by the *Escherichia coli* YgdE open reading frame and its orthologs. *Acta. Microbiol. Pol.* **49**, 253–260.

- Burdzinski, G. T., Middleton, C. T., Gustafson, T. L. und Platz, M. S. (2006). Solution Phase Isomerization of Vibrationally Excited Singlet Nitrenes to Vibrationally Excited 1,2-Didehydroazepine. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14804–14805.
- Burland, V. D., Plunkett, G., Sofia, H. J., Daniels, D. L. und Blattner, F. R. (1995). Analysis of the *Escherichia coli* genome VI: DNA sequence of the region from 92.8 through 100 minutes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2105–2119.
- Butland, G., Peregrin-Alvarez, J., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J. und Emili, A. (2005). Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**, 531–537.
- Cai, H. und Clarke, S. (1999). A novel methyltransferase catalyzes the methyl esterification of trans-aconitate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 13470–13479.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J. und Richarme, G. (2000). The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **275**, 16414–16419.
- Carrion, M., Gomez, M. J., Merchante-Schubert, R., Dongarra, S. und Ayala, J. A. (1999). mraW, an essential gene at the dcw cluster of *Escherichia coli* codes for a cytoplasmic protein with methyltransferase activity. *Biochimie* **81**, 879–888.
- Clamp, M., Frey, B., Kamal, M., Xie, X., Cuff, J., Lin, M. F., Kellis, M., Lindblad-Toh, K. und Lander, E. S. (2007). Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 19428–19433.
- Colson, C., Lhoest, J. und Urlings, C. (1979). Genetics of ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*. III. Map position of two genes, prmA and prmB, governing methylation of proteins L11 and L3. *Mol. Gen. Genet.* **169**, 245–250.
- Corbin, R. W., Paliy, O., Yang, F., Shabanowitz, J., Platt, M., Lyons, C. E., Root, J. K., McAuliffe, J., Jordan, M. I., Kustu, S., Soupene, E. und Hunt, D. F. (2003). Toward a protein profile of *Escherichia coli*: comparison to its transcription profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9232–9237.
- Cornell, K. A. und Riscoe, M. K. (1998). Cloning and expression of *Escherichia coli* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase: identification of the pfs gene product. *Biochim. Biophys. Acta.* **1396**, 8–14.

- De Bie, L. G. S., Roovers, M., Oudjama, Y., Wattiez, R., Tricot, C., Stalon, V., Droogmans, L. und Bujnicki, J. M. (2003). The *yggH* gene of *Escherichia coli* encodes a tRNA (m⁷G46) methyltransferase. *J. Bacteriol.* **185**, 3238–3243.
- Della-Ragione, F., Porcelli, M., Carteni-Farina, M., Zappia, V. und Pegg, A. E. (1985). *Escherichia coli* S-adenosylhomocysteine/5'-methylthioadenosine nucleosidase. Purification, substrate specificity and mechanism of action. *Biochem. J.* **232**, 335–341.
- Edman, P. und Begg, G. (1967). A protein sequenator *Eur. J. Biochem.* **1**, 80–91.
- Elkins, P. A., Watts, J. M., Zalacain, M., van Thiel, A., Vitazka, P. R., Redlak, M., Andraos-Selim, C., Rastinejad, F. und Holmes, W. M. (2003). Insights into catalysis by a knotted TrmD tRNA methyltransferase. *J. Mol. Biol.* **333**, 931–949.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89–92.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.
- Finkel, S. E. und Kolter, R. (2001). DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J. Bacteriol.* **183**, 6288–6293.
- Foret, S., Kucharski, R., Pittelkow, Y., Lockett, G. A. und Maleszka, R. (2009). Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. *BMC Genomics* **14**, 472.
- Forouhar, F., Su, M., Seetharaman, J., Janjua, H., Fang, Y., Xiao, R., Liu, J., Baran, M. C., Acton, T. B., Montelione, G. T., Tong, L. und Hunt, J. F. Crystal structure of UPF0341 protein yhiQ from *E. coli*, Northeast Structural Genomics Target ER585. PDB Eintrag 2PGX. Unpublished.
- Francetic, O., Lory, S. und Pugsley, A. P. (1998). A second prepilin peptidase gene in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **27**, 763–775.
- Fu, J. C., Ding, L. und Clarke, S. (1991). Purification, gene cloning, and sequence analysis of an L-isopartyl protein carboxyl methyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14562–14572.

- Geier, G. E. und Modrich, P. (1979). Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. *J. Biol. Chem.* **254**, 1408–1413.
- Gerdes, S. Y., Scholle, M. D., Campbell, J. W., Balazsi G., Ravasz, E., Daugherty, M. D., Somera, A. L., Kyrpides, N. C., Anderson, I., Gelfand, M. S., Bhattacharya, A., Kapatral, V., D'Souza, M., Baev, M. V., Grechkin, Y., Mseeh, F., Fonstein, M. Y., Overbeek, R., Barabási, A.-L., Oltvai, Z. N., und Osterman, A. L. (2003). Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J. Bacteriol.* **185**, 5673–5684.
- Goedecke, K., Pignot, M., Goody, R. S., Scheidig, A. J. und Weinhold, E. (2001). Structure of the N6-adenine DNA methyltransferase M·TaqI in complex with DNA and a cofactor analog. *Nature Struct. Biol.* **4**, 121–125.
- Goulding, C. W., Postigo, D., und Matthews, R. G. (1997). Cobalamin-Dependent Methionine Synthase Is a Modular Protein with Distinct Regions for Binding Homocysteine, Methyltetrahydrofolate, Cobalamin, and Adenosylmethionine. *Biochemistry* **36**, 8082–8091.
- Gruenbaum, Y., Howard, C. und Aharon, R. (1987). Restriction enzyme digestion of hemimethylated DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2509–2515.
- Gu, X. R., Ofengand, J. und Santi, D. V. (1994). In vitro methylation of *Escherichia coli* 16S rRNA by tRNA (m5U54)-methyltransferase. *Biochemistry* **33**, 2255–2261.
- Gu, X. R., Gustafsson, C., Ku, J., Yu, M. und Santi, D. V. (1999). Identification of the 16S rRNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 4053–4057.
- Gustafsson, C. und Persson, B. C. (1998). Identification of the rrmA gene encoding the 23S rRNA m1G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m1G745-deficient mutant. *J. Bacteriol.* **180**, 359–365.
- Hale, G., Wallis, N. G., und Perham, R. N. (1992). Interaction of avidin with the lipoyl domains in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: three-dimensional location and similarity to biotinyl domains in carboxylases. *Proc. R. Soc. B.* **249**, 247–253.
- Han, M. und Lee, S. Y. (2006). The *Escherichia coli* Proteome: Past, Present, and Future Prospects. *Microbiology and Molecularbiology Reviews* **70**, 362–439.

- Hansen, K. C., Schmitt-Ulms, G., Chalkley, R. J., Hirsch, J., Baldwin, M. A. und Burlingame, A. L. (2003). Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable ^{13}C -isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 299–314.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L., Mori, H. und Horiuchi, T. (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Syst. Biol.* **4**, E1–E5.
- Heinrikson, R. L. und Kingdon, H. S. (1971). Primary structure of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **246**, 1099–1106.
- Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., Low, D. A. und Mahan, M. J. (1999). An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**, 967–970.
- Heng, X., Kumar, S., Klimasauskas, S. und Roberts, R. J. (1993). Crystal-Structure of the HhaI Methyltransferase. *Annual Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **58**, 331–338.
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C. und Watanabe, C. (1993). Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5011–5015.
- Heurgue'-Hamard, V., Champ, S., Engstrom, A., Ehrenberg, M. und Buckingham, R. H. (2002). The hemK gene in *Escherichia coli* encodes the N(5)-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors. *EMBO J.* **21**, 769–778.
- Ishihama, Y., Schmidt, T., Rappsilber, J., Mann, M., Hartl, F. U., Kerner, M. J. und Frishman, D. (2008). Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* Cytosol. *BMC Genomics* **9**, 102.
- Iwig, D. F., Grippe, A. T., McIntyre, T. A. und Booker, S. J. (2004). Isotope and elemental effects indicate a rate-limiting methyl transfer as the initial step in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase. *Biochemistry* **43**, 13510–13524.
- James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly reviews of biophysics* **30**, 279–331.

- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. und Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**, 662–666.
- Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D. J. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using aminereactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 1154–1169.
- Khorana, H. G., Büchi, H., Ghosh, H., Gupta, N., Jacob, T. M., Kössel, H., Morgan, R., Narang, S. A., Ohtsuka, E. und Wells, R. D. (1966). Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **31**, 39–49.
- Kimura, S. und Suzuki, T. (2010). Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1341–1352.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J. und Cheng, X. (1994). M.HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**, 357–369.
- Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231–243.
- Knippers, R. (2001). *Molekulare Genetik*, 8. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Koonin, E. V. und Rudd, K. E. (1993). SpoU protein of *Escherichia coli* belongs to a new family of putative rRNA methylases. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5519.
- Kossykh, V. G. und Lloyd, R. S. (2004). A DNA adenine methyltransferase of *Escherichia coli* that is cell cycle regulated and essential for viability. *J. Bacteriol.* **186**, 6340.
- Köster, H., Little, D. P., Luan, P., Muller, R., Siddiqi, S. M., Marappan, S. und Yip, P. (2007). Capture Compound Mass Spectrometry: A Technology for the Investigation of Small Molecule Protein Interactions. *ASSAY and Drug Development Technologies* **5**, 381–390.

- Kuzin, A., Manor, P., Benach, J., Smith, P., Rost, B., Xiao, R., Montelione, G., Hunt, J. (2003). X-ray structure of YjhP from *E. coli*, northeast structural genomics research consortium (NESG) target ER13. PDB Eintrag 1NKV. Unveröffentlicht.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lee, T. T., Agarwalla, S. und Stroud, R. M. (2004). Crystal structure of RumA, an iron-sulfur cluster containing *E. coli* ribosomal RNA 5-methyluridine methyltransferase. *Structure* **12**, 397–407.
- Lee, P. T., Hsu, A. Y., Ha, H. T. und Clarke, C. F. (1997). A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the *Escherichia coli* ubiE gene. *J. Bacteriol.* **179**, 1748–1754.
- Leppik, R. A., Stroobant, P., Shineberg, B., Young, I. G. und Gibson, F. (1976). Membrane-associated reactions in ubiquinone biosynthesis. 2-Octaprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinone methyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* **428**, 146–156.
- Lesnyak, D. V., Osipiuk, J., Skarina, T., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., Edwards, A., Savchenko, A., Joachimiak, A. und Dontsova, O. A. (2007). Methyltransferase that modifies guanine 966 of the 16 S rRNA: functional identification and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* **282**, 5880–5887.
- Lesnyak, D. V., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A. und Dontsova, O. A. (2006). Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: I. the ycbY gene encodes a methyltransferase specific for G2445 of the 23 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **364**, 20–25.
- Lim, K., Zhang, H., Tempczyk, A., Bonander, N., Toedt, J., Howard, A., Eisenstein, E. und Herzberg, O. (2001). Crystal structure of YecO from *Haemophilus influenzae* (HI0319) reveals a methyltransferase fold and a bound S-adenosylhomocysteine. *Proteins* **45**, 397–407.
- Liu, M., Turner, R. J., Winstone, T. L., Saetre, A., Dyllick-Brenzinger, M., Jickling, M., Tari, L. W., Weiner, J. H. und Taylor, D. E. (2000). *Escherichia coli* TehB requires S-adenosylmethionine as a cofactor to mediate tellurite resistance. *J. Bacteriol.* **182**, 6509–6513.
- Lu, P., Vogel, C., Wang, R., Yao, X. und Marcotte, E. M. (2007). Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat. Biotechnol.* **25**, 117–124.

- MacBeath, G. und Schreiber, S. (2000). Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science* **289**, 1760–1764.
- Madsen, C. T., Mengel-Jorgensen, J., Kirpekar, F. und Douthwaite, S. (2003). Identifying the methyltransferases for m(5)U747 and m(5)U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4738–4746.
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. und Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**, 1437–1438.
- Merril, C. R., Goldman, D. und Vankeuren, M. L. (1984). Gel Protein Stains - Silver Stain. *Methods in Enzymology* **104**, 441–446.
- Michel, G., Sauve, V., Larocque, R., Li, Y., Matte, A. und Cygler, M. (2002). The structure of the RlmB 23S rRNA methyltransferase reveals a new methyltransferase fold with a unique knot. *Structure* **10**, 1303–1315.
- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. und Kakutani, T. (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* **411**, 212–214.
- Motorin, Y. und Grosjean, H. (1999). Multisite-specific tRNA:m⁵C-methyltransferase (Trm4) in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the gene and substrate specificity of the enzyme. *RNA* **5**, 1105–1118.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263–273.
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. und Grewal, S. I. S. (2001). Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly. *Science* **292**, 110–113.
- Nasvall, S. J., Chen, P. und Bjork, G. R. (2004). The modified wobble nucleoside uridine-5-oxyacetic acid in tRNA^{Pro}(cmo5UGG) promotes reading of all four proline codons in vivo. *RNA* **10**, 1662–1673.
- Needleman, S. B. und Wunsch C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**, 443–453.

- O'Farrell, H. C., Scarsdale, J. N. und Rife, J. P. (2004). Crystal structure of KsgA, a universally conserved rRNA adenine dimethyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **339**, 337–353.
- O'Gara, M., Klimasauskas, S., Roberts, R. J. und Cheng, X. (1996). Enzymatic C5-Cytosine Methylation of DNA: Mechanistic Implications of New Crystal Structures for HhaI Methyltransferase-DNA-AdoHcy Complexes. *J. Mol. Biol.* **261**, 634–645.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. und Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376–386.
- Pähler, A., Hendrickson, W. A., Kolks, M. A., Aragana, C. E. und Cantor, C. R. (1987). Characterization and chrystallization of core streptavidin. *J. Biol. Chem.* **262**, 13933–13937.
- Pappin, D. J., Hojrup, P. und Bleasby, A. J. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**, 487.
- Pellecchia, M., Montgomery, D. L., Stevens, S. Y., Van der Kooi, C. W., Feng, H. P., Gierasch, L. M. und Zuiderweg, E. R. (2000). Structural insights into substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 298–303.
- Persson, B. C., Jager, G. und Gustafsson, C. (1997). The spoU gene of *Escherichia coli*, the fourth gene of the spoT operon, is essential for tRNA (Gm18) 2'-O-methyltransferase activity. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4093–4097.
- Platz, M., Admasu, A. S., Kwaidkowski, S., Crocker, P. J., Imai, N. und Watt, D. S. (1991). Photolysis of 3-Aryl-3-(trifluoromethyl)diazirines: A Caveat Regarding Their Use in Photoaffinity Probes. *Bioconjugate Chem.* **2**, 337–341.
- Pljevaljcic, G., Pignot, M. und Weinhold, E. (2003). Design of a New Fluorescent Cofactor for DNA Methyltransferases and Sequence-Specific Labeling of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3486–3492.
- Pljevaljcic, G., Schmidt, F. und Weinhold, E. (2004). Sequence-specific methyltransferase-induced labeling of DNA (SMILing DNA) *ChemBioChem* **5**, 265–269.

- Pues, H., Holz, B. und Weinhold, E. (1997). Construction of a deletion library using a mixture of 5'-truncated primers for inverse PCR (IPCR). *Nucleic Acids Res.* **25**, 1303–1304.
- Purta, E., Kaminska, K. H., Kasprzak, J. M., Bujnicki, J. M. und Douthwaite, S. (2008). YbeA is the m³pU methyltransferase RlmH that targets nucleotide 1915 in 23S rRNA. *RNA* **14**, 1–11.
- Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M. und Douthwaite, S. (2008). YccW is the m⁵C Methyltransferase Specific for 23S rRNA Nucleotide 1962. *J. Mol. Biol.* **383**, 641–651.
- Purta, E., van Vliet, F., Tkaczuk, K. L., Dunin-Horkawicz, S., Mori, H., Droogmans, L. und Bujnicki, J. M. (2006). The yfhQ gene of *Escherichia coli* encodes a tRNA:Cm32/Um32 methyltransferase. *BMC Mol. Biol.* **7**, 23.
- Rathert, P., Zhang, X., Freund, C., Cheng, X. und Jeltsch, A. (2008). Analysis of the Substrate Specificity of the Dim-5 Histone Lysine Methyltransferase Using Peptide Arrays. *Chem. Biol.* **15**, 5–11.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. und Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593–599.
- Reiser, A. und Marley, R. (1968). Photolysis of Aromatic Azides, *Trans. Faraday Soc.* **64**, 1806–1815.
- Rina, M. und Bouriotis, V. (1993). Cloning, purification and characterization of the BseCI DNA methyltransferase from *Bacillus stearothermophilus*, *Gene* **133**, 91–94.
- Rina, M., Dialektakis, D., Clark, D., Pagamenou, M. und Bouriotis, V. (1992). Isolation and identification of restriction endonuclease BseCI. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1807.
- Rizk, M. S., Shi, X. und Platz, M. S. (2005). Lifetimes and Reactivities of Some 1,2-Didehydroazepines Commonly Used in Photoaffinity Labeling Experiments in Aqueous Solutions. *Biochemistry* **45**, 543–551.
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J. und Macelis, D. (2003). REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **31**, 418–420.

- Romanowski, M. J., Bonanno, J. B. und Burley, S. K. (2002). Crystal structure of the *Escherichia coli* glucose-inhibited division protein B (GidB) reveals a methyltransferase fold. *Proteins* **47**, 563–567.
- Sain, B. und Murray N. E. (1980). The hsd (host specificity) genes of *E. coli* K 12. *Mol. Gen. Genet.* **180**, 35–46.
- Sanger, F. (1952). The arrangement of amino acids in proteins. *Adv. Protein Chem.* **7**, 1-66.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463–5467.
- Sasarman, A., Echelard, Y., Letowski, J., Tardif, D. und Drolet, M. (1988). Nucleotide sequence of the hemX gene, the third member of the Uro operon of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* **16**, 11835–11835.
- Schluckebier, G., Zhong, P., Stewart, K. D., Kavanaugh, T. J. und Abad-Zapatero, C. (1999). The 2.2 Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* **289**, 277–291.
- Schmidt, F. H.-G., (2004). Neue Cofaktoren zur sequenzspezifischen Methyltransferasen-vermittelten Markierung von DNA, Doktorarbeit, RWTH-Aachen.
- Schmidt, F. H.-G., Hüben, M., Gider, B., Renault, F., Teulade-Fichou, M.-P. und Weinhold, E. (2008). Sequence-specific Methyltransferase-Induced Labelling (SMILing) of plasmid DNA for studying cell transfection. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 40–48.
- Selinger, D. W., Cheung, K. J., Mei, R., Johansson, E. M., Richmond, C. S., Blattner, F. R., Lockhart, D. J. und Church, G. M. (2000). RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nature Biotechnology* **18**, 1262–1268.
- Sergiev, P. V., Lesnyak, D. V., Bogdanov, A. A. und Dontsova, O. A. (2006). Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: II. The ygjO gene encodes a methyltransferase specific for G1835 of the 23 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **364**, 26–31.
- Sergiev, P. V., Serebryakova, M. V., Bogdanov, A. A. und Dontsova, O. A. (2008). The ybiN gene of *Escherichia coli* encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A1618 of 23 S ribosomal RNA, a methylated residue located close to the ribosomal exit tunnel. *J. Mol. Biol.* **375**, 291–300.

- Smith, T. F. und Waterman, M. S. (1981). Identification of Common Molecular Subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**, 195–197.
- Springer, W. R. und Koshland, D. E. (1977). Identification of a protein methyltransferase as the cheR gene product in the bacterial sensing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 533–537.
- Strahl, B. D. und Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41–45.
- Thanbichler, M., Neuhierl, B. und Bock, A. (1999). S-methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 662–665.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- Tobi, E. W. (2009). DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Human Mol. Gen.* **18**, 4046–4053.
- Torres, M. J., Zayas, J. und Platz, M. S. (1986). A Formal Insertion reaction of Aryl Nitrene into an Alkyl CH Bond. Implications for Photoaffinity Labelling. *Tetrahedron Lett.* **27**, 791–794.
- Tscherne, J. S., Nurse, K., Popienick, P. und Ofengand, J. (1999). Purification, cloning, and characterization of the 16 S RNA m2G1207 methyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 924–929.
- Vanet, A., Plumbridge, J. A., Guerin, M. F. und Alix J. H. (1994). Ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*: the gene prmA, encoding the ribosomal protein L11 methyltransferase, is dispensable. *Mol. Microbiol.* **14**, 947–958.
- Vogel, O., Hoehn, B. und Henning, U. (1972). Molecular structure of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1615–1619.
- Wang, J., Burdzinsky, G., Zhu, Z., Platz, M. S., Carra, C., und Bally, T. (2007). Ultrafast Spectroscopic and Matrix Isolation Studies of *p*-Biphenyl, *o*-Biphenyl and 1-Naphtylnitrenium Cations. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8380–8388.
- Wang, J., Jacek, K. und Platz, M. S. (2007). An Ultrafast Study of Phenyl Azide: The Direct Observation of Phenylnitrenium Ion. *Org. Lett.* **9**, 3973–3976.

- Walsh, C. T. (2006). *Posttranslational modification of proteins: expanding nature's Inventory*. Roberts & Co Publ., S. 121–149.
- Warren, M. J., Bolt, E. L., Roessner, C. A., Scott, A. I., Spencer, J. B. und Woodcock, S. C. (1994). Gene dissection demonstrates that the *Escherichia coli* *cysG* gene encodes a multifunctional protein. *Biochem. J.* **302**, 837–844.
- Watson, J. D. und Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**, 737–738.
- Whitchurch, C. B. und Mattick, J. S. (1994). *Escherichia coli* contains a set of genes homologous to those involved in protein secretion, DNA uptake and the assembly of type-4 fimbriae in other bacteria. *Gene* **150**, 9–15.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. und Williams, K. L. (1995). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 19–50.
- Wilkinson, S., Diechtierow, M., Estabrook, R. A., Schmidt, F., Hüben, M. und Weinhold, E. (2008). Molecular scale architecture: engineered three- and four-way junctions *Bioconjugate Chem.* **19**, 470–475.
- Yamanaka, K., Ogura, T., Niki, H. und Hiraga, S. (1995). Characterization of the *smtA* gene encoding an *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferase of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**, 59–63.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R. K., Ballinger, T., und Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* **39**, 61–69.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Poot
Vorname:	Peter
Geburtstag:	01.03.1976
Geburtsort:	Heinsberg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Qualifikationen:

1995	Abitur
1996 – 2004	Biologiestudium mit Abschluss Diplom
ab 2004	Promotion am Institut für Organische Chemie an der RWTH-Aachen