

Massenspektrometrische Proteomanalyse zur selektiven Proteinidentifizierung aus biologischem Material und komplexen Gemischen – "Affinity-Proteomics" und Autoimmunerkrankungen

Michael Przybylski¹, Marcus Macht^{1,2}, Markus Kohlmann¹, Sören-Oliver Deininger¹, Michael Wochner³ und Ulrich Krawinkel³

¹ Fakultät für Chemie, Universität Konstanz, 78457 Konstanz

² Zentrum für molekulare Medizin, 50931 Köln

³ Fakultät für Biologie, Universität Konstanz, 78457 Konstanz

Die Entwicklung von empfindlichen "soft-ionisation"-Methoden der Massenspektrometrie, insbesondere Elektrospray (ESI) und Matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI) hat in den letzten Jahren einen Durchbruch der Proteinstrukturanalyse sowie der Proteincharakterisierung aus biologischem Material ermöglicht. Massenspektrometrische Peptide-Mappingmethoden^[1,2], meist in Kombination mit zwei 2D-Gelelektrophorese haben in jüngster Zeit besonderes Interesse zur Peptid- und Proteinidentifizierung aus komplexen biologischen Gemischen gefunden (Proteomanalyse). Die Sicherheit der Identifizierung und Nachweis-Selektivität anhand von Peptid-Fragmentgemischen aus Sequenzdatenbanken hängt von einer Reihe kritischer Parameter ab, insbesondere Massengenauigkeit, Empfindlichkeit und Multiplizität der massenspektrometrisch bestimmten Fragmentpeptide. Neue Entwicklungen der ESI-MS und MALDI-MS in diesem Bereich werden in einer Übersicht dargestellt.

Konventionelle Verfahren zur Identifizierung von antigenen Determinanten basieren meist auf Affinitäts-Bindungsanalysen, z.B. mittels ELISA. Wesentliche Einschränkungen und Anwendungsgrenzen dieser Methoden sind häufig beobachtete Artefakte sowie das Fehlen von molekularen Informationen über Epitopstrukturen, insbesondere bei konformationsabhängigen Epitopen. Zur direkten Epitopanalyse haben wir, basierend auf der hohen proteolytischen Stabilität von Immunglobulinen, Methoden durch Kombination von proteolytischem Abbau von Antigen-Antikörperkomplexen und massenspektrometrischer Peptide-Mappinganalyse entwickelt (Epitop-Excision, -Extraktion)^[3,4]. In Verbindung mit selektiver, proteinchemischer Modifizierung lassen sich diese Methoden auch zur Charakterisierung von Konformationsepitopen nutzen^[5]. Ein von uns kürzlich entwickeltes Verfahren ist die Kombination von massenspektrometrischer Peptide-Mapping- und Epitop-Analyse. Hierbei wird das Peptid oder Protein Antigenmaterial bzw. biologisches Gemisch über eine Affinitäts-Mikrosäule mit gebundenem mono- oder polyklonalem Antikörper eluiert, gebundenes Protein direkt durch Proteasen abgebaut und nach Dissoziation massenspektrometrisch analysiert (MALDI- und/oder ESI-MS). Die Redundanz der so erhaltenen, überlappenden Peptidsequenzen mit einem gemeinsamen Epitopmotif ermöglicht eine hochselektive Proteinidentifizierung anhand weniger Peptide aus komplexen Gemischen, wie die Identifizierung des Herzmuskelproteins Troponin T aus Herzzell-Lysat^[6]. Die massenspektrometrische "Affinitäts-Proteomanalyse" wurde in jüngsten Anwendungen mit Erfolg zur Aufklärung von autoantigenen Epitopen bei Autoimmunerkrankungen herangezogen, wie z.B. des ribosomalen Proteins L7 als einem Autoantigen des *Lupus erythematoses*^[7].

[1] D. Suckau et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5630, 1992.

[2] M. Przybylski, *Adv. Mass Spectrom.* **13**, 257, 1995.

[3] D. Suckau et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9848, 1990.

[4] M. Macht et al., *Biochemistry*, **35**, 15633, 1996.

[5] W. Fiedler et al., *Bioconj. Chemistry*, **9**, 236, 1998

[6] M. Macht et al., *Science*, in press, 1999

[7] M. Macht et al., *Proc. 25th European Peptide Symposium*, Budapest 1998, in press