

Masterarbeit

Elektrophoretische Darstellung der Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I

Dietmar Glänzer, BSc

Betreuerin:

ao.Univ.-Prof. Dr. phil. Anna Gries

Zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

NAWI Graz

Ausgeführt am Institut für Physiologie

Harrachgasse 21, 5. Stock

August 2013

Vorwort

Folgende Arbeit entstand an der Medizinischen Universität Graz am vorklinischen Institut für Physiologie, Institutsvorstand Herr Univ.-Prof. Dr. med. univ. Helmut Hinghofer-Szalkay.

Mein besonderer Dank gilt Frau ao. Univ.-Prof. Dr. phil. Anna Gries für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themengebietes, sowie für jegliche Hilfestellung ihrerseits und der freundlichen und kompetenten Betreuung.

Weiters möchte ich mich bei Herrn Ing. Josef Kellner für die freundliche und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Großer Dank geht auch an das gesamte Team des Studienganges „Biochemie und Molekulare Biomedizin“ unter der Studiengangsleitung von Herrn Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Helmut Schwab an der Technischen Universität Graz.

Dank sei zuletzt meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin gesagt, die mich mental unterstützend in dieser Zeit begleitet haben.

Deutsche Fassung:
Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom 10.11.2008
Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 17.7.2013

Florian Dietmar
(Unterschrift)

Englische Fassung:

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

17.7.2013
date

Florian Dietmar
(signature)

Kurzfassung

Das humane β_2 -Glykoprotein-I (Apolipoprotein H) ist ein Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa und wird primär in der Leber exprimiert. Das Protein ist mit Lipoproteinen assoziiert und bindet an negativ geladene Phospholipidvesikel, Blutplättchen, DNA, Zellmembranen und Endothelzellen. β_2 -Glykoprotein-I weist genetisch determinierte strukturelle Polymorphismen auf, die mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) und Immunoblotting detektierbar sind. Hierbei wurden die Allele APOH*1, APOH*2 und APOH*3 beobachtet und ein weiteres Allel, APOH*4, das nur in Populationen afrikanischer Abstammung vorkommt. β_2 -Glykoprotein-I besitzt endständige Sialinsäuren, die für die negative Außenladung eukaryotischer Zellen mitverantwortlich sind. Für die Abspaltung dieser endständigen Sialinsäure ist das Enzym Neuraminidase verantwortlich. Die sialinsäurefreien Glykoproteine werden durch den Asialo-Glykoproteinrezeptor in die Hepatozyten aufgenommen und über die Galle ausgeschieden.

Zielstellung: Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu standardisieren, bei der die Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I und Asialo β_2 -Glykoprotein-I direkt aus dem Plasma mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt werden sollten.

Methoden: Die SDS-PAGE wurde verwendet um die Reinheit der verwendeten Proben zu überprüfen, wobei die Darstellung mit Coomassie-Brilliant-Blau und Immunoblotting erfolgte. Zur Auftrennung der Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I und Asialo- β_2 -Glykoprotein-I kam ein vertikales System der IEF zum Einsatz. Hierbei wurden die Proben in nativer und denaturierender Form im Fokussiergel aufgetrennt und durch Immunoblotting dargestellt. Zur Erhöhung der Löslichkeit der Proteine bei der IEF wurden Harnstoff und CHAPS verwendet.

Ergebnisse und Diskussion: Die IEF der nativen Proben von β_2 -Glykoprotein-I zeigte 14 Isoformen mit isoelektrischen Punkten zwischen 4,7 und 8,5. Eine Auftrennung der Isoformen von Asialo- β_2 -Glykoprotein-I in nativer Form stellte sich aufgrund des Fehlens an Ladungen durch die Abspaltung der endständigen Sialinsäuren als sehr schwierig heraus, da es zu Löslichkeitsproblemen kam. Nach Zugabe denaturierender Reagenzien zur Löslichkeitserhöhung resultierten bei β_2 -Glykoprotein-I fünf Isoformen mit hoher Auflösung, wobei es scheint, dass der Harnstoff die natürliche Konformation von β_2 -Glykoprotein-I soweit verändert, dass auch die Anzahl der darstellbaren Isoformen abnimmt. Eine Auftrennung von Asialo β_2 -Glykoprotein-I in denaturierter Form zeigte zwei scharf begrenzte Isoformen im pH-Bereich zwischen 8,3 und 8,5. Da durch die Abspaltung der Sialinsäuren nur mehr zwei Isoformen darstellbar sind, ist anzunehmen, dass der Großteil der Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I durch unterschiedlichen Sialinsäuregehalt zustande kommt.

Abstract

Human β_2 -glycoprotein-I (apolipoprotein H) is a plasma glycoprotein with a molecular weight of about 50 kDa and is primarily expressed in the liver. The protein is associated with lipoproteins and binds to negatively charged phospholipids, platelets, DNA, cell membranes and endothelial cells. β_2 -glycoprotein-I shows genetically-determined structural polymorphism which is detectable by isoelectric focussing (IEF) and immunoblotting. Three alleles APOH*1, APOH*2 and APOH*3 are observed in whites and a further allele, APOH*4, being present only in black individuals. β_2 -glycoprotein-I has terminal sialic acids which mostly determine the negative charge of eukaryotic cells. The enzyme neuraminidase is responsible for the separation of this terminal sialic acid. Sialic-acid-free glycoproteins are absorbed by the asialo-glycoprotein-receptor on hepatocytes and excreted by the bile.

Aim: The aim of this thesis was to standardize a method separating the isoforms of β_2 -glycoprotein-I and asialo- β_2 -glycoprotein-I.

Methods: SDS-PAGE followed by staining with coomassie-brilliant-blue or immunoblotting was used to verify the purity of the samples. For the separation of isoforms of β_2 -glycoprotein-I and asialo- β_2 -glycoprotein-I a vertical system of IEF was used. Thereby the samples were separated in native and denatured form followed by immunoblotting. To increase the solubility of proteins in IEF urea and CHAPS were used.

Results and Discussion: IEF of native samples of β_2 -glycoprotein-I revealed 14 isoforms with isoelectric points from 4.7 to 8.5. Separation of asialo- β_2 -glycoprotein-I-isoforms in native form was difficult because of problems with solubility caused by the removal of the terminal sialic acids. After addition of denaturing agents β_2 -glycoprotein-I resulted in five isoforms with high resolution and it seems that urea modifies the natural conformation of β_2 -glycoprotein-I so that the number of displayable isoforms decreases. Separation of asialo- β_2 -glycoprotein-I in denatured form showed two sharply defined isoforms in the pH range from 8.3 to 8.5. Since only two isoforms are represented after the removal of sialic acids it can be supposed that the majority of the isoforms of β_2 -glycoprotein-I results from the different sialic acid content.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glykoproteine.....	2
1.2	Plasmaglykoproteine	4
1.3	β_2 -Glykoprotein-I.....	5
1.3.1	Strukturelle Charakterisierung von β_2 -Glykoprotein-I.....	7
1.3.2	Genetik von β_2 -Glykoprotein-I.....	9
1.3.3	Polymorphismen von β_2 -Glykoprotein-I.....	10
1.3.4	Funktionen von β_2 -Glykoprotein-I.....	11
1.3.4.1	Lipid-Metabolismus	11
1.3.4.2	Antiphospholipidsyndrom (APS).....	12
1.3.4.3	Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).....	13
1.3.4.4	Atherosklerose.....	13
1.3.4.5	Blutgerinnung	14
1.4	Isoformen.....	15
1.4.1	Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I.....	16
1.5	N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure)	19
2	Methoden.....	21
2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.1.1	Prinzip – SDS-PAGE	21
2.2	Isoelektrische Fokussierung	23
2.2.1	Historische Entwicklung der isoelektrischen Fokussierung.....	24
2.2.2	Möglichkeiten zur Ausbildung eines pH-Gradienten.....	25
2.2.3	Entstehung eines pH-Gradienten.....	26
2.2.4	Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen	28
2.2.5	Identifizierung des isoelektrischen Punktes	28
2.3	Western Blot	29
2.3.1	Prinzip – Western-Blot.....	30
3	Durchführung und Reagenzien.....	33
3.1	Reagenzien und Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie-Färbung beziehungsweise anschließendem Western Blot	33
3.1.1	Reagenzien und Materialien.....	33
3.1.2	Durchführung.....	37

3.2	Reagenzien und Durchführung der isoelektrischen Fokussierung (IEF) mit anschließendem Western Blot	45
3.2.1	Reagenzien und Materialien	45
3.2	Durchführung	46
4	Ergebnisse	51
4.1	SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung	51
4.2	SDS-PAGE mit nachfolgendem Western – Blot	52
4.3	Native isoelektrische Fokussierung von β_2 -Glykoprotein-I, Plasma und HClO_4 - Fällungs-Überstand	53
4.4	Isoelektrische Fokussierung von β_2 -Glykoprotein-I und HClO_4 -Fällungs-Überstand unter Zusatz von 8 M Harnstoff	54
4.5	Isoelektrische Fokussierung von Plasma ohne und mit Vorfokussierung unter Zusatz von 8 M Harnstoff	55
4.6	Isoelektrische Fokussierung von Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I im Plasma in Gelen unterschiedlicher Zusammensetzung	56
4.7	Identifizierung der Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I und Asialo- β_2 - Glykoprotein-I..	57
5	Diskussion	59

1 Einleitung

Das humane β_2 -Glykoprotein-I, auch als Apolipoprotein H bekannt, ist ein Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa und besteht aus 326 Aminosäuren. Das Protein wird primär in der Leber exprimiert und spielt bei der Hämostase und der Produktion von Antiphospholipid-Antikörpern eine essentielle Rolle.¹ Es ist somit auch das Schlüssel-Antigen der Autoimmunerkrankung Anti-Phospholipid-Syndrom (APS).² β_2 -Glykoprotein-I zeigt genetisch bedingt strukturelle Polymorphismen durch das Vorhandensein von drei gemeinsamen Allelen (APOH*1, APOH*2 und APOH*3), die mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (IEF) und Immunoblotting detektierbar sind.³ Die isoelektrische Fokussierung von gereinigtem β_2 -Glykoprotein-I zeigt fünf Hauptbanden (Isoformen) mit isoelektrischen Punkten (pI) zwischen 5,1 und 6,1. Durch die Abspaltung der endständigen Sialinsäuren an den Zuckerketten von β_2 -Glykoprotein-I durch das Enzym Neuraminidase sind nur mehr zwei Banden im pI-Bereich von 8,0 und 8,2 detektierbar.⁴

Die Identifizierung von Glykoprotein-Isoformen stellt ein wichtiges Forschungsgebiet in der klinischen Chemie dar. Viele Studien haben gezeigt, dass Isoformen einiger Glykoproteine bei wichtigen Erkrankungen, wie zum Beispiel vaskulären Erkrankungen oder Krebs, als Biomarker dienen können.⁵ Da die IEF eine sehr hohe Trennschärfe aufweist, können die Ladungsisoformen eines Proteins optimal aufgetrennt und an ihren isoelektrischen Punkten fokussiert werden.⁶

Das Ziel dieser Arbeit war es eine Methode zu etablieren, bei der die Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I und Asialo- β_2 -Glykoprotein-I mit Hilfe des vertikalen Systems der IEF direkt aus dem Plasma bestimmt werden können. Weiters wurde versucht, die Durchführung der IEF auf einfachste und schnellste Weise sowie kostengünstig bei Raumtemperatur zu optimieren.

¹ Mehdi (2003)

² Bouma (1999)

³ Sanghera (1997) 57-62

⁴ Gries (1989)

⁵ Garrido-Medina (2012)

⁶ Wildemann (2006)

1.1 Glykoproteine

Die Tatsache, dass Glykoproteine in lebenden Organismen im Überfluss vorkommen, erweckte schon vor vielen Jahren das Interesse von BiochemikerInnen und BiologInnen. Aufgrund der vielfältigen Funktionen von Glykoproteinen sind diese deshalb auch Teil vieler wissenschaftlicher Arbeiten.⁷

Als Bestandteile der Glykoproteine, sowie auch Glykolipide, spielen Glykane (Saccharide) eine zentrale Rolle in vielen wichtigen biologischen Prozessen. Glykokonjugate können in Glykoproteine, wie Plasmaglykoproteine, zytosolische Proteine, lipid-gebundene Glykoproteine und Proteoglykane gruppiert werden. Über 50% aller Proteine sind Glykoproteine und es wird vermutet, dass 1-2 % des Genoms für glykanabhängige Gene kodiert werden.⁸ Strukturell bestehen Glykoproteine aus einer Polypeptidkette mit kovalent gebundenen Kohlenhydratgruppen, wobei der Kohlenhydratanteil weniger als ein Prozent bis mehr als achtzig Prozent der Proteinmasse betragen kann.⁹ Die prominentesten Vertreter der an das Protein kovalent gebundenen Zucker sind D-Galaktose, D-Mannose, D-Glucose, L-Fucose, D-Xylose, N-Acetyl-D-Glucosamin, N-Acetyl-D-Galactosamin, sowie die Sialinsäure.¹⁰ Glykoproteine sind das Ergebnis posttranslationaler Modifikationen. Die Kohlenhydrate können hierbei im Allgemeinen auf zwei Arten mit dem Protein verknüpft werden: N- und O-glykosidisch (Abbildung 1).^{11 12} Die O-glykosidische Verknüpfung der Polypeptidkette mit der Oligosaccharid-Seitenkette erfolgt über die Hydroxy-Gruppe eines Serin- oder Threonin Restes, wobei hier meist N-Acetyl-Galaktosamin der erste an die Peptidkette angelagerte Zuckerrest ist. Bei der N-glykosidischen Verknüpfung wird das Oligosaccharid am Amid-N eines Asparagin-Restes kovalent gebunden, wobei hier N-Acetylglucosamin meist der erste Zuckerrest ist.¹³

⁷ Balakrishnan (2012)

⁸ Hu (2012)

⁹ Balakrishnan (2012)

¹⁰ Schmid (1971)

¹¹ Richter 2003

¹² Wittmann (2007)

¹³ Doenecke (2005)

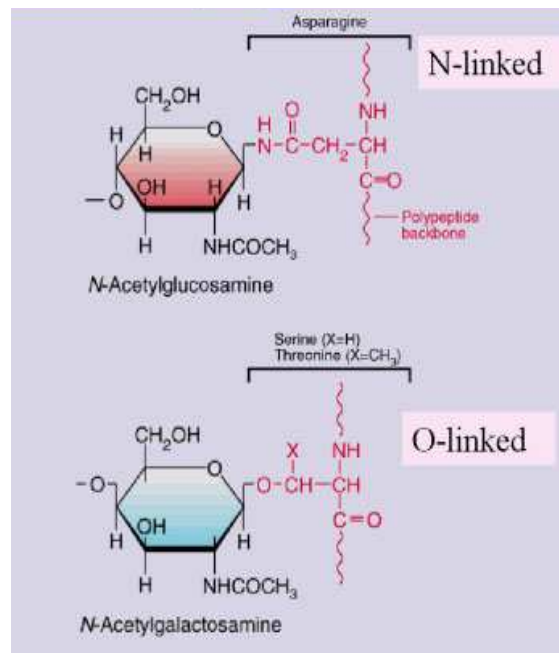


Abbildung 1: Darstellung der N- und O-glykosidischen Verknüpfung¹⁴

Während der intrazellulären Synthese der Glykoproteine werden nach der Aktivierung der Zucker, unter Mitwirkung spezifischer Glykosyltransferasen, die Ketten miteinander verknüpft, welche auch verzweigt sein können. Wenn die Oligosaccharidkette O-glykosidisch an das Protein gebunden werden soll, findet die Synthese der Zuckerkette Schritt für Schritt im Golgi-Apparat, direkt am Protein, statt. Bei der N-glykosidischen Bindung der Oligosaccharidkette an das Protein wird die Zuckerkette zunächst an der Membranınnenseite des Endoplasmatischen Retikulums, am Lipidanker (Dolicholphosphat), aufgebaut und anschließend auf das Protein übertragen.¹⁵

Viele Glykoproteine besitzen mehrere Glykosylierungsstellen an der Polypeptidkette, die in der Regel mit strukturell unterschiedlichen Glykanen besetzt sind. Diesbezüglich zeigen Glykoproteine keine einheitliche Struktur, da Anzahl, Position und Struktur der gebundenen Glykane differieren. Mithilfe der isoelektrischen Fokussierung ist die Auftrennung dieser vielfältigen Glykoformen in einem stabilen pH-Gradienten möglich. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der negativ geladenen Sialinsäure-Reste (N-Acetylneuraminsäure) an den Glykanketten kann eine elektrophoretische Auftrennung der Glykoproteine infolge von Ladungsunterschieden durchgeführt werden.¹⁶

¹⁴ Foodnetworksolution (2012)

¹⁵ Königshoff (2007)

¹⁶ Richter (2003)

Im Organismus erfüllen Glykoproteine zahlreiche Funktionen, unter anderem als strukturelle Bestandteile von Zellmembranen, in Körperflüssigkeiten wie Blutplasma, sowie als lösliche Proteine in Sekreten (Schleimsubstanzen). Bei den membranständigen Glykoproteinen durchzieht der Proteinteil als integrales Protein die gesamte Zellmembran, wobei die Kohlenhydrat-Seitenketten nach außen ragen und diese für das Verhalten der Zellen während der Entwicklung von großer Bedeutung sind. Im Blutplasma zählen bis auf wenige Ausnahmen alle Plasmaproteine zu den Glykoproteinen, wobei der Kohlenhydrat-Anteil meist zwischen 10 und 25 % liegt.¹⁷ Die Interaktion der Blutgruppensubstanzen mit Antikörpern erfolgt ebenfalls durch Glykoproteine. Schon das Hinzufügen oder Entfernen nur eines Monosaccharids von der Blutgruppenstruktur kann die Antigenität verändern. Weiters können Glykoproteine wichtige Funktionen als Hormone, Enzyme, Immunglobuline, Carrier-Proteine oder Inhibitoren erfüllen, um nur einige Beispiele zu erwähnen.¹⁸

1.2 Plasmaglykoproteine

Das Interesse an den verschiedenen Glykoproteinen ist in den vergangenen Jahren stark gestiegen. Besonders seit der Erkenntnis, dass diese konjugierten Proteine bei einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Funktionen eine Rolle spielen. Um die Bedeutung dieser Klassen an Proteinen vollständig zu verstehen, ist die Aufklärung ihrer Struktur primär wichtig.¹⁹ Speziell die Erforschung der Plasma-Glykoproteine wurde in den letzten Jahren in den Mittelpunkt gestellt, größtenteils um verschiedene Krankheitsbilder von Personen durch den Plasma-Glykoprotein-Komplex zu hinterfragen.²⁰ Das menschliche Blutplasma enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, die in Albumin, α_1 -, α_2 -, β -, und γ -Globuline eingeteilt werden. Bis auf Albumin sind nahezu alle Plasmaproteine Glykoproteine und Albumin ist somit das einzige der wichtigen Plasmaproteine, welches nicht glykosyliert ist.²¹ Die Differenzierung zwischen Albumin und den Globulinen hat keine funktionelle Bedeutung. Diese wird lediglich zur Unterscheidung des Löslichkeitsverhaltens der Proteine angewendet. Die Synthese der α_1 -, α_2 -, und β - Globuline erfolgt, wie auch bei Albumin, in den Leberzellen. Hingegen entstehen γ -Globuline durch die Ausdifferenzierung der Plasmazellen

¹⁷ Doenecke (2005)

¹⁸ Balakrishnan (2012)

¹⁹ Schmid (1971)

²⁰ Macbeth (1962)

²¹ Koolmann (2003)

in B-Lymphozyten.²² Globuline spielen im Organismus sehr wichtige Rollen. α - und β -Globuline sind am Transport von Lipiden, Vitaminen, Hormonen und Metall-Ionen beteiligt. Weiters repräsentieren diese beiden Fraktionen die Gerinnungsfaktoren, Protease-Inhibitoren, sowie die Proteine des Komplementsystems. Die Fraktion der γ -Globuline stellen die sehr gut löslichen Immunglobuline (Antikörper) dar.²³

Aufgrund der sehr hohen Komplexität und Diversität der Glykoproteine wird in dieser Arbeit ausschließlich auf das Plasmaglykoprotein β_2 -Glykoprotein-I eingegangen und dieses beschrieben.

1.3 β_2 -Glykoprotein-I

β_2 -Glykoprotein-I ist ein etwa 50kDa großes Protein, das zum ersten Mal 1961 von *Schulze et al.* als HClO₄-lösliches humanes Plasmaprotein²⁴ (0,2 mg/ml²⁵) beschrieben wurde. *Haupt et al.* konnten 1968 bei einem scheinbar gesunden Menschen einen erblich bedingten Konzentrationsmangel feststellen. Da dem Protein zu Beginn keine Funktion zugeschrieben werden konnte, erhielt es keine besondere Aufmerksamkeit. Jährlich erschien im Durchschnitt eine einzige Publikation in der Literatur (Abbildung 2).²⁶ Aufgrund des sehr hohen Gehaltes an Cystein (6,2%) und Prolin (8,3%) ist β_2 -Glykoprotein-I ein atypisches humanes Plasmaglykoprotein mit einem Kohlenhydratgehalt von etwa 19%.²⁷ Die mRNA wurde in Endothelzellen, der Plazenta, Zellen des zentralen Nervensystems und in den Hepatozyten nachgewiesen. Hauptsynthesequelle des Proteins ist jedoch die Leber.²⁸ β_2 -Glykoprotein-I ist mit Lipoproteinen assoziiert und bindet an Blutplättchen, DNA, Heparin, Mitochondrien und negativ geladene Phospholipidvesikel. Da negativ geladene Makromoleküle die intrinsische Kaskade der Gerinnung aktivieren, wird β_2 -Glykoprotein-I als physiologischer Modulator der Koagulation vermutet. Durch die Identifizierung des Proteins als Bestandteil von Chylomikronen, LDL, VLDL und HDL wurde auch angenommen, dass β_2 -Glykoprotein-I im Lipoproteinmetabolismus involviert ist. Nach der Bekanntgabe von Nakaya 1980, β_2 -

²² Rehner (2010)

²³ Koolmann (2003)

²⁴ Schulze (1961)

²⁵ Schwarzenbacher (1999)

²⁶ Haupt (1968)

²⁷ Richter (1988)

²⁸ Asherson (2002)

Glykoprotein-I sei ein Aktivator der Lipoprotein-Lipase, wurde dem Protein der Alternativname „Apolipoprotein H (APOH)“ gegeben.^{29 30 31}

Ab 1990 ist das Interesse an diesem scheinbar funktionslosen Protein deutlich gestiegen (Abbildung 2), da β_2 -Glykoprotein-I als wichtigstes Antigen einer Autoimmunerkrankung identifiziert wurde.^{32 33}

β_2 -Glykoprotein-I ist das Schlüssel-Antigen der Autoimmunerkrankung Anti-Phospholipid-Syndrom (APS), welche durch thromboembolische Komplikationen und die Anwesenheit von Anti-Phospholipid Autoantikörpern im Blut definiert wird.³⁴ β_2 -Glykoprotein-I dient als Kofaktor für die Bindung der Plasma-Autoantikörper beim Antiphospholipidsyndrom und korreliert weiters mit Thrombosen, Lupus Erythematoses (SLE), Thrombozytopenie und Fehlgeburten.^{35 36}

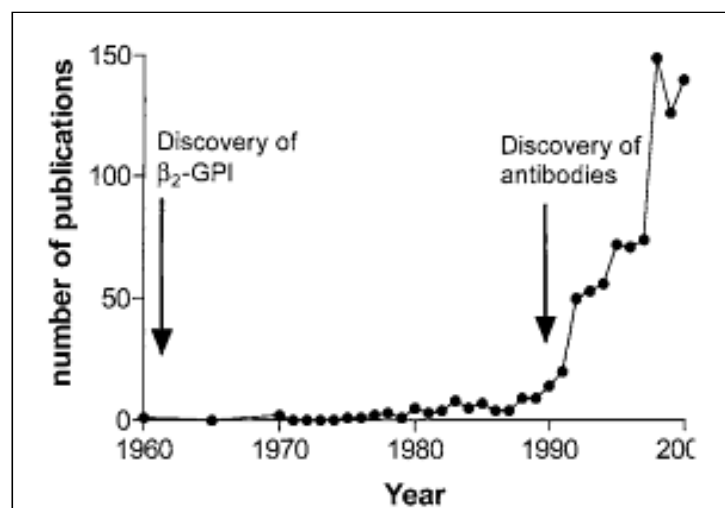


Abbildung 2: Anzahl der jährlich publizierten Artikel über β_2 -Glykoprotein-I³⁷

²⁹ Kamboh (1988)

³⁰ Asherson (2002)

³¹ Nakaya (1980)

³² McNeil (1990)

³³ De Groot (2011)

³⁴ Bouma (1999)

³⁵ Rouby (1992)

³⁶ Schwarzenbacher (1999)

³⁷ Asherson (2002)

1.3.1 Strukturelle Charakterisierung von β_2 -Glykoprotein-I

β_2 -Glykoprotein-I ist ein einkettiges Glykoprotein mit 326 Aminosäuren und einem Molekulargewicht im Bereich von 43-50kDa. Das Protein enthält elf Disulfidbrücken und fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen für Galaktose, Mannose, N-Acetylglucosamin, Fucose und N-Acetylneuraminsäure.³⁸ β_2 -Glykoprotein-I besteht größtenteils aus β -Faltblattstrukturen und „random coils“ mit α -helikalem Charakter.³⁹ Die Proteinkette (Abbildung 3) umfasst vier Short-Consensus-Repeats (SCRs) vom Complement-Control-Protein-Typ (CCP) mit der Bezeichnung GP-I oder Sushi-Domäne und eine fünfte C-terminale Domäne.^{40 41} Jede Domäne weist zwei Disulfidbrücken auf, Domäne V jedoch divergiert vom SCR-Modul und besitzt eine zusätzliche Disulfidbrücke sowie einen langen C-terminalen Loop.⁴² Die ersten vier Domänen (je ~ 60 Aminosäuren) verfügen über eine ähnliche Struktur, während die fünfte Domäne (84 Aminosäuren) sehr variabel ist und einen Cluster an positiv geladenen Aminosäuren (282-287), sowie vier hochkonservierte hydrophobe Aminosäuren (313-316) besitzt.⁴³ Die zusätzlichen Aminosäuren in Domäne V sind verantwortlich für besondere Funktionen und bewirken eine positive Ladung, wodurch die Affinität für anionische Phospholipide bestimmt wird.⁴⁴ Aufgrund dieser Architektur bindet β_2 -Glykoprotein-I an negativ geladene Oberflächen wie Heparin, DNA, Zellmembranen, Endothelzellen, Makrophagen und saure Phospholipide.⁴⁵

³⁸ Kamboh (1988)

³⁹ Lozier (1984)

⁴⁰ Matsuura (2000)

⁴¹ Schwarzenbacher (1999)

⁴² Matsuura (2000)

⁴³ Mehdi (2000)

⁴⁴ De Groot (2011)

⁴⁵ Schwarzenbacher (1999)

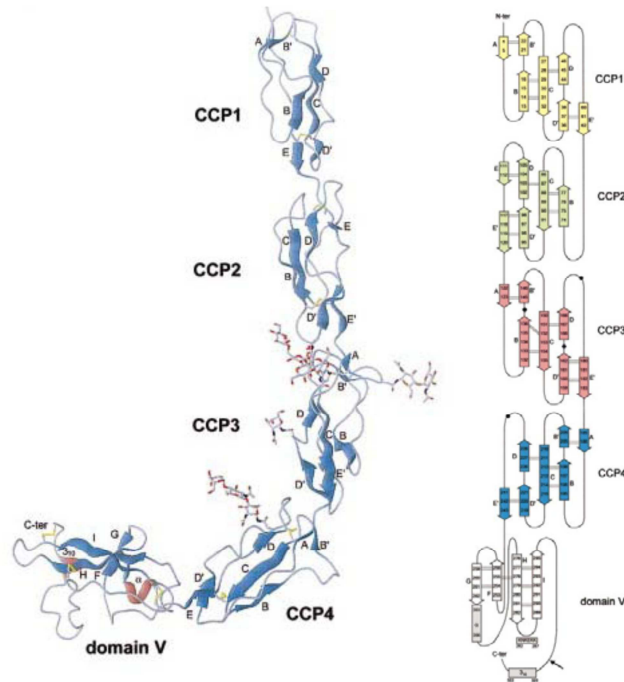


Abbildung 3: Darstellung der Sekundärstruktur (links) und des Topologiediagrammes (rechts) von β_2 -Glykoprotein-I⁴⁶

Mit Hilfe der Sequenzanalyse ermittelten *Lozier et al.* die Aminosäuren-Zusammensetzung (Tabelle 1), wobei Prolin die am häufigsten vorkommende Aminosäure ist. β_2 -Glykoprotein-I besitzt somit, außer Kollagen und verwandten Molekülen, eine der prolinreichsten Strukturen aller eukaryotischen Proteine. Cystein ist die fünfthäufigste Aminosäure und scheint eine Rolle bei den Disulfidbindungen zu haben. Es wird vermutet, dass der hohe Anteil an Prolin und Cystein, gekoppelt mit dem hohen Gehalt an Glycin, das häufige Auftreten von β -Faltblattstrukturen beeinflusst.⁴⁷

Tabelle 1: Darstellung der Aminosäuren-Zusammensetzung von β_2 -Glykoprotein-I⁴⁸

Amino acid	No. of residues	Amino acid	No. of residues
Aspartic acid	14	Valine	18
Asparagine	15	Methionine	4
Threonine	27	Isoleucine	13
Serine	19	Leucine	17
Glutamic acid	20	Tyrosine	14
Glutamine	4	Phenylalanine	18
Proline	31	Lysine	30
Glycine	23	Histidine	5
Alanine	17	Arginine	10
Half-cystine	22	Tryptophan	5

⁴⁶ Schwarzenbacher (1999)

⁴⁷ Lozier (1984)

⁴⁸ Lozier (1984)

1.3.2 Genetik von β_2 -Glykoprotein-I

Bereits durchgeführte Studien zeigten, dass die Menge an β_2 -Glykoprotein-I (APOH) im Plasma genetisch bedingt ist. Die Proteinkonzentrationen werden von einem Paar autosomal kodominanter Allele, genannt Bg^N und Bg^D , kontrolliert. Bei Individuen die homozygot für Bg^N sind wurde festgestellt, dass deren Konzentration an β_2 -Glykoprotein-I im Plasma zwischen 16 und 30mg/dl liegt, heterozygote (Bg^N und Bg^D) zeigten Konzentrationen zwischen 6 und 14mg/dl.⁴⁹ Das APOH-Gen umfasst 18 Kilobasen (kb), enthält acht Exons (Abbildung 4) und wurde am Chromosom 17q23-24 lokalisiert.⁵⁰ β_2 -Glykoprotein-I wird hauptsächlich in der Leber und sporadisch in intestinalen Zelllinien und Geweben exprimiert.^{51 52}

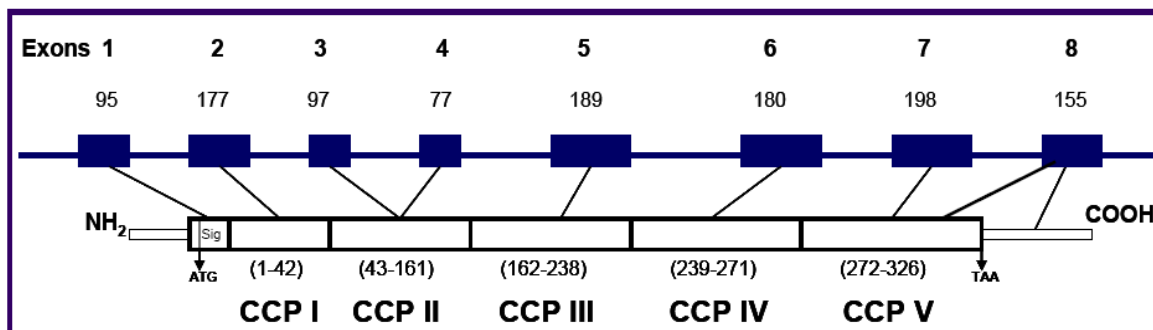


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Intron-Exon-Organisation von β_2 -Glykoprotein-I⁵³

Mit Hilfe von Primer-Extension-Analysen konnten alternative Transkriptionsstartpunkte (transcription start sites, TSSs) bei 31 Basenpaaren (bp) und 21 Basenpaaren (bp), stromaufwärts des APOH Translationsstartcodons, ermittelt werden. TSS bei 31 Basenpaaren stimmt mit der Konsensussequenz eines Initiator-Elementes (*Inr*) überein, welche die Transkriptionsinitiation aufrechterhält. Eine atypische TATA-Box sowie HNF-1 α cis Elemente konnten in weiterer Folge identifiziert werden, die für die APOH zelltypspezifische Transkriptionsregulation der unterschiedlichen Expression beim Menschen eine maßgebliche Rolle spielen.⁵⁴

⁴⁹ Gries (1989)

⁵⁰ Mehdi (2003)

⁵¹ Suresh (2010)

⁵² Sanghera (1997, 57)

⁵³ Suresh (2008)

⁵⁴ Suresh (2010)

1.3.3 Polymorphismen von β_2 -Glykoprotein-I

β_2 -Glykoprotein-I weist genetisch determinierte strukturelle Polymorphismen auf, die mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) und Immunoblotting detektierbar sind.⁵⁵ Hierbei wurden die Allele APOH*1, APOH*2 und APOH*3 beobachtet, die die Expression von sechs Phänotypen kontrollieren. Diese werden als 1-1, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2 und 3-3 bezeichnet. Ein weiteres Allel, APOH*4, wurde nur in Populationen afrikanischer Abstammung nachgewiesen. APOH*2 ist die häufigste Isoform mit einer relativen Allelfrequenz von >85% in allen Populationen, gefolgt von APOH*1 und APOH*3.^{56 57 58} Verschiedene Arbeiten beschäftigten sich mit drei monoklonalen IgG Antikörpern (mAb), die gegen humanes β_2 -Glykoprotein-I gerichtet sind, mit der Bezeichnung 3G9, 1B4 und 3D11. mAb 3G9 und 1B4 erkannten freies und phospholipidgebundenes β_2 -Glykoprotein-I und reagierten mit allen Isoformen der APOH-Allele. Der monoklonale Antikörper (mAb) 3D11 erkannte jedoch nur eine Form des APOH*3 Allels, genannt APOH*3^W, welches anionische Phospholipide nicht bindet.⁵⁹ APOH*3 kann aufgrund der Reaktivität zu monoklonalen Antikörpern (3D11) somit in zwei Subtypen unterteilt werden, in APOH*3^W (reaktiv) und APOH*3^B (nicht-reaktiv). Plasmaproben, die mit mAb 3D11 reagieren, können daher homozygot (H3^W/H3^W) oder heterozygot (H3^W/H3^B) sein.⁶⁰

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Allelen beruhen auf Missense-Mutationen (Abbildung 5) in den Genabschnitten (Exons), einschließlich Ser88Asn, Val247Leu, Cys306Gly und Trp316Ser. Eine Missense-Mutation in Exon 3 verändert den Aminosäurerest von Serin zu Asparagin am Codon 88, wodurch sich das APOH*1 Allel von APOH*2 unterscheidet. Eine weitere Missense-Mutation (TGG/TCG) in Exon 8 verändert am Codon 316 Tryptophan zu Serin und differenziert somit das APOH*3^W Allel vom APOH*2 Allel. Die Val247Leu und Cys306Gly Missense-Mutationen korrespondieren nicht mit Proteinpolymorphismen, da sich diese in der Domäne V befinden und die Bindung von β_2 -Glykoprotein-I an Phosphatidylserin aufheben.^{61 62}

⁵⁵ Kamboh (2004)

⁵⁶ Sanghera (1997, 311)

⁵⁷ Sanghera (1997, 57)

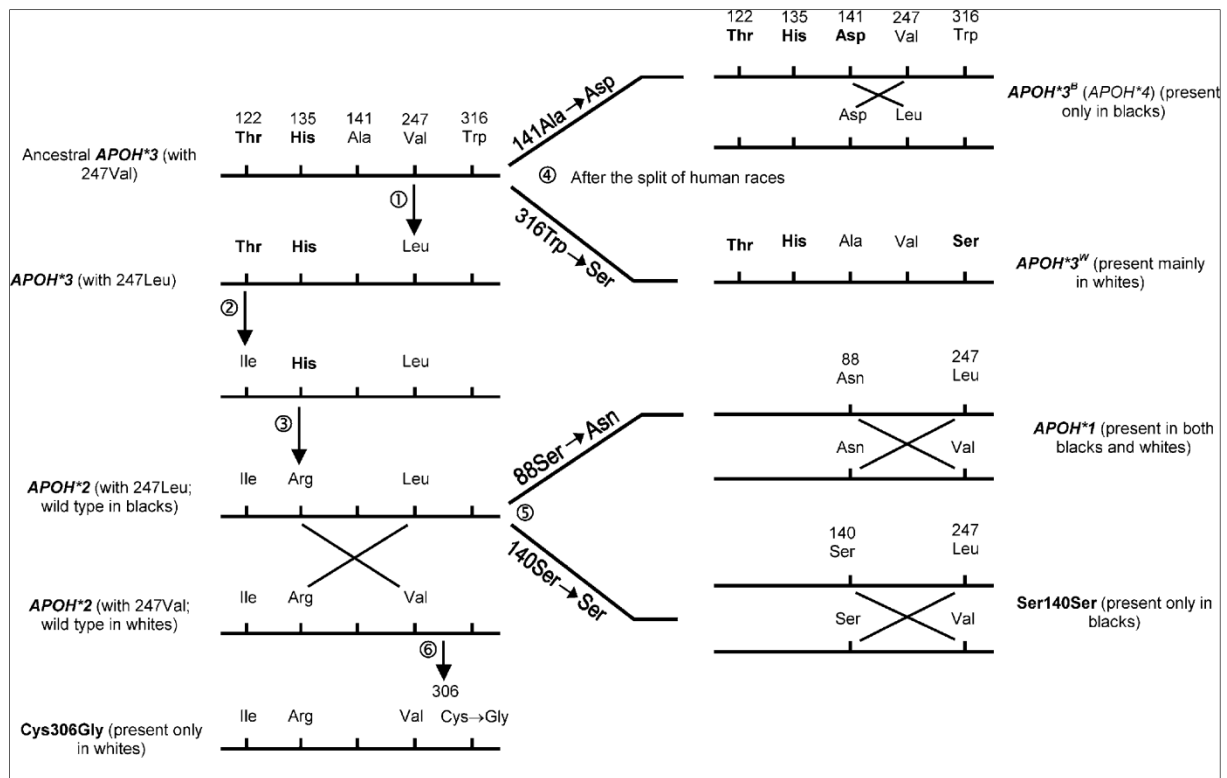
⁵⁸ Leduc (2008)

⁵⁹ Sanghera (1997, 311)

⁶⁰ Sanghera (1997, 57)

⁶¹ Kamboh (2004)

⁶² Mehdi (2000)


 Abbildung 5: Evolutionärer Verlauf der verschiedenen APOH-Haplotypen ⁶³

1.3.4 Funktionen von β_2 -Glykoprotein-I

1.3.4.1 Lipid-Metabolismus

Zunächst wurde angenommen, dass β_2 -Glykoprotein-I hauptsächlich in den Lipid-Metabolismus involviert ist, da viele zirkulierende Proteine an Lipoproteine gebunden sind und β_2 -Glykoprotein-I das Enzym Lipoproteinlipase (LPS) im Triglyzerid-Stoffwechsel aktivieren kann. Allerdings spielt β_2 -Glykoprotein-I auch in der Gerinnungskaskade und bei atherosklerotischen Prozessen über immunologische Reaktionen eine bedeutende Rolle.⁶⁴ 1980 postulierten *Nakaya et al.*, dass β_2 -Glykoprotein-I durch die Stimulation von APOC-II die enzymatische Aktivität der Lipoproteinlipase um etwa 45% im Triglyzerid-Metabolismus erhöht.⁶⁵

Im menschlichen Blutplasma wurde mit Hilfe der Ultrazentrifugation ein Teil von β_2 -Glykoprotein-I in der Lipoproteinfraktion gefunden, weshalb β_2 -Glykoprotein-I auch als Apolipoprotein-H bezeichnet wird. β_2 -Glykoprotein-I bindet an verschiedene Arten von negativ geladenen Substanzen, wie zum Beispiel Phospholipide oder Lipoproteine. Die

⁶³ Kamboh (2004)

⁶⁴ Leduc (2008)

⁶⁵ Nakaya (1980)

genaue Funktion von β_2 -Glykoprotein-I ist jedoch nicht bekannt.⁶⁶ Chylomikronen und VLDL (very low density lipoprotein) werden über den Darm, beziehungsweise die Leber, sezerniert und sind große Lipid-Protein-Komplexe, die beim Transport und Metabolismus von Triglyzeriden, Cholesterin und Cholesterinestern beteiligt sind. Etwa 35% der Menge an β_2 -Glykoprotein-I im Plasma werden mit den verschiedenen Lipoproteinklassen assoziiert. In Chylomikronen und VLDL liegt der Anteil an β_2 -Glykoprotein-I bei etwa 16%, in LDL (low density lipoprotein) bei etwa 2 % und in HDL (high density lipoprotein) bei etwa 17%. Der restliche Anteil an β_2 -Glykoprotein-I im Plasma (65%) befindet sich in der lipidfreien Fraktion.⁶⁷

1.3.4.2 Antiphospholipidsyndrom (APS)

Das Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom (APS) ist durch die Gegenwart klinischer Merkmale, wie venöser oder arterieller Thrombose, Fehlgeburten, autoimmuner Thrombozytopenie und zirkulierender Antiphospholipid-Antikörper (aPL) gekennzeichnet.⁶⁸ APS kann alleine auftreten (primäres APS) oder in Verbindung mit systemischem Lupus Erythematodes (SLE), anderen Autoimmunerkrankungen und in seltenen Fällen im Zusammenhang mit Infektionen oder Medikamenten.⁶⁹ Das Vorhandensein von Antiphospholipid-Antikörpern (aPL) ist die Voraussetzung für die Diagnose dieses Syndroms. Die aPL bilden eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern mit ausgeprägter Spezifität für Cardiolipin sowie für Plasmaproteine mit hoher Affinität zu anionischen Phospholipiden wie β_2 -Glykoprotein-I.⁷⁰ Die klinisch wichtigsten Untergruppen von aPL sind somit Anti-Cardiolipin Antikörper (aCL) und Anti- β_2 -Glykoprotein-I Antikörper, während der Lupus-Antikoagulans-Test aPL indirekt detektiert. Die Laborkriterien erfordern die Anwesenheit von aPL in zwei Messungen, welche im Abstand von 12 Wochen durchgeführt werden. Nach den Klassifikationskriterien von 2006 liegt ein APS nur dann vor, wenn mindestens eine dieser klinischen Untergruppen und eines der Laborkriterien erfüllt sind.⁷¹ β_2 -Glykoprotein-I ist das bedeutendste Autoantigen im Zusammenhang mit APS.⁷² Im Jahr 1990 berichteten drei

⁶⁶ Igarashi (1996)

⁶⁷ Lee (1983)

⁶⁸ Hörkkö (1997)

⁶⁹ Miyakis (2004)

⁷⁰ Devreese (2012)

⁷¹ Johnson (2010)

⁷² Ioannou (2011)

unabhängige Arbeitsgruppen, dass aPLs nicht direkt an Phospholipide binden, sondern über den Kofaktor β_2 -Glykoprotein-I.^{73 74 75} Domäne I dieses Kofaktors bindet an die Autoantikörper, während Domäne V eine Bindung mit anionischen Oberflächen der Phospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol, weniger gut mit Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, eingeht.^{76 77}

Eine Reihe von Studien hat den Nachweis erbracht, dass Autoantikörper gegen β_2 -Glykoprotein-I ein wesentlicher Risikofaktor für eine arterielle Thrombose bei jungen Erwachsenen sind.⁷⁸

1.3.4.3 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

Systemischer Lupus Erythematoses ist eine Autoimmunerkrankung, die durch die Produktion von Autoantikörpern gegen mehrere Antigene gekennzeichnet ist. Die Erkrankung tritt bei Frauen häufiger auf als bei Männern.⁷⁹ Antiphospholipid-Antikörper wie aCL und Lupus-Antikoagulans (LA) treten am häufigsten bei PatientInnen mit SLE auf. Diese Antikörper werden mit arterieller und venöser Thrombose, Thrombozytopenie und Fehlgeburten assoziiert.⁸⁰ Der Großteil der Lupus-Antikoagulans-Antikörper ist β_2 -Glykoprotein-I-abhängig, aber auch Prothrombin wird als Kofaktor für die Expression der LA-Aktivität vermutet. Da β_2 -Glykoprotein-I ein Inhibitor der intrinsischen und extrinsischen Gerinnungskaskade ist, können Antikörper mit LA-Aktivität die Bindung von β_2 -Glykoprotein-I an anionische Phospholipide erhöhen und somit die Prothrombin-Umwandlung und Faktor X-Aktivierung beeinträchtigen oder hemmen.⁸¹

1.3.4.4 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine zunehmend verbreitete vaskuläre Komplikation bei Autoimmunität. PatientInnen mit systemischen Autoimmunerkrankungen wie SLE und APS entwickeln

⁷³ McNeil (1990)

⁷⁴ Galli (1990)

⁷⁵ Matsuura (1990)

⁷⁶ Yang (2012)

⁷⁷ Hörkkö (1997)

⁷⁸ Ioannou (2011)

⁷⁹ Kamboh (1999)

⁸⁰ Nojima (2001)

⁸¹ Safa (1999)

lebensbedrohliche Komplikationen sowohl in venösen als auch in arteriellen Blutgefäßen.⁸² Es wird vermutet, dass oxidierte Lipoproteine einen Beitrag zur Entwicklung der Atherosklerose leisten. Oxidiertes LDL (ox-LDL) und oxidiertes Lipoprotein(a) [Lp(a)] induzieren eine intrazelluläre Akkumulation von Cholesterylestern in Makrophagen, welche aus spezifischen Reaktionen in Schaumzellen resultieren.⁸³ Oxidiertes LDL ist das wichtigste Lipoprotein, das in atherosklerotischen Läsionen gefunden wurde und reagiert mit β_2 -Glykoprotein-I und immunreaktiven Lymphozyten. Diese Erkenntnisse zeigten in weiterer Folge die Teilnahme von Antiphospholipid-Antikörpern an der Atherogenese.⁸⁴ Die Kolokalisation von ox-LDL und β_2 -Glykoprotein-I in atherosklerotischen Läsionen deutet auf eine aktive Rolle von β_2 -Glykoprotein-I in der Atherogenese hin. β_2 -Glykoprotein-I bindet an ox-LDL, nicht aber an natives LDL, wobei der oxLDL/ β_2 GPI-Komplex entsteht (Abbildung 6).⁸⁵

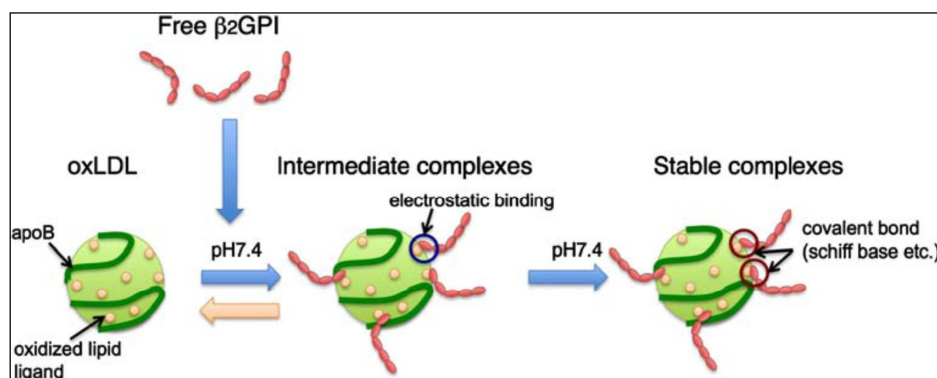


Abbildung 6: Darstellung der oxLDL/ β_2 GPI-Komplexbildung⁸⁶

1.3.4.5 Blutgerinnung

Verschiedene Arbeiten deuteten darauf hin, dass β_2 -Glykoprotein-I eine wichtige Rolle in der Gerinnungskaskade, Thrombozytenaktivierung und der Gerinnungsbildung spielt.^{87 88}

β_2 -Glykoprotein-I zeigt eine Vielzahl an gerinnungshemmenden Eigenschaften wie zum Beispiel die Hemmung der Kontaktaktivierung und der Prothrombinase-Aktivität auf

⁸² Lopez (2009)

⁸³ Zhang (2011)

⁸⁴ Matsuura (2005)

⁸⁵ Lopez (2009)

⁸⁶ Lopez (2009)

⁸⁷ Schousboe (1980)

⁸⁸ Nimpf (1987)

aktivierten humanen Blutplättchen oder Phospholipidvesikeln. Weiters ist β_2 -Glykoprotein-I in der Lage, die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation zu inhibieren.⁸⁹ Die Mitwirkung von β_2 -Glykoprotein-I in der Gerinnungskaskade scheint vielseitig zu sein, da das Protein sowohl gerinnungshemmende als auch prokoagulatorische Aktivitäten ausübt (Abbildung 7). Die Bindung von β_2 -Glykoprotein-I an anionische Phospholipide auf aktivierten Blutplättchen und Endothelzellen konkurriert möglicherweise mit den Gerinnungsfaktoren.⁹⁰

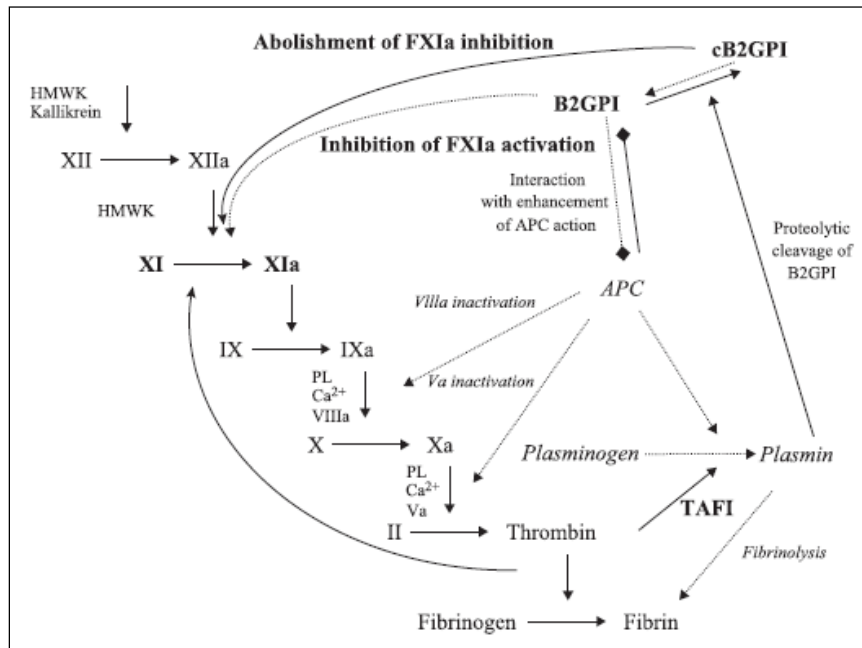


Abbildung 7: Rolle von β_2 -Glykoprotein-I in der Gerinnungskaskade⁹¹

1.4 Isoformen

Umfassende Analysen von humanen Plasmaproteinen können eine erhebliche Bedeutung bei der Identifizierung von zirkulierenden Biomarkern haben. Diese zirkulierenden Proteine besitzen jedoch ein breites Spektrum an Proteinkonzentrationen und viele treten in mehreren Isoformen auf, weshalb diese separat quantifiziert werden müssen.⁹² In der Molekularbiologie werden Isoformen als Varianten eines Proteins bezeichnet, die mit leichten bis größeren Unterschieden auftreten können. Diese können zum Beispiel von verschiedenen Genen oder vom selben Gen durch alternatives Splicing hergestellt werden.⁹³

⁸⁹ Horbach (1999)

⁹⁰ Miyakis (2004)

⁹¹ Miyakis (2004)

⁹² Misesk (2005)

⁹³ Babylon (2012)

Posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel die Glykosylierung, resultieren in einer großen Anzahl von Protein-Varianten (Isoformen), wobei diese Heterogenität besonders in Kohlenhydratgruppen von Glykoproteinen nachgewiesen wurde.⁹⁴ Die Mikroheterogenität ist unter Glykoproteinen weit verbreitet und vor allem auf die Unterschiede in der Kohlenhydrat-Struktur zurückzuführen. Schon die kleinste Veränderung kann einen Konformationswechsel des Proteins und eine Änderung der Protein-Turnover-Zeit bewirken, wodurch die Interaktionen mit anderen Molekülen und Zellen beeinflusst werden.⁹⁵

Weitere Beispiele für das Vorhandensein von Isoformen sind genetische Polymorphismen (SNP's), posttranskriptionelle (zum Beispiel RNA-Edition) Modifikationen, modifizierte funktionelle Aminosäuregruppen (zum Beispiel durch Phosphorylierung, Acetylierung) oder Proteolyse. Die Verteilung der Isoformen kann aufgrund physiologischer Regulation und pathologischer Prozesse verändert werden, wodurch das Verteilungsmuster der Isoformen (durch Isoelektrische Fokussierung nachweisbar) eine hohe klinische Bedeutung besitzt.^{96 97 98}

1.4.1 Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I

Das gegenwärtige Interesse an der Suche nach Biomarkern im menschlichen Plasma erfordert die Entwicklung von optimierten Protokollen, um Proteinartefakte zu vermeiden, welche aus der Degradierung von zellulären Elementen oder Veränderungen der zirkulierenden Proteine resultieren können. Zahlreiche Studien haben auf Proteinmodifikationen als eine essentielle Quelle für Biomarker hingewiesen.⁹⁹

Glykosylierungsstudien von β_2 -Glykoprotein-I zeigten ein hohes Maß an Glykan-Heterogenität, welche vor allem die Fucosylierung und Sialylierung betrifft. Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung von β_2 -Glykoprotein-I konnten fünf Hauptbanden mit isoelektrischen Punkten (PIs) zwischen 5,1 und 6,1¹⁰⁰, sowie zwei Proteinbanden des

⁹⁴ Maiiadiagnostics (2012)

⁹⁵ Lönnberg (2006)

⁹⁶ Chemie.de (2012]

⁹⁷ Packer (1996)

⁹⁸ Maiiadiagnostics (2012)

⁹⁹ Misek (2005)

¹⁰⁰ Kamboh (2004)

Neuraminidase-behandelten β_2 -Glykoprotein-I im pH-Bereich 7-9, identifiziert werden (Abbildung 8).¹⁰¹

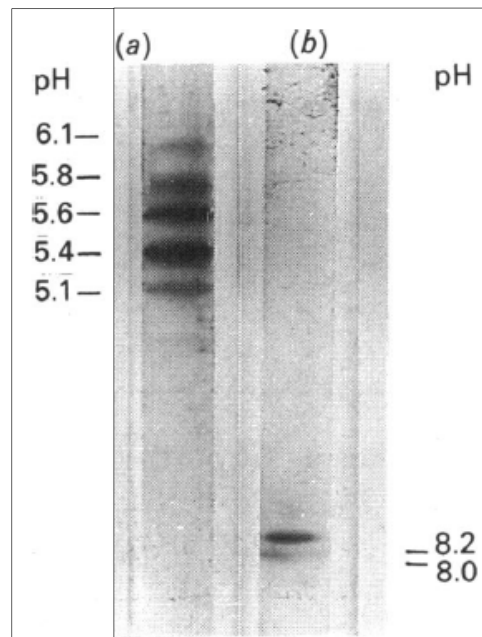


Abbildung 8: Isoelektrische Fokussierung von β_2 -GPI (a) und Neuraminidase-behandeltem β_2 -GPI (b) in 7,5 % Polyacrylamid mit 6 M Harnstoff¹⁰²

Die Arbeit von *Kamboh et al.* (1988) beschäftigt sich mit der Identifizierung der strukturellen Variationen am APO-H-Lokus in der weißen und schwarzen Bevölkerung der USA. Hierbei wurden drei gemeinsame Allele in beiden Gruppen beobachtet, während ein viertes, seltenes Allel nur in der schwarzen Bevölkerung identifiziert wurde. APOH*1 synthetisiert größtenteils saure Isoformen, APOH*2 liegt im mittleren Bereich und APOH*3 zeigt Isoformen im eher basischen Bereich. Die Phänotypen werden im homozygoten Zustand als APO H 1-1, APO H 2-2 und APO H 3-3 und im heterozygoten Zustand als APO H 2-1, APO H 3-1 und APO H 3-2 bezeichnet. Beides resultiert aus der kodominanten Expression von zwei Allelen. Zusätzlich zu den sechs Phänotypen wurde bei den schwarzen StudienteilnehmerInnen ein weiteres Allel (APOH*4) identifiziert, welches im heterozygoten Zustand in Kombination mit APOH*2 auftritt und somit als APO H 4-2 bezeichnet wird (Abbildung 9 und 10).¹⁰³

¹⁰¹ Gries (1989)

¹⁰² Gries (1989)

¹⁰³ Kamboh (1988)

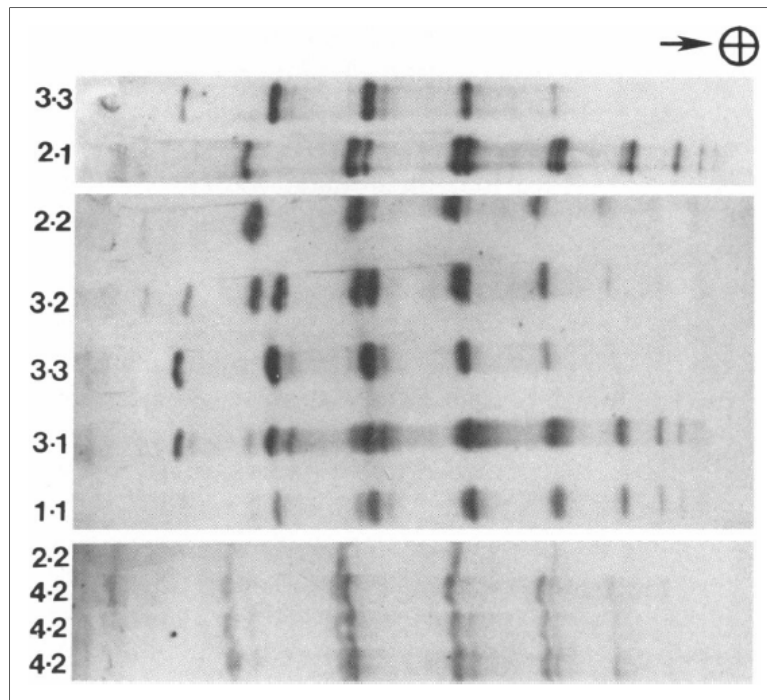


Abbildung 9; APO H Immunoblot-Muster in 5 % IEF Polyacrylamidgel mit 3 M Harnstoff in Kombination mit zwei Trägerampholyten (pH 4-6,5 und pH 5-8) aus verschiedenen Plasmen

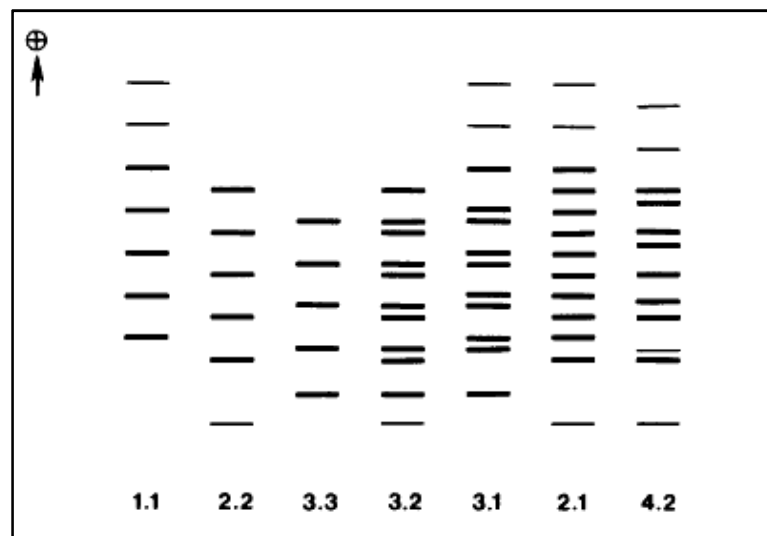


Abbildung 10: Schematische Darstellung der APOH-Phänotypen

In Anlehnung an die Ergebnisse von *Kamboh et al.*¹⁰⁴ untersuchten *Richter und Cleve (1988)* Seren von mehr als 400 gesunden BlutspenderInnen aus München und Tirol. Die Verteilung in beiden Probandengruppen zeigte ähnliche Resultate. Der häufigste Phänotyp von β_2 -Glykoprotein-I wird in dieser Publikation als B2G 2 (APOH*2) bezeichnet und wurde in 77-

¹⁰⁴ Kamboh (2004)

80 % der Testpersonen gefunden. Die ungefähren pI-Werte liegen hier bei 5.4, 5.7, 5.9 und 6.2. Die Phänotypen 1-2 und 2-3 wurden in 10 % der Testpersonen und 1-3 in vier Testpersonen (1 %) identifiziert. Personen mit dem Phänotyp 3 (APOH*3) konnten in dieser Studie nicht identifiziert werden und APOH*4 wurde ausgeschlossen. Die sechs Phänotypen werden in dieser Arbeit als B2G 1, 2, 1-2, 2-3, 1-3 und 2-4 bezeichnet (Abbildung 11).¹⁰⁵

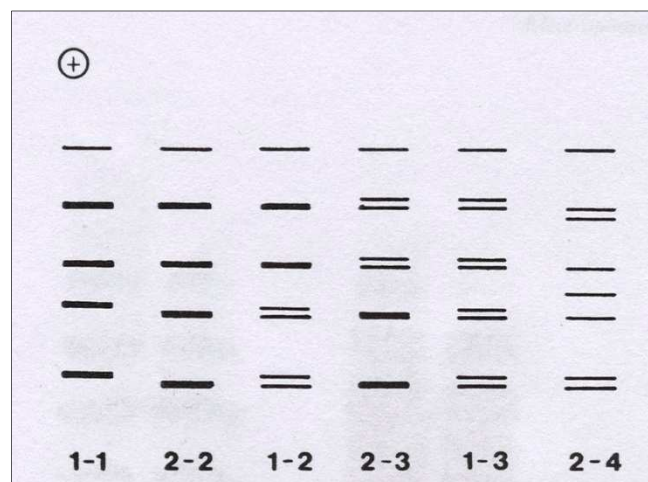


Abbildung 11: Darstellung der B2G-Phänotypen¹⁰⁶

1.5 N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure)

Mitglieder der Sialinsäure-Familie kommen in einer Vielzahl von Geweben und Körperflüssigkeiten sowie Bakterien vor und sind in konjugierte Proteine miteingebaut. Natürlich vorkommende Sialinsäuren sind substituierte Neuraminsäure-Derivate, wie zum Beispiel N-Acetyl-, N-Glykoly- oder N- und O-Diacetyl-Neuraminsäuren.¹⁰⁷ Als N-Acetyl- oder N-Glykoly-Verbindung ist die Neuraminsäure Bestandteil der Blutgruppenantigene, membranbildender Glykolipide und vieler Glykoproteine.¹⁰⁸ Die N-Acetyl-Neuraminsäure geht durch zwei Reaktionen aus Mannosamin hervor: Einerseits durch die Bindung eines Pyruvatrestes (Abbildung 12, rot) an das C1-Atom von Mannosamin (Abbildung 12, schwarz), wobei die Neuraminsäure entsteht und andererseits durch die Acetylierung des Aminorestes, woraus die N-Acetyl-Neuraminsäure resultiert.¹⁰⁹

¹⁰⁵ Richter (1988)

¹⁰⁶ Richter (1988)

¹⁰⁷ Warren (1959)

¹⁰⁸ Doenecke (2005)

¹⁰⁹ Horn (2009)

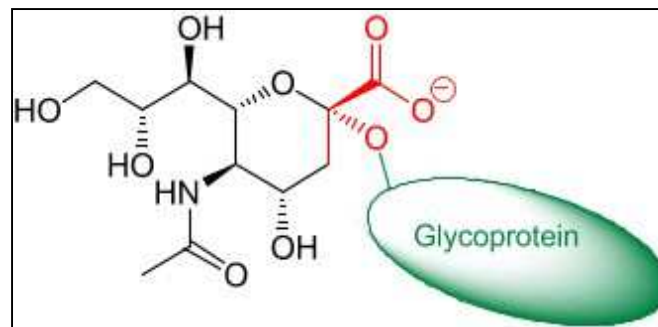


Abbildung 12: Verknüpfung der Sialinsäure mit einem Glykoprotein¹¹⁰

Häufig kommen Neuraminsäuren am Ende von Kohlenhydratketten vor und sind für die negative Außenladung eukaryotischer Zellen mitverantwortlich. Besonders Erythrozyten sind reich an Neuraminsäure, weshalb sich diese durch die negative Ladung im Blutstrom abstoßen. Im Alter wird der Neuraminsäure-Anteil der Erythrozyten reduziert und es kann zu Verklumpungen kommen, was zum Abbau in der Milz führt.¹¹¹

Bei den löslichen Glykoproteinen im Blutplasma bestimmt der Kohlenhydratanteil die Lebensdauer. Nahezu alle Glykoproteine besitzen endständige Sialinsäuren (N-Acetyl-Neuraminsäure). Für die Abspaltung dieser endständigen Sialinsäure ist das Enzym Neuraminidase verantwortlich, das sich in den Wänden der Blutgefäße befindet. Der nach der Abspaltung der Sialinsäure folgende Zucker (Galaktose) signalisiert dann ein gealtertes Glykoprotein.^{112 113} Für die Aufnahme vieler Sialinsäure-freier Glykoproteine in die Hepatozyten und deren Ausscheidung in die Galle ist ein Galaktose-spezifischer Rezeptor verantwortlich, der als Asialo-Glykoproteinrezeptor bezeichnet wird.¹¹⁴ Asialoglykoprotein-Rezeptoren (ASGPR) werden in den Hepatozyten exprimiert und sind für die Beseitigung der Asialoglykoproteine im Plasma verantwortlich. Verschiedene Erkrankungen, wie zum Beispiel Leberzirrhose oder Leberfibrose, korrelieren mit einer signifikanten Reduktion des Gehaltes an ASGPR im Plasma, weshalb diese als Marker für die Hepatozytenfunktion oder Leberfibrose dienen könnten.¹¹⁵

¹¹⁰ Chemgapedia (2012)

¹¹¹ Hirsch-Kaufmann (2006)

¹¹² Horn (2012)

¹¹³ Hirsch-Kaufmann (2009)

¹¹⁴ Dancygier (2003)

¹¹⁵ Veselkin (2011)

2 Methoden

2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine sehr effiziente Weiterentwicklung einfacher Elektrophoresemethoden ist die SDS-PAGE, oder auch Disk-Elektrophorese (Disk = diskontinuierlich) genannt. Während bei anderen Elektrophoresemethoden der poröse Träger, der die Pufferlösung aufnimmt, größtenteils zur Verhinderung der Wärmebewegung dient, ist dieser bei der SDS-PAGE für die Trennung selbst von entscheidender Bedeutung.¹¹⁶ Die Methode der SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wird vor allem zur Auftrennung von Proteinen bezüglich ihres Molekulargewichtes verwendet.¹¹⁷ Die von *Ornstein (1964)* und *Davis (1964)* entwickelte DISK-Elektrophorese ist somit die Methode der Wahl zur Analyse von Proteinen in Polyacrylamidgelen, insbesondere die modifizierte Variante der SDS-PAGE von *Laemmli* aus dem Jahre 1970.^{118 119}

2.1.1 Prinzip – SDS-PAGE

Proteine wandern aufgrund ihrer positiven und negativen Ladungen in einem elektrischen Feld, wobei die Wanderung durch ihre Größe, Gestalt und Nettoladung bestimmt wird. Mit Hilfe der Elektrophorese kann eine Auftrennung der zu analysierenden Proteine in einem Trägermedium, aber auch in freier Lösung durchgeführt werden.¹²⁰ Die Diskontinuität der SDS-PAGE-Methode bezieht sich auf den pH-Wert und die Art und Konzentration der Ionen in den verschiedenartigen Puffern, sowie die Gelstruktur, bei der ein großporiges Sammelgel einem engporigen Trenngel aufgelagert ist.¹²¹ Sammel- und Trenngel setzen sich aus einem Polymer von Acrylamid-Monomeren und N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer zusammen, wobei die Porengröße des Gels durch die Konzentration an Acrylamid und den Gehalt an Vernetzer festgelegt wird.¹²² Durch die Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) kommt es zur Überdeckung der Eigenladungen der Proteine,

¹¹⁶ Hallbach (2006)

¹¹⁷ Gey (2008)

¹¹⁸ Eckert (1997)

¹¹⁹ Pingoud (1997)

¹²⁰ Löffler (2007)

¹²¹ Eckert (1997)

¹²² Matissek (2010)

wobei anionische Mizellen entstehen.¹²³ Pro Gramm Protein binden etwa 1,4 Gramm SDS und denaturieren Proteine, sodass diese ihre Quartär-, Tertiär- und teilweise auch ihre Sekundärstruktur verlieren.^{124 125} Bei der SDS-PAGE wird ein Elektrodenpuffer mit Glycin-Ionen bei einem pH-Wert von 8,8 eingesetzt, während die Sammel- und Trenngelpuffer Chlorid-Ionen enthalten. Der pH-Wert des Trenngels (pH 8,8) ist höher als der des Sammelgels (pH 6,8).¹²⁶ Durch die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Startreagenz erfolgt die Polymerisation.¹²⁷ Die Durchführung der SDS-PAGE von Proteinen erfolgt meist in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Abbildung 13), wobei die aufzutrennenden Proteine in die Geltaschen im Sammelgel appliziert werden.¹²⁸

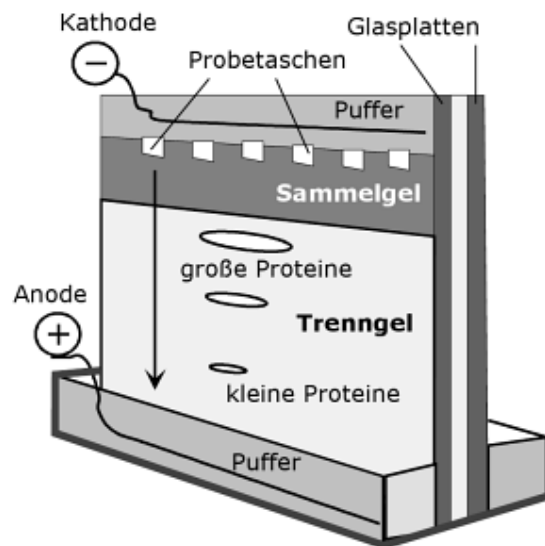


Abbildung 13: Vertikale Elektrophorese-Apparatur für SDS-PAGE¹²⁹

Nach Anlegen einer Spannung setzen sich die Chlorid-Ionen (sogenannte Leitonen) mit hoher Mobilität in Bewegung, während die Glycinmoleküle (sogenannte Folgeionen), die größtenteils als Zwitterionen mit der Nettoladung Null vorliegen, hinter den Chlorid-Ionen zurückbleiben. Es bildet sich eine Zone geringer Ionendichte zwischen den Leit- und Folgeionen aus, wodurch die mehr oder weniger negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe

¹²³ Mohrlüder (2007)

¹²⁴ Pingoud (1997)

¹²⁵ Gey (2008)

¹²⁶ Pingoud (1997)

¹²⁷ Matissek (2010)

¹²⁸ Gey (2008)

¹²⁹ Gey (2008)

konzentriert werden (Prinzip der Isotachophorese).^{130 131} Die Proteine werden somit zu einer sehr schmalen und scharf begrenzten Zone mit hoher Konzentration gesammelt und gelangen durch die Wanderung in Richtung Anode an die Grenzschicht des engporigen Trenngels.¹³² Im engporigen Trenngel wird Glycin durch den Anstieg des pH-Wertes (pH 8,8) negativ geladen und überholt die Proteine, wodurch diese aufgrund ihrer Größe nach dem „Molekularsiebeffekt“ aufgetrennt werden.¹³³

Um das Molekulargewicht (MW) der Proteine bestimmen zu können, werden zum Vergleich der elektrophoretischen Trennung Standardproteine bekannter Molekulargewichte verwendet.¹³⁴ Die aufgetrennten Proteine müssen nach Beendigung des Laufes gefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Die Färbung erfolgt meist mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau oder bei geringen Proteinmengen mit der hochempfindlichen Silberfärbung.¹³⁵

2.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine elektrophoretische Methode, welche in einem pH-Gradienten durchgeführt wird. Amphotere Verbindungen wie Proteine, Enzyme oder Poly- und Oligopeptide mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten können auf diese Weise voneinander getrennt werden.¹³⁶ Die isoelektrische Fokussierung kann ausschließlich bei amphoteren Verbindungen angewendet werden.¹³⁷ Aufgrund der Vielzahl an protonierbaren Gruppen mit verschiedenen pK-Werten tragen diese, je nach pH-Wert der Lösung, entweder positive oder negative Überschussladungen. Amphotere Proteine können deshalb sowohl als Säure als auch als Base vorkommen.¹³⁸ Während der Elektrophorese wandern die Moleküle je nach Ladung zur Anode oder Kathode, wobei es zum Verlust der effektiven Gesamtladungen im stabilisierten pH-Gradienten kommt. Die Moleküle verlieren an Geschwindigkeit und werden an ihrem isoelektrischen Punkt (IEP, pI) fokussiert, dem pH-

¹³⁰ Eckert (1997)

¹³¹ Pingoud (1997)

¹³² Mohrlüder (2007)

¹³³ Eckert (1997)

¹³⁴ Gey (2008)

¹³⁵ Löffler (2007)

¹³⁶ Budin (1995)

¹³⁷ Geckeler (1998)

¹³⁸ Adam (2009)

Wert an dem ihre Nettoladung null ist.^{139 140} Das Proteinmolekül erscheint bei diesem pH-Wert nach außen elektrisch neutral, wodurch es im elektrischen Feld die Beweglichkeit null besitzt.¹⁴¹

Die isoelektrische Fokussierung kommt im biochemischen Labor vor allem zur Überprüfung der Reinheit von Proteinpräparationen sowie zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes eines Proteins zum Einsatz. Identität und Komplexität eines Proteingemisches können somit erfasst werden. Darüber hinaus ist die isoelektrische Fokussierung auch in der klinischen Chemie zur Bestimmung von Isoformen eines Proteins von besonderem Interesse.¹⁴² So können Proteine, deren Größe häufig um nur eine oder zwei unterschiedliche Aminosäuren differiert, in ihrer nativen Form aufgetrennt werden.¹⁴³

2.2.1 Historische Entwicklung der isoelektrischen Fokussierung

Ikeda und Suzuki beobachteten im Jahr 1912 zum ersten Mal, dass in einer Trennkammer unter Elektrolyse die sauren Aminosäuren in Richtung Anode, die neutralen Aminosäuren in die Mitte und die basischen Aminosäuren in Richtung Kathode wanderten und sich somit ein pH-Gradient ausbildete. In den fünfziger Jahren entwickelte *Kolin* (1954, 1955) instabile pH-Gradienten mit unterschiedlichen pH-Werten und erhielt scharfe Proteinbanden während der Elektrophorese. Aufgrund theoretischer Überlegungen von *Svensson* (1961, 1962) entwickelte *Vesterberg* 1969 die ersten Trägerampholyte. Svenssons Kriterien für brauchbare Ampholyte inkludierten: niedriges Molekulargewicht und unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften von der zu trennenden Substanz. Gute Leitfähigkeit, Pufferkapazität und Wasserlöslichkeit am isoelektrischen Punkt waren ebenfalls wesentlich. Mit Hilfe dieser Vorstellungen synthetisierte *Vesterberg* Trägerampholyte mit puffernden Carboxyl- und Aminogruppen, welche kommerziell sehr teuer erhältlich waren. *Vinogradov* (1973) und *Righetti* (1975) versuchten *Vesterberg*'s Arbeit zu modifizieren, um finanziell günstigere Ampholyte zu erhalten. Es gelang ihnen, ein Produkt zu entwickeln, das im pI-Bereich pH 3-10 lag.^{144 145 146}

¹³⁹ Budin (1995)

¹⁴⁰ Geckeler (1998)

¹⁴¹ Adam (2009)

¹⁴² Pingoud (1997)

¹⁴³ Richter (2003)

¹⁴⁴ Budin (1995)

¹⁴⁵ Pingoud (1997)

¹⁴⁶ Pearson (1979)

2.2.2 Möglichkeiten zur Ausbildung eines pH-Gradienten

Um einen pH-Gradienten zu erzeugen und zu stabilisieren, werden entweder lösliche polymere, amphotere Elektrolyte (Trägerampholyte, englisch carrier ampholytes, CA), oder in das Polyacrylamidgel einpolymerisierte Ampholyte (immobilisierte Ampholyte, Immobiline), verwendet.¹⁴⁷

Bei den Trägerampholyten handelt es sich um ein heterogenes Gemisch verschiedenartiger niedermolekularer Oligoamino-Oligocarbonsäuren mit eng benachbarten pI-Punkten. Je nach Auswahl der Trägerampholyte erhält man mehr oder weniger steile pH-Gradienten. Das heißt, je enger der gewählte pH-Bereich ist umso größer wird die Auflösung sein. Obwohl Trägerampholyte in einem pH-Gradienten relativ stabil sind, können sie bei längeren Fokussierungszeiten zu driften beginnen, wodurch Proteine auf der Kathoden- oder Anodenseite verloren gehen. Dieses Problem kann man mit Hilfe von immobilisierten pH-Gradienten umgehen.¹⁴⁸ Trägerampholyte sind Zwitterionen und enthalten saure Carboxylgruppen und basische Aminogruppen. Um stabile und gleichmäßige pH-Gradienten zu erhalten, sollten ideale Trägerampholyte aus sehr vielen Komponenten gebildet werden, niedrige Molekülmassen haben um somit schnell ihre pI-Punkte zu erreichen, sowie ausreichend Pufferkapazität und Leitfähigkeit an den pI-Punkten zeigen.¹⁴⁹

Die Erhöhung der Stabilität nimmt in immobilisierten pH-Gradienten zu, wobei Immobiline, Derivate des Acrylamids mit Carboxy- oder tertiären Aminogruppen, verwendet werden. Im Gegensatz zu freien Trägerampholyten werden Immobiline in die Polymerisation der Gelmatrix einbezogen und binden dort kovalent an die Polyacrylamidstränge.¹⁵⁰

Trägerampholyte haben den Vorteil, dass eine pH-Wert-Bestimmung des isoelektrischen Punktes nach dem Lauf relativ einfach ist (Kapitel 2.2.5). Nachteilig sind der schwer zu bestimmende basische pH-Bereich, dass der pH-Gradient keinen Gleichgewichtszustand während des Laufes einnimmt, sowie eine hohe Salzabhängigkeit. Ebenfalls besteht bei Trägerampholyten eine geringe Abweichung der Eigenschaften von Charge zu Charge. Bei immobilisierten Ampholyten ist eine Trennung in einem breiteren pH-Bereich möglich und

¹⁴⁷ Holtzhauer (1997)

¹⁴⁸ Pingoud (1997)

¹⁴⁹ Budin (1995)

¹⁵⁰ Richter (2003)

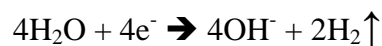
der Gradient ist über längere Zeit stabil. Die pH-Zuordnung ist jedoch schwieriger als bei Trägerampholyten, da keine direkte pH-Messung möglich ist.¹⁵¹

Isoelektrische Fokussierungen können in Röhrengelen und in Flachbettgelen (horizontal oder vertikal) durchgeführt werden, welche kommerziell mit Trägerampholyten beziehungsweise mit einpolymerisierten puffernden Gruppen, den sogenannten Immobilinen, erhältlich sind^{152 153} oder selbst hergestellt werden können.

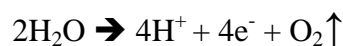
2.2.3 Entstehung eines pH-Gradienten

Während der isoelektrischen Fokussierung finden an den Elektroden elektrolytische Prozesse infolge elektrochemischer Reaktionen mit Wasser statt.

An der Kathode, wo ein Elektronenüberschuss besteht, bilden sich Hydroxid-Ionen und es entsteht dabei Wasserstoff:



An der Anode, wo Elektronenmangel herrscht, werden Protonen (in Form von Hydronium-Ionen, H_3O^+) gebildet und es entwickelt sich dabei Sauerstoff:



Die Kathode reagiert als Base (der pH-Wert erhöht sich) und die Anode als Säure (der pH-Wert sinkt), wobei sich durch die Ionenwanderung im elektrischen Feld ein pH-Gradient zwischen den Elektroden ausbildet. Um den pH-Gradienten an den Enden des Gels stabil zu halten, werden geeignete Elektrodenlösungen verwendet: eine Säure am Anodenende beziehungsweise eine Base am Kathodenende des Gels.¹⁵⁴

Die im Gel in einer Konzentration von 2 bis 2,5% vorhandenen Trägerampholyte verteilen sich im pH-Gradienten mit dem niedrigsten pI-Wert zur Anode und dem höchsten pI-Wert zur Kathode. Die anderen verteilen sich gemäß ihrem pI-Wert dazwischen.¹⁵⁵ Solche, bei denen

¹⁵¹ Holtzhauer (1997)

¹⁵² Pingoud (1997)

¹⁵³ Holtzhauer (1997)

¹⁵⁴ Budin (1995)

¹⁵⁵ Pingoud (1997)

der pI-Wert niedriger ist als der pH-Wert des Trennmediums tragen negative Ladungen und wandern zum anodischen Bereich und umgekehrt. Infolgedessen verbreitert sich der enge pH-Gradient und das pH-Plateau wird schmaler. Schließlich verschwindet auch das pH-Plateau, wodurch sich ein linearer und stabiler pH-Gradient ausbildet (Abbildung 14).¹⁵⁶

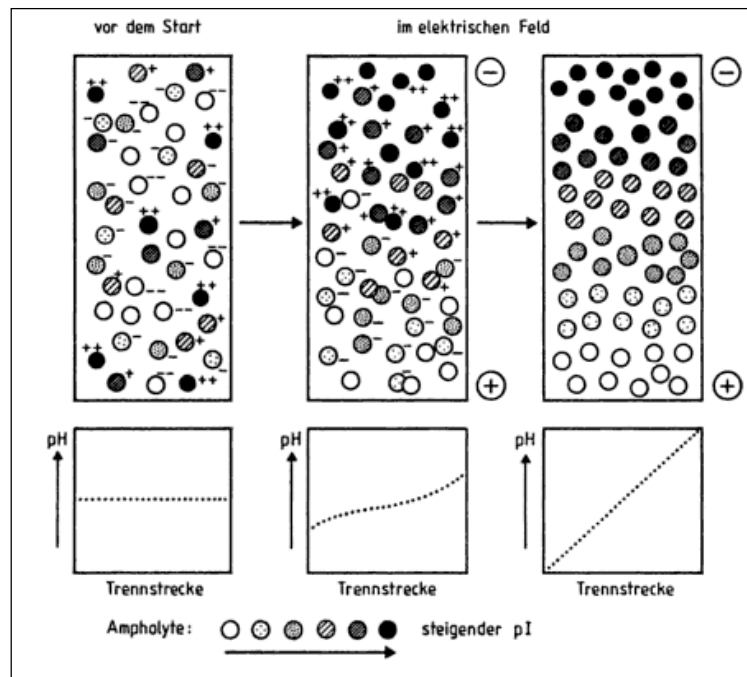


Abbildung 14: Entwicklung eines pH-Gradienten mit Trägerampholyten¹⁵⁷

Trägt man nun Proteine auf solche Trägerampholytgele auf, so werden diese im elektrischen Feld so lange wandern bis sie den pH-Bereich erreicht haben, an dem ihr isoelektrischer Punkt liegt. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, unabhängig davon, ob sie am Start eine negative oder positive Überschussladung tragen. Durch die Auswahl geeigneter Trägerampholyte können so Proteine, deren isoelektrische Punkte nur um 0,02 pH-Einheiten differieren, voneinander getrennt werden.¹⁵⁸

Zur besseren Stabilisierung können Immobiline (Kapitel 2.2.2) verwendet werden, wobei dem Polymerisationsansatz, neben den Acrylamid-Monomeren und Katalysatoren, basische und saure Immobiline zugegeben werden. Verändert man das Mischungsverhältnis der zwei Polymerisationslösungen kontinuierlich mit Hilfe eines Gradientenmischers, erhält man IEF-Gele mit stabilen pH-Gradienten. Dies resultiert in einem lückenlosen pH-Gradienten mit

¹⁵⁶ Budin (1995)

¹⁵⁷ Geckeler (1998)

¹⁵⁸ Holtzhauer (1996)

konstanter Leitfähigkeit und Pufferung, wodurch eine optimale Auflösung mit bis zu 0,01 pH-Einheiten pro Zentimeter erreicht wird.^{159 160}

Die isoelektrischen Punkte der meisten Proteine und Peptide liegen im pH-Bereich von 3 bis 11. Diese werden meist von einem pH-Gradienten von 3 bis 10 abgedeckt. Bei einem Proteingemisch das zum Beispiel im pH-Bereich 5 bis 6 fokussiert werden soll, können dementsprechende Trägerampholyte verwendet werden, um eine bessere Trennschärfe zu erzielen.¹⁶¹

2.2.4 Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen

Für die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung werden meist Flachgele aus Polyacrylamid verwendet. Seltener kommt es zum Einsatz von Agarose, die nur dann brauchbar ist, wenn ihre typischen Ladungsgruppen zuvor blockiert oder entfernt wurden. Agarose hat gegenüber Polyacrylamid den Vorteil, dass diese ungiftig ist und Proteine über 800kDa aufgrund ihrer Porengröße aufgetrennt werden können.¹⁶² Bei Polyacrylamidgelen kann die Größe der Poren durch Variieren der Polyacrylamidkonzentration und des Vernetzungsgrades bestimmt werden. Auch können bei Polyacrylamidgelen sehr hohe Feldstärken aufgrund des Fehlens polarer Gruppen eingesetzt werden, wobei keine störenden elektroosmotischen Effekte verursacht werden. Weiters sind Polyacrylamidgele chemisch sehr widerstandsfähig, haben keine adsorptiven Eigenschaften und werden auch von Enzymen nicht angegriffen.¹⁶³

2.2.5 Identifizierung des isoelektrischen Punktes

Die Proteinprobe kann bei Gradientengelen entweder vertikal in eine im Gel vorgefertigte Auftragstasche pipettiert werden oder ein kleines Stück Filterpapier wird in der Probenlösung getränkt und kann dann an frei gewählten Positionen am horizontalen Gel platziert werden.¹⁶⁴ Bei der darauffolgenden isoelektrischen Fokussierung wird die Stromversorgung so eingestellt, dass die Feldstärke im Gel zu Beginn möglichst niedrig ist ($< 40 \text{ V cm}^{-1}$), da ein

¹⁵⁹ Richter (2003)

¹⁶⁰ Pingoud (1997)

¹⁶¹ Budin (1995)

¹⁶² Richter (2003)

¹⁶³ Budin (1995)

¹⁶⁴ Pingoud (1997)

Teil der Proteine bei zu hoher Anfangs-Feldstärke präzipitieren kann.¹⁶⁵ Das Probenmaterial und die Trägerampholyte können durch die große Wärmebildung geschädigt werden, weshalb die Gradientengele während des Laufes meist auf einer Kühlplatte bei 10° C platziert werden.¹⁶⁶

Um den isoelektrischen Punkt der Proteinproben nach Beendigung des Laufes ermitteln zu können, lässt man in einer Gelspur Markerproteine mit bekannten pI-Werten mitlaufen. Bei der anschließenden Färbung des Gels müssen die Trägerampholyte jedoch ausgewaschen werden, da diese ebenfalls mit dem Farbstoff reagieren können. Eine direkte pH-Messung an Gelabschnitten kann mit Oberflächen-pH-Elektroden durchgeführt werden, wobei die Temperaturabhängigkeit des pI-Wertes bei dessen Ermittlung berücksichtigt werden muss. Eine weitere Ermittlung des pH-Gradienten kann unmittelbar nach der Fokussierung durch Ausschneiden von Gelstücken erfolgen, wobei nach deren Inkubation in kohlendioxidfreiem destilliertem Wasser der pH-Wert gemessen werden kann.^{167 168}

2.3 Western Blot

Als Blotting-Verfahren bezeichnet man eine Methode, bei der biologische Makromoleküle nach Auftrennung in der Gelelektrophorese auf eine Nylon- oder Nitrozellulose-Membran transferiert und immobilisiert werden.¹⁶⁹ Dementsprechend liegt die zuvor getrennte Probe als identisches Abbild in immobilisierter Form auf der Matrix vor. Ein wesentlicher Vorteil der Blotting-Verfahren ist, dass die Blot-Membranen gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden können.¹⁷⁰

Der erste durchgeführte Blot entstand bei der Detektierung von DNA-Fragmenten und wurde erstmals von Edwin M. Southern im Jahre 1975 beschrieben. Seither wird dieses Verfahren zur Auftrennung von DNA mit nachfolgender Hybridisierung als Southern-Blot bezeichnet.¹⁷¹

¹⁷² Es folgten weitere Blotting-Verfahren, die in Anlehnung an den Southern-Blot als

¹⁶⁵ Geckeler (1998)

¹⁶⁶ Richter (2003)

¹⁶⁷ Holtzhauer (1996)

¹⁶⁸ Holtzhauer (1997)

¹⁶⁹ Gressner (2007)

¹⁷⁰ Kayser (2002)

¹⁷¹ Kremer (2011)

¹⁷² Schütt (2011)

Northern-Blot (RNA) und Western-Blot (Protein) bezeichnet wurden.¹⁷³ Um nahezu alle Himmelsrichtungen zu besetzen, entstanden in weiterer Folge Blotting-Verfahren wie zum Beispiel der Middle-Eastern-Blot zur Beladung von derivatisiertem Papier mit mRNA, sowie der South-Western-Blot zum DNA-Nachweis mit Hilfe eines spezifischen Proteins.¹⁷⁴

2.3.1 Prinzip – Western-Blot

Western Blotting ist eine Methode, um Proteine nach der Gelelektrophorese auf eine Nylon- oder Nitrozellulose-Membran zu transferieren und zu immobilisieren. Die im Gel befindlichen Proteine müssen auf die Membran übertragen (geblottet) werden, da sie für hochmolekulare Nachweis-Liganden, wie zum Beispiel Antikörper, im Gel schwer zugänglich sind. Dies geschieht durch Einbringen in ein zum Gel senkrecht angelegtes elektrisches Feld. Der Blot kann hierbei auf Nitrozellulosepapier oder Nylonfolien durchgeführt werden. Die am häufigsten verwendete Membran ist die Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von etwa 0,2–0,45 μm . Je kleiner die Poren sind, desto mehr steigt die Bindungskapazität der Blotmembranen.^{175 176 177} Die aufgetrennten Proteine werden vom Elektrophoresegel (SDS-PAGE, IEF) auf die Membran transferiert, indem das Gel und die Membran zwischen in Blottingpuffer (pH 8-9) getränkten Filterpapieren (Abbildung 15) positioniert werden, wodurch diese Kontakt mit den beiden Elektroden haben. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können nun die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert werden.¹⁷⁸

¹⁷³ Kayser (2002)

¹⁷⁴ Kremer (2011)

¹⁷⁵ Budin (1995)

¹⁷⁶ Löffler (2007)

¹⁷⁷ Gressner (2007)

¹⁷⁸ Koehl (2002)

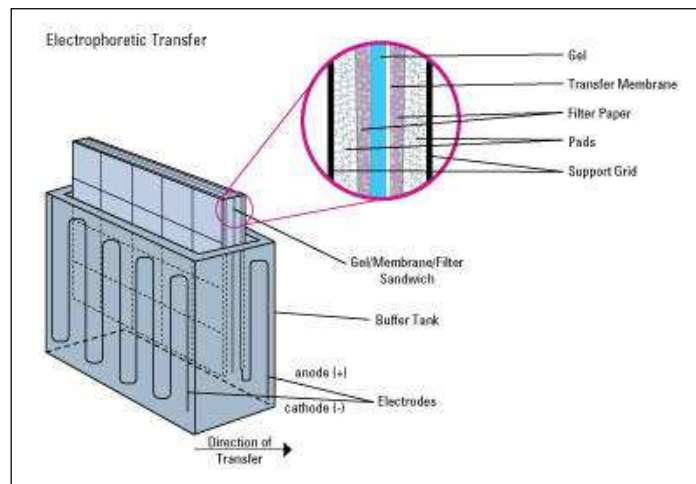


Abbildung 15: Western-Blot-Transfer-Apparatur ¹⁷⁹

Bevor die Antikörper oder Antikörper-Enzym-Konjugate dem Blot hinzugegeben werden, müssen zunächst die reaktiven Gruppen auf der Membran beziehungsweise die restlichen Proteinbindungsstellen blockiert werden. Als Blockmittel wird häufig entfettetes Milchpulver verwendet, aber auch fetales Kälberserum, Gelatine oder Tween 20 kommen zum Einsatz.¹⁸⁰
181

Nach Absättigung der freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgt die eigentliche Nachweisreaktion durch die Bindung eines Erstantikörpers an das transferierte Protein. Dieser Immunkomplex ist üblicherweise nicht sichtbar, weshalb ein zweiter Antikörper zur Visualisierung eingesetzt wird. Der Zweitantikörper ist gegen konstante Abschnitte (z.B. Fc-Fragment) des Erstantikörpers gerichtet, stammt aus einer anderen Spezies und ist an Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder Radionuklide zur Sichtbarmachung konjugiert (Abbildung 16).¹⁸²

¹⁷⁹ Piercenet (2012]

¹⁸⁰ Pingoud (1997)

¹⁸¹ Rehm (2010)

¹⁸² Jansohn (2012)

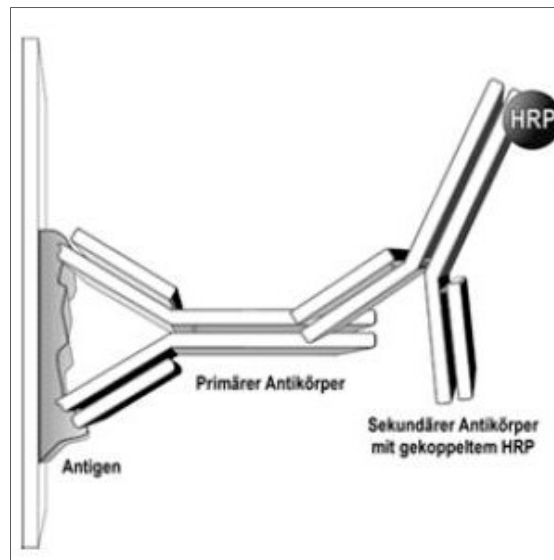


Abbildung 16: Antigen-Antikörperkomplex mit Primärantikörper und Sekundärantikörper mit Meerrettichperoxidase (HRP)

Zur direkten Visualisierung trägt der Zweitantikörper eine Radionuklid- oder Fluorophormarkierung, bei der indirekten eine Enzymmarkierung. Die indirekten Methoden haben sich bis heute stärker durchgesetzt, da diese keinen radioaktiven Abfall produzieren und der apparative Aufwand geringer ist. Meerrettichperoxidase, Peroxidase oder alkalische Phosphatase werden bei der Enzymmarkierung am häufigsten verwendet, wobei durch die Zugabe entsprechender Substrate (zum Beispiel 4-Chlor-1-Naphtol¹⁸³) mit dem Enzym ein unlöslicher Farbstoffkomplex gebildet wird.¹⁸⁴

¹⁸³ Hermey (2010)

¹⁸⁴ Jansohn (2012)

3 Durchführung und Reagenzien

Im folgenden Kapitel werden die Methoden sowie die dafür beanspruchten Materialien und Reagenzien, welche für die Durchführung dieser Masterarbeit verwendet wurden, beschrieben.

3.1 Reagenzien und Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie-Färbung beziehungsweise anschließendem Western Blot

3.1.1 Reagenzien und Materialien

Für die Herstellung der SDS-PAGE-Gele wurden in dieser Arbeit Fertiggassetten der Firma Invitrogen mit einer Gelstärke von einem Millimeter verwendet (Lot Nr. 61229-J). Zur Auftrennung der Proteine wurde ein Stromversorgungsgerät (Power Supply) der Firma BIO-RAD (Model 1000/500) mit einer Elektrophoresekammer der Firma NOVEX XCELL (NOVEL EXPERIMENTAL TECHNOLOGY) eingesetzt.

Probenvorbereitung

- 10 – 20 %ige Saccharose (fest)
- Demineralisiertes H₂O
- Isotone 0,9 %ige NaCl-Lösung
- 0,2 g Bromphenolblaulösung in 100 ml demineralisiertem H₂O, Fa. MERCK
- Sammelgelpuffer (3, 4, und 5 % SDS)

Gelherstellung

- Acrylamid – bisacrylamid (N,N'-Mehylen-bisacrylamid) Stammlösung (T30 C2,67), Fa. SERVA
- Trenngelpuffer für SDS-PAGE: 3,0 mol/l Tris-HCl (pH 8,8), Fa. SERVA
- Sammelgelpuffer für SDS-PAGE: 0,5 mol/l Tris-HCl (pH 6,8), Fa. SERVA
- TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin), Fa. MERCK
- 1,5% APS (Ammonium Persulfat), Fa. SIGMA
- Demineralisiertes H₂O

Gelelektrophorese

Herstellung des SDS Reservoir Buffer Stocks (pH 8,3)

- 0,25 mol Tris : 30,3 g
- 1,92 mol Glycin: 144,0 g
- 34,67 mmol SDS: 10,0 g
- Mit demineralisiertem H₂O auf 1000 ml auffüllen

SDS Reservoir Buffer (Laufpuffer):

- 100 ml Reservoir Buffer Stock (pH 8,3)
- + 900 ml demineralisiertes H₂O
- Verhältnis (1 + 9)

Färbung

Fixierlösung

- 25 ml 10 %ige 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat-Lösung (zur Analyse, Fa. MERCK)
- 25 ml 20 %ige Trichloressigsäure (zur Analyse, Fa. MERCK)
- Verhältnis 1:1

Coomassie-Färbelösung

- 2,0 g Coomassie Brilliant Blau (R-250), Fa. SERVA
- 300 ml Methanol (100 %)
- 100 ml Eisessig (100 %)
- 600 ml demineralisiertes (bzw. deionisiertes) H₂O
- Insgesamt: 1 Liter

Entfärbelösung

- 300 ml Methanol (100 %)
- 100 ml Eisessig (100 %)
- 600 ml demineralisiertes H₂O

Western – Blot

- Nitrozellulosemembran (6 cm x 8,5 cm), Fa. Amershan Biosciences, Hybond
- 10 % Methanol

Western-Blot-Stammlösung

- 0,1 M di-Na-tetraborat-decahydrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) Fa. MERCK
- Demineralisiertes H_2O

Western –Blot – Lösung

- 100 ml Western-Blot-Stammlösung in einen 1 Liter Messbecher überführen
- Mit demineralisiertem H_2O auf 1000 ml auffüllen
- Verhältnis: 1 + 9

Achtung:

- Bei der IEF werden zusätzlich 5 ml 10 % SDS in die Lösung gegeben.

Immunoblot (IB)**Blockpuffer – Stammlösung**

- 0,2 mol Tris
- 0,9 mol NaCl
- Auf 1000 ml mit demineralisiertem H_2O

Waschpuffer A

- 100 ml Blockpuffer-Stammlösung
- 900 ml demineralisiertes H_2O
- Auf pH 7,4 einstellen (mit HCl)

Waschpuffer B

- 100 ml Blockpuffer-Stammlösung
- 900 ml demineralisiertes H_2O
- 1 ml Tween-20
- 1 g SDS
- 2,5 g Natriumdesoxycholat
- Auf pH 7,4 einstellen (mit HCl)

Blockpuffer (Milchpulverlösung)

- 5 g Magermilchpulver
- 100 ml Waschpuffer A (pH 7,4)

- 250 μ l Tween-20

Immunoblot – Entwickler

- 300 mg 4-Chlor-1-naphtol in 100 ml Methanol

Verwendete Antikörper

- AK 1: rabbit anti human IgG, Fa. BioGenes
- AK 2: HRP goat anti rabbit IgG, Fc-spezifisch, Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories

Neuraminidase-Behandlung

- Acetatpuffer (pH 5,5), Fa. MERCK
- Neuraminidase (0,5 mg/ml), Fa. SIGMA

3.1.2 Durchführung

Verwendete Proben

Standard

Als Standard diente ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker für SDS-Polyacrylamidgele der Firma ROTH[®] (Roti[®]-Mark STANDARD).

Proben

- Das gereinigte β_2 -Glykoprotein-I wurde in einer Menge von etwa 0,8 μg (Coomassie-Färbung) und etwa 0,025 μg (Western-Blot) auf das Gel aufgetragen.
- β_2 -Glykoprotein-I im Plasma wurde in einer Konzentration von etwa 0,05 μg (Western-Blot) elektrophoretisch aufgetrennt.
- Mit Hilfe von Neuraminidase wurde die endständige N-Acetyl-Neuraminsäure bei pH 5,5 (Acetatpuffer) von der Zuckerkette abgespalten. Bei der SDS-PAGE wurden Mengen von etwa 1,4 μg (Coomassie-Färbung) und etwa 0,025 μg (Western-Blot) vom gereinigten β_2 -Glykoprotein-I und eine Menge von 0,05 μg (Western-Blot) von β_2 -Glykoprotein-I im Plasma der Neuraminidase-behandelten Proben aufgetragen.

Behandlung der Proben mit Neuraminidase

Herstellung des 0,1 M Acetatpuffers (pH 5,5)

- 1,36 g NaAc (Natriumacetat)
- Mit demineralisiertem H_2O auf 100 ml auffüllen
- Einstellen des pH-Wertes (pH 5) mit Essigsäure

β_2 -Glykoprotein-I

- 20 μl 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,5)
- Zugabe von 20 μl β_2 -Glykoprotein-I (0,5 mg/ml)
- + 2 μl Enzym (Neuraminidase)

Plasma

- 50 μl 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,5)
- Zugabe von 50 μl Plasma (0,15 mg/ml)
- + 20 μl Enzym (Neuraminidase)

Herstellung der SDS-Gele

Für die Herstellung der SDS-Gele wurden das Trenn- und Sammelgel in Fertiggassetten der Firma Invitrogen (Abbildung 17) eingegossen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 10%igen SDS-Gel wie in Tabelle 2 beschrieben.

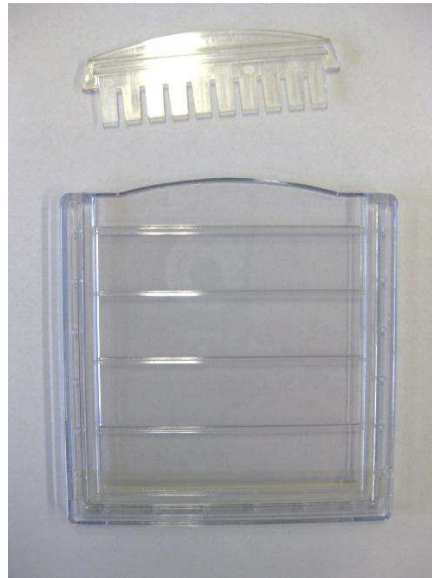


Abbildung 17: Fertiggassette mit Kamm

Tabelle 2: Zusammensetzung des 10%igen SDS-Gels

Reagenzien	Trenngel (T10 C2,67) pH 8,8	Sammelgel (T3,75 C2,67) pH 6,8
Acrylamid-bis (30:08)	3,000 ml	0,500 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8/6,8)	1,125 ml	1,000 ml
10% SDS (w/w)	0,090 ml	0,040 ml
H ₂ O demineralisiert	4,335 ml	2,260 ml
TEMED	0,015 ml	0,015 ml
1,5% APS (w/w)	0,450 ml	0,200 ml
Summe	9,015 ml	4,015 ml

- Bei der Gelherstellung wird zunächst das Trenngel angefertigt
- Nach Zugabe von 1,5 %igem APS wird die Trenngel-Lösung so schnell wie möglich mit Hilfe einer Transferpipette in die Fertiggassette überführt (Trenngelhöhe etwa 6 cm)
Achtung: APS dient als Startreagenz, wodurch das Gel zu polymerisieren beginnt
- Überschichtung mit Iso-Butanol um das Gel von der Luft fernzuhalten

- Nach etwa 30 Minuten, wenn das Trenngel polymerisiert ist, das Iso-Butanol entfernen (abgießen)
- Mit demineralisiertem H₂O nachspülen
- Wasserreste mit Filterpapier entfernen
- Herstellung des Sammelgels
- Nach Zugabe von 1,5 %igem APS die Sammelgel-Lösung so schnell wie möglich mit einer Transferpipette auf das polymerisierte Trenngel in der Fertiggassette überführen (Sammelgelhöhe etwa 0,8 mm)
- Vorsichtig den Slotkamm in die Sammelgel-Lösung stecken
- Nach etwa 15 Minuten ist auch das Sammelgel polymerisiert
- Bei Bedarf kann die Fertiggassette mit dem SDS-Gel auch in Schutzfolie eingeschweißt und für den nächsten Tag im Kühlschrank bei 4°C – 8°C aufbewahrt werden

Gelelektrophorese

- Bevor die Fertiggassette mit dem SDS-Gel in die Elektrophoreseapparatur eingebaut wird, muss das Abdeckband im unteren Bereich entfernt werden, damit stromleitender Kontakt zum Laufpuffer in der Anodenkammer hergestellt wird.
- Mit einer Transferpipette werden die Probenauftragstaschen mit Laufpuffer gefüllt.
- Beladen der Probenauftragstaschen mit den Proben und dem Standard mittels einer Mikroliterspritze (Microsyringe) durch Unterschichtung des Laufpuffers.
- Laufpuffer (pH 8,3) niveaugleich in die Kathodenkammer und Anodenkammer der Elektrophoreseapparatur einfüllen
- Elektrodendeckel richtig gepolt anbringen
- Richtig gepolt an Power Supply anschließen

Elektrophoreseeinstellungen:

- Starten der Elektrophorese (Abbildung 18) bei 100 Volt
- Nach 30 Minuten auf 150 Volt einstellen
- Nach etwa 120 Minuten (insgesamt) Elektrophorese stoppen



Abbildung 18: Elektrophorese-Apparatur der Firma Novex

Fixieren der Proteine auf dem Gel

- Die Fertiggassette mit dem SDS-Gel wird nach Beendigung der Elektrophorese mit Hilfe eines Metallspatels aufgeknackt
- Den Gelenteil mit den Slots mithilfe eines Spatels entfernen
- Gel in einen kleinen Behälter überführen
- Zugabe der Fixierlösung
- Behälter mit Gel und Fixierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur am Schwenkpult schwenken (ca. 10/Minuten einstellen)
- Nach 30 Minuten wird die Fixierlösung abgesaugt
- Das Gel wird einmal mit demineralisiertem H₂O gewaschen und anschließend wieder abgesaugt

Färben des SDS – Gels mit Coomassie-Brilliant-Blau

- Etwa 50 ml der Coomassie-Färbelösung werden in den Behälter mit dem SDS-Gel überführt
- Das Gel muss vollständig mit der Färbelösung bedeckt sein
- Die Färbung erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur am Schwenkpult
- Absaugen der Coomassie-Färbelösung

Entfärben des SDS - Gels

- Etwa 50 ml der Entfärbelösung werden in den Behälter mit dem SDS-Gel überführt
- Das Gel muss vollständig bedeckt sein
- Nach etwa 20 Minuten Entfärbelösung absaugen
- Nochmalige Zugabe der Entfärbelösung
- Nach etwa 30 Minuten Entfärbelösung vollständig absaugen
- Der Gelhintergrund muss klar sichtbar sein (nach etwa 2 Stunden)
- Die Lagerung des SDS-Gels erfolgt in demineralisiertem H₂O
- Einscannen des SDS-Gels
- Interpretation

Western Blot

Vorbereitung:

- Nitrozellulosemembran (6 cm x 8,5 cm) in 10 %igem Methanol einlegen (aktivieren)
- Herstellung der Westernblot-Lösung:
 - 100 ml Western Blot Stock
 - + 900 ml demineralisiertes H₂O
- Etwa 300 ml der Westernblot-Lösung in eine Wanne überführen
- Vorbereitung der Western-Blot-Apparatur (Abbildung 19)

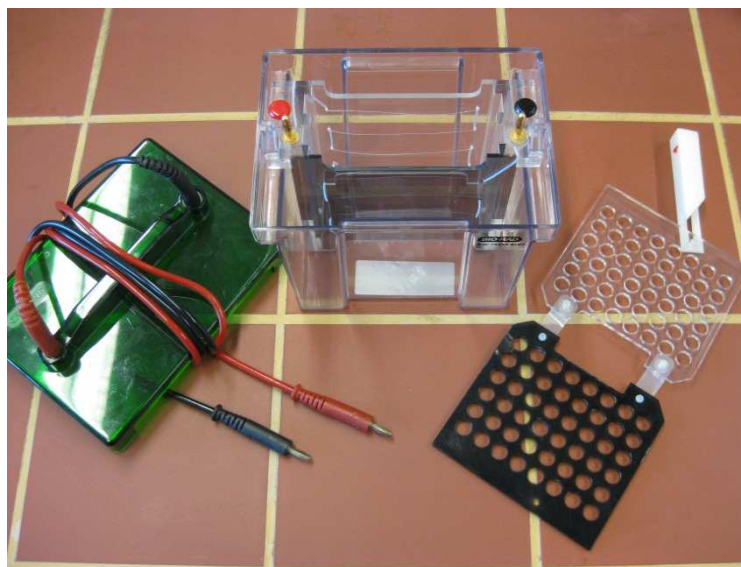


Abbildung 19: Western-Blot-Apparatur mit Sandwichhalterung

Western-Blot – Durchführung

- Nach erfolgter SDS-PAGE wird die Fertiggassette mit einem Metallspatel aufgeknackt
- Der Gelteil mit den Slots wird mit dem Spatel entfernt
- Vorsichtiges Lösen des Gels von einem Teil der Fertiggassette
- Das Gel mit dem zweiten Teil der Fertiggassette wird mit dem Gel nach unten in die Wanne mit der vorgelegten Western-Blot-Lösung gelegt
- Durch vorsichtiges Auf- und Abbewegen der Fertiggassette löst sich das Gel von der Kassette
- Während das Gel in der Wanne bleibt, wird ein Papierfilter (8 x 10cm) mit der Western-Blot-Lösung getränkt und auf dem Anodenteil (weiß) der Sandwichhalterung positioniert
- Anschließend wird die Nitrozellulosemembran mit einer Pinzette aus der 10 %igen Methanollösung genommen, kurz in die Wanne mit der Western-Blot-Lösung eingetaucht und vorsichtig auf das Filterpapier gelegt
- Das Gel wird aus der Wanne auf die Nitrozellulosemembran überführt
- Ein weiteres, in Western-Blot-Lösung getränktes Filterpapier wird auf das Gel gelegt und mit einem Reagenzglas vorsichtig abgestreift um Luftblasen zu vermeiden
- Bevor die Sandwichhalterung geschlossen wird, kann ein drittes getränktes Filterpapier hinzugegeben werden, damit das Sandwich nicht verrutscht
- Das Sandwich mit der Halterung in die vorbereitete Kammer der Western-Blot-Apparatur in die richtige Position stecken
- Einfüllen der Western-Blot-Lösung in die Apparatur → insgesamt 1 Liter
- Elektrodendeckel schließen (rot zu rot, schwarz zu schwarz)

Western-Blot-Transfer-Einstellungen:

- Starten bei 250 mA Konstantstrom, Spannungsbegrenzung 100 Volt
- In der Zwischenzeit werden 100 ml Blockpuffer für das anschließende Blocken der freien Bindungsstellen vorbereitet
- Nach etwa 2 Stunden wird der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran gestoppt

Blocken des Blots

- Sandwichhalterung öffnen und die Filter und das Elektrophoresegel verwerfen
- Gebloctete Nitrozellulosemembran in eine kleine Wanne überführen
- Zugabe von etwa 40 ml Milchpulverlösung (Blockpuffer)
- Gebloct wird für etwa 30 Minuten auf dem Schüttelpult (Abbildung 20)



Abbildung 20: Blocken am Schüttelpult

Zugabe des Primärantikörpers

- Nach dem Blocken wird die Milchpulverlösung abgesaugt und verworfen
- 3x Kurzes Waschen des Blots mit Waschlösung A (je etwa 30 ml)
- Zugabe von Waschlösung B und etwa 5 Minuten am Schüttelpult waschen
- Waschlösung B absaugen
- 3x Kurzes Waschen des Blots mit Waschlösung A
- Zugabe von Waschlösung B und etwa 5 Minuten am Schüttelpult waschen
- Absaugen von Waschlösung B
- 3x Kurzes Waschen des Blots mit Waschlösung A
- Vollständiges Absaugen des Waschlösungspuffers
- Zugabe von etwa 30 ml Milchpulverlösung (Blot muss vollständig überschichtet sein)
- Zugabe von 20 μ l Primärantikörper (AK 1) pro 30 ml Milchpulverlösung
- Etwa 5 Minuten am Schwenkpult (Abbildung 21) inkubieren



Abbildung 21: Schwenkpult

- Nach etwa 5 Minuten wird die Wanne mit dem Blot und AK1 über Nacht bei 4°-8° C im Kühlschrank horizontal gelagert

Zugabe des Sekundärantikörpers

- Absaugen der Milchpulverlösung mit dem AK1
- Waschen des Blots:
 - 3x kurz waschen mit Waschpuffer A, dazwischen absaugen
 - Inkubation mit Waschpuffer B (etwa 5 min am Schüttelpult), dann absaugen
 - Wieder 3x kurz mit Waschpuffer A waschen, dazwischen absaugen
 - Inkubation mit Waschpuffer B (etwa 5 min am Schüttelpult), absaugen
 - 3x kurz mit Waschpuffer A waschen, dazwischen absaugen
- Zugabe der restlichen 30 ml Milchpulverlösung in die Wanne mit dem Blot
- 10 μ l AK 2 pro 30 ml Milchpulverlösung pipettieren
- Etwa 4 Stunden am Schwenkpult (10/min) inkubieren
- Waschen des Blots wie zuvor beschrieben
- Gründliches Absaugen der restlichen Waschpufferlösung

Entwickeln des Blots

Entwicklerlösung:

- 30 ml Waschpuffer A in einen 50 ml Plastikbecher überführen
- Zugabe von 6 ml „Immunoblot - Entwickler“
- 20 μ l H₂O₂ (30%ig) dazupipettieren
- Nach etwa 5 min kann demineralisiertes H₂O in die Wanne hinzugegeben werden (Entwicklung von violetten beziehungsweise dunkelblauen Banden)
- Waschen des Blots unter laufendem Leitungswasser
- Nach etwa 15 min wird der Blot zum Trocknen auf einem Papierhandtuch lichtgeschützt gelagert
- Einscannen

3.2 Reagenzien und Durchführung der isoelektrischen Fokussierung (IEF) mit anschließendem Western Blot

3.2.1 Reagenzien und Materialien

Für die Herstellung der IEF-Gele wurden Fertiggassetten der Firma Invitrogen mit einer Gelstärke von einem Millimeter verwendet. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein Elektrophorese-Gerät der Firma BIO-RAD Power Supply (Model 1000/500) eingesetzt.

Probenvorbereitung

- 10 – 20 %ige Saccharose
- Harnstoff, Fa. MERCK
- 0,1 M Natronlauge (NaOH), Fa. MERCK
- CHAPS, Fa. SIGMA-ALDRICH
- Demineralisiertes H₂O
- 0,2 g Bromphenolblaulösung in 100 ml demineralisiertem H₂O, Fa. MERCK

Fraktionierung von Plasma

- 70 %ige Perchlorsäure (HClO₄), Fa. MERCK
- Natriumcarbonat (Na₂CO₃), Fa. MERCK
- SERVAPOR[®] dialysis tubing, diameter: 6 mm, Fa. SERVA
- Demineralisiertes H₂O
- Universal-Indikatorpapier (pH 1 – 14), Fa. Machery-Nagel

Neuraminidase-Behandlung von β_2 -Glykoprotein-I

- Acetatpuffer, Fa. MERCK
- Neuraminidase (0,5 mg/ml), Fa. SIGMA

Gelherstellung

- Harnstoff, Fa. MERCK
- Acrylamid – bisacrylamid (N,N'-Mehylen-bisacrylamid) Stammlösung (T30 C2,67), Fa. SERVA
- SERVALYT[®] pI 3 – 10, Fa. SERVA
- CHAPS, Fa. SIGMA-ALDRICH, Nr. C3023

- TEMED, Fa. MERCK
- 1,5% Ammonium Persulfat (APS), Fa. SIGMA
- Demineralisiertes H₂O

Elektrolytlösungen

- Kathodenlösung: 0,1 M Natronlauge (NaOH), Fa. MERCK
- Anodenlösung: 0,1 M Phosphorsäure (H₃PO₄), Fa. MERCK

Western Blot

Siehe Kapitel 3.1.1

Identifizierung der isoelektrischen Punkte

- IEF Markers 3-10, SERVA Liquid Mix

3.2 Durchführung

Verwendete Proben

- Das gereinigte β_2 -Glykoprotein-I wurde in einer Menge von 0,086 μg beziehungsweise 0,6 μg auf das Gel aufgetragen.
- Die elektrophoretische Auftrennung der Plasmaprobe erfolgte in einer Menge von 0,048 μg bezüglich β_2 -Glykoprotein-I.
- Nach der Fraktionierung der Plasmaprobe mit Perchlorsäure (Kapitel 3.1.2) wurde der HClO₄-Fällungs-Überstand in ungefähren Mengen wie bei den Plasmaproben für die IEF verwendet.
- Mit Hilfe von Neuraminidase wurde die endständige N-Acetyl-Neuraminsäure bei pH 5,5 (Acetatpuffer) von der Zuckerkette abgespalten und bezüglich β_2 -Glykoprotein-I im Plasma wurden 0,065 μg für die IEF eingesetzt.

Fraktionieren der Plasmaprobe

➔ Pro 100 μl Plasma werden 2,7 μl 70%ige Perchlorsäure (HClO₄) zur Fällung säuresensibler beziehungsweise säurelabiler Plasmoproteine eingesetzt

- Überführen von 100 μl Plasma in ein frisches Eppendorf-Tube
- 2,7 μl Perchlorsäure zusetzen
- Das Eppendorf-Tube nach der Zugabe der Perchlorsäure schnell vortexen (fällen)

Achtung: Wenn die Perchlorsäure direkt in das Plasma überführt wird, ist die Konzentration lokal zu hoch, wodurch auch säurestabile Proteine gefällt werden

- Lagerung der Proteinsuspension für 5-15 min im Kühlschrank (4° - 8° C)
- In der Zwischenzeit wird ein kurzes Stück Dialyseschlauch (etwa 15 cm lang) in einem 100 ml-Gefäß mit demineralisiertem H₂O eingeweicht
- Zentrifugieren der Proteinsuspension bei 12000 rpm
- Abheben des Überstandes und Überführung in ein neues Eppendorf-Tube
- Der pH-Bereich liegt hier bei etwa 1 (kann mit pH-Papier gemessen werden)

Neutralisierung und pH-Einstellung

- Etwa 1 Spatelspitze Natriumcarbonat (Na₂CO₃) wird dem Überstand hinzugegeben
- Es kommt zu einer Gasentwicklung (CO₂↑ aus Na₂CO₃). Soviel Na₂CO₃ zugeben, dass der pH-Wert bei 8-9 liegt (pH-Papier)

Dialysieren:

- Dialyseschlauch aus dem demineralisierten H₂O nehmen und eine Seite verknüpfen
- Überstand aus dem Eppendorf-Tube in den Dialyseschlauch pipettieren und zweite Seite verknüpfen
- Den Dialyseschlauch mit dem Überstand in einen Behälter mit einem Liter demineralisiertem H₂O geben und am Magnetrührer rühren
- Dialysiert wird etwa 4 Stunden bei Raumtemperatur (etwa jede Stunde H₂O wechseln)
- Der Überstand (etwa 100 μ l) wird aus dem Schlauch in ein frisches Eppendorf-Tube überführt

Behandeln der Proben mit Neuraminidase

Herstellung des 0,1 M Acetatpuffers (pH 5,5)

- 1,36 g NaAc (Natriumacetat)
- Mit demineralisiertem H₂O auf 100 ml auffüllen
- Einstellen des pH-Wertes (pH 5) mit Essigsäure (96%ig)

β_2 -Glykoprotein-I

- 20 μ l 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,5)
- 20 μ l β_2 -Glykoprotein-I (0,5 mg/ml)
- + 2 μ l Enzym (Neuraminidase)

Plasma

- 50 μ l 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,5)
- + 50 μ l Plasma
- + 20 μ l Enzym (Neuraminidase)

HClO₄-Plasma-Überstand

- 50 μ l 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,5)
- + 50 μ l HClO₄-Fällungs-Überstand
- + 5 μ l Enzym (Neuraminidase)

Die Neuraminidase-behandelten Proben werden anschließend im Wärmeschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

Herstellung der IEF-Gele

Für die Herstellung des IEF-Geles wurden Fertiggassetten der Firma Invitrogen verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 5 und 7,5 %igem IEF-Gel (T5 C2,67 und T7,5 C2,67).

Tabelle 3: Zusammensetzung des 5 %igen IEF-Gels

Reagenzien	Volumen
Acrylamid-bis (30:08)	1,666 ml
SERVALYT [®] pI 3 - 10	0,500 ml
H ₂ O demineralisiert	7,334 ml
TEMED	0,015 ml
1,5% APS (w/w)	0,500 ml
Summe	10,015 ml

Tabelle 4: Zusammensetzung des 5 %igen IEF-Gels mit 8 M Harnstoff

Reagenzien	Volumen
Harnstoff	4,8 g
Acrylamid-bis (30:08)	1,666 ml
SERVALYT [®] pI 3 - 10	0,500 ml
H ₂ O demineralisiert	~3,900 ml
TEMED	0,015 ml
1,5% APS (w/w)	0,500 ml
Summe	10,000 ml

Tabelle 5: Zusammensetzung des 5 %igen IEF-Gels mit 5 M Harnstoff und 1 % CHAPS

Reagenzien	Volumen
Harnstoff	3,0 g
Acrylamid-bis (30:08)	1,666 ml
SERVALYT [®] pI 3 - 10	0,500 ml
H ₂ O demineralisiert	~2,400 ml
10 % CHAPS	1,000 ml
TEMED	0,015 ml
1,5% APS (w/w)	0,500 ml
Summe	10,000 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung des 7,5 %igen IEF-Gels mit 8 M Harnstoff

Reagenzien	Volumen
Harnstoff	4,8 g
Acrylamid-bis (30:08)	2,500 ml
SERVALYT [®] pI 3 - 10	0,500 ml
H ₂ O demineralisiert	~3,100 ml
TEMED	0,015 ml
1,5% APS (w/w)	0,500 ml
Summe	10,000 ml

- Nach der Zugabe von 1,5 %igem APS wird die Gel-Lösung so schnell wie möglich mit Hilfe einer Transferpipette in die Fertiggassette überführt.
Achtung: APS dient als Startreagenz, wodurch das Gel zu polymerisieren beginnt.
- Vorsichtig den Slotkamm in die Gel-Lösung stecken
- Nach etwa 45 min ist das Gel polymerisiert
- Bei Bedarf kann die Fertiggassette mit dem IEF-Gel auch in Schutzfolie eingeschweißt und für den nächsten Tag im Kühlschrank bei 4 – 8°C aufbewahrt werden.

IEF - Elektrophorese

- Schutzfolie an der Unterseite der Fertiggassette entfernen, damit die Elektrodenlösung durch den Schlitz in das Gel diffundieren kann.
- Mit einer Transferpipette werden die Probenauftragstaschen mit der Elektrodenlösung ausgespült (erleichtert die Beladung mit den Proben)
Achtung: Bei der Vorfokussierung nicht notwendig
- Beladen der Probenauftragstaschen mit den Proben mittels einer Mikroliterspritze (Microsyringe)
- 150 ml Elektrodenlösungen ((0,1M NaOH bzw. 0,1M H₃PO₄) werden je nach Durchführung in eine der Kammern eingefüllt

- Elektrodendeckel richtig anbringen (Kathode: schwarz zu schwarz, Anode: rot zu rot)

Elektrophoreseeinstellungen:

- Isoelektrische Fokussierung wird mit 100 Volt gestartet
- Nach etwa 30 Minuten auf 400 bzw. 500 Volt und 4 mA bzw. 5 mA umstellen
- Elektrophorese bei 1300 – 1600 Voltstunden (Vh) stoppen

Achtung:

Bei der Vorfokussierung wird das IEF-Gel ohne Proben bei 100 Volt gestartet und nach beliebiger Zeit (z.B. nach 45 Minuten) wieder gestoppt um die Proben aufzutragen. Anschließend wird auf 400 bzw. 500 Volt und 4 mA bzw. 5 mA umgestellt.

Western – Blot

Durchführung wie in Kapitel 3.1.2

4 Ergebnisse

4.1 SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung

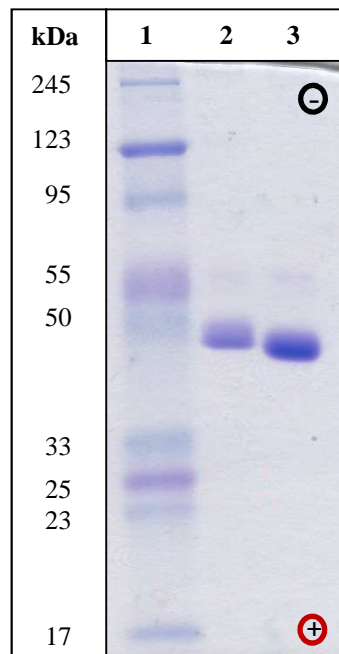


Abbildung 22: SDS-PAGE (10%) von β_2 -GPI nach Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung
 1: Molekulargewichtstandard (kDa)
 2: β_2 -GPI (0,8 μ g)
 3: β_2 -GPI-N (1,4 μ g)

Abbildung 22 zeigt ein 10 %iges SDS-Gel mit dem aufgetrennten β_2 -Glykoprotein-I (β_2 -GPI) auf Bahn 2 und dem Neuraminidase-behandelten β_2 -Glykoprotein-I (β_2 -GPI-N) auf Bahn 3. Die Verdünnung beider Proben erfolgte mit 4 %igem SDS-Sammelgelpuffer. Nach der Elektrophorese erfolgte die Färbung der Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau (siehe Kapitel 3.1.2).

Bahn 2 zeigt β_2 -Glykoprotein-I in einer Auftragsmenge von 0,8 μ g und Bahn 3 das Neuraminidase-behandelte β_2 -Glykoprotein-I mit 1,4 μ g. Durch den Vergleich der Proteine mit dem Molekulargewichtsstandard Roti-Mark BICOLOR (Bahn 1), ergibt sich bei β_2 -GPI ein Molekulargewicht von etwa 45-50 kDa und bei β_2 -GPI-N ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa.

4.2 SDS-PAGE mit nachfolgendem Western – Blot

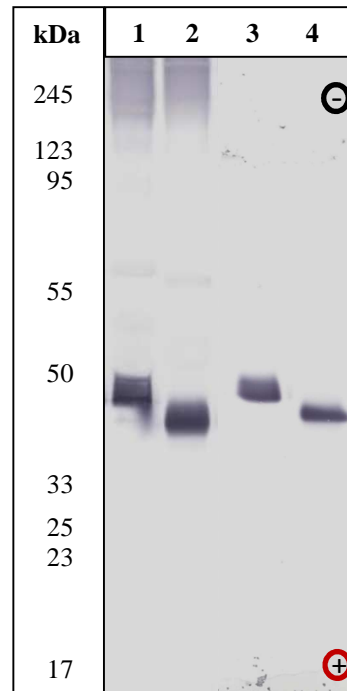


Abbildung 23: SDS-PAGE (10%) von β_2 -GPI nach Immunoblot

- 1: β_2 -GPI im Plasma (0,05 μ g)
- 2: β_2 -GPI-N im Plasma N (0,05 μ g)
- 3: β_2 -GPI (0,025 μ g)
- 4: β_2 -GPI-N (0,025 μ g)

In Abbildung 23 ist das Ergebnis der 10 %igen SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot von gereinigtem β_2 -Glykoprotein-I (β_2 -GPI), β_2 -Glykoprotein-I im Plasma sowie dem Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I im Plasma und Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I (β_2 -GPI-N) dargestellt. Die Verdünnung der Proben erfolgte mit 3 %igem Sammelgelpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht (Kapitel 3.1.2).

In Bahn 1 ist β_2 -Glykoprotein-I im Plasma und in Bahn 2 das Neuraminidase-behandelte β_2 -Glykoprotein-I im Plasma bei einer Menge von 0,05 μ g dargestellt. Die Bahn 3 zeigt das gereinigte β_2 -Glykoprotein-I (0,025 μ g) und die Bahn 4 das Neuraminidase-behandelte gereinigte β_2 -Glykoprotein-I (0,025 μ g). Der Vergleich der Proben mit dem Molekulargewichtsstandard Roti-Mark BICOLOR zeigt bei den unbehandelten Proben (Bahnen 1 und 3) ein Molekulargewicht von etwa 45-50 kDa und bei den mit Neuraminidase behandelten Proben (Bahnen 2 und 4) ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa.

4.3 Native isoelektrische Fokussierung von β_2 -Glykoprotein-I, Plasma und HClO_4 -Fällungs-Überstand

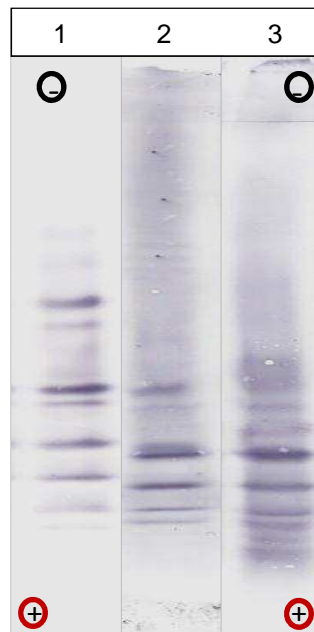


Abbildung 24: Native IEF (5%)

1: β_2 -GPI (0,6 μg)

2: β_2 -GPI im Plasma (0,048 μg)

3: β_2 -GPI im HClO_4 -Fällungs-Überstand

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der nativen (ohne Harnstoff) isoelektrischen Fokussierung (5%ig) von gereinigtem β_2 -Glykoprotein-I (β_2 -GPI), β_2 -Glykoprotein-I im Plasma und β_2 -Glykoprotein-I im HClO_4 -Fällungs-Überstand. Die Verdünnung von β_2 -Glykoprotein-I erfolgte mit H_2O , die von Plasma mit 0,9%iger NaCl -Lösung und der HClO_4 -Fällungs-Überstand wurde nach der Dialyse direkt eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde der Transfer der Proteine aus dem IEF-Gel auf eine Nitrozellulosemembran durchgeführt und die Isoformen anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht (Kapitel 3.1.2).

β_2 -Glykoprotein-I (Bahn 1) zeigt vier starke, drei mittelstarke und vier sehr schwache Banden (Isoformen), β_2 -Glykoprotein-I im Plasma (Bahn 2) drei starke und 4 schwache Banden und β_2 -Glykoprotein-I im HClO_4 -Fällungs-Überstand (Bahn 3) zwei starke und sechs schwache Banden.

4.4 Isoelektrische Fokussierung von β_2 -Glykoprotein-I und HClO_4 -Fällungs-Überstand unter Zusatz von 8 M Harnstoff

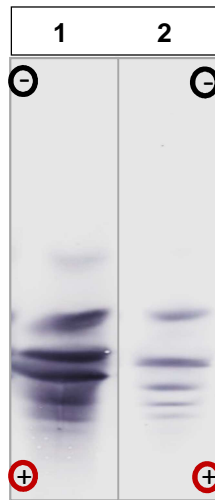


Abbildung 25: IEF (5 %) von β_2 -GPI mit 8 M Harnstoff

1: Gereinigtes β_2 -Glykoprotein-I (0,086 μg)

2: β_2 -Glykoprotein-I im HClO_4 -Fällungs-Überstand

Die isoelektrische Fokussierung von gereinigtem β_2 -Glykoprotein-I (Abbildung 25, Bahn 1) und β_2 -Glykoprotein-I im HClO_4 -Fällungs-Überstand (Abbildung 25, Bahn 2) erfolgte in einem 5 %igen IEF-Gel mit 8 M Harnstoff (siehe Tabelle 4) und vierzigminütiger Vorfokussierung. Die Verdünnung der beiden Proben erfolgte mit 0,1 M Natronlauge (NaOH). Nach der Elektrophorese wurde der Transfer der Proteine aus dem IEF-Gel auf eine Nitrozellulosemembran durchgeführt und die Isoformen anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht (Kapitel 3.1.2).

Die Fokussierungen von gereinigtem β_2 -Glykoprotein-I und β_2 -Glykoprotein-I im HClO_4 -Fällungs-Überstand zeigen drei starke, sowie zwei schwache Banden (Isoformen). In Bahn 1 ist eine zusätzliche schwache Bande in Richtung Kathode erkennbar.

4.5 Isoelektrische Fokussierung von Plasma ohne und mit Vorfokussierung unter Zusatz von 8 M Harnstoff

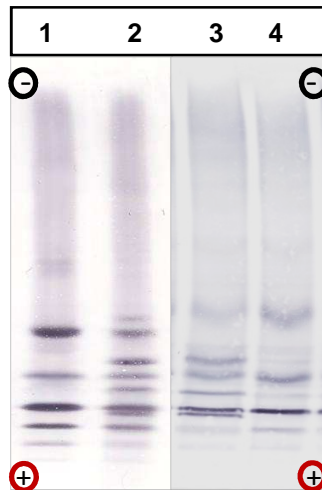


Abbildung 26: IEF (5%ig) ohne und mit Vorfokussierung (8 M Harnstoff)

- 1: β_2 -Glykoprotein-I im Plasma ohne Vorfokussierung (0,048 μg)
- 2: β_2 -Glykoprotein-I im Plasma ohne Vorfokussierung (0,048 μg)
- 3: β_2 -Glykoprotein-I im Plasma mit Vorfokussierung (0,048 μg)
- 4: β_2 -Glykoprotein-I im Plasma mit Vorfokussierung (0,048 μg)

In Abbildung 26 ist die isoelektrische Fokussierung von β_2 -Glykoprotein-I zweier unterschiedlicher Plasmen ohne und mit Vorfokussierung im 5 %igen IEF-Gel mit 8 M Harnstoff dargestellt. Die exakte Zusammensetzung der IEF-Gele ist in Tabelle 4 ersichtlich. Bei der Probenvorbereitung wurden die Plasmen 1:100 mit 0,1 M Natronlauge (NaOH) verdünnt. Bei Bahn 1 und 2 erfolgte die Elektrophorese ohne Vorfokussierung und bei Bahn 3 und 4 wurden die Plasmen nach einstündiger Vorfokussierung aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde der Transfer der Proteine aus dem IEF-Gel auf eine Nitrozellulosemembran durchgeführt und die Isoformen anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht (Kapitel 3.1.2).

In den vier Bahnen wurden bezüglich β_2 -Glykoprotein-I dieselben Mengen aufgetragen. Die verwendeten Plasmaproben zeigen unterschiedliche Phänotypen von β_2 -Glykoprotein-I. Bahnen 1 und 4 zeigen drei starke sowie zwei schwache Banden (Isoformen), Bahnen 2 und 3 fünf starke sowie vier schwache Banden.

4.6 Isoelektrische Fokussierung von Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I im Plasma in Gelen unterschiedlicher Zusammensetzung

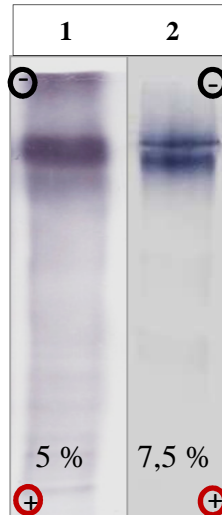


Abbildung 27: IEF von Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I im Plasma in 5%igem (5 M Harnstoff, 1 % CHAPS) und 7,5 %igem (8 M Harnstoff) Gel
 1: β_2 -GPI-N im Plasma, 0,065 μ g
 2: β_2 -GPI-N im Plasma, 0,065 μ g

Die Abspaltung der N-Acetyl-Neuraminsäure von den endständigen Zuckerketten mit Neuraminidase wird in Kapitel 3.2 beschrieben. Abbildung 27 zeigt das Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung von Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I (β_2 -GPI-N) im Plasma in 5 und in 7,5 %igem Gel. Das 5 %ige IEF-Gel beinhaltet unter anderem 5 M Harnstoff sowie 1% CHAPS (Tabelle 5) und das 7,5 %ige 8 M Harnstoff (Tabelle 6). Die Verdünnung der Proben für das 5 %ige IEF-Gel erfolgte mit 0,1 M Natronlauge (NaOH) mit 1% CHAPS und für das 7,5 %ige IEF-Gel wurden die Proben nur mit 0,1 M Natronlauge verdünnt. Nach etwa 45-minütiger Vorfokussierung wurden die Proben im kathodischen Bereich aufgetragen und bei etwa 1500 Voltstunden (Vh) fokussiert. Nach der Elektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine aus dem IEF-Gel auf eine Nitrozellulosemembran und die Isoformen wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht (Kapitel 3.1.2).

Die Auftrennung des Neuraminidase-behandelten β_2 -Glykoprotein-I direkt aus dem Plasma zeigt in beiden Gelen zwei Banden im Bereich von pI 8,0. Die Auflösung der basischen β_2 -GPI-N-Isoformen erscheint im 7,5 %igen Gel mit 8 M Harnstoff mit höherer Trennschärfe zu erfolgen.

4.7 Identifizierung der Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I und Asialo- β_2 -Glykoprotein-I

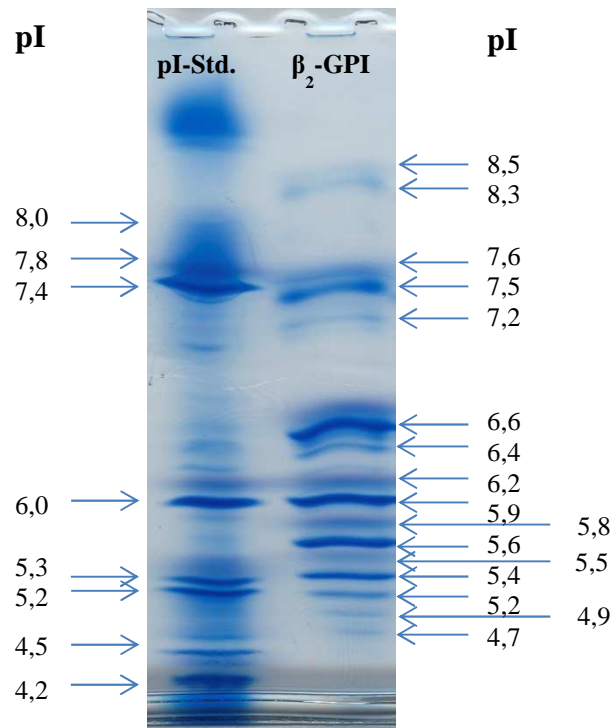


Abbildung 28: Identifizierung der Isoformen mit einem pI-Marker

pI-Std: 200 μ g pI-Marker

β_2 -GPI: 50 μ g gereinigtes β_2 -Glykoprotein-I

In Abbildung 28 ist die isoelektrische Fokussierung des pI-Standards (pI-Std.) und des gereinigten β_2 -Glykoprotein-I (β_2 -GPI) in nativer Form (ohne Harnstoff) dargestellt, wobei 200 μ g pI-Standard und 50 μ g β_2 -Glykoprotein-I eingesetzt wurden. Nach fünfstündiger Fokussierung bei 1650 Voltstunden erfolgte die Sichtbarmachung mit Hilfe von Coomassie-Brilliant-Blau. Die bekannten isoelektrischen Punkte der Standardproteine liegen im Bereich von 4,2 – 8,0. Mit Hilfe der Standardkurve (Abbildung 29) erfolgte die Bestimmung der pIs des gereinigten β_2 -Glykoprotein-I, wobei diese zwischen pI 4,7 – 8,5 liegen.

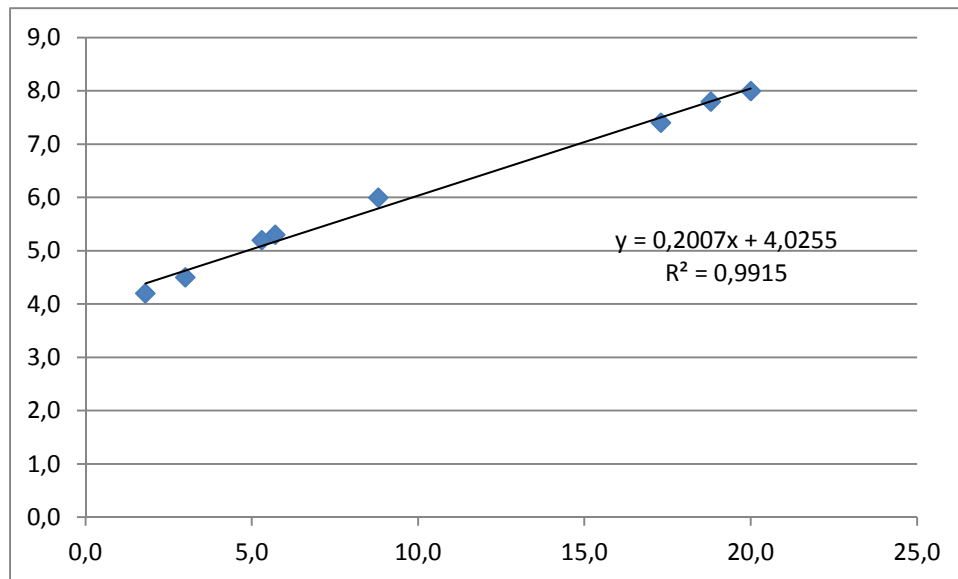


Abbildung 29: Standardkurve der pI-Werte 4,2 – 8,0 (EXCEL 2010)

Abbildung 29 zeigt den pH-Gradienten nach isoelektrischer Fokussierung, ermittelt anhand der bekannten pI-Werte der eingesetzten Standardproteine. Die pI-Werte des gereinigten β_2 -Glykoprotein-I (Abbildung 28) wurden mittels linearer Regression errechnet.

Das Bestimmtheitsmaß (R^2) gibt die Relation der abhängigen und unabhängigen Variablen an und beschreibt somit die Güte des linearen Zusammenhangs: $R^2 = 0,9915$

5 Diskussion

Die vorliegende Masterarbeit beschreibt eine Methodenentwicklung, bei der die isoelektrische Fokussierung (IEF) und das Immunoblotten der Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I und Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I direkt aus dem Plasma standardisiert werden sollten. Ein primäres Ziel dieser Arbeit war es, mit reduziertem Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand, bezogen auf Arbeitsvorschriften vorangegangener Arbeiten, optimale Ergebnisse in Polyacrylamidgelen und auf Nitrozellulosemembranen zu erzielen.

Der Vorteil der IEF von β_2 -Glykoprotein-I direkt aus dem Plasma besteht darin, dass keine aufwändige Probenvorbereitung notwendig ist, das heißt, β_2 -Glykoprotein-I muss nicht zuvor aus dem Plasma isoliert werden, sondern dieses kann direkt eingesetzt werden. Dies kann somit schnellere Ergebnisse liefern. Weiters werden im Gegensatz zu anderen IEF-Systemen, wie zum Beispiel der horizontalen IEF, weniger Trägerampholyte benötigt, wodurch Kosten gespart werden. Einige IEF-Systeme benötigen aufgrund hoher Wärmebildung im Gel Kühlsysteme, in dieser Arbeit sollte die IEF bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Bereits 1988 konnten Kamboh et al die Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I mit Hilfe der IEF verschiedener Plasmen darstellen und sechs verschiedene Phänotypen in der weißen und einen zusätzlichen Phänotyp in der schwarzen Bevölkerung identifizieren (siehe Kapitel 1.4.1). Die Analysen erfolgten in Anwesenheit von 3 M Harnstoff in einem pH-Gradienten von 4 - 8, wobei hier eine Mischung von pH 4 - 6,5 und pH 5 - 8 an Trägerampholyten zum Einsatz kam.¹⁸⁵

Gries et al beschäftigten sich im Jahr 1989 mit der Darstellung von Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I (Asialo- β_2 -Glykoprotein-I). Durch die Abspaltung der N-Acetyl-Neuraminsäure an der endständigen Zuckerkette konnte nach der IEF der enzymbehandelten Plasmaproben eine Veränderung der Anzahl an Isoformen dargestellt werden (siehe Kapitel 1.4.1). Die Analysen erfolgten hierbei in 7,5 %igem Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff in einem pH-Bereich von 7 - 9.¹⁸⁶

Die SDS-PAGE und die IEF von β_2 -Glykoprotein-I, Plasma, HClO₄-Fällungs-Überstand und dem Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I wurden in dieser Arbeit in ein und demselben vertikalen System durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.1).

¹⁸⁵ Kamboh (1988)

¹⁸⁶ Gries (1989)

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen β_2 -Glykoprotein-I, Plasma und das Neuraminidase-behandelte β_2 -Glykoprotein-I nach SDS-PAGE, wobei die Sichtbarmachung der Proteine einerseits mit Coomassie-Brilliant-Blau erfolgte und hier ein Molekulargewichtstandard mitgeführt werden konnte, andererseits durch Immunoblotting um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu überprüfen. In beiden Abbildungen wird eine erfolgreiche Auftrennung der Proteine dargestellt, wobei das gereinigte β_2 -Glykoprotein-I und β_2 -Glykoprotein-I im Plasma eine Molekülgröße von etwa 50 kDa zeigen, während Neuraminidase-behandeltes β_2 -Glykoprotein-I ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa aufweist.

Bei der nativen IEF von β_2 -Glykoprotein-I (Abbildung 24) wurde versucht, die strukturelle Konformation der Proteine beizubehalten, weshalb keine denaturierenden Reagenzien eingesetzt wurden. Interessanterweise sind im Gelbild mit dem gereinigten β_2 -Glykoprotein-I (Abbildung 24) fünf Hauptbanden und 7 schwache Banden zu sehen, also mehr Isoformen als in der Literatur beschrieben sind. Die Fokussierungen von β_2 -Glykoprotein-I im Plasma und im HClO_4 -Fällungs-Überstand (Abbildung 24) zeigen, im Gegensatz zum gereinigten β_2 -Glykoprotein-I, weniger Banden mit geringerer Auflösung. Eine mögliche Ursache hierfür könnten störende Proteine im Plasma sein. Allerdings sind auch hier mehr Isoformen erkennbar als in der Literatur beschrieben sind.

In weiterer Folge wurde für die IEF der Proben auch Harnstoff als denaturierendes Agens eingesetzt. Die native Konformation der Proteine wird dadurch zwar gestört, die Eigenladung bleibt jedoch erhalten und die Proteine bleiben in Lösung. Um die Löslichkeit der Proteine zusätzlich zu erhöhen, wurde das zwitterionische Detergenz CHAPS verwendet.^{187 188}

Wie in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt, zeigt sich ein unterschiedliches Ergebnis der Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I gegenüber der nativen IEF in Abbildung 24. Durch die Zugabe von Harnstoff werden die Proteine besser in Lösung gehalten, wodurch sich die Bandenschärfe deutlich erhöht und das Hintergrundrauschen („smears“) merklich abnimmt. Die besten Ergebnisse wurden bei 1400 bis 1500 Voltstunden (Vh) und einer Gesamtfokussierzeit von 260 – 280 Minuten erzielt (siehe Kapitel 3.2).

Als HClO_4 -Fällungs-Überstand wurde in dieser Arbeit jener Plasma-Überstand bezeichnet, bei dem die störenden Proteine zuvor mit Hilfe von Perchlorsäure (HClO_4) entfernt,

¹⁸⁷ Rehm (2010)

¹⁸⁸ Geckeler (1998)

beziehungsweise gefällt wurden. Da β_2 -Glykoprotein-I säurelöslich ist und durch die Perchlorsäure nicht angegriffen wird, bleibt dieses im Überstand erhalten. In Abbildung 25 wurde β_2 -Glykoprotein-I im HClO_4 -Fällungs-Überstand in 5 %igem Fokussiergel mit 8 M Harnstoff elektrophoretisch aufgetrennt. Trotz Säurebehandlung der Proben sind in diesem Experiment keine Unterschiede in der Anzahl und im Muster der Isoformen, bezogen auf das gereinigte β_2 -Glykoprotein-I (Abbildung 25) und β_2 -Glykoprotein-I direkt aus dem Plasma (Abbildung 26), ersichtlich.

In Abbildung 26 wurde versucht, die IEF von β_2 -Glykoprotein-I direkt aus dem Plasma ohne und mit Vorfokussierung durchzuführen. Hierbei wurden verschiedene Plasmen verwendet, aus denen zwei unterschiedliche Phänotypen resultierten (siehe Kapitel 1.4.1). Aufgrund der Vorfokussierung werden die Banden deutlich breiter und im anodischen pH-Bereich auch eindeutig schärfer. In Richtung Kathode zeigen die Banden eine leichte Wölbung und werden unschärfer. Eine mögliche Ursache könnte die zu lange Vorfokussierzeit sein. Eindeutige Identifizierungen der Banden sind im Gelbild ohne Vorfokussierung möglich, wobei diese Anordnung der Isoformen auch der Literatur entspricht. Verglichen mit Abbildung 24 scheint es, dass der Harnstoff die natürliche Konformation von β_2 -Glykoprotein-I soweit verändert, dass auch die Anzahl der darstellbaren Isoformen abnimmt und sich auf 5 Isoformen reduziert.

Desialysierung von β_2 -Glykoprotein-I mit dem Enzym Neuraminidase vermindert die Isoformen-Anzahl und verändert die isoelektrischen Punkte (pI), wie schon in der Literatur beschrieben ist. Die IEF von Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I wurde in dieser Arbeit auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt. Einerseits in 5 %igem Fokussiergel mit 5 M Harnstoff und 1 % CHAPS, andererseits in 7,5 %igem Fokussiergel mit 8 M Harnstoff (Abbildung 27).

Die Auftrennung der Isoformen von Asialo- β_2 -Glykoprotein-I in nativer Form stellte sich aufgrund des Fehlens an Ladungen durch die Abspaltung der endständigen Sialinsäuren als sehr schwierig heraus, da es zu Löslichkeitsproblemen kam. In nahezu allen Versuchen mit kathodischem Probenauftrag sind die Proteine in den Probenauftragstaschen beim Übergang in die Gelmatrix ausgefallen. Auch durch Umkehr der IEF, also bei anodischem Probenauftrag, erhielt man keine positiven Ergebnisse, weshalb in weiterer Folge Harnstoff zur besseren Löslichkeit der Proteine eingesetzt wurde.

Bei der IEF kann ein anodischer Probenauftrag je nach pI des Proteins den Fokussierweg bestimmter Proteine (wie Asialo- β_2 -Glykoprotein-I) erhöhen, wodurch sich die Auflösung der

Banden verbessert. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten vertikalen System konnte das Asialo- β_2 -Glykoprotein-I im Fokussiergel mit Harnstoff ausschließlich kathodisch aufgetragen werden, da durch den anodischen Probenauftrag keine reproduzierbaren Ergebnisse sichtbar wurden.

Die Darstellung (Abbildung 27) der Isoformen von Asialo- β_2 -Glykoprotein-I wurde in 5 – und 7,5 %igem Fokussiergel durchgeführt, wobei in beiden Gelen Harnstoff zur Erhöhung der Löslichkeit eingesetzt wurde. Im 5 %igen Fokussiergel wurde versucht, die Löslichkeit zusätzlich mit Hilfe des amphoteren Detergens CHAPS zu erhöhen, woraus zwei Isoformen im kathodischen Bereich mit geringer Auflösung resultierten. Durch die Erhöhung der Gelkonzentration auf 7,5 % wird die Porengröße des Gels verringert. Hierbei konnten zwei Isoformen mit hoher Auflösung im kathodischen pH-Bereich dargestellt werden. Durch die Erhöhung der Gelkonzentration von 5 % auf 7,5 % scheint eine Diffusion der Proteine von ihren pI-Punkten weitgehend unterdrückt zu werden, weshalb sich die Trennschärfe der Banden erhöht. Da durch die Abspaltung der Sialinsäuren nur mehr zwei Isoformen darstellbar sind, ist anzunehmen, dass der Großteil der Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I durch unterschiedlichen Sialinsäuregehalt zustande kommt.

Zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte von β_2 -Glykoprotein-I wurde die IEF im Vergleich mit einem pI-Marker durchgeführt. Da die einzelnen Proteine des pI-Markers mit Harnstoff denaturiert werden können, erfolgte die IEF des pI-Markers in nativer Form (Abbildung 28) mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung. Aufgrund der bekannten pI-Werte der Standardproteine konnten die isoelektrischen Punkte des gereinigten β_2 -Glykoprotein-I (in nativer Form) durch Erstellen einer Standardkurve (Abbildung 29) berechnet werden. Die etwa 14 Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I zeigen pI-Werte zwischen 4,7 und 8,5, wobei die fünf Hauptbanden im pH-Bereich von 5,2 und 6,6 liegen. Da die Sialinsäureabspaltung von β_2 -Glykoprotein-I physiologisch auch im Plasma stattfindet, könnten die beiden Isoformen mit den isoelektrischen Punkten bei pI 8,3 und 8,5 vom Asialo- β_2 -Glykoprotein-I stammen. Die Banden im Bereich von pH 7,5 werden in keiner Literatur als Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I beschrieben und könnten eventuell Aggregate darstellen. Um sichere Aussagen treffen zu können, müssten die einzelnen Isoformen sowohl in nativer als auch in denaturierter Form durch Sequenzierung charakterisiert und somit identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode standardisiert, bei der die Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I und Asialo- β_2 -Glykoprotein-I mit Hilfe der vertikalen IEF auf einfache Weise

aufgetrennt werden können. Vor allem wurde versucht, β_2 -Glykoprotein-I und Asialo- β_2 -Glykoprotein-I direkt aus dem Plasma zu analysieren um somit die Isolierung und Aufreinigung aus dem Plasma zu umgehen. Die Experimente zur Standardisierung der IEF von β_2 -Glykoprotein-I aus dem Plasma, aber auch von gereinigtem β_2 -Glykoprotein-I und β_2 -Glykoprotein-I aus dem HClO_4 -Fällungs-Überstand zeigten, dass durch die Verwendung von 5 %igem Polyacrylamidgel und 8 M Harnstoff bei einer Fokussierzeit von 1300 – 1600 Voltstunden (Vh) optimale Ergebnisse mit höchster Bandenschärfe resultieren. Auch eine Auftrennung der nativen Proben, also ohne Harnstoff, ist mit der standardisierten Methode möglich, jedoch mit geringem Verlust an Bandenschärfe. Für die Auftrennung von Asialo- β_2 -Glykoprotein-I konnte eine Erhöhung der Gelkonzentration von 5 % auf 7,5 % die Fokussierung der Isoformen an ihren isoelektrischen Punkten verbessern.

Im Hinblick auf zukünftige Forschungsprojekte in diesem interessanten Themengebiet kann in weiterer Folge eine exakte Identifizierung der einzelnen Isoformen von β_2 -Glykoprotein-I und Asialo- β_2 -Glykoprotein-I durch Protein-Sequenzierung durchgeführt werden. Da die mRNA von β_2 -Glykoprotein-I größtenteils in der Leber exprimiert wird, könnte eine Charakterisierung der Isoformen bei bestimmten Lebererkrankungen eine essentielle Rolle spielen und bestimmte Isoformen als Biomarker zur Früherkennung oder Diagnose von Krankheiten verwendet werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der N- und O-glykosidischen Verknüpfung	3
Abbildung 2: Anzahl der jährlich publizierten Artikel über β_2 -Glykoprotein-I	6
Abbildung 3: Darstellung der Sekundärstruktur und des Topologiediagrammes von β_2 - Glykoprotein-I.....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Intron-Exon-Organisation von β_2 -Glykoprotein-I	9
Abbildung 5: Evolutionärer Verlauf der verschiedenen APOH-Haplotypen	11
Abbildung 6: Darstellung der oxLDL/ β_2 GPI-Komplexbildung	14
Abbildung 7: Rolle von β_2 -Glykoprotein-I in der Gerinnungskaskade.....	15
Abbildung 8: Isoelektrische Fokussierung von β_2 -GPI (a) und Neuraminidase-behandeltem β_2 -GPI (b) in 7,5 % Polyacrylamid mit 6 M Harnstoff	17
Abbildung 9; APO H Immunoblot-Muster in 5 % IEF Polyacrylamidgel mit 3 M Harnstoff in Kombination mit zwei Trägerampholyten aus verschiedenen Plasmen.....	18
Abbildung 10: Schematische Darstellung der APOH-Phänotypen.....	18
Abbildung 11: Darstellung der B2G-Phänotypen	19
Abbildung 12: Verknüpfung der Sialinsäure mit einem Glykoprotein	20
Abbildung 13: Vertikale Elektrophorese-Apparatur für SDS-PAGE	22
Abbildung 14: Entwicklung eines pH-Gradienten mit Trägerampholyten	27
Abbildung 15: Western-Blot-Transfer-Apparatur	31
Abbildung 16: Antigen-Antikörperkomplex mit Primärantikörper und Sekundärantikörper mit Meerrettichperoxidase (HRP)	32
Abbildung 17: Fertiggassette mit Kamm	38
Abbildung 18: Elektrophorese-Apparatur der Firma Novex.....	40
Abbildung 19: Western-Blot-Apparatur mit Sandwichhalterung	41
Abbildung 20: Blocken am Schüttelpult	43
Abbildung 21: Schwenkpult.....	43
Abbildung 22: SDS-PAGE (10%) von β_2 -GPI nach Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung	51
Abbildung 23: SDS-PAGE (10%) von β_2 -GPI nach Immunoblot	52
Abbildung 24: Native IEF (5%)	53
Abbildung 25: IEF (5 %) von β_2 -GPI mit 8 M Harnstoff	54
Abbildung 26: IEF (5%ig) ohne und mit Vorfokussierung (8 M Harnstoff)	55
Abbildung 27: IEF von Neuraminidase-behandeltem β_2 -Glykoprotein-I im Plasma in 5 (5 M Harnstoff, 1 % CHAPS) und 7,5 %igem (8 M Harnstoff) Gel	56

Abbildung 28: Identifizierung der Isoformen mit einem pI-Marker	57
Abbildung 29: Standardkurve der pI-Werte 4,2 – 8,0 (EXCEL 2010)	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der Aminosäuren-Zusammensetzung von β_2 -Glykoprotein-I	8
Tabelle 2: Zusammensetzung des 10%igen SDS-Gels	38
Tabelle 3: Zusammensetzung des 5 %igen IEF-Gels.....	48
Tabelle 4: Zusammensetzung des 5 %igen IEF-Gels mit 8 M Harnstoff	48
Tabelle 5: Zusammensetzung des 5 %igen IEF-Gels mit 5 M Harnstoff und 1 % CHAPS	49
Tabelle 6: Zusammensetzung des 7,5 %igen IEF-Gels mit 8 M Harnstoff	49

Literaturverzeichnis

Adam, G.; Läuger, P.; Stark, G. (2009) *Physikalische Chemie und Biophysik*, Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer.

Asherson, R.; Cervera, R.; Piette, J.C.; Shoenfeld, Y. (2008) *The Antiphospholipid Syndrome II: Autoimmune Thrombosis*, England: Wiley.

Babylon (2012) "Free Online Dictionary", <http://www.babylon.com/definition/Isoform/>

Balakrishnan (2012), http://www.scribd.com/doc/51510177/glycoprotein#outer_page_7

Bouma, B.; De Groot, P.; Van Den Elsen, J.; Ravelli, R.; Schouten, A.; Simmelink, M.; Derksen, R.; Kroon, J.; Gros, P. (1999) *Adhesion mechanism of human β_2 -Glykoprotein-I to phospholipids based on its crystal structure*, The EMBO Journal 18, 5166-5174

Budin, M. (1995) *Elektrophorese - Theorie und Praxis*, Berlin, New York: de Gruyter.

Chemgapedia (2012) *Lebenszyklus des Influenza-Virus im Detail - Der Weg durch das Mucin*
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/12/thr/vlu_thr/relenza.vlu/Page/vsc/de/ch/12/thr/wirkstoffe/relenza/a2_04_mucin/mucin.vscml.html

Chemie.de (2012), <http://www.chemie.de/lexikon/Isoform.html>

De Groot, Meijers (2011) *β_2 -Glycoprotein I: evolution, structure and function*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 1275–1284

Dancygier, H. (2003) *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik, und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*. Mit einem Geleitwort von V.J. Desmet, Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Devreese, K. (2012) *Antiphospholipid antibodies: Evaluation of the thrombotic risk*, *Thrombosis Research*, 130, 37–40

Doenecke, D.; Koolman, J.; Fuchs, G.; Gerok, W. (2005) *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, Stuttgart: Thieme.

Eckert, W.A.; Kartenbeck, J. (1997) *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Foodnetworksolution (2012)

<http://www.foodnetworksolution.com/vocab/word/1595/glycoprotein>

Galli, M. Comfurius, P.; Maasen, C. (1990) *Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor*, *Lancet*, 335, 1544–1547

Garrido-Medina, R.; Puerta, A.; Rivera-Monroy, Z.; De Frutos, M.; Guttmann, A.; Diez-Masa, J.C. (2012) *Analysis of alpha-1-acid glycoprotein isoforms using CE-LIF with fluorescent thiol derivatization*. *Electrophoresis*, 33, 1113–1119

Geckeler, K.E.; Eckstein, H. (Hrsg.) (1998) *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*, Braunschweig, Wiesbaden: Vieweg, Teubner.

Gey, M. H. (2008) *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik – Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, Berlin, Heidelberg: Springer.

Gressner, A.; Arndt, T. (2007) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Band 1: Klinische Chemie: Präanalytik, Analytik, Kenngrößen, Interpretation*, Heidelberg: Springer.

Gries, A.; Nimpf, J.; Wurm, H.; Kostner, G.; Kenner, T. (1989) *Characterization of isoelectric subspecies of asialo- β_2 -glycoprotein-I*, *Biochem. J.* 260, 531-534

Hallbach, J. (2006) *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*, Stuttgart: Thieme.

Haupt, H.; Schwick, H.G.; Storiko, K. (1968) *On a hereditary beta-2-glycoprotein I deficiency*, *Humangenetik*, 5, 291–3.

Hermey, G.; Mahlke, C.; Schwake, M.; Sommer, T. (2010) *Der Experimentator – Neurowissenschaften*, Heidelberg: Spektrum.

Hirsch-Kaufmann, M.; Schweiger, M. (2006) *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Stuttgart: Thieme.

Hirsch-Kaufmann, M.; Schweiger, M.; Schweiger, M-R (2009) *Biologie und molekulare Medizin*, Stuttgart: Thieme.

Holtzhauer, M. (1997) *Biochemische Labormethoden*, Heidelberg: Springer.

Holtzhauer, M. (Hrsg.) (1996) *Methoden in der Proteinanalytik*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Horbach, DA.; Van Oort, E.; Lisman, T.; Meijers, J.; Derksen, R.; De Groot, P.; (1999) *β_2 -Glycoprotein I Is Proteolytically Cleaved In Vivo upon Activation of Fibrinolysis*, *Thromb Haemost*, 81, 87–95

Hörkkö, S.; Miller, E.; Branch, W.; Palinski, W.; Witztum, J. (1997) *The epitopes for some antiphospholipid antibodies are adducts of oxidized phospholipid and β_2 -Glykoprotein-I (and other proteins)*, *Medical Sciences*, 94, 10356–10361

Horn, F. (2009) *Chemie des Menschen – Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, Stuttgart: Thieme.

Horn, F. (2012) *Biochemie des Menschen – Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, Stuttgart: Thieme.

Hu, W-S; Zeng, A-P (2012) *Genomics and Systems - Biology of Mammalian Cell Culture*, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer.

Igarashi, M.; Matsuura, E.; Igarashi, Y.; Nagae, H.; Ichikawa, K.; Triplett, D.; Koike, T. (1996) *β_2 -Glykoprotein-I as an Anticardiolipin Cofactor determined using deleted Mutants expressed by a Baculovirus System*, *The American Society of Hematology*, 87, 3262-3270

Ioannou, Y.; Zhang, JY.; Qi, M.; Gao, L.; Qi, JC.; Yu, DM.; Lau, H.; Sturgess, A.; Vlachoyiannopoulos, P.; Moutsopoulos, H.; Rahman, A.; Pericleous, C.; Atsumi, T.; Koike, T.; Heritier, S.; Giannakopoulos, B.; Krilis, S. (2011) *Novel Assays of Thrombogenic Pathogenicity in the Antiphospholipid Syndrome Based on the Detection of Molecular Oxidative Modification of the Major Autoantigen β_2 -Glykoprotein-I*, ARTHRITIS & RHEUMATISM, 63, 9, 2774–2782

Jansohn, M.; Rothhämel, S. (2012) *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Heidelberg: Spektrum.

Johnson, SJA.; Valborgland, T.; Bostad, L.; Omdal, R. (2010) *Thrombotic microangiopathy and the antiphospholipid syndrome*, Lupus 19, 1569–1572

Kamboh, I.; Manzo, S.; Mehdi, H.; Fitzgerald, S.; Sanghera, D.; Kuller, L.; Atson, C. (1999) *Genetic variation in apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) affects the occurrence of antiphospholipid antibodies and apolipoprotein H concentrations in systemic lupus erythematosus*, Lupus, 8, 742-750

Kamboh, I.; Sanghera, D.; Mehdi, H.; Nestlerode, C.; Chen, Q.; Khalifa, O.; Naqvi, A.; Manzi, S.; Bunker, C. (2004) *Single Nucleotide Polymorphisms in the Coding Region of the Apolipoprotein H (β_2 -Glycoprotein I) Gene and their Correlation with the Protein Polymorphism, Anti- β_2 -Glycoprotein I Antibodies and Cardiolipin Binding: Description of Novel Haplotypes and Their Evolution*, Annuals of Human Genetics, 68, 285-299

Kamboh, I.; Ferrell, RE.; Sepehrnia, B. (1988) *Genetic Studies of Human Apolipoproteins. IV. Structural Heterogeneity of Apolipoprotein H (β_2 -Glykoprotein-I)*, Human Genetics Division of Biostatistics, 42, 452-457

Kayser, O. (2002) *Grundwissen Pharmazeutische Biotechnologie*, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden: Teubner.

Koehl, J. (2002) *Aufreinigung und Charakterisierung der Elicatine von *Phytophthora quercina**, München: Utz.

Königshoff, M.; Brandenburger, T. (2007) *Kurzlehrbuch Biochemie*, Stuttgart: Thieme.

Koolmann, J. Röhm, K-H. (2003) *Taschenatlas der Biochemie*, Stuttgart: Thieme.

Kremer, B.; Bannwarth, H. (2011) *Einführung in die Laborpraxis – Basiskompetenzen für Laborneulinge*, Berlin, Heidelberg: Springer.

Leduc, M.; Shimmin, L.; Klos, K.; Hanis, C.; Boerwinkle, E.; Hixson, J. (2008) *Comprehensive evaluation of apolipoprotein H gene (APOH) variation identifies novel associations with measures of lipid metabolism in GENOA*, Journal of Lipid Research, 49, 2648- 2656

Lee, N.; Brewer, B.; Osborne, Jr.; Osborne, J. (1983) *β_2 -Glykoprotein-I*, The Journal of Biological Chemistry, 258. 8, 4765-4770

Löffler, G.; Petrides, P.E.; Heinrich, P.C. (2007) *Biochemie & Pathobiochemie*, Heidelberg: Springer.

Lönneberg, M.; Carlsson, J. (2006) *Lab-on-a-chip technology for determination of protein isoform profiles*, Journal of Chromatography A, 1127, 175–182

Lopez, LR.; Kobayashi, K.; Matsunami, Y.; Matsuura, E. (2009) *Immunogenic Oxidized Low-density Lipoprotein/ β_2 -glycoprotein I Complexes in the Diagnostic Management of Atherosclerosis*, Clinic Rev Allerg Immunol, 37, 12–19

Lozier, J.; Takahashi, N.; Putnam, F. (1984) *Complete amino acid sequence of human plasma β_2 -glycoprotein I*, Department of Biology, 81, 3640-3644

Macbeth, R.; Bekesi, G. (1962) *Plasma Glycoproteins in Various Disease States Including Carcinoma*, 22, 1170-1176.

Maiadiagnostics (2012)

http://www.maiadiagnostics.com/research/protein_isoform_determination.htm

Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M. (2010) *Lebensmittelanalytik*, Berlin, Heidelberg: Springer.

Matsuura, E.; Igarashi, Y.; Fujimoto, M.; Ichikawa, K.; Koike, T. (1990) *Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease*, *Lancet*, 336, 177–178

Matsuura, E.; Kobayashi, K.; Inque, K.; Shoenfeld, Y. (2005) *Oxidized LDL/ β_2 -glycoprotein I complexes: new aspects in atherosclerosis*, *Lupus*, 14, 736–741

Matsuura, E.; Inagaki, J.; Kasahara, H.; Yamamoto, D.; Atsum, T.; Kobayashi, K.; Kaihara, K.; Zhao, D.; Ichikawa, K.; Tsutsumi, A.; Yasuda, T.; Triplett, D.; Koike, T. (2000) *Proteolytic cleavage of β_2 -Glykoprotein-I: Reduction of antigenicity and the structural relationship*, *The Japanese Society for Immunology*, 12, 8, 1183-1192

McNeil, HP.; Simpson, RJ.; Chesterman, CN.; Krilis, SA. (1990) *Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H)*, *Proc Natl Acad SciUSA*, 87, 4120–4

Mehdi, H.; Naqvi, A.; Kamboh, I. (2000) *A hydrophobic sequence at position 313-316 (Leu-Ala-Phe-Trp) in the fifth domain of apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) is crucial for cardiolipin binding*, *Eur. J. Biochem.*, 267, 1770-1776

Mehdi, H.; Manzi, S.; Desai, P.; Chen, Q.; Nestlerode, C.; Bontempo, F.; Stom, S.; Zarnegar, R.; Kamboh, I. (2003) *A functional polymorphism at the transcriptional initiation site in β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) associated with reduced gene expression and lower plasma levels of β_2 -glycoprotein I*, *Eur. J. Biochem.*, 270, 230–238

Misek, DE.; Kuick, R.; Wang, H.; Galchev, V.; Deng, B.; Zhao, R.; Tra, J.; Pisano, MR.; Amunugama, R.; Allen, D.; Walker, AK.; Strahler, JR.; Andrews, P.; Omenn, GS.; Hanash, SM. (2005) *A wide range of protein isoforms in serum and plasma uncovered by a quantitative intact protein analysis system*, *Proteomics*, 5, 3343–3352

Miyakis, S.; Giannokopoulos, B.; Krilis, SA. (2004) *Beta 2 glycoprotein I - function in health and disease*, *Thrombosis Research*, 114, 335-346

Mohrlüder, J. (2007) *Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen*, Düsseldorf: Jülich Forschungszentrum.

Nakaya, Y.; Schaefer, EJ.; Brewer, HB. (1980) *Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I)*, *Biochem. Biophys. Res Commun*, 95(3), 1168-72,

Nimpf, J.; Wurm, H.; Kostner, GM. (1987) *Beta 2-glycoprotein-I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation*, *Atherosclerosis*, 63, 109–114

Nojima, J.; Kuratsune, H.; Suehisa, E.; Futsukaichi, Y.; Yamanishi, H.; Machii, T.; Iwatani, Y.; Kanakura, Y. (2001) *Association between the Prevalence of Antibodies to β_2 -Glycoprotein I, Prothrombin, Protein C, Protein S, and Annexin V in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Thrombotic and Thrombocytopenic Complications*, *Clinical Chemistry*, 47, 6, 1008–1015

Packer, NH.; Wilkins, MR.; Golaz, O.; Lawson, MA.; Gooley, AA.; Hochstrasser, DF.; Redmond, JW.; Williams, KL. (1996) *Characterization of Human Plasma Glycoproteins separated by Two-Dimensional Gel Electrophoresis*, *Biotechnology*, 66-70

Pearson, K.; Oates, D. (1979) *Production of Synthetic Ampholytes for Isoelectric Focusing*, Nebraska Game and Parks Commission-White Papers, Conference Presentation, Manuscripts, Paper13

Pingoud, A.; Urbanke, C. (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie*, Berlin: de Gruyter.

Piercenet (2012)

<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55 AA6C14F31193>

Rahgozar, S. (2012) *Revisiting Beta 2 Glycoprotein I, the Major Autoantigen in the Antiphospholipid Syndrome*, *Immunol.*, 9 (2), 73-85

Rehm, H.; Letzel, T. (2010) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Heidelberg: Spektrum.

Rehner, G.; Daniel, H. (2010) *Biochemie der Ernährung*, Heidelberg: Springer.

Richter, A.; Cleve, H. (1988) *Genetic variations of human serum β_2 -Glykoprotein-I demonstrated by isoelectric focusing*, *Electrophoresis*, 9, 317-322

Richter, G. (2003) *Praktische Biochemie – Grundlagen und Techniken*, Stuttgart: Thieme.

Rouby, R.; Pratt, C.; Buyon, J.; Winfield, J. (1992) *Lupus Anticoagulant Activity of Autoimmune Antiphospholipid Antibodies Is Dependent upon β_2 -Glycoprotein I*, *J. Clin. Invest.*, 90, 1100-1104

Safa, O.; Crippa, L.; Della-Valle, P.; Sabbadini, MG.; D'Angelo, SV.; D'Angelo, A. (1999) *IgG reactivity to phospholipid-bound β_2 -glycoprotein I is the main determinant of the fraction of lupus anticoagulant activity quenched by addition of hexagonal (II) phase phospholipid in patients with the clinical suspicion of antiphospholipid-antibody syndrome*, *Haematologica*, 84, 829-838

Sanghera, D.; Kristensen, T.; Hamman, R.; Kamboh, I. (1997) *Molecular basis of the apolipoprotein H (β_2 -Glykoprotein-I) protein polymorphism*, *Hum Genet*, 100, 57-62

Sanghera, D.; Wagenknecht, D.; McIntyre, J.; Kamboh, I. (1997) *Identification of structural mutations in the fifth domain of apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) which affect phospholipid binding*, *Human Molecular Genetics*, 6, 2, 311–316

Schmid, K. (1971) *Characterization and Structure of Plasma Glycoproteins*, Department of Biochemistry, 591-596

Schousboe, I. (1980) *Binding of beta-2-glycoprotein I to platelets: effect of adenylate cyclase activity*. *Thromb Res*, 19, 225–237

Schultze, HR.; Heide, K.; Haupt, H. (1961) *Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares β_2 -Globulin des Humanserums*, *Naturwissenschaften*, 48, 719

Schütt, C.; Bröker, B. (2011) *Grundwissen Immunologie*, Heidelberg: Spektrum.

Schwarzenbacher, R.; Zeth, K.; Diederichs, K.; Gries, A.; Kostner, G.; Laggner, P.; Prassl, R. (1999) *Crystal structure of human β_2 -Glykoprotein-I: Implications for Phospholipid binding and the Antiphospholipid Syndrome*, *The EMBO Journal*, 18,22, 6228-6239

Suresh, S.; Demirci, Y.; Lefterov, I.; Kammerer, C.; Ramsey-Goldman, R.; Manzi, S.; Kamboh, I. (2010) *Functional and genetic characterization of the promoter region of apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein-I)*, *FEBS J*, 951–963

Suresh, S. (2008) *Functional Characterization of Apolipoprotein H Polymorphisms and their relation to Systemic Lupus Erythematosus*, Diss. University of Pittsburgh

Veselkin, E.; Kondratyev, M.; Lurie, Y.; Ron, E.; Santo, M.; Reif, S.; Elashvili, I.; Bar, L.; Lederkremer, G. (2011) *A secreted form of the asialoglycoprotein receptor, sH2a, as a novel potential noninvasive marker for liver fibrosis*, *PloS ONE*, e272 10

Warren, L. (1959) *The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids*, *The Journal of Biological Chemistry*, 234, 8, 1971-1975

Wildemann, B.; Oschmann, P.; Reiber, H. (2006) *Neurologische Labordiagnostik*, Stuttgart: Thieme.

Wittmann, V. (2007) *Glycopeptides and Glycoproteins: Synthesis, Structure, and Application*, Berlin, Heidelberg: Springer.

Yang, P.; Kruh, JN.; Foster, S. (2012) *Antiphospholipid antibody syndrome*, *Curr Opin Ophthalmol*, 23, 528–532

Zhang, C.; Li, X.; Niu, D.; Zi, R.; Wang, C.; Han, A.; Wang, X.; Li, K.; Wang, J. (2011) *Increased serum levels of β_2 -GPI-Lp(a) complexes and their association with premature atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis*, Clinica Chimica Acta, 412, 1332–1336