

**Die Entwicklung von Immunoproteomics-Methoden am Beispiel der
Identifizierung Magenkarzinom-assoziiierter *Helicobacter pylori* Antigene**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl. Biophys. Alexander Krah
geboren am 05. November 1973 in Erfurt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Klotzel
2. Prof. Dr. Thomas F. Meyer
3. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2004

Zusammenfassung

Das magenbesiedelnde Bakterium *Helicobacter pylori* gehört zu den am weitesten verbreiteten Infektionserregern. Obwohl die Infektion meist lebenslang symptomlos verläuft, kann *H. pylori* bei einigen Menschen schwere Erkrankungen bis hin zum Magenkarzinom verursachen. Ziele dieser Arbeit waren Magenkarzinom-assoziierte Antigene für einen diagnostischen Test zu finden und Methoden zur Untersuchung von Spotkompositionen mittels MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie zu entwickeln.

Im ersten Teil der Promotion wurden die Antigenerkennungsmuster von 30 Magenadenokarzinom- mit 30 Ulkus duodeni-Patienten mithilfe hochauflösender zweidimensionaler Immunoblots von *H. pylori* Lysat verglichen. Diese fokussierte Gegenüberstellung eignet sich gut für diese Fragestellung, da beide Erkrankungen von diesem Bakterium verursacht werden, aber nur sehr selten gemeinsam auftreten. Durch univariate statistische Analysen wurden 14 Magenkarzinom korrelierte Spots gefunden ($p < 0,01$), die mit MALDI-TOF Massenspektrometrie als folgende Proteine identifiziert wurden: GroES, GroEL und HyuA. Diese drei ORFs kodieren für hochkonservierte Antigene, die keine evidente Rolle in der Virulenz spielen und deshalb als Surrogatmarker der Erkrankung angesehen werden können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die genaue Zusammensetzung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese separierter Spots untersucht. Diese können mehr als eine Komponente enthalten, so dass nicht immer eindeutig entschieden werden kann, welche von Antikörpern erkannt wurde. Für die Analyse von Spotkompositionen gibt es bisher keine Standardvorgehensweise. Aus diesem Grunde wurden hier Methoden entwickelt, mit denen Nebenkomponten von Spots detektiert werden können. Dies geschah durch Anwendung der hierarchischen Clusteranalyse und der Weiterentwicklung der Korrespondenzanalyse für MALDI-TOF Massenspektren. Für die o.g. Magenkarzinom-korrelierten Spots konnten damit entsprechend der Empfindlichkeit unserer Methode Nebenkomponten ausgeschlossen werden.

Als alternativer Ansatz zur Detektion von *H. pylori* Antigenen sollte im dritten Teil dieser Doktorarbeit eine Immunopräzipitation mit Patientenseren etabliert werden. Da nur ein geringer Anteil der Serumantikörper gegen *H. pylori* gerichtet ist, wurde mittels Affinitätsreinigung versucht, die spezifischen Antikörper anzureichern. Aufgrund der knappen Serenmenge und der letztlich nicht ausreichenden Ausbeute der Affinitätsreinigung konnte dieses Verfahren jedoch nicht realisiert werden.

Abstract

The stomach-colonizing bacterium *Helicobacter pylori* is one of the most widespread infectious agents. Although infection mostly persists unnoticed, it may cause serious diseases like gastric carcinoma. Aims of this project were to find gastric carcinoma-associated antigens for a diagnostic test and to develop methods to analyze spot compositions using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.

In the first part of this project antigen recognition patterns of 30 gastric carcinoma- and 30 duodenal ulcer- patients were compared using high-resolution two-dimensional immunoblots of *H. pylori* lysate. This focused comparison lent itself to this question because both diseases are caused by the bacterium but rarely occur conjointly. Utilizing univariate statistical tests 14 gastric carcinoma-associated spots were found ($p < 0.01$) which were identified by MALDI-TOF mass spectrometry to contain the following proteins: GroES, GroEL and HyaA. These ORFs code for highly conserved antigens that do not play any evident role in virulence and may therefore be considered as surrogate markers for this condition.

In the second part of this doctorate compositions of spots separated by two-dimensional gel electrophoresis were analyzed. Such spots may contain more than one component and it therefore cannot easily be decided which of them was recognized by antibodies. So far there is no standard approach towards this problem. Therefore, methods were developed to detect minor components of spots in an automatic manner. For this purpose hierarchical clustering was applied and correspondence analysis advanced for MALDI-TOF mass spectra. For the above mentioned gastric carcinoma-associated spots minor components could be ruled out according to the sensitivity of our method.

As an alternative approach to detect *H. pylori* antigens an immunoprecipitation using patient sera ought to be established in the third part of this project. Since only a small portion of antibodies in the serum is directed against *H. pylori* an affinity purification was to be established to enrich specific antibodies. Due to the poor amount of patient serum and the insufficient yield of the affinity purification this procedure could not be realized.

Schlagworte

Helicobacter pylori, Immunoproteomics, Magenkarzinom, Ulkus duodeni, Antigen, Antikörper, Patientenserum, Immunoblot, Proteinidentifizierung, MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie, Immunopräzipitation, Affinitätsreinigung.

Keywords

Helicobacter pylori, immunoproteomics, gastric carcinoma, duodenal ulcer, antigen, antibody, patient serum, immunoblot, protein identification, MALDI-TOF/TOF mass spectrometry, immunoprecipitation, affinity purification.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
Abkürzungen	8
1 Einleitung	10
1.1 Helicobacter pylori	10
1.1.1 Die <i>Helicobacter pylori</i> Infektion	10
1.1.2 Suche nach Antigenen	12
1.2 Immunoproteomics	12
1.2.1 Das Proteom und dessen Auftrennung	12
1.2.2 Antigen-Erkennungsmuster von <i>H. pylori</i>	13
1.2.3 Fokus: <i>H. pylori</i> Antigene als diagnostische Marker	14
1.2.4 Die Komposition von 2-DE separierten Spots	16
1.3 Immunopräzipitation	17
1.3.1 Konformationelle Epitope	17
1.3.2 Immunopräzipitation mit Patientenseren	18
1.4 MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie	18
1.4.1 Identifizierung von Proteinen	18
1.4.1.1 Ionisierung der Peptide	18
1.4.1.2 Analyse der Peptidmassen	19
1.4.1.3 Peptide Mass Fingerprint	20
1.4.1.4 Tandem Massenspektrometrie	21
1.4.2 Automatisierung des Identifizierungsprozesses	22
1.4.3 Suche nach Nebenkompenten in Spots	23
1.4.3.1 Die Spotkomposition	23
1.4.3.2 Voranalyse mittels „MS-Screener“	23
1.4.3.3 Analyse mit multivariaten statistischen Methoden	24
1.5 Ziele dieser Arbeit	26
2 Material und Methoden	29
2.1 Identifizierung Magenkrebs-assoziiierter Antigene mittels Immunoblots	29
2.1.1 Charakterisierung der Patienten	29
2.1.2 Aufzucht von <i>Helicobacter pylori</i>	29

2.1.3	Proteinseparation mittels 2-DE und Blotten.....	30
2.1.3.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese	30
2.1.3.2	Kolloidale Coomassie Färbung	30
2.1.3.3	Das Blotten.....	30
2.1.4	Inkubation der Immunoblots mit Patientenseren	31
2.1.5	Auswertung der Antigen-Erkennungsmuster	32
2.1.5.1	Bildanalyse	32
2.1.5.2	Multivariate Statistik	32
2.1.5.3	Univariate Statistik	32
2.1.6	Identifizierung der Antigene	33
2.1.6.1	Spotmustervergleich mit 2-DE Datenbank	33
2.1.6.2	Identifizierung mittels PMF	33
2.2	Detaillierte Analysen von Massenspektren	34
2.2.1	Proteinseparation	34
2.2.2	Automatisches Ausstechen der Spots und tryptischer Verdau.....	34
2.2.3	Messung mittels MALDI-TOF MS.....	35
2.2.4	Identifizierung von Haupt- und Nebenkompenten der Spots.....	36
2.2.4.1	Datenbanksuche mit Mascot	36
2.2.4.2	Analyse der PMFs mithilfe des Programms MS-Screener.....	36
2.2.4.3	Hierarchisches Clustering mittels R.....	37
2.2.4.4	Korrespondenzanalyse mit weiterentwickelter Software “CorrAn“	37
2.2.5	Identifizierung von in-vivo exprimierten Proteinen von <i>S. enterica</i>	37
2.2.5.1	Separation der Proteine	37
2.2.5.2	MALDI-TOF/TOF MS Messung der Spots	38
2.2.5.3	Datenbanksuche mit dem GPS Explorer	38
2.3	Immunopräzipitation von <i>H. pylori</i> Antigenen.....	39
2.3.1	<i>H. pylori</i> Lyse.....	39
2.3.2	Affinitätsreinigung von <i>H. pylori</i> spezifischen Antikörpern	40
2.3.2.1	Affinitätsreinigung mittels Nitrocellulosepartikel	40
2.3.2.2	Affinitätsreinigung mittels <i>H. pylori</i>	41
2.3.3	Bestimmung der AK Konzentration mittels ELISA	42
2.3.3.1	Aufkonzentrierung der Eluate	42
2.3.3.2	ELISA mit <i>H. pylori</i> Lysat.....	42
2.3.3.3	ELISA mit intakten Bakterien.....	43
2.3.4	Präzipitation der Antigene.....	43
2.3.5	Separation der Präzipitate mittels 1-DE	44

2.3.5.1	1-DE	44
2.3.5.2	Silberfärbung	44
2.3.5.3	CBB G-250 Färbung und Identifizierung	45
2.3.5.4	Immunoblots	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Identifizierung Magenkrebs-assoziiierter Antigene mittels Immunoblots	46
3.1.1	Verschiedene Subproteome von <i>H. pylori</i>	46
3.1.2	Hohe Variabilität der Antigenmuster	47
3.1.3	Globaler Vergleich der Antigenerkennungsmuster	48
3.1.4	Erkrankungskorrelierte Antigene	50
3.1.5	Einfluss der Patientenparameter	51
3.1.6	Identifizierung der Spots	52
3.1.7	Die Antigenität verschiedener Proteinspezies	53
3.1.8	Ein hypothetischer serologischer Test	54
3.2	Detaillierte Analysen von Massenspektren	54
3.2.1	Automatisierung des Identifizierungsprozesses	54
3.2.2	Überprüfung der Zuverlässigkeit der Identifizierungen	55
3.2.3	Verbesserung der Identifizierungsergebnisse	55
3.2.4	Untersuchung von <i>H. pylori</i> Antigenen	57
3.2.5	Proteinspezies in 2-DE Gelen	60
3.2.5.1	Verteilung von GroEL Spezies	60
3.2.5.2	Weitere Beispiele für Proteinspezies	62
3.2.6	Suche nach weiteren Spotkomponenten mittels Korrespondenzanalyse	65
3.2.7	Vervollständigung des <i>H. pylori</i> Proteoms	66
3.2.8	Identifizierung von in-vivo exprimierten Proteinen von <i>S. enterica</i>	66
3.3	Immunopräzipitation von <i>H. pylori</i> Antigenen	67
3.3.1	Abschätzung der nötigen IgG Menge für die Immunopräzipitation	67
3.3.2	Affinitätsreinigung <i>H. pylori</i> spezifischer Antikörper	68
3.3.2.1	Affinitätsreinigung mittels Nitrocellulosepartikel	68
3.3.2.2	Affinitätsreinigung mittels <i>H. pylori</i>	69
3.3.3	Präzipitation der Antigene	70
4	Diskussion	73
4.1	Identifizierung Magenkrebs-assoziiierter Antigene mittels Immunoblots	73
4.2	Detaillierte Analysen von Massenspektren	77

4.3 Immunopräzipitation von <i>H. pylori</i> Antigenen.....	84
<i>Referenzen</i>	<i>87</i>
<i>Publikationsliste</i>	<i>93</i>

Abkürzungen

1-DE	Eindimensionale Gelelektrophorese
2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Rinderserumalbumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CHAPS	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpi	Punkte pro Zoll
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
DU	Ulkus duodeni (Zwölffingerdarmgeschwür)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
GC	Magenadenokarzinom
HDPR	Half-decimal place rule
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgA, IgG, IgM	Immunoglobulin A, G oder M
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
KA	Korrespondenzanalyse
kD	Kilodalton
Magenkrebs	hier: Magenadenokarzinom
MALDI-TOF(/TOF) MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (time of flight) Massenspektrometrie
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue

MG	Molekulargewicht
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
NC	Nitrocellulose
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Personalcomputer
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide mass fingerprint
ppm	Parts per million
PTM	Posttranslationale Modifikation
RT	Raumtemperatur
S/N	Signal zu Rausch Verhältnis
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgel-Elektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Ulkus	hier: Ulkus duodeni
xg	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung (1xg = 9,81 m/s ²)
σ	Standardabweichung

1 Einleitung

1.1 *Helicobacter pylori*

1.1.1 Die *Helicobacter pylori* Infektion

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein magenbesiedelndes Gram-negatives Bakterium. Es tritt entweder spiralförmig und unipolar begeißelt oder coccoid in Erscheinung und ist etwa $0,5 \times 3 \mu\text{m}$ groß. *H. pylori* lebt unter mikroaeroben Bedingungen in der Region zwischen Magenschleimhaut und Magenepithelzellen. Dort ist es in der Lage eine Reihe von Erkrankungen zu verursachen – das Spektrum reicht von asymptomatischer Gastritis bis zum Magenkarzinom. Die Frage nach den Pathogenitätsmechanismen, besonders bei der Krebsentstehung, macht es zu einem äußerst wichtigen Untersuchungsobjekt.

In den Jahren 1983 und 1984 wurde dieses Bakterium erstmalig von Marshall und Warren als möglicher Verursacher von Gastritis und Ulkus duodeni genannt [1,2]. Diese Hypothese blieb lange Zeit umstritten, da man die Besiedlung mit *H. pylori* für eine rein opportunistische Infektion hielt [3].

H. pylori ist vermutlich die am weitesten verbreitete chronische Bakterieninfektion des Menschen [4]. Die Rate der infizierten Erwachsenen ist außerordentlich unterschiedlich, sie reicht von 20% in einigen Industrieländern bis zu 90% in einigen Entwicklungsländern [5,6]. Die hohe Durchseuchungsrate weist auf eine hervorragende Anpassung des Bakteriums an seinen Wirt hin. Es besteht die Vermutung, dass Menschen bereits seit Jahrtausenden mit *H. pylori* infiziert sind; eine Studie konnte große Wanderungsbewegungen der Menschheit (z.B. die Besiedlung Amerikas vor ca. 12.000 Jahren) anhand der genetischen Variabilität einzelner Bakterienstämme nachvollziehen [7]. Die Übertragung von *H. pylori* erfolgt vermutlich auf fäkal-oralem oder oral-oralem Wege hauptsächlich in der Kindheit, wobei die genauen Transmissionswege immer noch unklar sind. Als natürliche Reservoirs werden die Menschen selbst genannt, andere Infektionsquellen könnten Trinkwasser, Hauskatzen oder sogar Hausfliegen sein. Die Infektion persistiert bei den meisten Betroffenen lebenslang völlig symptomlos. Durch das fehlende Verständnis der genauen Infektionswege ist eine Prävention schwierig [8].

Jede Infektion mit *H. pylori* führt zu einer komplexen Immunantwort. Es kommt zu einer lokalen Entzündungsreaktion und einem Anstieg der Cytokinkonzentrationen von IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 sowie der Einwanderung von Neutrophilen, Macrophagen, T- und B-Lymphozyten in die Magenschleimhaut [6,9]. Ebenso sind in der entzündeten Schleimhaut hohe Antikörpertiter der Klassen IgG, IgM und IgA zu finden. Einen sehr sensitiven Infektionsmarker stellt der Titer an

spezifischem Serum-IgG dar. Die T-Zell Antwort auf die *H. pylori* Infektion ist vom Th-1 Typ; die Th-2 Antwort wird herunterreguliert, was zu einer Überproduktion von Interferon- γ und somit der Aktivierung von Macrophagen und Neutrophilen führt. Diese Zellen erreichen keine effiziente Bekämpfung des Bakteriums sondern können sogar das Magenepithel schädigen [6]. Weitere evolutionäre Anpassungen des Bakteriums führen zu einer Abschwächung der Immunantwort. Beispiele hierfür sind das Abtöten von T-Zellen durch Fas-FasL Interaktionen sowie die molekulare Mimikrie von Wirtsantigenen des Lewis-Phänotyps durch *H. pylori* [10,11]. Insgesamt reicht die Reaktion des Immunsystems in vielen Fällen nicht aus, um die Infektion zu beseitigen [6], was die hohen Durchseuchungsraten erklärt.

Die meisten der *H. pylori* Infizierten bemerken lebenslang nichts von der Infektion. Trotzdem ist der Erreger in der Lage, bei einigen Menschen nach Jahrzehnten der Besiedlung Erkrankungen zu verursachen. Mit der Infektion erfolgt eine Entzündung der Magenschleimhaut, die meist unbemerkt lebenslang persistiert. Mit einer Wahrscheinlichkeit von geschätzten 10% kann sich im Laufe des Lebens ein gastroduodenales Ulkus entwickeln. Für ca. 90% aller Ulkus duodeni (im Weiteren als Ulkus bezeichnet) in Europa zeichnet sich *H. pylori* verantwortlich [12]. Gefährlicher jedoch ist die Möglichkeit der Krebsentstehung. Hier sind das Mucosa associated Lymphoid Tissue-Lymphom (MALT-Lymphom) und das Adenokarzinom des Magens (im Weiteren als Magenkrebs bezeichnet) zu nennen. Während erstere Erkrankung selten auftritt, ist die zweite eine der häufigsten Todesursachen bei Krebskranken (Inzidenz in Europa: 10/100.000 Menschen pro Jahr) [8,13]. *H. pylori* ist das erste Bakterium, das von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als „Gruppe I Karzinogen“ ausgewiesen wurde [8].

Bei Auftreten von Magenbeschwerden und/oder Diagnose einer der o.g. Erkrankungen in Zusammenhang mit einer *H. pylori* Infektion ist eine Therapie angezeigt. Hierfür stehen eine ganze Reihe von Antibiotika (z.B. Amoxicillin, Clarithromycin, Metronidazol, Tetrazyklin, Wismutsubsalizylat) und Protonenpumpenhemmer (z.B. Omeprazol) zur Verfügung. Üblicherweise führt eine Kurzzeit-Tripeltherapie (zwei Antibiotika und ein Protonenpumpenhemmer) zu einer Sanierung in ca. 96% der Fälle [12]. Wesentliche Nachteile der Behandlung sind Komplikationen durch Nebenwirkungen, das Auftreten von resistenten Stämmen, die Reinfektionsgefahr und die hohen Kosten. Aus letzterem Grund ist die Anwendung der Therapie in Entwicklungsländern kaum möglich, aber gerade dort erreichen die Durchseuchungsraten Spitzenwerte. Ein weiterer gewichtiger Nachteil der Eradikation von *H. pylori* ist das verstärkte Auftreten von Ulzera des Ösophagus, des sogenannten BARRETT Ösophagus, der als Präkanzerose für das Ösophaguskarzinom gilt [14,15].

1.1.2 Suche nach Antigenen

Als Alternative zur medikamentösen Behandlung wird an der Entwicklung eines prophylaktischen und/oder therapeutischen Impfstoffes gegen *H. pylori* gearbeitet. Im Mausmodell gelangen bereits solche Immunisierungen. Beim Menschen waren die Versuche allerdings bisher ohne Durchbruch [12,16,17], obwohl das Mausmodell für Vakzinestudien weiterhin geeignet erscheint [18]. Große Bedeutung hat auch die Suche nach einem diagnostischen Test, mit dem *Helicobacter*infizierte mit hohem Krebsrisiko von denen unterschieden werden könnten, die keine schweren Komplikationen zu erwarten haben. Dann wäre man in der Lage, Risikopatienten bereits lange vor den ersten Symptomen gegen *H. pylori* zu behandeln und somit bereits die Entstehung des Karzinoms zu verhindern. Zur Suche nach geeigneten Antigenen (Ag) für die beiden oben genannten Zwecke wurde unter anderem der hypothesefreie Ansatz von Immunoproteomics gewählt [19].

1.2 Immunoproteomics

1.2.1 Das Proteom und dessen Auftrennung

Das Proteom wurde von Wasinger et al. definiert als die Gesamtheit aller Proteine eines Genoms [20]; exakter definiert kann man darunter die Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem bestimmten Ort und unter bestimmten Umweltbedingungen vorhandenen Proteine verstehen. Im Vergleich zum Genom ist das Proteom also dynamischer und aufgrund diverser Regulationsmechanismen auch wesentlich komplexer (u.a. alternatives Spleißen, Posttranslationale Modifikationen (PTM), Degradation, Transport). Untersuchungsmethoden des Proteoms werden unter dem Begriff „Proteomics“ zusammengefasst, oft handelt es sich dabei um hypothesefreie Methoden. Die klassische, aber immer noch moderne, hypothesefreie Methode zur Untersuchung des Proteoms ist die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-DE) [21], die bereits vor ca. 30 Jahren erfunden wurde [22,23]. Hierbei werden komplexe Proteingemische unmittelbar nacheinander nach isoelektrischem Punkt (pI) und Molekulargewicht (MG) aufgetrennt. Das Ergebnis ist ein Muster an Punkten (Spots), die einzelne Proteinspezies darstellen [24]. Diese werden durch ihre exakte chemische Struktur definiert, können also z.B. modifiziert oder partiell degradiert sein. Die 2-DE ist in ihrer hochauflösenden Variante („Großgeltechnik“) in der Lage, etwa 5000 verschiedene Proteinspezies auf einem 23 x 30 cm großen Gel aufzulösen [24]. Die im Vergleich zu eukaryotischen Organismen geringere Komplexität von Prokaryoten- Proteomen macht diese für die 2-DE zu geeigneten Untersuchungsobjekten [19]. Für *H. pylori* 26695 mit 1590 vorhergesagten Genen [4] bedeutet die o.g. Auflösung der Gele, dass theoretisch mehr als drei Proteinspezies pro Gen detektiert werden können. Aufgrund der technischen Begrenzungen auf

pI-Werte zwischen 4 und 10 und MG-Werte zwischen 6 und 130 kD sowie der extrem unterschiedlichen Abundanz der Proteine, die von einer bis zu einigen hundert Millionen Kopien pro Zelle reichen, können nie alle Proteinspezies auf einem Gel aufgetrennt werden. Wie von den genetischen Studien über *H. pylori* zu erwarten, zeigte sich auch bei den Proteomen verschiedener Stämme eine hohe Variabilität, wie der Vergleich mit *H. pylori* J99 zeigte [25]. Die Proteomdatenbank am MPIIB (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/>) [26] enthält Informationen von verschiedenen Mikroorganismen, ermöglicht Suchabfragen und Recherchen zur funktionellen Klassifizierung von Proteinen. Unter anderem sind dort auch die Proteome der *H. pylori* Stämme 26695 und J99 sowie Subproteome (das Sekretom und Oberflächenproteine) öffentlich zugänglich [25,27,28].

Eine vielversprechende Impfstrategie gegen *H. pylori* ist die Verwendung eines attenuierten *Salmonella* Stammes, der rekombinante *H. pylori* Ag exprimiert [29,30,31,32,33]. Von besonderem Interesse ist es hierbei, das in-vivo Proteom der Salmonellen während der Infektion zu untersuchen, welches besondere Aufschlüsse über tatsächlich exprimierte Virulenzfaktoren zulässt.

1.2.2 Antigen-Erkennungsmuster von *H. pylori*

Bei Immunoproteomics wird der klassische Proteomics-Ansatz mit einer immunologischen Detektionsmethode verbunden [19,34]. Hierbei werden Ag auf zweidimensionalen Immunoblots (Western Blots) durch die Inkubation mit Antikörpern (AK), z.B. aus Patientenseren, detektiert. Die entstehenden Spotmuster werden als Ag-Erkennungsmuster bezeichnet. Mittels Datenbankvergleichs, Massenspektrometrie oder N-terminaler Sequenzierung können die so gefundenen Ag identifiziert werden. Auf diese Weise wurden bereits nicht nur *H. pylori* spezifische Ag identifiziert (Vaccinekandidaten) sondern auch Pathogenitätsfaktoren und deren Assoziation mit Erkrankungen (diagnostische Marker) untersucht.

McAtee et al. [35] verglichen mit dieser Methode die Ag-Erkennung eines Serumpools von 14 *H. pylori* Infizierten mit einem Kontrollserumpool von 14 *H. pylori* negativen Patienten. Insgesamt wurden mehr als 30 Antigene identifiziert. Einige bereits bekannte Ag wie Flagellin (Motilität), Urease (Pufferung des pH-Wertes), VacA (Schädigung von Magenepithelzellen durch Vakuolisierung) und CagA (vermutlich Transport in Epithelzellen durch Typ IV Sekretionsweg und Verstärkung der Entzündungsreaktion [36]) konnten mit dieser Studie bestätigt werden. Dies zeigte, dass Immunoproteomics eine geeignete Methode zum Auffinden von Ag ist. Ein Nachteil der Studie ist der Verlust jeglicher Information über die Variabilität der Immunreaktionen der einzelnen Patienten durch das Poolen der Seren.

In einer Studie von Kimmel et al. [37] wurden die Korrelationen von Ag mit verschiedenen

Erkrankungen untersucht. Hierbei wurden 2-DE Immunoblots von *H. pylori* positiven Patienten mit Gastritis (6 Patientenseren), Ulkus ventriculi oder Ulkus (5), Magenkrebs (4) sowie MALT-Lymphom (1) verglichen. Als Kontrolle wurden fünf *H. pylori* negative Seren verwendet. In dieser Arbeit konnten 29 Ag identifiziert werden, die teilweise mit denen der Studie von McAtee et al. [35] übereinstimmten. Die außerordentlich großen Variabilitäten der Immunreaktionen der einzelnen Patienten führten dazu, dass keine Korrelationen zwischen Ag und Erkrankungen gefunden wurden. Die Autoren vermuten folgende Ursachen: mögliche Ag könnten unter dem Detektionslimit der Methode liegen, *H. pylori* könnte in Kultur nicht alle Virulenzfaktoren exprimieren oder die Anzahl der untersuchten Seren pro Erkrankungsgruppe könnte zu gering gewesen sein.

In einer Studie aus unserem Institut [38] wurde eine größere Anzahl von Patientenseren mit kleinen 2-DE Blots (7 x 8 cm) untersucht. Zur Identifizierung von Vaccinekandidaten erfolgte der Vergleich von zwölf Seren nicht infizierter Patienten mit 24 Infizierten. Außerdem wurden in dieser Studie 15 Gastritis-, neun Ulkus-, fünf Magenkrebs- und ein MALT-Lymphom-Patientenserum verglichen. Insgesamt konnten 32 Ag identifiziert werden, von denen neun bisher nicht bekannt waren. Es wurden auch Ag gefunden, die mit der Erkrankung der Patienten korrelierten. Zum Beispiel wurden 15 Ag identifiziert, die bevorzugt von Magenkrebspatienten im Vergleich mit Ulkuspatienten erkannt wurden.

Es gibt eine ganze Reihe weiterer Veröffentlichungen, die mit der o.g. Immunoproteomics Methode *H. pylori* Ag identifiziert haben, hier aber nur erwähnt werden sollen [39,40,41,42]. Aus all diesen Studien resultiert eine Anzahl von Ag, die potentielle Kandidaten für Impfstoffe oder diagnostische Marker sind. Sabarth et al. [43] haben versucht, durch eine Multiparameter-Selektion aus 59 Ag diejenigen zu finden, die das höchste protektive Potential aufweisen und als Impfstoffkandidaten besonders geeignet erscheinen. Im Tiermodell zeigten die so selektierten Antigene bereits vielversprechende Ergebnisse.

1.2.3 Fokus: *H. pylori* Antigene als diagnostische Marker

Meine Arbeit befasst sich in besonderem Maße mit der Suche nach Ag, die als diagnostische Marker für Magenkrebs verwendet werden könnten. Wie bereits erwähnt, könnte mit einer einfachen diagnostischen Methode ein „Bevölkerungsscreening“ durchgeführt werden, mit dem man in der Lage wäre, die geringe Anzahl an *H. pylori* infizierten Menschen mit hohem Magenkrebs-Risiko aus der großen Menge der „unkritischen“ Infizierten herauszufiltern. Da Serum IgG gute Infektionsmarker darstellen, wäre hierfür ein einfacher serologischer Test gut geeignet [6]. Bei Risikopatienten könnte sofort nach dem Test die Eradikation von *H. pylori* durchgeführt werden, also lange bevor erste Beschwerden auftreten. Diese prophylaktische

Maßnahme wäre möglicherweise in der Lage den Sieg gegen den Magenkrebs einzuläuten, denn es wird vermutet, dass etwa 90% aller Magenkrebfälle ursächlich auf eine aktive oder überstandene *H. pylori* Infektion zurückzuführen sind [12]. Die bereits bekannten Virulenzfaktoren wie z.B. cag PAI („Cag-Pathogenitätsinsel“ – ein Genabschnitt mit 27 Genen) oder vacA erhöhen vermutlich allgemein das Risiko schwerer Erkrankungen [44], sind allerdings nicht direkt mit einer Erkrankung korreliert [45]. Somit ist die spezifische Suche nach Erkrankungs-korrelierten Ag notwendig.

Ein günstiger Startpunkt für die Suche nach Magenkrebs-assoziierten Ag mittels Immunoproteomics ist der Vergleich der Ag-Erkennungsmuster mit einer klinisch divergierenden Erkrankung gleicher Ursache. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist das ebenfalls meist von *H. pylori* verursachte Ulkus [46,47]. Patienten mit Ulkus sind gut davor geschützt zusätzlich an Magenkrebs zu erkranken da beide Erkrankungen nur selten gemeinsam auftreten [48,49,50,51]. **Abbildung 1** zeigt mögliche langfristige Verläufe der *H. pylori* Infektion. Ein Indikator für den Erkrankungsverlauf scheint die Magensäuresekretion zu sein; Hyposekretion ist ein Risikofaktor für Magenkrebs, wohingegen Hypersekretion das Ulkusrisiko erhöht [52].

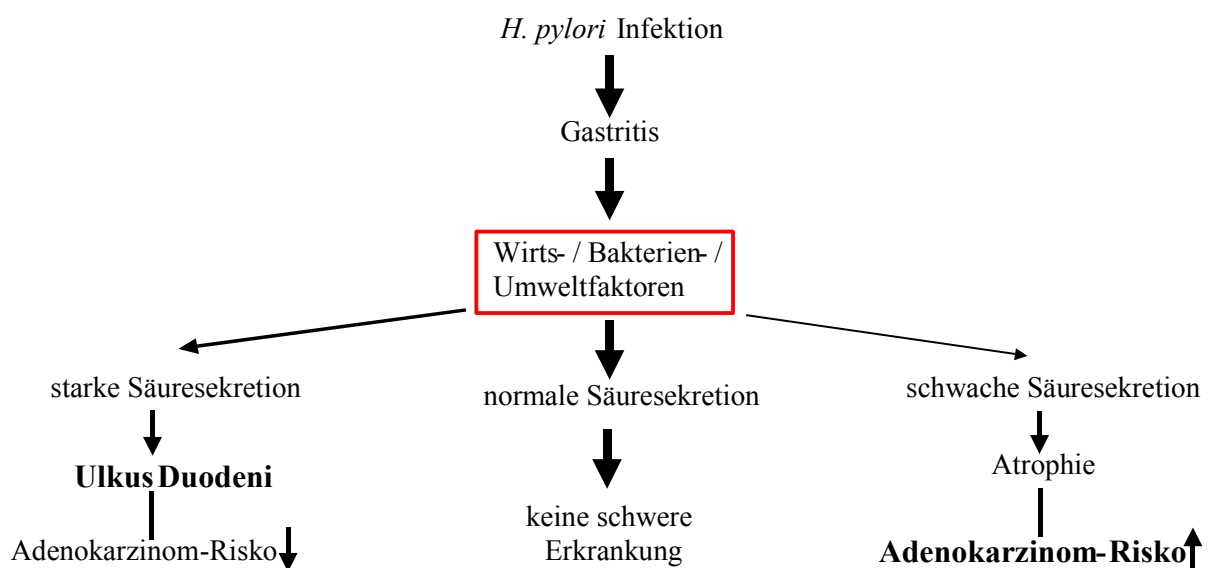


Abbildung 1: Langfristige Verlaufsmöglichkeiten der *H. pylori* Infektion. Während alle Infizierten Anzeichen einer Gastritis zeigen, wird der weitere Verlauf von Wirts-, Bakterien-, und/oder Umweltfaktoren beeinflusst. Magenkrebs und Ulkus sind divergierende Erkrankungen, die nur vereinzelt gemeinsam vorkommen. Das seltene MALT-Lymphom bleibt hier außer Acht.

Für die Entstehung von Magenkrebs wird ein multifaktorieller Mechanismus vermutet. Die chronische Entzündung der Magenschleimhaut sowie die damit verbundene Epithelzellschädigung führt zu einer erhöhten Zellproliferation. Durch erhöhte DNA Replikation steigt die Fehlerrate. Dieser Effekt wird verstärkt durch die entzündungsbedingte Erhöhung der

Konzentration an reaktiven Sauerstoffradikalen, die Verringerung der Konzentration an antioxidativen Substanzen (z.B. Ascorbinsäure) und die Entstehung kanzerogener Nitrosamine [46,47]. Die Krebsentstehung geht mit einer Erhöhung des Magen pH-Wertes bedingt durch die Schädigung der säuresekretierenden Zellen (Atrophie) einher, was zu einer Ausbreitung von *H. pylori* im Korpus des Magens beiträgt [53]. Dies führt in einem Kreislauf zur weiteren Verschlechterung des Zustandes und könnte letztendlich eine Ursache der Krebsentstehung sein. Die Eradikation von *H. pylori* führt in den meisten Fällen zu einer Normalisierung der Säuresekretion [47] und ebenso zur Verringerung des Krebsrisikos.

Eine Reihe von Autoren beschäftigten sich bereits mit der Frage, welche Faktoren über den Verlauf der Infektion entscheiden. Es kommen prinzipiell drei Möglichkeiten in Frage. Erstens: Wirtsfaktoren wie z.B. genetische Prädispositionen könnten eine wichtige Rolle spielen. Polymorphismen der IL-1 β und TNF-A Gene wurden bereits als Risikofaktoren beschrieben [9,54]. Ein reines Screening nach IL-1 β Polymorphismen scheint allerdings nicht für eine Vorhersage auszureichen [55]. Als zweites könnten Bakterienfaktoren entscheidend sein. Hierfür spricht die hohe genetische Diversität der bekannten *H. pylori* Stämme und im besonderen die unterschiedliche Expression von Virulenzfaktoren [25,56,57,58] sowie die o.g. Studie von Haas et al. [38]. Drittens könnten auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Eine gesunde und vitaminreiche Ernährung kann zu einer Verringerung des Risikos führen [9].

1.2.4 Die Komposition von 2-DE separierten Spots

Die 2-DE stellt ein Verfahren zur Trennung komplexer Proteingemische dar. Das hohe Auflösungsvermögen dieser Methode führte zu der allgemein verbreiteten Ansicht, dass klar separierte Spots einzelne Proteinspezies darstellen. Dies ist jedoch nicht immer der Fall, wie Untersuchungen unserer Gruppe gezeigt haben [59]. Ein Spot kann neben einem Protein als Hauptkomponente noch ein oder mehrere Nebenkomponten enthalten, die entweder andere Proteinspezies des gleichen Proteins oder gänzlich andere Proteine sind. Während die Hauptkomponente eines Spots leicht mit einer Datenbanksuche eines PMFs identifiziert wird, bleiben Nebenkomponten, die in geringerer Menge im Spot vorliegen, bei einer solchen Analyse meist unerkannt. In Umkehrung können auch Proteine in mehreren Spots über das Gel verteilt auftreten. Diese Proteinspezies unterscheiden sich im Laufverhalten während der 2-DE, also in MG und/oder pI, was durch verschiedene Größen der Proteinspezies und/oder durch Modifikationen verursacht wird. Dabei ist es ein prinzipieller Vorteil von Immunoproteomics, eventuelle Unterschiede in Immunogenität bzw. Antigenität einzelner Spezies eines Proteins erkennen zu können.

Die mögliche Zusammensetzung von Spots aus mehreren Komponenten hat den Nachteil, dass

bei hochsensitiven Detektionsmethoden nicht eindeutig festgestellt werden kann, welche der Komponenten des Spots detektiert wird. Dies trifft auch für die Ag-AK Wechselwirkung zu, wie sie beim Immunoblotting stattfindet. Falls ein hochaffiner AK aus dem Patientenserum eine Nebenkomponte anstelle der Hauptkomponente eines Spots erkennt, kann dies nicht unterschieden werden, da in beiden Fällen der Spot vom sekundären AK detektiert wird. Um das tatsächlich erkannte Ag mit hoher Sicherheit zu identifizieren, müssen möglichst alle Komponenten des betroffenen Spots gefunden werden. Hierfür können z.B. Ähnlichkeiten zwischen den Massenspektren der Spots genutzt werden (s. Kapitel 1.4.3).

1.3 Immunopräzipitation

1.3.1 Konformationelle Epitope

Immunoblots haben hinsichtlich der Ag-Erkennung eine Einschränkung: durch die Auftrennung der Proteine mittels 2-DE werden u.a. durch die hohen Konzentrationen an Harnstoff im Probenpuffer die Proteine partiell aufgefaltet. Dies zerstört die native dreidimensionale Struktur für viele Proteine unwiederbringlich. Da AK nicht nur gegen sequentielle sondern auch gegen konformationelle Epitope gerichtet sein können, sind letztere mit Immunoblots nicht detektierbar. Um diese zusätzliche Untergruppe von Ag der Analyse zugänglich zu machen, soll die Immunopräzipitation (IP) eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der die Ag-AK Wechselwirkung unter physiologischen Bedingungen in wässriger Lösung stattfinden kann. Üblicherweise werden die AK über die Bindung an Protein-G, welches eine hohe Affinität für die F_c-Region von Immunglobulinen aufweist, an Sepharose gebunden. Diese Aufschlammung wird dann mit dem Bakterienlysat inkubiert, so dass Ag an die IgG der Protein-G Sepharose binden können. Nach dem Waschen können nun die Ag unter nicht-physiologischen Bedingungen eluiert und anschließend z.B. mittels 1-DE oder 2-DE aufgetrennt werden. Eine Reihe von Studien haben bereits IPs in Verbindung mit 2-DE erfolgreich genutzt [60,61,62,63]. Zusätzlich hat die IP den prinzipiellen Vorteil, dass keine Beschränkungen hinsichtlich MG und pI der präzipitierbaren Proteine auftreten. Obwohl die meisten Ag polyklonale Immunantworten hervorrufen, die höchstwahrscheinlich AK sowohl gegen sequentielle als auch gegen konformationelle Epitope bilden, kann die IP als ergänzende Methode zu dem Immunoblots gesehen werden, da die Hoffnung besteht, mittels einer komplementären Herangehensweise zusätzliche Ag zu finden. Parallel zur Studie mit den Immunoblots könnten hier die IPs von Magenkrebs- und Ulkus-Patientenseren verglichen werden.

1.3.2 Immunopräzipitation mit Patientenseren

Üblicherweise werden für IPs gereinigte AK verwendet um das betreffende Ag hochspezifisch zu präzipitieren. In diesem Fall liegen die AK jedoch in Form von Patientenseren vor, also sind, konservativ geschätzt, nur 1% der AK spezifisch gegen *H. pylori* gerichtet. Aus diesem Grund sollen diese AK mittels Affinitätsreinigung angereichert und dann erst an Protein-G Sepharose gebunden werden. Diese Prozedur soll das unspezifische Binden von crossreaktiven Ag verringern. Für die Affinitätsreinigung sollen entweder Nitrocellulosepartikel (NC-Partikel) oder Bakterienoberflächen verwendet werden. Die frisch hergestellten NC-Partikel [64] werden mit Bakterienlysate „beladen“ und anschließend können durch Inkubation mit Patientenserum die spezifischen AK gebunden und am Ende eluiert werden. Für die Durchführung des Experiments muss beachtet werden, dass nur eine geringe Menge an Serum (max. 500 µl pro Patient) vorhanden ist. Folgende Abschätzung soll aber die prinzipielle Durchführbarkeit darlegen: humanes Serum enthält etwa 13 mg/ml IgG; jedes IgG Molekül kann im molaren Maßstab 1:2 Ag binden; das MG von IgG = 146 kD; bei durchschnittlich 73 kD großen Ag kann also IgG im MG-Verhältnis 1:1 Ag binden. Wenn nun 1% der IgG im humanen Serum *H. pylori* spezifisch sind (0,13 mg/ml), können mit 500 µl Serum 65 µg Ag präzipitiert werden. Diese Menge würde für die Auftrennung in 2-DE mittels „Kleingeltechnik“ ausreichen. Zusätzlich könnten die AK durch kovalente Kopplung an die Protein-G Sepharose mehrfach für IPs verwendet werden.

1.4 MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie

1.4.1 Identifizierung von Proteinen

1.4.1.1 Ionisierung der Peptide

Nachdem Sir J. J. Thomson bereits im Jahre 1912 ein Massenspektrometer vorgestellt hatte, dauerte es noch bis in die 1980er Jahre bis langkettige Biomoleküle durch „sanfte“ Ionisierungsmethoden der Analyse zugänglich wurden. Im Jahre 1988 wurde die Elektrospray-Ionisierung (ESI) erstmals zur Messung gelöster Polypeptide eingesetzt [65]. Ein weiteres sanftes Ionisierungsverfahren ist die Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) Technik, die im Jahre 1987 erstmals präsentiert [66] und 1988 für Proteine angewendet wurde [67]. Für diese beiden Ionisierungstechniken gab es im Jahre 2002 den Nobelpreis für John B. Fenn (ESI) und Koichi Tanaka (MALDI).

Die in dieser Arbeit vorgestellte MALDI Technik ermöglicht die Ionisierung von zwischen Matrixkristallen eingelagerten Peptiden oder Proteinen durch Laserbeschuss. Das Prinzip ist einfach: die Energie eines Laserpulses wird von den Matrixmolekülen absorbiert und auf die

Peptide übertragen. Diese desorbieren von der Oberfläche des Probenträgers in einer „Wolke“ aus protonierten Peptiden und Elektronen. Die meisten dieser Ionen werden durch die Elektronen neutralisiert und am Ende des Prozesses „überleben“ fast ausschließlich einfach geladene Analytmoleküle [68]. Voraussetzung hierfür sind jedoch Matrices, die Absorption und Transfer der Laserenergie, dessen Wellenlänge am Absorptionsmaximum der Matrix liegt, ohne Schädigung der Analyten ermöglichen. Beispiele hierfür sind die häufig verwendeten organischen Säuren 2,5-Dihydroxybenzoesäure und α -cyano-4-hydroxy-Zimtsäure. Die wesentlichen Vorteile der MALDI- gegenüber der ESI-Ionisierung sind die beinahe ausschließliche Entstehung einfach geladener Ionen, die relativ hohe Toleranz gegenüber Verunreinigungen, z.B. mit Salzen oder Detergenzien, sowie die schnelle Identifizierung von Proben mit geringerer Komplexität.

1.4.1.2 Analyse der Peptidmassen

In Kombination mit der MALDI Ionisierung wird meist eine Flugzeitmassenanalyse (TOF = time of flight) eingesetzt. Hierbei werden die Analytionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und im feldfreien Raum geschieht die Separation nach der Geschwindigkeit der Teilchen. Erfolgt nun eine Messung der Flugzeit, so kann die Masse wie folgt berechnet werden:

$$\text{Energieerhaltungssatz : } E_{el} = E_{kin} \rightarrow zeU = \frac{m}{2} v^2$$

$$\text{mit : } v = \frac{s}{t} (\text{feldfreier Flug nach Beschleunigung})$$

$$\Rightarrow \frac{m}{z} = \frac{2eU}{s^2} t^2$$

(m – Masse; z – Ladungszahl; e – Elementarladung; U – Spannung; s – Wegstrecke; t – Flugzeit)

Da die Parameter z , e , U und s während einer Messung festgelegt sind, ist die Masse pro Ladung proportional zum Quadrat der Flugzeit und kann mittels Messung der letzteren exakt bestimmt werden. Da bei der Ionisierung mittels MALDI fast ausschließlich einfach geladene Ionen entstehen ($z=1$) ist die Masse leicht zu bestimmen. Ein großer Vorteil der TOF Messung ist die hohe Genauigkeit der Massenbestimmung. Ein Nachteil ist, dass nur definiert gepulste Messungen durchgeführt werden können und somit keine einfache online Kopplung mit der Flüssigkeitschromatographie möglich ist. Die Detektion der geladenen Teilchen erfolgt mit einer Vielkanalplatte (Microchannel Plate). Weitere technische „Tricks“ verbessern die Auflösung und Massengenauigkeit:

- „Time Delay Extraction“: gleicht ionisierungsbedingte Unterschiede der Anfangsgeschwindigkeiten aus, indem Ionen mit höherer Geschwindigkeit, die sich durch die

Zeitverzögerung zwischen Ionisierung und dem Einschalten der Beschleunigungsspannung bereits weit in Richtung Detektor fortbewegt haben, ein geringeres Beschleunigungspotential „sehen“ und entsprechend weniger stark beschleunigt werden;

- „Guide Wire“: verhindert die Defokussierung der Peptidionen im Flugrohr indem die abstoßenden Kräfte zwischen den gleich geladenen Ionen teilweise kompensiert werden;
- „Velocity Focusing“: gleicht die trotz Massengleichheit auftretenden kleinen Geschwindigkeitsdifferenzen mithilfe des Reflektors aus, da schnellere Peptidionen gleicher Masse tiefer in das Reflektorfeld eindringen und somit eine längere Wegstrecke bis zum Detektor zurücklegen müssen.

In [Abbildung 3](#) ist auch das Prinzip einer MALDI-TOF MS Messung dargestellt.

1.4.1.3 Peptide Mass Fingerprint

In Analogie zum Fingerabdruck in der Kriminologie, der durch Vergleich bestimmter Merkmale eine sehr sichere Identifizierung einer Person erlaubt, kann ein Protein durch einen Peptidmassen-Fingerabdruck (PMF = Peptide Mass Fingerprint, [Abbildung 2](#)) identifiziert werden. Hierzu wird das Protein durch ein Enzym spezifisch an bestimmten Schnittstellen geschnitten, so dass charakteristische Peptide entstehen. Vergleicht man die gemessenen Peptidmassen einer Probe mit den theoretisch verdauten Massen einer Proteindatenbank, so ist die Identifizierung eines Proteins unter Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit möglich. Hierzu sind keine experimentellen Informationen über die eigentliche Sequenz der Aminosäuren (AS) nötig. Häufig wird das zu identifizierende Protein mit Trypsin verdaut, das spezifisch nach Arginin und Lysin schneidet. Ein wesentlicher Nachteil der Prozedur ist, dass Proteine nur dann identifiziert werden können, wenn sie in einer Datenbank eingetragen sind oder in anderen Organismen Homologe vorkommen.

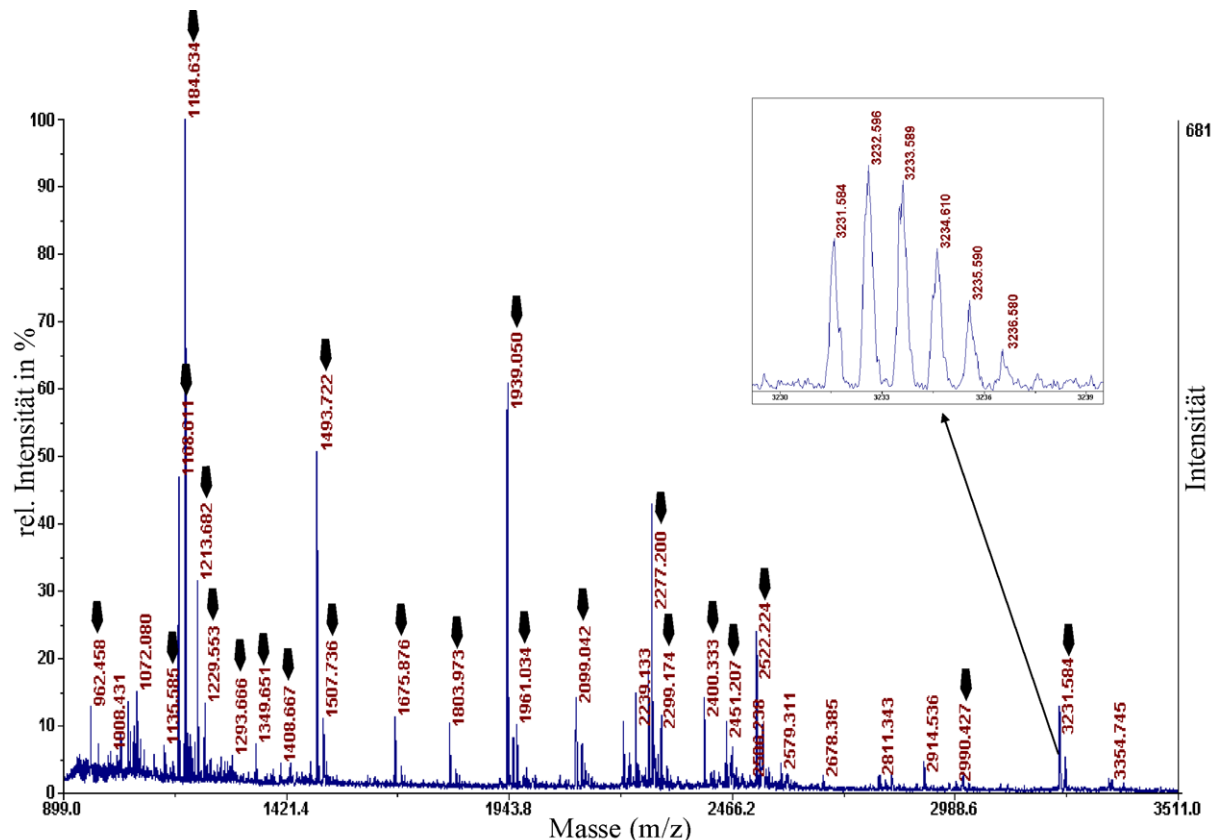


Abbildung 2: Peptide Mass Fingerprint eines 2-DE separierten *H. pylori* Spots. Das Spektrum wurde mit dem 4700 Proteomics Analyzer aufgenommen. Alle zum Hitzeschockprotein 70 (HP0109) zugeordneten Peaks sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die hohe Auflösung des Massenspektrometers bis in den Bereich großer Massen wird in dem Zoomfenster des Peaks $m/z = 3231,584$ gezeigt – hier ist die Isotopenverteilung der Peptidmassen erkennbar.

1.4.1.4 Tandem Massenspektrometrie

Werden Peptide in einem Massenspektrometer fragmentiert und die Massen der Fragmente bestimmt, spricht man von Tandem Massenspektrometrie (MS/MS). Dies kann z.B. in einem MALDI-TOF/TOF MS passieren. Das Prinzip der Messung wird in [Abbildung 3](#) erläutert. Nach Beschleunigung (meist mit 20 kV) und zeitlicher Auswahl des zu fragmentierenden Peptids („Timed Ion Selector“) gelangt dieses in die Kollisionszelle. Durch das Abbremsen der Peptide vor Eintritt in die Zelle (üblicherweise bis auf 1 oder 2 keV Energie) und verschiedene Gasdrücke können Stoßenergien eingestellt werden, die bevorzugt zu Fragmentierungen an den Peptidbindungen oder von Seitenketten führen. Die Fragmente werden anschließend in Source 2 wieder beschleunigt und die Auftrennung nach Flugzeit erfolgt im anschließenden Flugrohr und Reflektor. Durch die kürzere Länge des verbleibenden Flugrohres und Unschärfen, die bei den Stoßprozessen entstehen, ist die Massengenauigkeit bei MS/MS Spektren deutlich niedriger als bei PMFs. Ein Vorteil dieser Fragmentierungsmethode ist, dass die Peptide hauptsächlich an der Peptidbindung fragmentieren, so dass die Massendifferenzen zwischen den Fragmenten AS

entsprechen, die idealerweise aus dem Spektrum abgelesen werden können. Sind die Fragmente vom C-Terminus her intakt, spricht man von y-Ionen; sind sie hingegen vom N-Terminus her intakt, spricht man von b-Ionen. Es gibt noch eine ganze Reihe weiterer Fragmente, die durch Brüche an anderen Bindungen entstehen, die aber bei MALDI-TOF/TOF relativ selten auftreten (a, c, x, z sowie interne Fragmente). Mithilfe von MS/MS Spektren können vielfältige Informationen über die AS-Sequenz gewonnen werden. Dies eignet sich besonders für die Bestätigung von nicht-eindeutigen Identifizierungen mittels PMF und die Charakterisierung von PTMs. Die Suche basiert dabei genau wie beim PMF auf dem Vergleich mit einer Datenbank. In Idealfällen ist allerdings auch eine de-novo Sequenzierung möglich, d.h. ein Ablesen längerer AS-Sequenzen direkt aus dem Spektrum.

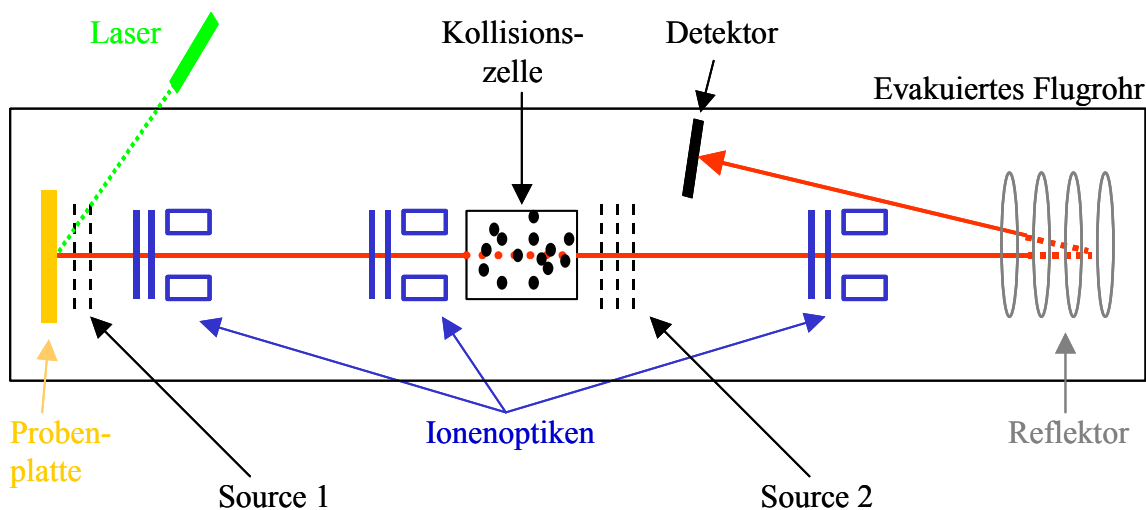


Abbildung 3: Prinzipschema eines MALDI-TOF/TOF MS. Durch einen kurzen Laserblitz werden Matrix und Peptide desorbiert und ionisiert. Bei der Messung eines PMF (MALDI-TOF MS) werden die Ionen in Source 1 beschleunigt, durchfliegen die leere Kollisionszelle, werden im Reflektor umgelenkt sowie fokussiert und beim Eintreffen am Detektor wird die Flugzeit bestimmt. Bei der Messung eines MALDI-TOF/TOF Spektrums (MS/MS) werden die Ionen in Source 1 beschleunigt und an der Source 2 Ionenoptik wird das zu fragmentierende Peptid ausgewählt (1. TOF-Messung). Nur dieses Peptid wird nun abgebremst, gelangt in die Kollisionszelle und wird dort durch Stöße mit Gasatomen fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden in Source 2 erneut beschleunigt und ihre Flugzeit bis zum Detektor bestimmt (2. TOF-Messung). Die gesamte Messung findet im Hochvakuum statt.

1.4.2 Automatisierung des Identifizierungsprozesses

Eine moderne Geräteausstattung erlaubt die Identifizierung von Proteinen im Hochdurchsatz. Folgende Geräte sind hierfür erhältlich: Roboterstationen für das Ausstechen, Verdauen der Spots und Auftragen der Peptide auf die Probenplatte; MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer mit automatischen Messmodi, Datenprozessierung und –interpretation; und Auswertesoftware für automatische Datenbanksuchen. Mit derartiger Ausstattung wurden Durchsätze von 15.000

Spots pro Tag berichtet [69]. Entscheidende Schwierigkeiten bestehen aber bei allen Prozessen, die manuelle Kontrollen benötigen. Dazu gehören insbesondere die Auswahl der zu identifizierenden Spots (Bildanalyse) und die Interpretation der Datenbanksuchergebnisse. Für komplexere Fragestellungen wie die Analyse von PTMs, Bestätigung von Identifizierungskandidaten und die Suche nach weiteren Spotkomponenten sind diese Techniken nur bedingt geeignet und die Auswertung muss weitgehend manuell erfolgen. Für derartige Fragestellungen ist es sinnvoll, eine Strategie zu wählen, die den Anteil an manueller Arbeit minimiert. Eine Möglichkeit die Sicherheit automatischer Identifizierungen zu erhöhen ist die Wiederholung der Messungen mit unabhängig präparierten Proben, so dass nur noch widersprüchliche Suchergebnisse manuell kontrolliert werden müssen. Auch können automatische Datenbanksuchen bereits mit verschiedenen Parametern durchgeführt werden, so dass die bei der nachfolgenden manuellen Kontrolle eventuell benötigten Ergebnisse dann bereits vorliegen. Für weniger komplexe Fragestellungen wie die Identifizierung aller Spots eines Gels, z.B. für das in-vivo *S. enterica* Proteom, sind Hochdurchsatzverfahren sehr gut geeignet.

1.4.3 Suche nach Nebenkomponten in Spots

1.4.3.1 Die Spotkomposition

Aufgrund des hohen Auflösungsvermögens der 2-DE wird vielfach davon ausgegangen, dass ein Spot genau ein Protein bzw. eine Proteinspezies enthält. Wie bereits in Kapitel 1.2.4 erwähnt, ist dies jedoch nicht immer der Fall. Einerseits können Proteine in verschiedenen Spots über ein Gel verteilt auftreten und andererseits können Spots aus mehreren Komponenten bestehen. Die genaue Analyse der Spotkompositionen ist eine wichtige Voraussetzung sowohl für quantitative Analysen als auch für hochspezifische Detektionsmethoden wie u.a. bei Immunoblots. Automatische Datenbanksuchen führen meist nur zur Identifizierung der Hauptkomponente eines Spots. Die Suche nach weiteren Komponenten mithilfe von nicht zuordenbaren Peaks in den PMFs ist sehr aufwendig und derzeit nicht automatisiert möglich. Liegt nun ein großer Datensatz mit vielen Spektren eines Gels vor, so kann mit statistischen Methoden versucht werden, Ähnlichkeiten zwischen den Spektren zu nutzen, um Nebenkomponten in Spots zu finden. Wenn beispielsweise ein Protein neben dem Hauptspot noch in mehreren anderen Spots als Nebenkomponten auftritt, sind einige Peptidmassen in den Spektren gleich, welche bei Verwendung geeigneter Verfahren, z.B. von Clusteranalysen, gefunden werden können.

1.4.3.2 Voranalyse mittels „MS-Screener“

Für das Clustern von MS-Daten werden zuerst Peaklisten erzeugt. Einige Peaks enthalten

allerdings keine Spot-spezifischen Informationen, da sie in vielen Spots vorkommen, wie z.B. Trypsin- und Matrixpeaks - diese werden hier als Kontaminanten bezeichnet. In einer statistischen Analyse würden solche Peaks zu einer Gruppierung führen und sollten daher zuerst entfernt werden. Außerdem werden die MS-Daten in Form einer Datenmatrix benötigt, um weitere Analysen durchführen zu können. Zu diesem Zwecke wurde in unserer Arbeitsgruppe das Softwareprogramm „MS-Screener“ entwickelt [59]. Nach dem Einladen der Peaklisten eines Datensatzes können damit Kontaminantenpeaks entfernt werden, Spektren miteinander verglichen und am Ende die Daten intervallisiert als Matrix exportiert werden. Eine Intervallisierung ist nötig, da aufgrund von Messungenauigkeiten für ein Peptid Massenabweichungen zwischen verschiedenen Spektren auftreten, und trotzdem jedes Peptid in die korrekte Spalte der Matrix zugeordnet werden soll. Eine weitere Fähigkeit des MS-Screener ist die graphische Darstellung der Peakmassen und ihrer Nachkommastellen um Peptide von anderen Substanzen unterscheiden zu können. Aufgrund der elementaren Zusammensetzung von Peptiden sind die Nachkommastellen der Massen nicht gleichverteilt, sondern folgen linear der Masse an sich. Entsprechend der „Half decimal place rule“ (HDPR) berechnet sich die erste Nachkommastelle als die Hälfte der ersten Ziffer (500-999 Da und 2000-3000 Da) bzw. der ersten beiden Ziffern (1000-1999 Da) [70]. Für ein Peptid mit 1000 Da ist also eine Nachkommastelle von etwa fünf zu erwarten ($= 1000,5$ Da). Peakmassen, die weit von dieser Regel abweichen, stammen höchstwahrscheinlich nicht von Peptiden, sondern z.B. von Matrixclustern oder anderen Verunreinigungen. Eine Analyse eines Datensatzes in bezug auf die HDPR ermöglicht also das Finden weiterer Kontaminanten.

1.4.3.3 Analyse mit multivariaten statistischen Methoden

Bei multivariaten Verfahren wird nicht eine Variable isoliert, sondern das Zusammenwirken mehrerer Variablen in einem Datensatz gleichzeitig untersucht. Im Falle eines Satzes von MS Daten wird also nicht das Vorkommen einzelner Massen analysiert, sondern es werden die Ähnlichkeiten ganzer Spektren miteinander verglichen und bewertet. Spektren, die bei der Analyse die größte Anzahl gemeinsamer Massen haben, also stark verwandt sind, werden einer Gruppe zugeordnet. Clusteranalysen und die Korrespondenzanalyse stellen typische multivariate statistische Methoden dar.

Hierarchisches Clustern

Verschiedene multivariate statistische Analysen wurden bereits zur Analyse von 2-DE Daten angewendet [71,72,73], hier sollen diese Methoden jedoch für Massenspektren Verwendung finden. Das hierarchische agglomerative Clusterverfahren liefert Aussagen über die globale Ähnlichkeit von Daten. Hierzu wird zuerst jedem Datenpunkt der ähnlichste Partner zugeordnet.

Durch Mittelung der Werte der Pärchen kann im nächsten Schritt ein weiterer verwandter Partner zugeordnet werden. Somit entsteht agglomerativ eine Baumstruktur (ausgegeben als Dendrogramm), in der ähnliche Datenpunkte nahe beieinander liegen. Zusätzlich wird ein Distanzmaß ausgegeben, das die Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Datenpunkten quantifiziert. Mit dieser Methode wurden bereits Spots eines Gels identifiziert, die GroEL als Haupt- bzw. Nebenkomponekte enthielten [59].

Korrespondenzanalyse

Die Korrespondenzanalyse (KA) ermöglicht die Untersuchung von Assoziationen zwischen Objekten und Merkmalen, indem der hochdimensionale Datenraum in einen zweidimensionalen Faktorraum projiziert wird. Diese Methode hat den entscheidenden Vorteil, dass Objekte und Merkmale gleichzeitig dargestellt werden können. Für die Analyse von Massenspektren wurde die mit dem MS-Screener erstellte Datenmatrix aus intervallisierten Peaklisten verwendet. Hier stellen die Peaklisten der Spots die Objekte und die Massenintervalle die Merkmale dar. Durch die Projektion vom hochdimensionalen Datenraum (z.B. 284 Spots x 1600 Massen) in eine zweidimensionale Fläche können per Auge Gruppen von ähnlichen Spots und gleichzeitig die für diese Gruppen charakteristischen Massen gefunden werden. Da die Datenmatrix für alle Massenintervalle in denen kein Peak vorkommt den Wert null hat, wurden die Daten mit einem kleinen additiven Beitrag verrauscht, der auf die Ergebnisse der Analyse keinerlei Einfluss hatte. Wesentliche Vorteile gegenüber dem hierarchischen Clustern sind, dass keine künstliche Pärchenbildung stattfindet und dass mit den Gruppen gleichzeitig deren wichtigste Merkmale identifiziert werden können. Für die Realisierung der KA wurde von R. Wessel und K.-P. Pleißner ein Softwareprogramm geschrieben, das die Berechnungen in Anlehnung an [72] realisiert. Der Nachteil der Methode, dass bei großen Datensätzen nur wenige Gruppen von Spots in einer einzigen Fläche gefunden werden können, wurde mit dieser Arbeit durch eine Weiterentwicklung der Software, die jetzt CorrAn genannt wird, ausgeglichen [74]. Durch die Ausgabe der absoluten Beiträge der Merkmale zu den Clustern, ermöglicht die KA das selektive Löschen von Beiträgen, die ober- oder unterhalb einer bestimmten Schwelle liegen. Durch Implementierung der Schwellensetzung in CorrAn wurde ein iteratives Vorgehen möglich, indem schrittweise mit Versuch und Irrtum der Datensatz reduziert und jeweils erneut eine KA berechnet wird. Das Ziel dieser Prozedur ist es, mit jedem Schritt Gruppen von Spots zum Vorschein zu bringen, deren charakteristische Merkmale sonst durch die Größe des Datensatzes untergehen. Werden also in der ersten Iteration nur Gruppen von Spots mit einem bestimmten Protein als Hauptkomponente gefunden, so können durch weitere Iterationen auch Gruppen gefunden werden, die ein Protein als Haupt- oder Nebenkomponekte enthalten. Durch die genaue Analyse solcher Gruppen können also Nebenkomponekten in Spots gefunden und später mit

MS/MS bestätigt werden.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Meine Doktorarbeit besteht aus drei Teilprojekten: 1. Identifizierung Magenkrebs-korrelierter Ag mittels Immunoblots, 2. Untersuchung der Komposition von 2-DE separierten Spots und 3. IP von *H. pylori* Ag. In einem Flussdiagramm ([Abbildung 4](#)) sind die wichtigsten Arbeiten zusammengefasst und die Zusammenhänge zwischen den Projekten dargestellt. Das Ziel aller Projekte ist es, durch hypothesefreie Herangehensweisen diagnostische Marker Kandidaten für das von *H. pylori* verursachte Magenkarzinom zu finden. Der Vergleich der Ag-Erkennung der Seren *H. pylori* infizierter Patienten, die unter den divergierenden Erkrankungen Magenkrebs bzw. Ulkus leiden, sowohl mit Immunoblots als auch mit einer IP soll Magenkrebs-korrelierte Ag identifizieren, die Serummarker für diese Erkrankung darstellen. Falls diese Marker auch prognostischen Wert haben, könnte ein einfacher Bluttest *H. pylori* Infizierte mit hohem Magenkrebsrisiko identifizieren.

Trotz einiger Zweifel [45] konnten bereits Korrelationen von Ag mit Erkrankungen gezeigt werden [38]. Die Schwächen bisheriger Studien wie geringe Serenanzahl [37,38], gepoolte Seren [35] und geringe Auflösung durch Verwendung kleiner 2-DE Gele sollten in dieser Arbeit vermieden werden. Die Blots werden von 2-DE Gelen in „Großgeltechnik“ angefertigt, die bei *H. pylori* ein Auflösungsvermögen von 1800 Spots haben [25]. Im Vergleich zu den 1590 vorhergesagten Genen [4] kann also theoretisch mehr als eine Proteinspezies pro Gen aufgetrennt werden. Um statistisch gesicherte Aussagen zu erhalten werden 30 Patientenserum pro Gruppe miteinander verglichen. Diese große Anzahl wurde aufgrund der großen Variabilität der Ag-Muster auf den Immunoblots nötig. Die Verwendung des Referenzstammes *H. pylori* 26695 für die Analyse hat den Vorteil, dass Proteinidentifizierungen leicht möglich sind, da er bereits vollständig sequenziert ist. Außerdem eignen sich die autologen Patientenstämme nicht für eine solche Analyse, da nur konservierte Marker für einen diagnostischen Test in Frage kommen.

Aufgrund der hochspezifischen Ag Detektion mittels Serum-AK muss es ein Ziel sein, möglichst alle Spotkomponenten zu identifizieren, um irreführende Identifizierungen von Ag zu vermeiden. Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden basieren auf der Idee, mittels der Identifizierung möglichst vieler Spots eines Gels die nicht zur Hauptkomponente eines Spots zugeordneten Peaks mithilfe multivariater statistischer Methoden zum Auffinden von Nebekomponenten zu nutzen. Hierfür wird methodisch an der Verbesserung der automatischen Identifizierung mittels MALDI-TOF/TOF MS gearbeitet, was auch zur Identifizierung weiterer *H. pylori* und *S. enterica* Proteine genutzt werden soll. Zur Untersuchung der Komposition von Spots wird das in unserer Gruppe entwickelte Programm MS-Screener verwendet und die

hierarchische Clustermethode für MS-Spektren angewendet. Das Programm CorrAn zur Realisierung der KA wird weiterentwickelt, um in einem iterativen Verfahren weitere Nebekomponenten von Spots zu finden. Die Messungen am MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer wurden anfangs in Kooperation mit der Universität Greifswald und ab Anfang 2004 an unserem institutseigenen Gerät durchgeführt. Ein wichtiges Ziel dieser methodischen Entwicklungen ist die Bestätigung der mittels Immunoblots gefundenen *H. pylori* Ag. Weitere Ziele der Analyse von MS-Spektren waren die Verbesserungen der Identifizierungsquoten automatischer Messungen und die Untersuchung der Verteilung von Proteinspezies in 2-DE Gelen.

Als komplementäre Methode bei der Suche nach diagnostischen Ag soll eine IP mit Patientenseren entwickelt werden. Nach der Wechselwirkung von AK und Ag im nativen Zustand werden die Ag präzipitiert und mittels 2-DE aufgetrennt. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass konformationelle Epitope erkannt werden können, also eine zusätzliche Gruppe von Ag der Analyse zugänglich wird [75]. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, sollen die *H. pylori* spezifischen AK durch eine Affinitätsreinigung angereichert werden. Wie in der Immunoblotstudie könnte auch hier eine große Anzahl an individuellen Patientenseren eingesetzt und hochauflösende 2-DE zur Ag-Separation verwendet werden.

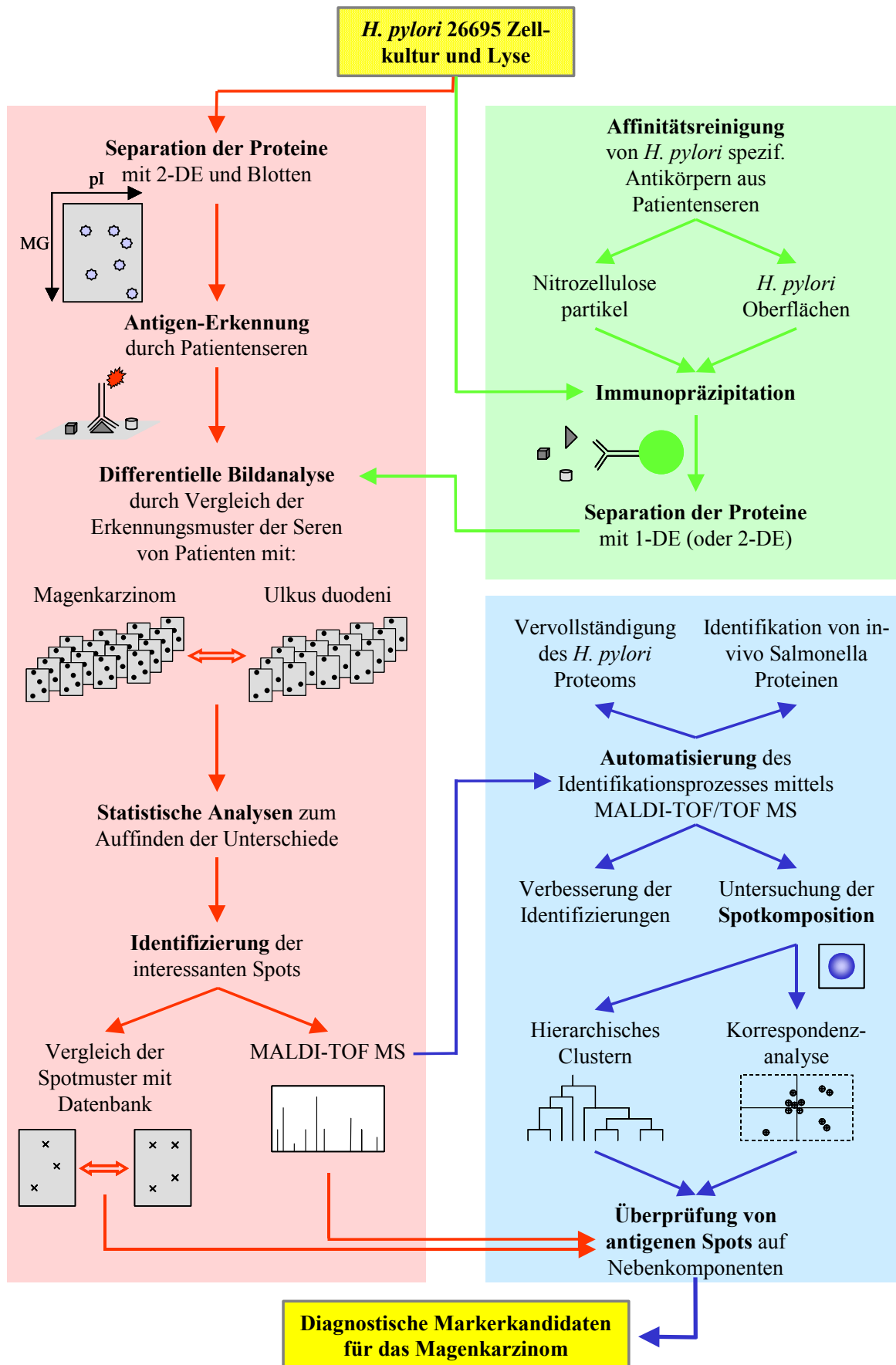


Abbildung 4: Flussdiagramm der drei Teilprojekte meiner Promotion.

2 Material und Methoden

Allgemeine Materialien:

- Wasser: für alle Lösungen wurde Millipore-Wasser verwendet
- PBS: 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,6

2.1 Identifizierung Magenkrebs-assoziiierter Antigene mittels Immunoblots

2.1.1 Charakterisierung der Patienten

Die Patienten wurden in verschiedenen klinischen Zentren Süddeutschlands zwischen 1995 und 2001 rekrutiert. Sowohl die Diagnose der *H. pylori* Infektion als auch der Erkrankungen des gastrointestinalen Traktes wurden durch einen Pathologen erstellt. Die Serenproben wurden zum Zeitpunkt der Diagnose entnommen und bei –20°C eingefroren. Für die Rekrutierung der Patienten galten folgende Ausschlusskriterien: gescheiterte *H. pylori* Eradizierungsversuche, Einnahme von Antibiotika oder Protonenpumpenhemmern innerhalb der letzten zwei Wochen vor Endoskopie sowie überstandene Magenoperationen. Patientenparameter wie Alter, Geschlecht und Grad der Besiedlung mit *H. pylori* wurden aufgezeichnet (Tabelle 1). Abgesehen vom Alter waren beide Patientengruppen sehr ähnlich. Obwohl 2/3 der Patienten in den überlappenden Altersbereich von 41-71 Jahren fielen, waren Magenkrebspatienten im Durchschnitt älter als Ulkuspatienten.

Tabelle 1: Patientenparameter.

Patienten- gruppe	Anzahl	Alters bereich	Durchschnitts alter (σ) ^a	männlich	weiblich	<i>H. pylori</i> Status	Besiedlungs- grad ^b (σ)
Magenkrebs	30	41-87	66 (± 10)	14	16	alle pos.	2.3 (± 0.8)
Ulkus	30	24-71	47 (± 13)	15	15	alle pos.	2.0 (± 0.8)

^a σ = Standardabweichung; ^b Kolonisierungsgrad mit *H. pylori* lt. Histologie (Stufen 1-3).

2.1.2 Aufzucht von *Helicobacter pylori*

Die Kultivierung des *H. pylori* Stammes 26695 erfolgte unter mikroaeroben Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂; Verwendung von CampyGen, Oxoid, Basingstoke, UK). Die Zellen wurden auf Agarplatten (mit 10 µg/ml Vancomycin) angeimpft und einzelne Klone wurden nach drei Tagen in BHI Medium (mit 10% FCS) gelöst und auf Agarplatten expandiert. Nach zwei Tagen erfolgte die Ernte mit Wattestäbchen und die Bakterien wurden in eiskaltem PBS (mit Complete protease inhibitors, Roche, Basel) resuspendiert. Mithilfe einer zehnminütigen Zentrifugation bei 3000xg und 4°C wurden die Zellen pelletiert und anschließend einmal

gewaschen.

2.1.3 Proteinseparation mittels 2-DE und Blotten

2.1.3.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Bakterienpellets wurden mit einem halben Volumen Wasser verdünnt und die folgenden Chemikalien wurden zugegeben, so dass die angegebenen Endkonzentrationen erreicht wurden: 9 M Harnstoff, 1,4% CHAPS, 2% Servalyte pI 2-11 (Serva, Heidelberg, Germany) und 70 mM DTT. Zur Solubilisierung wurde die Lösung 30 min bei RT geschüttelt und dann wurden die unlöslichen Bestandteile bei 100,000xg abzentrifugiert. Die Proteinlösung wurde bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Die Separation der Proteine erfolgte mittels hochauflösender 2-DE in 23x30 cm umfassenden Großgelen, die ein Auflösungsvermögen von bis zu 5000 Spots haben. Die Herstellung dieser 2-DE Gele wurde ausführlich beschrieben [76]. In Kürze: für die erste Dimension wurden 150 μg (für Immunoblots) bzw. bis zu 500 μg Protein (für präparative Gele) auf die anionische Seite des IEF-Rundgels aufgetragen. Nach der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden die Rundgele mit SDS äquilibriert, auf das Gel der zweiten Dimension platziert und mit Agarose fixiert. Hierauf erfolgte die Trennung nach dem MG senkrecht zur ersten Dimension.

2.1.3.2 Kolloidale Coomassie Färbung

Die präparativen Gele zur Proteinidentifizierung wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250, BioRad, Hercules, CA) gefärbt. Für diese MS-kompatible Färbung wurden die Gele in 50% Methanol, 2% Phosphorsäure über Nacht fixiert, 3x für 30 min mit Wasser gewaschen, anschließend in 34% Methanol, 17% w/v Ammoniumsulfat, 2% Phosphorsäure inkubiert und nach einer Stunde erfolgte die Zugabe von 0,66 g/l CBB G-250 worin die Gele nun für fünf Tage bei RT geschüttelt wurden. Am Ende wurden die Gele mit 25% Methanol gespült und mit Wasser in Folie eingeschweißt bei 4°C gelagert.

2.1.3.3 Das Blotten

Blotpuffer für hohes MG (ca. 30-150 kD):

- Anodenpuffer: 50 mM Borsäure, 20% Methanol, pH 9,0
- Kathodenpuffer: 50 mM Borsäure, 10% Methanol, 5% SDS, pH 9,0

Blotpuffer für niedriges MG (ca. 4-30 kD):

- Anoden- und Kathodenpuffer: 100 mM Borsäure, 20% Methanol, pH 9,0

Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte auf PVDF-Membranen (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) im semi-dry Verfahren [77]. Vorher wurden die Gele so halbiert, dass hohe und niedrige MG getrennt waren. Anschließend wurde für jede Hälfte der folgende Sandwich gebaut: Anode (+) – drei Schichten Filterpapier (in Anodenpuffer getränkt) – PVDF – Gel – drei Schichten Filterpapier (in Kathodenpuffer getränkt) – Kathode (-). Für zwei Stunden wurden 1 mA/cm² appliziert und anschließend die Membranen getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.4 Inkubation der Immunoblots mit Patientenseren

- PBST: PBS + 0,05% Tween-20

Die 60 verschiedenen Immunoblots wurden mit jeweils einem Patientenserum inkubiert – keiner der Blots wurde ein zweites mal verwendet um quantitative Vergleiche zwischen den Blots zu ermöglichen. Aufgrund der geringen Menge an vorhandenen Patientenseren wurde die gesamte Prozedur auf minimalen Serenverbrauch hin optimiert. Hierzu wurden jeweils die beiden zusammengehörenden Membranhälften (Proteinseite nach außen) in eine Kunststofftüte eingeschweißt. Durch Abdecken der Tüten mit Glasplatten konnte die Lösung während des Schüttelns gut innerhalb der Tüte zirkulieren und die Membranen in einem Flüssigkeitsfilm schwimmen. Somit konnte das Volumen an benötigter Lösung auf 0,125 ml/cm² (= 50 ml pro Tüte) minimiert werden. Die PVDF Membranen wurden kurz in Methanol getränkt und für mind. 1h in den Tüten mit PBST + 5% Milchpulver blockiert. Über Nacht erfolgte bei 4°C die Inkubation mit den primären AK durch direkte Zugabe von Patientenseren in die Tüte (1:200 Verdünnung). Nach viermaligem Waschen für je 15 min in PBST erfolgte die einstündige Inkubation mit dem sekundärem AK (Goat anti human polyvalent IgG - Peroxidase Conjugate, A-8400, Sigma, St. Louis, MO; 1:5.000 in PBST mit 5% Milchpulver). Nach erneutem viermaligem Waschen wurden die Membranen mit ECL Reagenz benetzt (NEL-101, PE, Boston, MA; auf RT aufgewärmt und frisch gemixt), zwischen Folien verpackt und dann wurden zwei Filme (Biomax MR1, Kodak, Rochester, NY) für 1,5 bzw. 5 min belichtet. Zur Kontrolle der Blotqualität wurden die Membranen anschließend mit CBB R-250 wie folgt gefärbt. Nach 5 min Färbung in 50% Methanol, 10% Essigsäure und 0,1% CBB R-250 erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes für 3x2 min in 50% Methanol, 10% Essigsäure. Am Ende wurden die Blots getrocknet und bei RT aufbewahrt. Zu Vergleichszwecken wurde auch ein Blot vom Stamm *H. pylori* J99 angefertigt und wie oben beschrieben behandelt.

2.1.5 Auswertung der Antigen-Erkennungsmuster

2.1.5.1 Bildanalyse

Die 1,5 min belichteten Filme wurden alle unter Verwendung identischer Parameter eingescannt (8 bit Grauwerte, 100 dpi, gleiche Helligkeits- und Kontrastwerte). Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software PDQuest (Version 7.1, BioRad, Hercules, CA). Die Spotdetektion und Quantifizierung erfolgten automatisch indem die Software die Intensitäten (Grauwerte) der gefundenen Spots in ein zweidimensionales Gaußmodell fittet. Dann wurden unter Verwendung eines mathematischen Verzerrungsmodells die Laufunterschiede der Spots in den verschiedenen Gelen ausgeglichen und jeweils korrespondierende Spots aus den verschiedenen Blots einander zugeordnet. Die Ergebnisse dieses Prozesses wurden mithilfe eines Masterblots dargestellt, der die theoretischen Grauwerteverteilungen aller Spots enthielt. Nun wurden in aufwendiger manueller Arbeit die automatischen Ergebnisse überprüft. Hierzu konnten Spots hinzugefügt oder gelöscht werden sowie das Matchen („Zuordnen“) der Spots verändert werden. Diese Kontrolle war unbedingt erforderlich, da derzeit keine der uns bekannten automatischen Analysesoftware fehlerfrei arbeitet. PDQuest eignete sich hierzu besonders gut, da es manuelle Eingriffe in die Analyse ermöglichte.

2.1.5.2 Multivariate Statistik

Statistische Analysen ohne Verwendung von Patientendaten wurden mit der hierarchischen Clusteranalyse und der KA durchgeführt. Mit beiden Methoden wurde nach Patientengruppen gesucht, die durch gewisse Ähnlichkeiten der Ag-Erkennungsmuster gruppiert werden konnten. Die verwendete Datenmatrix bestand aus den Intensitäten der insgesamt 611 verschiedenen Spots in den 60 Blots. Für die Analyse mittels KA wurde ein Softwarepaket verwendet, dass in DELPHI geschrieben wurde und auf Windows PCs läuft [71]. Das hierarchische agglomerative Clusterverfahren wurde in der statistischen Programmierungsumgebung R (<http://www.r-project.org>) durchgeführt. Hierzu wurde die Datenmatrix binarisiert und eine binäre Distanzmetrik verwendet.

2.1.5.3 Univariate Statistik

Zur Analyse der Korrelationen zwischen den Erkrankungen der Patienten und der Erkennung bestimmter Ag wurden die Blots in zwei Gruppen eingeteilt: 30 Blots von Magenkrebs- und 30 von Ulkuseren. Anschließend wurden mithilfe des Signifikanztests „t-Test“ diejenigen Spots ermittelt, deren Intensitätsmittelwerte mit unterschiedlichen Signifikanzniveaus mit den Erkrankungen korrelierten ($p < 0,1$ bis $p < 0,01$). PDQuest bot auch die Möglichkeit quantitative

Analysen zu machen, zum Beispiel Spots anzuzeigen, deren Mittelwerte der Intensitäten in einer von beiden Gruppen um einen bestimmten Faktor hoch- oder herunterreguliert waren. Zusätzlich konnten verschiedene Analysen logisch verknüpft werden.

2.1.6 Identifizierung der Antigene

2.1.6.1 Spotmustervergleich mit 2-DE Datenbank

Unsere institutseigene 2-DE Datenbank enthält Referenzgele verschiedener Mikroorganismen, u.a. auch von *H. pylori* 26695 (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE>). Durch den Vergleich „regionaler“ Spotmuster auf den Blots mit dem Referenzgel konnten Spots eindeutig zugeordnet und damit identifiziert werden. Die Zuordnung musste dabei sehr vorsichtig erfolgen, da sich die Spotmuster von Blots und silbergefärbten Gelen stark unterscheiden.

2.1.6.2 Identifizierung mittels PMF

Tryptischer Verdau

- Entfärbepuffer: 200 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 50% Acetonitril
- Verdaupuffer: 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 5% Acetonitril
- Trypsinlösung: 0,1 µg/µl Trypsin (sequencing grade modified trypsin, Promega, Madison, WI; gelöst in mitgeliefertem Resuspendierungspuffer)
- Schrumpfpuffer: 60% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure (TFA)
- Probenpuffer: 33% Acetonitril, 0,1% TFA
- Matrixlösung: 50 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure in 33% Acetonitril, 0,33% TFA

Die zu identifizierenden Spots wurden in keratinarmer Umgebung mit einer gekürzten Pasteurpipette (Innendurchmesser ca. 1 mm) ausgestochen. Dann erfolgte die Entfärbung für 30 min bei 37°C in Entfärbepuffer. Anschließend wurden die Spots in Verdaupuffer (30 min bei 37°C) geschüttelt. Die entfärbten Spots wurden nun in einer Speed Vac getrocknet und 0,25 µl Trypsinlösung wurde direkt auf die Spots pipettiert und anschließend 25 µl Verdaupuffer hinzugefügt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurde der Verdaupuffer abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Zum vollständigen Herauslösen aller Peptide wurden die Spots für 10 min mit 20 µl Schrumpfpuffer geschüttelt und die Überstände mit dem bereits entnommenen Verdaupuffern vereinigt. Die Peptidlösungen wurden anschließend in der Speed Vac vollständig eingetrocknet und bei -70°C gelagert. Für die Messung wurden die Peptide in 1,3 µl Probenpuffer gelöst und 0,25 µl davon mit dem gleichen

Volumen an Matrixlösung gemischt und auf die MALDI-Platte aufgetragen („dried droplet“ Methode).

MALDI-TOF MS Messung

Die Messung der charakteristischen Peptidmassen erfolgte manuell an einem MALDI-TOF Massenspektrometer (Voyager Elite DE, Applied Biosystems, Framingham, MA) mit folgenden Parametern: 20 kV Beschleunigungsspannung, 70% Gitterspannung, 0,08% Leitdrahtspannung, 200 ns Verzögerungszeit und einer Einlasssperr für Massen kleiner als 500 Da.

Datenbanksuchen

Die Peaks der Spektren wurden per Hand in der Software Grams (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) gelabelt und dann in Form von Peaklisten exportiert. Anschließend erfolgte die Datenbanksuche gegen die folgenden Proteindatenbanken: NCBItr (<http://www.ncbi.nih.gov/Ftp/>) und SwissProt (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/index.html>) mit den Suchmaschinen Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe) und MSFit (<http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0/msfit.htm>) unter Verwendung folgender Parameter: 100 ppm Peptidmassentoleranz, maximal zwei übersprungene Trypsinschnittstellen und mögliche Methioninoxidationen. Die Kriterien für eine eindeutige Identifizierung waren signifikante Scorewerte bei Suchen gegen alle Spezies und ein Minimum an 30% Sequenzabdeckung. Die Identifizierungen wurden zusätzlich manuell überprüft.

2.2 Detaillierte Analysen von Massenspektren

2.2.1 Proteinseparation

Die Aufzucht der *H. pylori* Zellen, die Proteinseparation mittels 2-DE und die CBB-Färbung der präparativen Gele erfolgte wie in den Kapiteln 2.1.2 und 2.1.3 beschrieben. Bei den hier verwendeten präparativen Gelen wurden 250 µg Protein aufgetragen.

2.2.2 Automatisches Ausstechen der Spots und tryptischer Verdau

- Waschpuffer I: 50% Acetonitril, 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat
- Waschpuffer II: 75% Acetonitril
- Trypsinlösung: 20 ng/µl Trypsin (Promega, Madison, WI)
- Schrumpfpuffer: 50% Acetonitril, 0,1% TFA

- Probenpuffer: 50% Acetonitril, 0,5% TFA
- Matrixlösung: gesättigte Lösung von α -cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 70% Acetonitril

Alle Arbeitsschritte vom Ausstechen der Spots bis einschließlich der MS Messungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald durchgeführt. Für das automatische Ausstechen der Spots wurde ein großer Ausschnitt verwendet, der etwa 2/3 des Gels umfasste (ca. 20-80 kD, gesamter pI-Bereich). Mit einem automatischen Pickroboter (Proteome Works, BioRad) wurden 384 verschiedene Spots aller Farbeintensitäten in dreifacher Wiederholung ausgestochen. Diese Spots wurden vorher manuell ausgewählt und in die Steuerungssoftware eingegeben. Der Stanzkopf hatte einen Durchmesser von 2 mm. Die Spots wurden in Mikrotiterplatten (96er Format) überführt und dort verdaut. Der tryptische Verdau und das Auftragen auf die MALDI-Platten wurde mithilfe eines Verdauroboters (Ettan spot-handling workstation, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) durchgeführt. Die Gelstücke wurden zweimal für 30 min mit 100 μ l Waschpuffer I und anschließend für 10 min mit Waschpuffer II gewaschen. Danach wurden die Spots bei 37°C getrocknet und 10 μ l Trypsinlösung appliziert. Im Anschluss erfolgte ein zweistündiger Verdau bei 37°C. Für die Peptidextraktion wurden die Spots mit 60 μ l Schrumpfpuffer bedeckt und die Lösungen nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 40°C in neue Mikrotiterplatten transferiert. Die Extraktion wurde mit 40 μ l der gleichen Lösung wiederholt und die vereinigten Überstände bei 40°C getrocknet. Die Peptide wurden nun in 3 μ l Probenpuffer gelöst und 0,4 μ l davon wurden auf die MALDI-Platten aufgetragen. Am Ende wurden 0,4 μ l Matrixlösung zu jeder Probe hinzu pipettiert und beide Lösungen durch fünfmaliges Ansaugen und Ausstoßen gemischt und 15 min trocknen gelassen, so dass der Matrix-Proben-Mix auskristallisieren konnte.

2.2.3 Messung mittels MALDI-TOF MS

Die MALDI-TOF Messungen wurden am 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA) durchgeführt. Dieses Gerät ist für die Hochdurchsatz-Identifizierung von Proteinen geeignet, ist also in der Lage automatisch Proben zu messen, Spektren zu kalibrieren und zu prozessieren. Die Spektren wurden in einem Massenbereich von 900-3700 Da und einer Fokusmasse von 2000 Da aufgenommen. Pro Spektrum wurden in einem Zufallsmuster 20 Subspektren mit jeweils 100 Laserschüssen akkumuliert. Wenn das autolytische Trypsinfragment $m/z=2211,104$ ein Signal-zu-Rausch Verhältnis (S/N) von mindestens 10 erreichte, wurde das Spektrum mit diesem Peak intern kalibriert. Falls diese Prozedur fehlschlug wurde automatisch die Gerätekalibrierung verwendet und das Spektrum später manuell nachkalibriert. Peakdetektion und Export der Peaklisten erfolgte mithilfe des Skriptes „Peak to Mascot“ der 4700 Explorer Software (Steuersoftware des Gerätes) mit folgenden Parametern:

Massenbereich 900-3500 Da, maximale Peakdichte von 50 Peaks/200 Da, minimale Fläche von 0 und einer maximalen Anzahl von 200 Peaks pro Spektrum. Drei verschiedene Peaklisten für S/N 5, 7 und 10 wurden generiert. Für die manuelle Inspektion der Spektren und der Überprüfung der Peakdetektion wurde der Data Explorer (Applied Biosystems, Framingham, MA) verwendet. Zur Bestätigung der Identifizierung bestimmter Peptide wurden einzelne MS/MS Spektren später manuell aufgenommen.

2.2.4 Identifizierung von Haupt- und Nebenkomponten der Spots

2.2.4.1 Datenbanksuche mit Mascot

Die Datenbanksuchen erfolgten im Batch-Verfahren mit dem Mascot protein identification system (Matrix Science, London, UK [78]) auf unserem institutseigenen Mascot Server. Hierzu wurde die aktuelle Version der *H. pylori* 26695 Proteindatenbank vom „The institute of genomic research“ (TIGR, www.tigr.org) heruntergeladen. Die Suchparameter wurden sorgfältig optimiert und die besten Identifizierungsergebnisse konnten mit folgenden Parametern erzielt werden: 30 ppm Peptidmassentoleranz, Oxidation von Methionin und ein Maximum von einer übersprungenen Trypsinschnittstelle. Das Identifizierungskriterium war ein signifikanter Mascot Score >45 ($p < 0,05$).

2.2.4.2 Analyse der PMFs mithilfe des Programms MS-Screener

Zur Unterstützung bei der Analyse großer Datenmengen wurde in unserer Gruppe die Software MS-Screener entwickelt. Das anfänglich in Perl (<http://www.perl.com>) programmierte Tool wurde später in Java (<http://java.sun.com>) umgeschrieben und mit einer benutzerfreundlichen graphischen Oberfläche versehen [59]. Der MS-Screener kann ASCII Dateien aus verschiedenen Analysesoftwaren (Grams, Data Explorer, Peak to Mascot usw.) importieren und bearbeiten. Folgende Funktionen wurden implementiert: die Suche und Entfernung von Kontaminantenpeaks, die Berechnung der Nachkommastellen der Massen in Bezug zur HDPR, die Suche nach bestimmten Massen, der Vergleich verschiedener Spektren und ihr Ranking sowie die Intervallisierung der Daten zur Erzeugung einer Datenmatrix für externe Clusteranalysen. Peakmassen, die in mehr als 5% aller Spektren auftraten (30 ppm Toleranz), wurden aus den Daten entfernt. Zur Berechnung der HDPR-Ausreißer wurde eine absolute Toleranz von 0,12 Da verwendet und in Form einer Tabelle extrahiert. Zur Erzeugung der Datenmatrix wurde eine Intervallweite von 30 ppm verwendet, so dass etwa 1600 Massenintervalle für jedes Gel entstanden. Somit hatte die Datenmatrix eine Größe von 1600 x 384 (Spalten x Zeilen).

2.2.4.3 Hierarchisches Clustering mittels R

Zur Analyse der Beziehungen zwischen den einzelnen Spots eines Gels wurden multivariate statistische Verfahren benutzt. Ein solches Verfahren ist das bereits erwähnte hierarchische agglomerative Clusterverfahren, welches die Analyse der Ähnlichkeiten von Peaklisten ermöglicht und diese in Form eines Dendrogramms ausgibt. Die Untersuchung wurde in der statistischen Programmierungsumgebung R (<http://www.r-project.org>) durchgeführt. Hierzu wurde die Datenmatrix binarisiert und eine binäre Distanzmetrik verwendet. Die Ähnlichkeiten zwischen den Spots, d.h. bestimmte Proteine als mögliche Nebenbestandteile anderer Spots, wurden durch manuelle Auswertung der Dendrogramme näher untersucht.

2.2.4.4 Korrespondenzanalyse mit weiterentwickelter Software „CorrAn“

Für die Analyse von Ähnlichkeiten zwischen Spots wurde das in Kapitel 2.1.5.2 erwähnte Softwarepaket weiterentwickelt und CorrAn genannt. Die KA ermöglichte die Projektion des hochdimensionalen Datenraumes (hier 284 Spots eines Gels = 284 Dimensionen) in einen zweidimensionalen Faktorraum, der leicht graphisch darstellbar war. Somit konnten Cluster ähnlicher Peaklisten gefunden werden. Im Gegensatz zum hierarchischen Clustering wurden die Intensitäten der einzelnen Peaks mit in die Analyse einbezogen. Die in Folge der Intervallisierung entstandenen Nullwerte (nicht jedes Spektrum enthält in jedem Intervall einen Peak) wurden mithilfe der Zufallsfunktion „rnorm“ in R verwechselt. Weiterhin bot die KA die Möglichkeit, die absoluten Beiträge der einzelnen Massen zur Gruppenbildung darzustellen. Die Software wurde in diesem Projekt so modifiziert, dass Beiträge ober- oder unterhalb eines manuell gesetzten Schwellenwertes gelöscht werden konnten. Nach der anschließenden Neuberechnung wurden neue Cluster sichtbar, die sonst in der Mehrheit der nicht-signifikanten Beiträge untergegangen waren. Im „Versuch und Irrtum“ Verfahren konnten so neue Zusammenhänge zwischen Spots gefunden werden.

2.2.5 Identifizierung von in-vivo exprimierten Proteinen von *S. enterica*

2.2.5.1 Separation der Proteine

Ziel dieses Projektes war die Identifizierung von Proteinen von *Salmonella enterica* subspecies typhimurium SL1344, die in-vivo exprimiert wurden und für die Virulenz dieser Bakterien eine große Rolle spielen könnten. Die Prozedur wurde ausführlich in [79] beschrieben, deshalb gebe ich hier nur eine kurze Übersicht. Balb/c Mäuse wurden mit *S. enterica* intravenös infiziert. Nach 20 h wurden die Bakterien aus dem Caecum präpariert, gewaschen und mit einem 35 µm Zellsieb filtriert. Die GFP-markierten Salmonellen wurden dann mittels „Fluorescence Activated

Cell Sorting“ (FACS) sortiert. Die Probenaufarbeitung, 2-DE und CBB-G250 Färbung erfolgte wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben.

2.2.5.2 MALDI-TOF/TOF MS Messung der Spots

Anschließend wurden alle 194 sichtbaren Spots ausgestochen und manuell in Mikrotiterplatten verdaut. Hierfür wurde eine ähnliche Prozedur verwendet wie in Kapitel 2.1.6.2 beschrieben. Im Unterschied zu o.g. Prozedur wurde nach der Entfärbung ein weiterer Schritt mit 75% Acetonitril eingeführt um die Trocknung der Proben in den Mikrotiterplatten bei RT zu beschleunigen. Um die Extraktion der Proteine zu verbessern wurde die Konzentration von TFA auf 0,5% erhöht und ein zweiter Schritt mit Schrumpfpuffer (erst 60% dann 100% Acetonitril) hinzugefügt. Anschließend wurden 0,4 µl Probe auf Parafilm mit 0,4 µl Matrixlösung (5 mg/ml α -cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 50% Acetonitril, 0,1% TFA) gemixt und dann auf eine 192er MALDI-Platte aufgetragen. Nach der Kristallisierung der Proben erfolgte die Messung an unserem institutseigenen 4700 Proteomics Analyzer. Die Messparameter waren die folgenden: Messbereich 800-4000 Da und Fokusmasse 2000 Da. Unmittelbar vor der Messung wurde die Geräteeichung sowohl für PMF als auch für MS/MS Spektren aktualisiert. Für die PMFs wurden 30 Subspektren (S/N je mindestens 20) mit jeweils 50 Laserschüssen (Intensität 2380) aufsummiert, bis zu 100 Subspektren wurden hierzu getestet. Für die MS/MS Spektren wurden alle Subspektren (je 125 Schüsse, Laserintensität 3800) akzeptiert bis das resultierende Spektrum S/N 30 erreichte (minimal 15, maximal 80 Subspektren). Die PMF-Spektren wurden mit mindestens einer der folgenden Trypsin bzw. Matrixpeaks intern kalibriert: 515,32 Da; 842,51 Da; 877,03 Da; 2211,10 Da; (S/N>30). Die MS/MS Spektren wurden mit der Gerätekalibrierung gemessen. In der Interpretationsmethode wurden automatisch Peaks ausgewählt, von denen MS/MS Spektren aufgenommen wurden. Es wurden die drei intensivsten Peaks verwendet, die den folgenden Kriterien genügten: S/N mindestens 20, keine der Ausschlussmassen (Trypsin-, Keratin-, Matrix-, CBB- Peaks) und kein Natriumaddukt eines bereits ausgewählten Peaks. Bei nicht automatisch identifizierten Spots wurde die Messung mit neu aufgetragener Probe wiederholt und bei einigen ausgewählten Peaks wurden manuelle MS/MS Messungen mit CID (Stoßgas: Luft mittleren Drucks) vorgenommen.

2.2.5.3 Datenbanksuche mit dem GPS Explorer

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software GPS Explorer (Applied Biosystems, Framingham, MA), deren integrierte Datenbanksuchmaschine auf dem Mascot protein identification system basiert. Die Suchen erfolgten gegen die neusten Versionen der Proteindatenbanken NCBI nr und UniProt (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/index.html>) als

kombinierte Suchen von PMF und MS/MS Spektren. Folgende Toleranzen wurden verwendet: 30 ppm für Peptide und 0,5 Da für Fragmente. Mögliche Modifikationen waren Methioninoxidationen und Natriumaddukte an Aspartat und Glutamat. Die Suche erfolgte gegen alle Spezies mit maximal einer übersprungenen Trypsinschnittstelle. Die Peakdetektion für PMF Spektren wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: $S/N > 10$, maximal 10 Peaks/200 Da, maximal 100 Peaks/Spektrum – eine Liste von typischen Kontaminantenpeaks und Natriumaddukte wurden ausgeschlossen. Für MS/MS Spektren galten diese Parameter: $S/N > 3$, maximal 50 Peaks/200 Da und maximal 100 Peaks/Spektrum. Die Kriterien für eine eindeutige Identifizierung waren signifikante Scorewerte ($p < 0,01$) bei Suchen gegen alle Spezies. Diese wurden entweder durch gute PMF Spektren allein oder durch Bestätigung des Ergebnisses mithilfe von MS/MS Daten einiger Peaks erreicht. Alle Identifizierungen wurden manuell bestätigt.

2.3 Immunopräzipitation von *H. pylori* Antigenen

2.3.1 *H. pylori* Lyse

Lysepuffer:

- RIPA-Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,25% Natriumdeoxycholat, 10 mM EDTA, pH 7,4
- PBS+Complete

Die *H. pylori* 26695 Aufzucht erfolgte wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben. Um die Bakterienzellen intakt zu erhalten wurde das Pellet nach der Ernte in 25% Glycerol in PBS bei -80°C gelagert. Zum Zwecke der Lyse wurden die Bakterien nach dem Auftauen bei 4°C für 5 min mit $2000\times g$ pelletiert und zweimal in eiskaltem PBS+Complete gewaschen. Für 400 mg Zellpellet (Volumen: ca. 450 μl) wurden 600 μl Lysepuffer zugegeben und kurz gevortext. Mit dem Ultraschallstab wurden die Zellen zerstört (4 x 30 s auf Eis, Stufe 7, 15%) und anschließend weitere 600 μl Lysepuffer zugegeben. Die Suspension wurde nun für 10 min auf Eis stehen gelassen und zeitweilig gevortext. Am Ende wurden die unlöslichen Bestandteile bei $16.000\times g$ 10 min abzentrifugiert und der klare Überstand (ca. 5 mg/ml Protein) bei -20°C gelagert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL) eingesetzt.

2.3.2 Affinitätsreinigung von *H. pylori* spezifischen Antikörpern

2.3.2.1 Affinitätsreinigung mittels Nitrocellulosepartikel

Herstellung der Nitrocellulosepartikel

Die Herstellung der Partikel aus NC erfolgte unmittelbar vor der Inkubation. Eine Blotmembran aus Nitrocellulose (Protran Nitrocellulose Hybridization Transfer Membrane, 0.45 µm, Schleicher und Schüll, Perkin Elmer, Boston, MA) wurde in kleine Stücke geschnitten. Ein Stück von 1 cm² Größe wurde in 1,25 ml DMSO gelöst und das gleiche Volumen an Na₂CO₃/NaHCO₃ Puffer (14/36 mM, pH 9,6) tropfenweise zugegeben während ständig mit einem Rührfisch stark gerührt wurde. Anschließend wurden die NC-Partikel für 5 min bei 1200xg abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in jeweils 1,5 ml PBS waren diese fertig zur weiteren Verwendung. Pro cm² entstanden so etwa 70 µl NC-Partikel.

Affinitätsreinigung

Elutionspuffer:

- sauer: 100 mM NaH₂PO₄, pH 2,5
- basisch: 100 mM Na₂HPO₄, pH 11,0
- hochsalz: 3,5 M MgCl₂, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,1
- niedrigsalz: reines Milliporewasser
- ImmunoPure IgG Elution Buffer aus dem SeizeX Protein G Immunoprecipitation Kit, Pierce, Rockford, IL, USA (enthält primäre Amine mit pH 2,8)

Das Proteinbindungsvermögen von NC beträgt ca. 50 µg/cm². Zur vollständigen Absättigung der NC mit *H. pylori* Proteinen wurde die vierfache Proteinmenge verwendet. Dementsprechend wurden für 70 µl NC-Partikel 40 µl *H. pylori* Lysat (200 µg Protein) verwendet. Lysat und NC-Partikel wurden in insgesamt 1 ml PBS+Complete bei RT für 1 h inkubiert. Danach wurden überschüssige Proteine durch Waschen mit 1 ml PBS+Complete, 50 µl Elutionspuffer und 1 ml PBS+Complete entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 1 ml 1:20 oder 1:40 in PBS+Complete verdünntem Testserum. Dieser Schritt erfolgte unter ständigem Schütteln entweder für 1 h bei RT oder über Nacht auf Eis. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS+Complete erfolgte die Elution der AK in drei Fraktionen mit je 40 µl Elutionspuffer. Zur Überprüfung der Elution wurde die NC bei –20°C aufgehoben und später mit auf die SDS-PAGE aufgetragen.

2.3.2.2 Affinitätsreinigung mittels *H. pylori*

Intakte Bakterien

- Quenching buffer (aus SeizeX Kit, s.o.): 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2

Alle hier beschriebenen Prozeduren wurden auf Eis mit kaltem PBS+Complete durchgeführt. Die bei -70°C in PBS + 25% Glycerol eingefrorenen *H. pylori* Zellen wurden unter Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS+C vorsichtig aufgetaut und zweimal in PBS+Complete gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2000xg bei 4°C pelletiert und wieder in 1 ml kaltem PBS aufgenommen. Nun erfolgte die Inkubation durch Zugabe von 1:20 verdünntem Patientenserum und über Nacht Schwenken auf Eis. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit 1 ml kaltem PBS+Complete. Die AK wurden von den Bakterienoberflächen in drei Fraktionen mit je 100 μl Elution Buffer eluiert und mit 5 μl 1 M Tris pH 9,5 neutralisiert. Bakterienreste wurden mit einer Zentrifugation von 5 min bei 16,000xg entfernt. Die IgG der Eluate wurden nun von coeluierten Proteinen durch einen Anreicherungsschritt mit Protein-G Sepharose (GammaBind G Sepharose, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, SE) gereinigt. Dazu wurden 0,1 ml Sepharose-G (50% slurry) zweimal in 0,5 ml Binding Buffer gewaschen und die gepoolten Eluate in 500 μl Binding Buffer 3 h bei RT geschüttelt. Danach folgte viermaliges Waschen mit Quenching buffer und die Elution der IgG mit 50 μl Elution Buffer (aus SeizeX Kit, s.o.). Anschließend wurden die Lösungen mit je 2,5 μl 1 M Tris pH 9,5 neutralisiert. Die Sepharose wurde durch zweimaliges Waschen in Quenching buffer regeneriert und bei 4°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Membranfraktion

Als Membranfraktion wurden die Pellets nach der *H. pylori* Lyse (s. Kapitel 2.3.1) verwendet. Ca. 130 mg Membranen wurden in 1 ml kaltem PBS+Complete resuspendiert und dann wurde 1:20 verdünntes Patientenserum zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf Eis. Am nächsten Tag wurde die Suspension für 5 min bei 4000xg und 2°C zentrifugiert und anschließend zweimal mit 1 ml kaltem PBS+Complete gewaschen. Die Elution erfolgte mit 200 μl Elution Buffer und die AK wurden mit 10 μl 1 M Tris pH 9,5 neutralisiert. Am Ende der Prozedur wurden die Bakterienreste abzentrifugiert. Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, wurden auch hier die IgG mittels Protein-G Sepharose angereichert.

2.3.3 Bestimmung der AK Konzentration mittels ELISA

2.3.3.1 Aufkonzentrierung der Eluate

- Binding buffer (aus SeizeX Kit, s.o.): 140 mM NaCl, 8 mM Na₃PO₄, 2 mM K₃PO₄, 10 mM KCl, pH 7,4

Zum Aufkonzentrieren und Umpuffern der AK und IP Eluate wurden Ultrafree-Röhrchen (Ultrafree 0,5 centrifugal filter device, Millipore, Billerica, MA) verwendet. Nach dem Spülen der Ultrafree mit 0,5 ml PBS wurde die Membran für 30 min mit 0,5 ml PBS + 1% BSA abgesättigt (Zentrifugationen mit 12,000xg) um den Verlust an adsorbierenden AK bzw. Proteinen zu minimieren. Anschließend wurde mit 0,5 ml PBS gewaschen, ausgeschüttelt und dann wurden die Eluate umpuffert mit 2x 500 µl PBS oder Binding buffer, und eingeengt auf etwa 30 µl. Alternativ wurde eine TCA Fällung durchgeführt. Hierbei wurde zum Eluat TCA zugegeben (Endkonzentration 10%) und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 2°C und 16,000xg zentrifugiert, zweimal mit 1 ml -20°C kaltem Aceton gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und am Ende in PBS+Complete aufgenommen.

2.3.3.2 ELISA mit *H. pylori* Lysat

Titertest *H. pylori* spezifischer AK:

- Wienpuffer: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6
- Standard Diluent: 0,5% BSA, 0,1% Tween-20 in PBS

Die Mikrotiterplatte (MaxiSorp, Nunc, eBioscience, San Diego, CA) wurde über Nacht bei 4°C mit 1:1000 in Wienpuffer verdünntem *H. pylori* Lysat gecoatet (50 µl je well). Mit einem ELISA-washer wurde die Platte dreimal mit PBS + 0,05% Tween-20 gewaschen und freie Adsorptionsstellen für 2 h bei RT in 100 µl 2% BSA in PBS blockiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die zweistündige Inkubation mit 50 µl Seren bzw. Eluaten, die jeweils als Doppelwerte in 1:2 Schritten in Standard Diluent verdünnt wurden. Die Eluate wurden mit 1:20 beginnend bis 1:2560 verdünnt; die Seren von 1:400 bis 1:51,200. Nach dem Waschen der Platte wurde mit 50 µl 1:200,000 in Standard Diluent verdünntem anti-human horseradish peroxidase-konjugiertem IgG für 1 h inkubiert. Nach weiterem Waschen erfolgte die Detektion mit 100 µl TMB (frisch gemixtes Peroxidase Substrate + Solution B, KPL, Gaithersburg, Maryland). Nach 10-20 min schütteln bei RT wurde die Reaktion mit 50 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Färbung bei 450 nm im ELISA reader gemessen. Als Standards wurden Patientenseren vor und nach der Inkubation eingesetzt. Zur quantitativen Bestimmung der IgG Konzentrationen wurde ein

humaner IgG Standard mit 10 mg/ml verwendet.

Normierung mit gesamt-IgG-Gehalt

Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 4°C mit den Seren bzw. Eluaten ge-coated (50µl je well, Doppelwerte). Die Verdünnung erfolgte von 1:2 bis 1:2560 in Wienpuffer. Waschschritte, Blockierung, sekundärer AK und Detektion erfolgten wie oben beschrieben. Anschließend wurde der Anreicherungsfaktor an IgG im Vergleich zum Patientenserum und die IgG Ausbeute berechnet:

- $$\text{IgG Anreicherungsfaktor} = \left\{ \frac{T_{\text{spez. IgG}}}{T_{\text{gesamtIgG}}} \right\}_{\text{Elution}} \bigg/ \left\{ \frac{T_{\text{spez. IgG}}}{T_{\text{gesamtIgG}}} \right\}_{\text{Serum}}$$
- $$\text{IgG Ausbeute} = \left(\frac{\left\{ T_{\text{spez. IgG}} \times V_{\text{spez. IgG}} \right\}_{\text{Elution}}}{\left\{ T_{\text{spez. IgG}} \times V_{\text{spez. IgG}} \right\}_{\text{Serum}}} \right) \times 100\%$$

mit T = Titer bei einer OD im linearen Bereich und V = Volumen der Lösung

2.3.3.3 ELISA mit intakten Bakterien

Zur Bestimmung des Titers der *H. pylori* oberflächenspezifischen AK wurden intakte Bakterien in Mikrotiterplatten fixiert. Dazu wurden die bei -70°C in 25% Glycerol aufbewahrten Zellen aufgetaut und zweimal mit PBS gewaschen. Mithilfe einer OD Bestimmung und des Vergleichs mit einer Wachstumskurve wurde eine Konzentration von 10^8 – 10^9 Zellen pro ml eingestellt. Die Mikrotiterplatten wurden nun mit 50 µl Bakteriensuspension versehen und für 10 min bei 500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Platte trocken gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl eiskaltem Methanol fixiert und die Platte dreimal mit PBS + 0,05% Tween-20 gewaschen. Die folgenden Schritte fanden wie oben beschrieben statt: Blockierung, Inkubation mit Serum, sekundärem AK und Detektion. Ebenso wurde eine Normierung nach gesamt-IgG-Gehalt wie oben durchgeführt.

2.3.4 Präzipitation der Antigene

Die 0,1 ml 50% slurry ImmunoPure Plus Immobilized Protein G (aus SeizeX Kit, s.o.) wurden zweimal in 0,4 ml binding buffer gewaschen. Anschließend wurden die AK verdünnt in 0,3 ml binding buffer auf die Sepharose gegeben und für 1 h geschüttelt. Ungebundene Moleküle wurden dreimal mit 0,4 ml Binding Buffer gewaschen. Zum Zwecke der kovalenten Kopplung von AK mit der Sepharose wurde letztere in 0,1 ml Binding Buffer resuspendiert und 250 µg des Kopplungsreagenz DSS (aus SeizeX Kit, frisch gelöst in DMSO) zugegeben. Nach einer Stunde Schütteln erfolgte eine aufwendige Waschprozedur: 2x Quenching Buffer, 5x

Elution Buffer, 3x Quenching Buffer und am Ende 1x mit Binding Buffer. Für die eigentliche IP wurde 200 µl *H. pylori* Lysat 1:1 verdünnt in Binding Buffer+Complete zur Sepharose gegeben und für 2 h geschüttelt. Danach erfolgte viermaliges Waschen mit Quenching Buffer. Die Elution fand in drei Schritten a 50 µl Elution Buffer statt. Am Ende wurde die Sepharose durch viermaliges Waschen in 0,5 ml Quenching Buffer regeneriert und bei 4°C gelagert.

Für einige Versuche wurde das *H. pylori* Lysat vor der IP mit Protein-G Sepharose präinkubiert um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Hierzu wurde die Sepharose mit dem Lysat für 2 h geschüttelt und dann abzentrifugiert.

2.3.5 Separation der Präzipitate mittels 1-DE

2.3.5.1 1-DE

Zur Auftrennung immunopräzipitierter Proteine wurden zehnprozentige 1 mm dicke eindimensionale SDS-Polyacrylamidgele (1-DE) angefertigt. Die Proben wurden direkt vor dem Auftragen in reduzierendem Probenpuffer für 10 min bei 95°C gekocht. Der Lauf der Gele erfolgte mit maximal 40 mA (Kühlung mit Eis).

2.3.5.2 Silberfärbung

- Fixierlösung: 50% Ethanol, 10% Essigsäure
- Inkubationslösung: 30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutaraldehyd, 0,2% Natriumthiosulfat
- Silberlösung: 0,1% AgNO₃, 0,01% Formaldehyd
- Entwicklung: 2,5% Natriumcarbonat, 0,05 mM Natriumthiosulfat, 0,01% Formaldehyd, pH 11,3
- Stopplösung: 0,05 M EDTA, 0,02% Thimerosal

In Anlehnung an [80] wurden die Gele nach dem Lauf für 1 h in der Fixierlösung geschüttelt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation in Inkubationslösung. Die Gele wurden nun dreimal für 20 min in Wasser gewaschen, dann für 30 min in Silberlösung geschüttelt und nochmals für 30 s in Wasser gespült. Die Entwicklung in entsprechender Lösung wurde mit der Stopplösung nach dem Erreichen guter Kontraste beendet. Am Ende wurden die Gele bei 50 mbar und 75°C in einem Vakuumtrockner getrocknet.

2.3.5.3 CBB G-250 Färbung und Identifizierung

Für die Identifizierung von Banden wurde die MS verträgliche colloidale CBB Färbung und MALDI -TOF MS verwendet. Die Prozeduren sind im Einzelnen in den Kapiteln 2.1.3.2 und 2.1.6.2 beschrieben worden.

2.3.5.4 Immunoblots

- Blotpuffer: 50 mM Borsäure, 20% Methanol, pH 9

Die Gele wurden für 100 min bei 100 mA in folgendem Sandwich geblottet: Kathode(-) – drei Filter (getränkt in Blotpuffer) – Gel – PVDF-Membran (getränkt in Methanol; 0,45µm; Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) – drei Filter (getränkt in Blotpuffer) – Anode(+). Anschließend wurden die Blots getrocknet. Im weiteren wurden die Blots kurz in Methanol eingelegt und dann über Nacht bei 4°C in PBST mit 5% Milchpulver blockiert. Die Inkubation mit 1:200 in Blockierlösung verdünntem Patientenserum erfolgte für eine Stunde. Nach viermaligem Waschen in PBS+0,05% Tween-20 wurden die Blots für 1 h in 1:5.000 in PBST mit 5% Milchpulver verdünntem Anti-humanem sekundärem AK (Goat anti human polyvalent IgG - Peroxidase Conjugate, A-8400, Sigma, St. Louis, MO) inkubiert. Wieder erfolgte viermaliges Waschen und anschließend wurde eine Minute in frisch gemixtem ECL (Renaissance NEL-101, PE, Boston, MA) geschüttelt und Filme (Biomax MR1, Kodak, Rochester, NY) je nach Signalstärke unterschiedlich lang aufgelegt. Zur Kontrolle der Blotqualität wurden diese mit CBB R-250 wie folgt angefärbt: 5 min Färbung in 50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Serva Blue R-250, 3x2 min Entfärbung in 50% Methanol, 10% Essigsäure und am Ende Lufttrocknung.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung Magenkrebs-assoziiierter Antigene mittels Immunoblots

3.1.1 Verschiedene Subproteome von *H. pylori*

Um Kandidaten für einen diagnostischen Test zu finden, wurden die Ag-Erkennungsmuster von unter Magenkrebs oder Ulkus leidenden *H. pylori* infizierten Patienten verglichen. Die mittels 2-DE aufgetrennten *H. pylori* 26695 Proteine wurden geblottet und mit den Patientenseren inkubiert. Hierfür wurde eine Inkubationstechnik für die großen Blots etabliert, die speziell auf minimalen Serenverbrauch hin optimiert wurde. Die verwendete 2-DE Technik ist in der Lage, in Kombination mit der Silberfärbung 1800 *H. pylori* Proteinspezies aufzulösen (s. Referenzgel unserer Datenbank). Die Muster der Immunoblots unterschieden sich allerdings stark von denen eines silbergefärbten Gels ([Abbildung 5](#)), da nur Spots erfasst wurden, die von den AK im Patientenserum erkannt wurden. Bei der Silberfärbung werden Spots bereits ab einem Proteingehalt von etwa 1 ng detektiert. Die Empfindlichkeit der Immunodetektion war jedoch noch größer, da auch Spots erkannt wurden, die auf dem Silbergel nicht zu sehen waren. Ein Beispiel hierfür ist die diagonale Spotserie im oberen Teil der [Abbildung 5](#) rechts; hier wurden Ag erkannt, die vermutlich weniger als 1 ng Protein enthielten, da sie nicht mit der Silberfärbung detektierbar waren. Silberfärbung und Immunofärbung decken also ganz unterschiedliche Subproteome auf. Interessanterweise war nur ein kleiner Teil der *H. pylori* Proteine antigen – im Durchschnitt wurden 142 Spots pro Blot erkannt – das sind nur 8% der sichtbaren Spots des Silbergels. Der bei ca. 25 kD im Immunoblot sichtbare Streifen bestand vermutlich aus einem (oder mehreren) schlecht fokussierten Protein, das in geringer Konzentration vorlag und deshalb nicht im Silbergel zu sehen war.

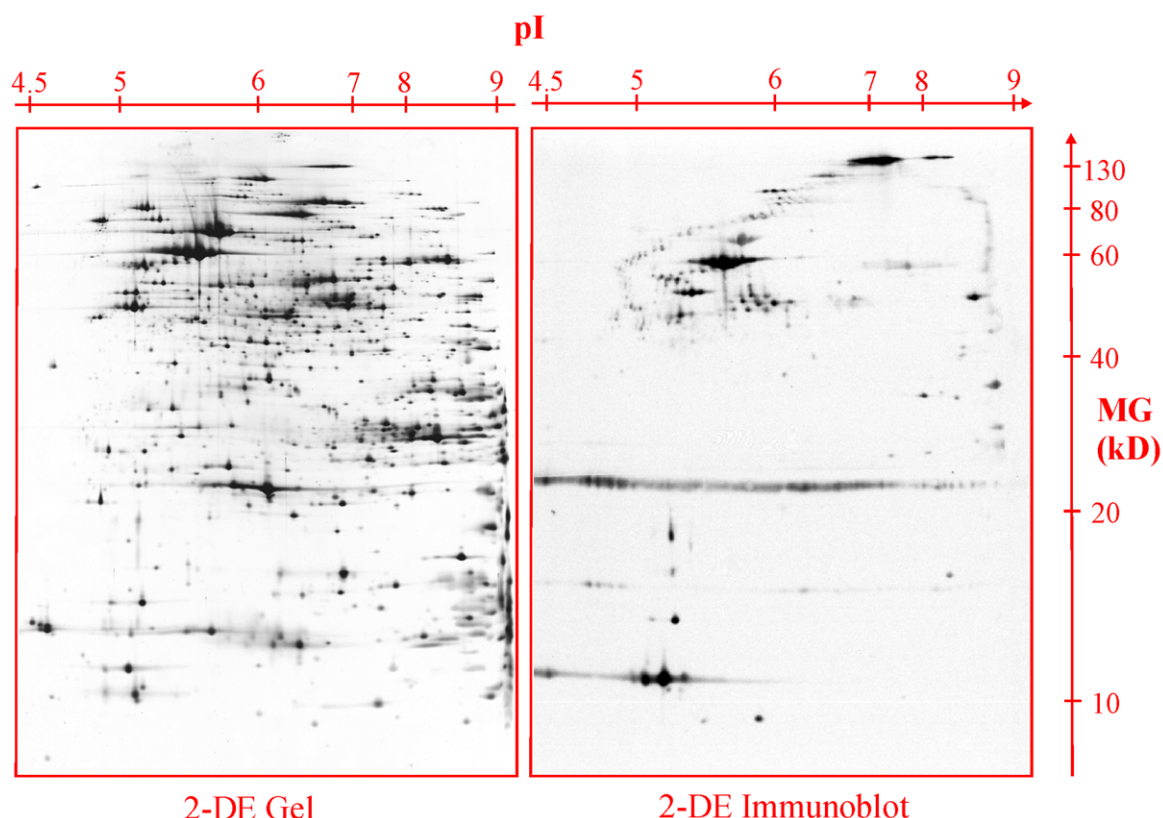


Abbildung 5: Vergleich eines großen 2-DE Gels (links) und eines großen 2-DE Immunoblots (rechts). **Links** ist ein silbergefärbtes 23 x 30 cm großes Gel von *H. pylori* Lysat zu sehen. Es enthält ca. 1800 Spots, deren Identifizierungsergebnisse interaktiv in unserer Datenbank (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE>) erkundet werden können. **Rechts** ist ein 23 x 30 cm großer 2-DE Immunoblot mit 198 Spots zu sehen, der mit dem Serum eines Ulkuspatienten inkubiert wurde (Serum DU23). Durch die hohe Spezifität und Sensitivität der Methode wurden einerseits Spots detektiert, die nicht im Silbergel zu sehen sind, z.B. die diagonale Spotserie im oberen MG-Bereich; andererseits wurden viele abundante Proteine nicht von den Serum-AK erkannt.

3.1.2 Hohe Variabilität der Antigenmuster

Im unteren Teil der [Abbildung 6](#) ist eine repräsentative Auswahl an Immunoblots dargestellt. Diese fünf Blots demonstrieren die extremen Variationen der Erkennungsmuster der einzelnen Patientenserum unabhängig von den Erkrankungen. Nicht nur die Anzahl erkannter Spots sondern auch die Intensität der Hintergründe unterschieden sich stark. Einzelne Muster sind jedoch wiederholt und reproduzierbar gefunden worden. Zum Beispiel war die bereits erwähnte diagonale Spotserie in den Blots DU17 und DU23 sichtbar; insgesamt wurde diese in 37 der 60 Blots gefunden und definiert somit eine Subgruppe an Patienten. Leider korrespondierte diese nicht mit den klinischen Befunden der Patienten. Insgesamt wurden 611 unterschiedliche Spots von den Seren erkannt, die Anzahl der von individuellen Seren erkannten Ag reichte jedoch von 24 bis 391. Im Durchschnitt detektierten die AK von Magenkrebspatienten 49% mehr Spots mit einer um 75% höheren Gesamtsumme der Spotintensitäten. Nur ein einziger Spot, der Hauptspot

von GroEL, wurde von ausnahmslos allen Seren erkannt; sehr häufig wurden auch andere bekannte Ag wie CagA (58 x) und UreB (57 x) erkannt. Die große Mehrheit aller detektierten Spots (531 x) wurde hingegen bei weniger als der Hälfte aller Blots gefunden. Insgesamt 32 wurden sogar nur ein einziges Mal detektiert. Diese außerordentliche Variabilität der Daten war der Grund, die Gruppengröße von anfänglich zehn auf 30 Patienten pro Gruppe anzuheben und verschiedene statistische Analysen durchzuführen.

3.1.3 Globaler Vergleich der Antigenerkennungsmuster

Für eine globale Analyse der Blots ohne Verwendung von Patientendaten wurden multivariate statistische Methoden verwendet. Ziel dieser Analysen war die Gruppierung der Blots allein nach den Informationen, die in den Blotmustern stecken. Mit der ersten Methode, der KA, können Ähnlichkeiten zwischen Objekten durch eine Projektion typischer Merkmale in einen zweidimensionalen Faktorraum gefunden werden. Diese Analyse ergab eine Gruppe, die zwar einen Teil der Magenkrebspatienten enthielt, die anderen Magenkrebs- und auch Ulkusseren waren jedoch gleichmäßig im faktoriellen Raum verteilt. Mit der zweiten Methode, dem hierarchisch agglomerativen Clusterverfahren, wurden jedoch fünf verwandte Gruppen an Blots entdeckt (Nummern 1-5 in [Abbildung 6](#)), die sich durch ähnliche Ag-Erkennungsmuster auszeichnen. Für jede Gruppe ist ein Blot mit den typischen Spotmustern dargestellt, die in der Abbildung mit Pfeilen markiert wurden. Die diagonale Spotserie konnte in den Gruppen 2 und 3 gefunden werden (Blots DU23, DU17), während eine typische Spotgruppe in den Clustern 2 und 5 zu sehen war (Blots DU23, GC05). Die Cluster 1 und 4 enthielten im Gegensatz zu den anderen Gruppen nur wenige Spots mit geringen Intensitäten und keines der oben erwähnten Charakteristika, unterschieden sich jedoch durch eine Reihe anderer Spots (Blots DU13, DU08). Keine der hier gefundenen Gruppen war mit den Erkrankungen der Patienten korreliert. Die Existenz von Patientengruppen mit ähnlichen Ag-Erkennungsmustern lässt allerdings darauf schließen, dass Gemeinsamkeiten der Immunreaktion oder der *H. pylori* Stämme vorliegen. Die globale Analyse schließt jedoch die Korrelation einzelner Spots mit den Erkrankungen nicht aus.

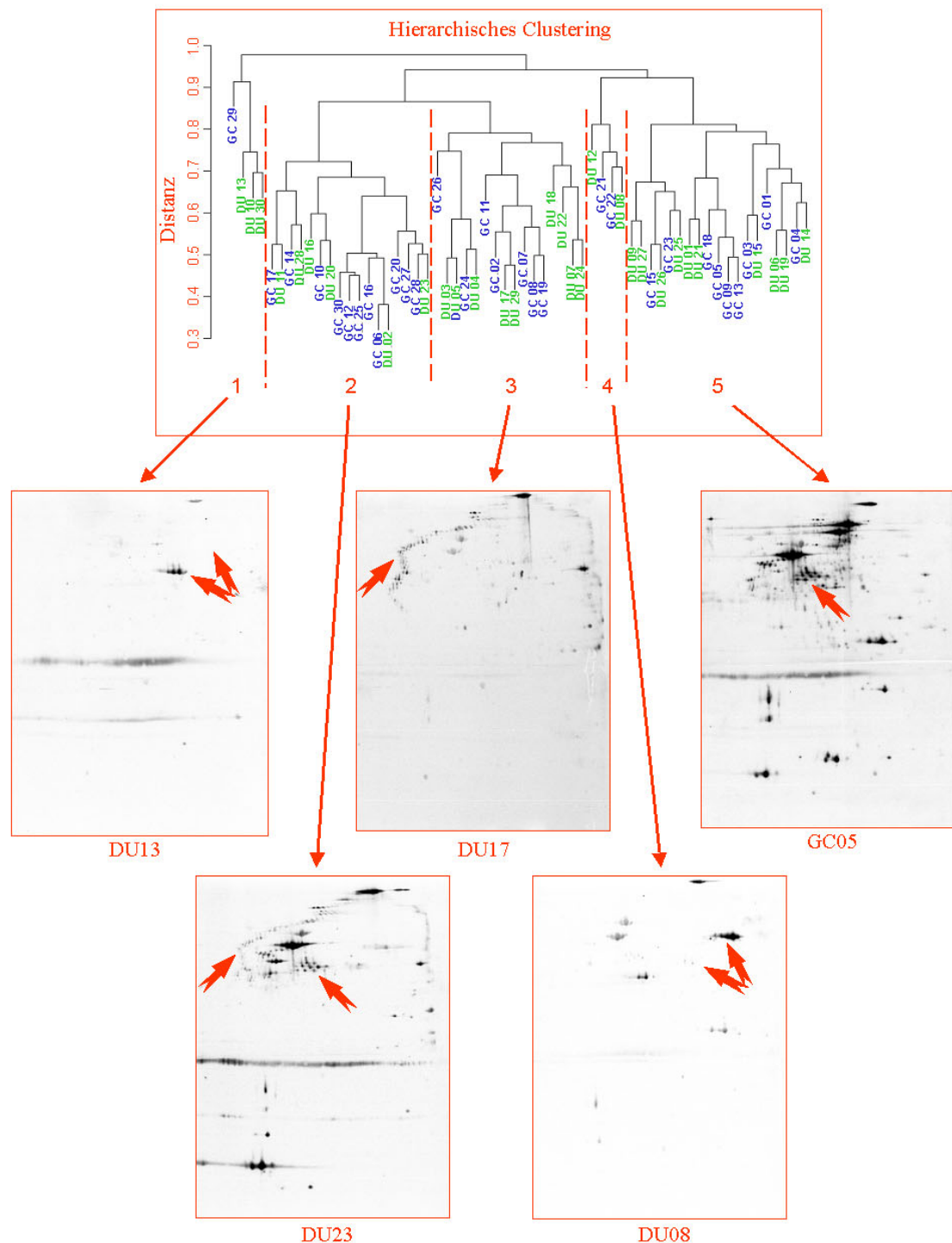


Abbildung 6: Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse und Beispiele von Immunoblots mit charakteristischen Spotmustern. Die Analyse basiert ausschließlich auf den Ag-Erkennungsmustern der 60 Blots. Die linke Skala zeigt die Distanz zwischen den einzelnen Blots an, d.h. je niedriger die waagerechten Verbindungslinien zwischen Blots ist, desto ähnlicher sind sich diese. Fünf gut erkennbare Gruppen von Blots wurden mit Nummern 1-5 beschriftet. Im unteren Teil ist für jede Gruppe ein Blot dargestellt, der typische Merkmale enthält (Pfeile, Erläuterungen im Text). Diese Blots geben einen guten Überblick über die Variabilität der Erkennungsmuster, die sich besonders in unterschiedlicher Anzahl und

Intensität von Spots bemerkbar macht. Alle Seren wurden mit dem Kürzel der Erkrankung (GC = Magenkrebs (blau) oder DU = Ulkus (grün)) beschriftet und durchnummeriert.

3.1.4 Erkrankungskorrelierte Antigene

Die Analyse von 30 einzelnen Patientenseren pro klinischer Gruppe ermöglichte die Verwendung eines univariaten statistischen Tests, des t-Tests. Dies ist eine Methode um mit definierter Sicherheit diejenigen Spots zu finden, die mit einer der Erkrankungen korrelieren. Diese Ag stellen diagnostische Markerandidaten für die jeweilige Erkrankung dar. Hierfür wurden die Patienten in zwei den Erkrankungen entsprechende Gruppen eingeteilt und t-Tests mit verschiedenen Signifikanzschwellen durchgeführt. Wie in [Tabelle 2](#) ersichtlich, führt die Verwendung unterschiedlicher Signifikanzkriterien zu sehr verschiedenen Ergebnissen. Wird ein einfacher Faktor als Signifikanzschwelle verwendet, liefert das eine wesentlich größere Anzahl in Magenkrebsblots stärker oder schwächer erkannter Spots als die statistischen Tests, die schärfere Kriterien darstellen. Dieses Resultat spiegelt die hohe Varianz der Daten wieder. Der t-Test hat den Vorteil, dass 1. die Varianz der Daten mit in die Analyse einbezogen wird und 2. die Zuverlässigkeit der Analyse abgeschätzt werden kann. Es wurde eine Signifikanzschwelle von $p < 0,01$ für unsere Analyse gewählt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die 14 bei Magenkrebs stärker erkannten Spots mit 99%-iger Sicherheit tatsächlich mit Magenkrebs korrelieren.

Tabelle 2: Vergleich verschiedener Korrelationsanalysen. Die Tabelle zeigt die je nach verwendeter Methode unterschiedliche Anzahl der erkrankungskorrelierten Ag. Bemerkenswert ist hierbei der Unterschied zwischen Analysen mithilfe eines simplen Faktors und den statistischen Analysen.

Intensität der Spoterkennung GC/DU	Anzahl an Spots bei Verwendung von:		Anzahl an Spots bei Verwendung des t-Tests		
	Faktor 2	Faktor 3	$p < 0,1$	$p < 0,05$	$p < 0,01$
stärker	315	192	144	78	14
schwächer	49	35	2	0	0

Interessanterweise wurden bei einer Signifikanz von $p < 0,01$ 14 Spots von den Magenkrebsseren (GC) stärker erkannt aber kein einziger Spot wurde stärker von den Seren der Ulkuspatienten (DU) detektiert. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, dass in Magenkrebsblots eine größere Anzahl Spots und höhere Intensitäten vorkommen. Die 14 Magenkrebs-korrelierten Spots sind in [Abbildung 7](#) mit Pfeilen markiert. Die Abbildung basiert auf dem Masterblot, der in PDQuest künstlich erzeugt wird und alle 611 Spots der Analyse enthält. Es handelt sich um ein virtuelles Bild mit Gauß-gefitteten Spots. Die Intensitäten der Spoterkennung der individuellen Seren sind mit schwarzen Balken dargestellt (bildnahe Boxen). Die äußeren Boxen zeigen jedoch die durchschnittlichen Spotintensitäten in den Erkrankungsgruppen an

(Erläuterungen s. Abbildung). Die differentiell erkannten Spots fallen in einen großen MG-Bereich (12-80 kD) aber einen recht engen pI Bereich (4,9-6,5).

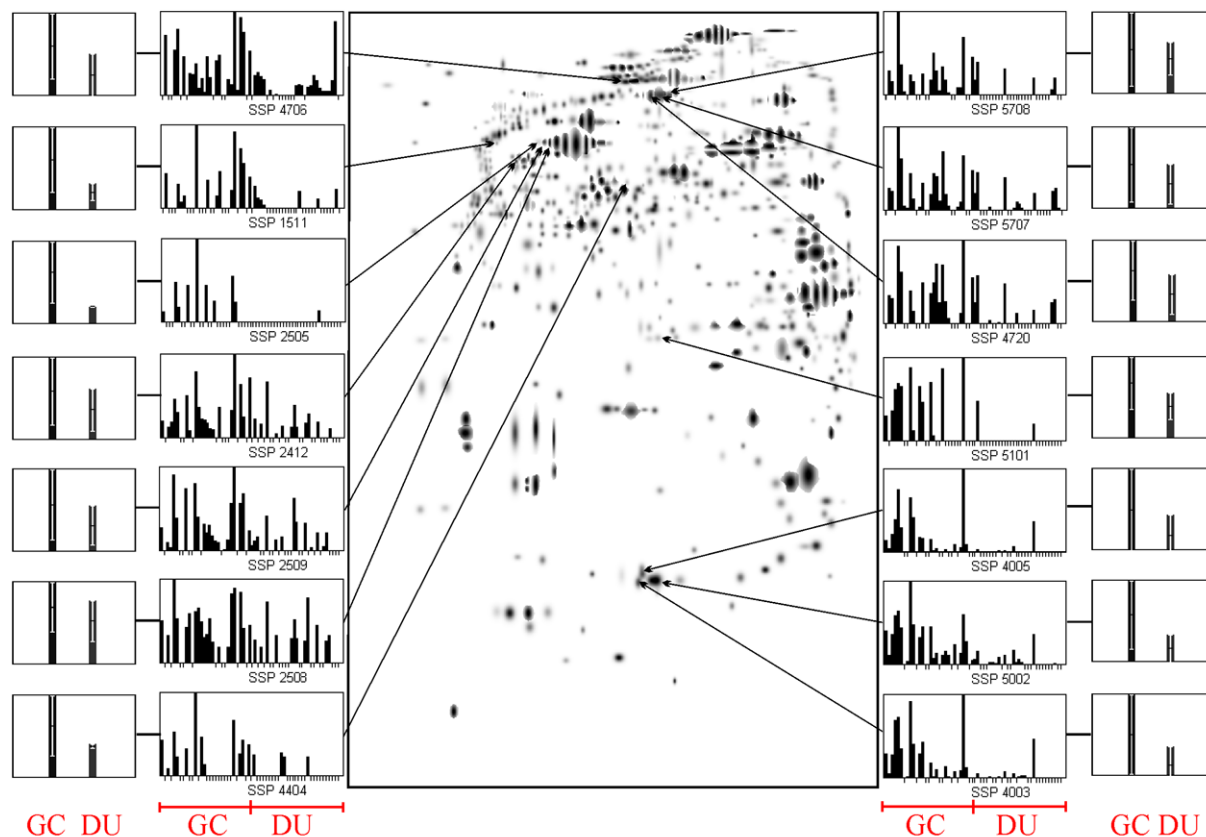


Abbildung 7: Masterblot mit den Spotintensitäten der 14 von Magenkrebsseren stärker erkannten Spots. Dieser virtuelle Blot enthält alle 611 Spots der 60 Blots der Analyse. Die 14 Magenkrebs-spezifischen Spots (t-Test, $p < 0,01$) sind mit Pfeilen markiert. Die bildnahen Kästchen enthalten die individuellen Spotintensitäten des jeweiligen Spots in den 60 Blots (30 links: GC=Magenkrebs, 30 rechts: DU= Ulkus). Die äußeren Boxen enthalten die Balken der Durchschnittsintensitäten (schwarzer Querbalken) und die Bereiche der Standardabweichungen (weiße Füllungen). Zu beachten ist, dass alle Intensitäten auf die Maximalintensität je Box normiert sind. SSP: automatisch generierte Spotnummer.

3.1.5 Einfluss der Patientenparameter

Da die Variabilität der Ag-Erkennungsmuster auch andere Ursachen als die Erkrankungen gehabt haben könnte, wurden alle bekannten Patientenparameter genauer untersucht. Die Patienten wurden nacheinander nach Geschlecht, Besiedlungsgrad bzw. Alter gruppiert und dann wurden t-Tests durchgeführt. Für die ersten beider Parameter ergaben sich keine Korrelationen ($p < 0,01$) mit Spots, was auch nicht zu erwarten war, da sich beide Erkrankungsgruppen in Bezug auf diese Parameter nicht signifikant unterschieden. Geschlecht und Besiedlungsgrad hatten also keinen Einfluss auf die Analyse. Anders sah es hingegen mit dem Alter der Patienten aus – die Magenkrebspatienten waren im Durchschnitt signifikant älter als die Ulkuspatienten – Alter und Erkrankung stellten also keine unabhängigen Variablen dar. Ein t-Test ($p < 0,01$) der 30 ältesten gegen die 30 jüngsten Patienten ergab jedoch keine Korrelationen. Im weiteren wurden

altersangepasste Subgruppen von 18 Magenkrebs- und 19 Ulkuspatienten verglichen (Altersunterschied mit $p = 0,07$ nicht mehr signifikant). Beim Vergleich dieser Erkrankungssubgruppen konnten neun (5 mit $p < 0,01$ und weitere vier mit $p < 0,05$) der 14 in der Gesamtanalyse mit Magenkrebs korrelierenden Spots eindeutig validiert werden. Die übrigen fünf Spots wurden bei dieser Analyse nicht als korrelierend gefunden (# in [Tabelle 3](#)) – hier könnte das Alter der Patienten einen Einfluss auf die Analyse gehabt haben. Da es sich aber um eine Untergruppe von nur 37 Patienten handelte, waren die Analysen nicht von so hoher Aussagekraft wie die der Gesamtanalyse mit allen 60 Seren.

3.1.6 Identifizierung der Spots

Die 14 von den Magenkrebsseren signifikant stärker erkannten Spots ([Abbildung 7](#)) wurden durch Mustervergleich bzw. MALDI-TOF MS identifiziert. Der Mustervergleich erfolgte durch Vergleichen von Spots und deren Abständen zu benachbarten Spots (lokale Spotmuster) auf den Blots mit denen des Referenzgels unserer 2-DE Datenbank. In den Fällen wo kein zugehöriger Spot gefunden werden konnte bzw. dieser noch nicht identifiziert worden war, wurde die Identifizierung aus präparativen Gelen mittels PMF durchgeführt. In [Tabelle 3](#) wurden die Ergebnisse der zehn Spots aufgelistet, die identifiziert werden konnten. Die anderen vier Spots konnten aufgrund der viel geringeren Empfindlichkeit der CBB G-250 Färbung im Vergleich zum Immunoblot nicht im Gel gefunden und somit auch nicht identifiziert werden. Die zehn identifizierten Spots enthielten Proteinspezies von vier verschiedenen Proteinen: AtpA, GroEL, GroES, und HyuA – alles bekannte *H. pylori* Ag aber keine Virulenzfaktoren. Die o.g. Spots sind in unserer 2-DE Datenbank als Magenkrebs-assoziierte Ag aufrufbar. Leider konnte die Antigenität von AtpA nicht bestätigt werden (s. Kapitel [3.2.4](#)).

Tabelle 3: Liste der identifizierten Magenkrebs-korrelierten Antigene.

Spot Nr. (SSP)	TIGR ^a Locus	Proteinname	Protein- spezies ^b	GC korreliert lt. Literatur? ^c
2412	HP1134 [§]	ATP synthase F1, subunit alpha (AtpA)	1/9	nicht erwähnt
2505 [#]	HP0010	Heat shock protein 60 (GroEL)	3/15	ja [38,81] nein [37]
2508	HP0010	Heat shock protein 60 (GroEL)		
2509*	HP0010	Heat shock protein 60 (GroEL)		
4003*	HP0011	Heat shock protein 10 (GroES)	3/3	nein [37]
4005*	HP0011	Heat shock protein 10 (GroES)		
5002	HP0011	Heat shock protein 10 (GroES)		
4720	HP0695	Hydantoin utilization protein A (HyuA)	3/3	ja [38]
5707	HP0695	Hydantoin utilization protein A (HyuA)		
5708* [#]	HP0695	Hydantoin utilization protein A (HyuA)		
1511 [#]	-	Nicht identifiziert	-	-
4404 [#]	-	Nicht identifiziert		
4706* [#]	-	Nicht identifiziert		
5101	-	Nicht identifiziert		

a – Genlocus lt. TIGR Datenbank für *H. pylori* 26695; b – Anzahl der Magenkrebs-korrelierten Proteinspezies (GC) im Verhältnis zu allen im Referenzgel gefundenen Spezies dieses Proteins; c – Alle Proteine sind bekannte *H. pylori* Ag. Referenzen für veröffentlichte Analysen bzgl. Magenkrebskorrelation wurden angegeben; # Das Alter der Patienten könnte die Signifikanz dieser Spots beeinflusst haben; * Diese fünf Spots wurden als hypothetischer serologischer Test verwendet (s. Kapitel 3.1.8). § Spot 2412 enthält auch GroEL – die Korrelation von AtpA zu Magenkrebs konnte somit nicht bestätigt werden (s. Kapitel 3.2.4).

3.1.7 Die Antigenität verschiedener Proteinspezies

Ein wesentlicher Vorteil der 2-DE ist die Separation von Proteinspezies, die sich in pI und/oder MG unterscheiden und z.B. durch PTM entstanden sein können. Die individuellen Spezies eines Proteins können sich in Hinsicht auf Immunogenität oder Antigenität unterscheiden. Zwei der vier verschiedenen Magenkrebs-korrelierten Ag zeigen einen solchen Effekt (s. [Tabelle 3](#)): GroEL und AtpA. Der Befund für ersteres Protein muss jedoch mit Vorsicht behandelt werden, da sich die Intensitäten der drei korrelierenden Spots in der Nähe des Detektionslimit befinden. Hier könnte eine Signifikanz nur „vorgetäuscht“ sein, da Intensitäten knapp unter dem Detektionslimit den Wert null erhielten. Dieser systematische Fehler beeinflusste die Mittelwerte der Spotintensitäten schwacher Spots prozentual stärker als diejenigen starker Spots. Für AtpA trifft dieser Fakt jedoch nicht zu, da der Magenkrebs-korrelierte Spot eine mittlere Intensität aufweist und weitere acht AtpA Spots nicht signifikant mit Magenkrebs korrelieren. Diese Proteinspezies könnte also aufgrund einer bestimmten Modifikation eine andere Immunogenität besitzen als die anderen AtpA Spezies, leider konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden,

wie die Untersuchung der Spotkompositionen in Kapitel 3.2.4 zeigte.

3.1.8 Ein hypothetischer serologischer Test

Um die diagnostische Relevanz der Ergebnisse einzuschätzen, wurde nach einer Untergruppe von Spots gesucht, die als Antigene für einen diagnostischen Test fungieren sollten. Es wurden verschiedene Kombinationen von Spots manuell zusammengestellt und geprüft, welche die meisten Magenkrebspatienten aus unserem Set von 60 Seren finden würden. Die folgenden fünf Spots lieferten die besten Ergebnisse: 2509, 4003, 4005, 4706 und 5708 (* in Tabelle 3). Mit dem Kriterium, dass mindestens drei der fünf Spots vom jeweiligen Prüfserum erkannt werden sollten, konnten die Magenkrebsfälle mit einer Sensitivität von 77% und einer Spezifität von 83% gefunden werden, d.h. 77% aller Magenkrebsseren wurden richtig erkannt und 83% aller Ulkusseren wurden korrekt als „nicht Magenkrebs“ erkannt.

3.2 Detaillierte Analysen von Massenspektren

3.2.1 Automatisierung des Identifizierungsprozesses

Aus einem großen Bereich eines *H. pylori* Lysat 2-DE Gels wurden 384 Spots in dreifacher Wiederholung automatisch ausgestochen, verdaut und mittels MALDI-TOF MS vermessen. Das automatische Prozessieren der Spektren führte zu einer Quote von 88% intern kalibrierten Spektren. Weitere 3% konnten manuell nachkalibriert werden, so dass letztlich 960 auswertbare Spektren zur Verfügung standen. Durch die Benutzung automatischer Datenbanksuchsysteme ist eine schnelle Identifizierung einer großen Anzahl an Spots möglich. Allerdings können Massenspektren sehr unterschiedliche Qualitäten aufweisen, so dass die Suchergebnisse stark von den verwendeten Suchparametern abhängen. Zur Optimierung der Suchen wurde deshalb ein Parameteroptimum für diesen Datensatz gesucht. Hierfür wurden ca. 6000 automatische Datenbanksuchen mit den Peaklisten, die mit S/N 5, 7 oder 10 erzeugt wurden, durchgeführt. Zusätzlich wurden verschiedene variable Modifikationen und Peptidmassentoleranzen getestet. Die folgenden Parameter produzierten für diesen Datensatz die höchsten Identifizierungsquoten: Peakdetektion mit S/N 7, fixe Methioninoxidation, 30 ppm Peptidmassentoleranz und maximal eine übersprungene Trypsinschnittstelle. Mit diesem Parameterset konnten 547 Spektren (= 57%) automatisch identifiziert werden. Durch die dreifache Wiederholung des Datensatzes wurden letztlich 75% aller Spots mindestens einmal mit signifikantem Score ($p < 0,05$) identifiziert. Die Verwendung nur des autolytischen Trypsinpeaks bei 2211,104 Da für die interne Einpunktkalibrierung führte zu einer Peptidmassengenauigkeit von 30 ppm. Die Fehlerverteilung zeigte einen Abfall in den negativen Bereich für kleinere Massen. Dies hätte durch einen zweiten Kalibrierpunkt verhindert werden können, leider enthielten aber viele Spektren keinen weiteren

geeigneten Peak, so dass die Einpunktkalibrierung einen guten Kompromiss für diesen Datensatz darstellte.

Ein interessanter Peak konnte u.a. im Spektrum von Spot 433d gefunden werden. Dessen Isotopenmuster hatte die für MALDI-TOF MS ungewöhnlichen Abstände von $m/z = 0,5$, d.h. er war vermutlich zweifach geladen. Auch der einfach geladene Peak war im Spektrum zu finden (m/z 2278,1 einfach und m/z 1139,5 zweifach geladen). Das zugehörige Peptid enthielt drei Histidine als potentielle Protonenakzeptoren für die zweite Ladung.

3.2.2 Überprüfung der Zuverlässigkeit der Identifizierungen

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der automatischen Identifizierungen wurde nach Widersprüchen zwischen den Identifizierungen der drei Wiederholungen eines Spots gesucht. Nur neun Spots (3%) wurden mit signifikanten aber widersprüchlichen Identifizierungsergebnissen gefunden. Bei genauerer Analyse des Sachverhaltes wurde gefunden, dass davon drei Widersprüche durch ungenaues Ausstechen in einer Gelregion mit hoher Spotdichte entstanden waren. Zwei Spots enthielten Komponenten von Nachbarspots, die hier als Hauptkomponenten identifiziert wurden. Weitere drei Spots enthielten ein Mix aus mehreren Proteinen, von denen mal das eine und mal das andere als Hauptkomponente identifiziert wurden. Nur ein einziges Spektrum wurde vom Datenbanksuchalgorithmus einem falschen Protein zugeordnet. Der Anteil fehlerhafter Identifizierungen liegt also in der Größenordnung der von Mascot angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) für signifikante Scores.

Eine weitere Möglichkeit die Ergebnisse zu validieren war der Vergleich der automatischen Ergebnisse mit einigen in den letzten Jahren am Institut manuell identifizierten Spots (Benutzung des Voyager Elite MALDI-TOF [36]). Hierfür wurden 28 Spots zufällig ausgewählt und deren Identifizierungsergebnisse, Mascotscores, Anzahl zugeordneter Peptide und Sequenzabdeckungen verglichen. Es wurden, abgesehen von der Peptidmassentoleranz, identische Suchparameter verwendet (automatisch: 30 ppm, manuell: 100 ppm). Diese Werte sind auf die unterschiedlichen Genauigkeiten der verwendeten Geräte zurückzuführen. Durchschnittlich intensiv gefärbte Spots lieferten vergleichbare Ergebnisse. Für die wesentlich interessanteren schwach gefärbten Spots (Proteingehalt nahe an der Nachweisgrenze) wurden allerdings mit der manuellen Methode bessere Ergebnisse erzielt. Bei manuellem Verdau und Messung konnten die Prozeduren zeitaufwendig für die individuellen Proben angepasst und somit letztlich eine höhere Sensitivität erreicht werden.

3.2.3 Verbesserung der Identifizierungsergebnisse

Für diesen Teil der Analysen wurde die neuentwickelte Version des MS-Screener eingesetzt.

Zuerst wurden Massen, die häufiger als in 5% der Spektren (>47 von 960 Spektren) auftauchten, eliminiert. Diese Massen wurden als Kontaminanten angesehen, die keine spotspezifischen Informationen enthielten. Sie sind mit der jeweiligen Häufigkeit in [Abbildung 8](#) dargestellt und in [Tabelle 4](#) mit ihren vermuteten Quellen aufgelistet. Insgesamt wurden 61 Kontaminantenmassen gefunden. Davon konnten die folgenden zugeordnet werden: 12x Trypsin, 12x Na⁺, K⁺ - Komplexe von α -cyano-4-Hydroxymizsäure (Matrix), 7x Isotopenpeaks, 4x Ausreißer des HDPR, 3x GroEL und die anderen Massen waren von unbekannter Herkunft. Interessanterweise wurden keine Keratinpeaks gefunden. Mit dem Entfernen der Kontaminanten aus dem Datensatz konnte die Identifizierungsquote um 3% auf 78% gesteigert werden. Zusätzlich wurde die Sicherheit der Identifizierungen für die meisten Spots erhöht. Eine Ausnahme bilden die GroEL Spots, da drei Peptide dieses Proteins zu den Kontaminanten gerechnet und aus dem Datensatz entfernt wurden. Obwohl dieses Protein „nur“ in 15 verschiedenen Spots identifiziert wurde (nur 3,9% aller Spots) wurden diese Massen in mehr als 6% der Spektren gefunden und somit irrtümlich zu den Kontaminanten gezählt.

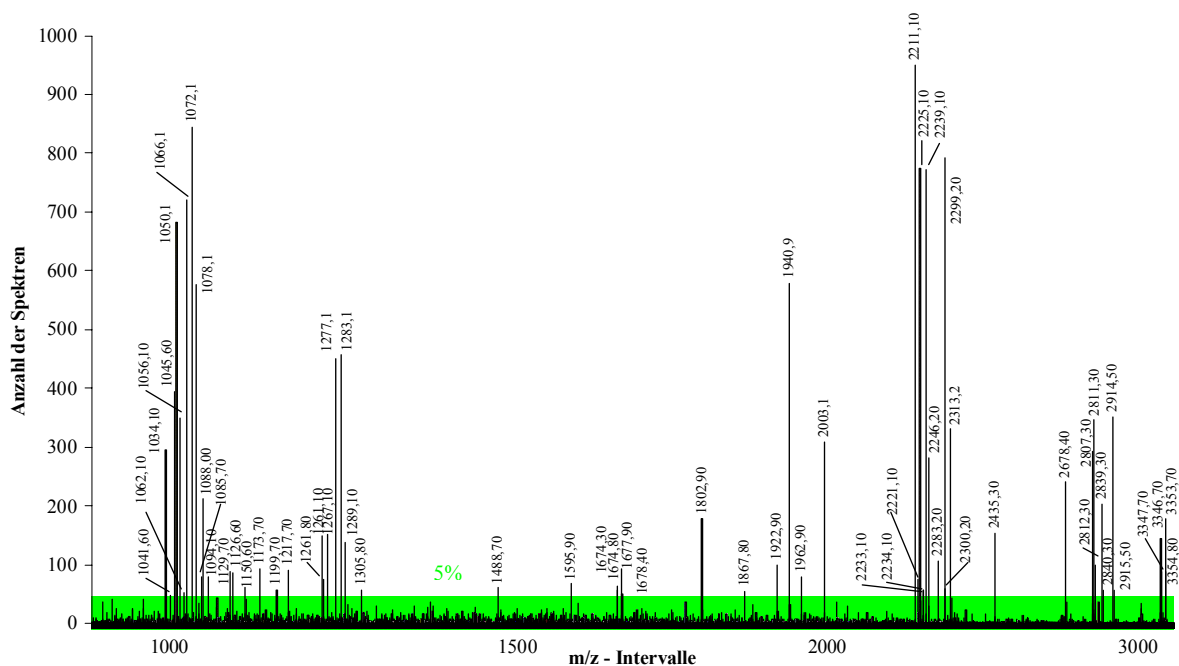


Abbildung 8: Kontaminantenpeaks im gesamten Datensatz. Die Höhe der Balken gibt die Anzahl der Spektren an, in denen die entsprechende Peakmasse vorkommt. Insgesamt 61 Massen wurden in mehr als 5% der Spektren gefunden (über dem grünschrattierten Bereich) und als Kontaminanten definiert. Die Peptidmassen wurden mit dem MS-Screener mit 30 ppm Toleranz intervallisiert und gezählt.

Tabelle 4: Liste der Kontaminantenmassen und deren mögliche Quellen.

m/z	Mögliche Quelle	m/z	Mögliche Quelle	m/z	Mögliche Quelle
1034,1	Matrix	1277,1	Matrix	2239,1	Trypsin
1041,6	-	1283,1	Matrix	2246,2	-
1045,6	Trypsin	1289,1	HDPR Ausreißer	2283,2	Trypsin
1050,1	Matrix	1305,8	-	2299,2	Trypsin
1056,1	Matrix	1488,7	GroEL	2300,2	Isotopenpeak
1062,1	HDPR Ausreißer	1595,9	GroEL	2313,2	-
1066,1	Matrix	1674,3	HDPR Ausreißer	2435,3	-
1072,1	Matrix	1674,8	-	2678,4	-
1078,1	Matrix	1677,9	-	2807,3	Trypsin
1085,7	-	1678,4	HDPR Ausreißer	2811,3	-
1088,0	Matrix	1802,9	-	2812,3	Isotopenpeak
1094,1	Matrix	1867,8	GroEL	2839,3	-
1126,6	Trypsin	1922,9	-	2840,3	Isotopenpeak
1129,7	-	1940,9	Trypsin	2914,5	Trypsin
1150,6	-	1962,9	-	2915,5	Isotopenpeak
1173,7	-	2003,1	-	3346,7	Trypsin
1199,7	-	2211,1	Trypsin	3347,7	Isotopenpeak
1217,7	-	2221,1	-	3353,7	-
1261,1	Matrix	2225,1	Trypsin	3354,8	Isotopenpeak
1261,8	-	2233,1	Trypsin		
1267,1	Matrix	2234,1	Isotopenpeak		

Alle Peaks, die häufiger als in 5% der Spektren auftraten, wurden als Kontaminanten definiert. Die Massen möglicher Matrixcluster wurden berechnet [82] und die autolytischen Trypsinmassen nach [59,83,84] zugeordnet. Die drei GroEL Peaks gehören zu den intensivsten Peaks im Spektrum des GroEL Hauptspots und wurden irrtümlich als Kontaminanten definiert, da sie in $\geq 5\%$ der Spektren auftraten. Beim automatischen Peaklabeln wurden insbesondere bei schwachen Peaks hoher Massen auch Isotopenpeaks gelabelt.

3.2.4 Untersuchung von *H. pylori* Antigenen

Die Ergebnisse des Vergleichs der Ag-Erkennungsmuster von Magenkrebs- und Ulkuspatienten mittels Immunoproteomics sind in Kapitel 3.1 ausführlich beschrieben worden. Für die Methode typisch sind die hohe Spezifität und Sensitivität, da AK der Patientenserum hochaffin an *H. pylori* Ag binden. Ein mittels 2-DE separierter Spot kann allerdings aus mehr als einem Protein bestehen – also mehrere Komponenten haben. Die hohe Sensitivität von Immunoproteomics macht eine genaue Untersuchung der Spotkomposition notwendig, da eventuell die Nebenkompone eines Spots von den AK erkannt werden könnte und mittels PMF oft nur die Hauptkomponente eines Spots identifiziert wird. In einem solchen Fall wäre das identifizierte Protein gar nicht das Ag.

Vierundzwanzig von früheren Studien als erkrankungskorreliert bekannte Ag von *H. pylori* 26695 [38,85] bzw. in Mäusen protektiv wirkende Ag [43] wurden für die Analyse ausgewählt (Tabelle 5). Die entsprechenden Spots mussten im CBB G-250 Gel angefärbt und zuordenbar sein. Für diese Studie kam mir die dreifache Wiederholung der Spotidentifizierungen zu Gute, so dass nur die reproduzierbar in den PMFs auftretenden Peaks ($\geq 2/3$ Spektren) untersucht werden mussten. Mithilfe des Programms MS-Screener und des hierarchischen Clusterverfahrens wurden: 1. weitere Proteine in den Spots identifiziert, 2. Peaks aus Proteinen, die in anderen Spots des Gels identifiziert wurden, zugeordnet (hierarchisches Clustering) und 3. mögliche Peptidmodifikationen gefunden (Datenbanksuchen). Um weitere Proteine in einem Spots per Datenbanksuche zu identifizieren wurden die der Hauptkomponente zugeordneten Massen gelöscht und die Suche wiederholt. Diese Methode führte allerdings nur in einem Fall (Spot 154) zum Erfolg, da übrig gebliebene Massen meist nicht zur eindeutigen Identifizierung ausreichten. Das hierarchische Clustering war dabei erfolgreicher. Spots, die im Dendrogramm nahe beieinander lagen und als verschiedene Proteine identifiziert wurden, waren Kandidaten für eine nähere Analyse. Durch Vergleich der Peaklisten dieser Spots wurden die identischen Massen in den betreffenden Spots gefunden, die zur gemeinsamen Gruppierung geführt hatten. In vermutlich acht Spots waren somit Peaks anderer Proteine vorhanden, die also Nebenkomponten waren. Hierbei konnte allerdings nicht unterschieden werden, ob es sich bei der Hauptkomponente des einen Spots und der Nebenkomponten des anderen Spots um die gleichen Proteinspezies handelte. Weiterhin wurden nicht-zugeordnete Peptidmassen der Spektren mittels Datenbanksuchen mit vielen möglichen Modifikationen (Deamidierung (N, Q), Methylester (D, E), N-Acetylierung (Protein), Propionamid (C), N-terminales Pyroglutamin (Q), Natriumaddukte (D, E) sowie zwei übersprungene Trypsinschnittstellen) untersucht. Für die Spots mit übrig gebliebenen, also nicht erklärten Peaks, wurde dieser Fakt in der Tabelle vermerkt. Solche Peaks können in Zukunft per MS/MS genauer untersucht werden, falls die Intensität hierfür ausreicht.

Die Ergebnisse dieser gesamten Prozedur stellten sich folgendermaßen dar. Insgesamt sechs Ag enthielten keine reproduzierbaren Peaks, die nicht zum identifizierten Protein zugeordnet werden konnten. Mit Bezug auf die Empfindlichkeit der verwendeten Methode konnte bei diesen Spots angenommen werden, dass sie keine Nebenkomponten enthielten. Neun Spots enthielten Peaks die nicht zu anderen Proteinen (aus Nachbarspots oder durch Spots die im Clusterdendrogramm nahe lagen) zugeordnet werden konnten. Diese könnten von seltenen Peptidmodifikationen (die nicht mit den Identifizierungsprogrammen gesucht werden können) stammen, durch unspezifische Trypsinschnitte oder unbekannte Nebenkomponten verursacht worden sein. In den verbleibenden neun Spots wurden Peaks gefunden, die vermutlich aus anderen Proteinen stammten, sechs davon aus direkt benachbarten Spots. Abgesehen von zwei

Proteinen (HP1533, HP0380) sind die anderen sieben bekannte *H. pylori* Ag und wurden im folgenden näher untersucht. Hierzu wurde in den Immunoblots nachgesehen, ob die betreffenden Spots immer gemeinsam mit den Hauptspots ihrer Nebenkomponten detektiert wurden. Diese Analyse brachte Hinweise, dass dies bei drei Spots der Fall war und bei jenen die Ag Erkennung durch die Nebenkomponten verursacht sein könnte (Spots 154, 278, 279). Bei den anderen vier Spots war die Ag-Erkennung unabhängig von der Detektion der Hauptspots der jeweiligen Nebenkomponten – die Antigenität dieser Spots wurden vermutlich nicht durch diese Nebenkomponten beeinflusst. In der eben beschriebenen Analyse musste allerdings wieder die Proteinspezies-Ebene verlassen werden, d.h. die Aussagen treffen nur zu, wenn bei diesen Spots keinen Unterschied zwischen der Antigenität der Proteinspezies als Nebenkomponten und der (möglicherweise anderen) Proteinspezies des entsprechenden Hauptspots gab.

Das bekannte Ag GroEL (HP0010) wurde in 15 verschiedenen Spots unseres Datensets identifiziert (s. Kapitel 3.2.5.1). Die Untersuchung der Antigenität der einzelnen Proteinspezies in den Immunoblots zeigte, dass alle 15 immer gleichzeitig von den Patientenseren detektiert wurden. Bei der Analyse der 24 Spots im Datensatz, die drei der fünf intensivsten GroEL Peaks enthielten (Tabelle 6), konnte festgestellt werden, dass alle bis auf drei (Spots 313, 314, 372) immer gleichzeitig erkannt wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese 21 Spots tatsächlich GroEL als Haupt- oder Nebenkomponten enthielten. Ebenso gab es keine Hinweise auf eine differentielle Antigenität bzw. Immunogenität einzelner GroEL Spezies. Für Spot 154 (SSP2412) gab es in der Immunoblotanalyse Hinweise, dass nur diese AtpA Spezies signifikant stärker von Magenkrebsseren erkannt wurde (s. Kapitel 3.1.7). Hier wurde jetzt herausgefunden, dass dieser Spot einen Mix aus AtpA (HP1134) und GroEL (HP0010) darstellt und vermutlich keine differentielle Antigenität verschiedener AtpA Proteinspezies vorliegt (Tabelle 5). Die Magenkrebs-Korrelation könnte von einer der beiden Spotkomponenten stammen, von welcher konnte hier allerdings nicht entschieden werden.

Tabelle 5: Untersuchung der Spotkomposition serumreaktiver Spots

Spot Nr.	TIGR Locus	Kurzname	Nebenkomponenten
114	HP0072	UreB	unbekannte Peaks
125 [§]	HP0695	HyuA	keine gefunden
126 [§]	HP0695	HyuA	unbekannte Peaks
133	HP0192	FrdA	keine gefunden
154 [§]	HP1134	AtpA	Mix mit HP0010 (GroEL)*
163	HP0010	GroEL	unbekannte Peaks
189	HP0875	KatA	unbekannte Peaks
204	HP1205	TufB	Nebenkomponente HP1132
225	HP0010	GroEL	keine gefunden
265	HP0224 [#]	MsrA	Nebenkomponente HP1012
266	HP0224 [#]	MsrA	Nebenkomponente HP0380
267	HP0224 [#]	MsrA	Nebenkomponente HP0027
278	HP1012	PqqE	Nebenkomponente HP0224*
279	HP1104	Cad	Nebenkomponente HP0224*
287	HP1104	Cad	Nebenkomponente HP1533
338	HP1152	FfH	keine gefunden
346	HP0537	Cag16	unbekannte Peaks
384	HP1562	CeuE	keine gefunden
433	HP0410	HpaA	keine gefunden
436	HP0073	UreA	unbekannte Peaks
439	HP0073	UreA	unbekannte Peaks
442	HP1564	(omp)	Nebenkomponente HP0073
445	HP0231	hypothetisch	unbekannte Peaks
455	HP0175	(cbf 2)	unbekannte Peaks

Die aufgelisteten Spots sind bekannte Ag von *H. pylori* [38,43,85]. Mit [§] markierte Spots gehören zu den 14 signifikant stärker von Magenkrebspatientenseren erkannten Ag (s. Kapitel 3.1.4). Loci markiert mit [#] wurden bei [38] als HP0027 identifiziert (hohe Spotdichte in dieser Region). Die unbekannten Peaks sind in mindestens zwei der drei Replikate aufgetreten und konnten weder zur Hauptkomponente des Spots noch zum Protein eines anderen Spots, der im Dendrogramm in der Nähe lag, zugeordnet werden. „Keine gefunden“ bedeutet, dass alle reproduzierbaren Peaks der Hauptkomponente zugeordnet werden konnten. * diese Nebenkomponenten haben wahrscheinlich die Antigenität des Spots beeinflusst (Erläuterungen im Text).

3.2.5 Proteinspezies in 2-DE Gelen

3.2.5.1 Verteilung von GroEL Spezies

Ein Vorteil der 2-DE Technik ist die Auftrennung einzelner Proteinspezies, vorausgesetzt diese unterscheiden sich in pI bzw. MG. Somit können mehrere unterschiedlich modifizierte Expressionsprodukte von einem ORF in Form mehrerer Spots in Erscheinung treten. Beispiele für dieses Phänomen sind die folgenden Proteine: Translation Elongation Factor EF-Tu (4

Spots), Catalase (5 Spots), Alkyl Hydroperoxide Reductase (8 Spots), Urease alpha-Subunit (9 Spots) und GroEL (15 Spots). Im Durchschnitt des gesamten Datensatzes wurden 1,6 Proteinspezies pro ORF gefunden. Mit 15 verschiedenen Spots trat GroEL am häufigsten auf ([Abbildung 9](#)). Interessanterweise kamen diese Spots in drei Gruppen vor: eine Gruppe um den Hauptspot (5 + 2 Spots), eine Gruppe mit niedrigerem MG und saurerem pI (2 Spots) und eine Gruppe mit niedrigerem MG und basischerem pI (6 Spots). Beim Vergleich der Sequenzabdeckungen mit dem Hauptspot wurde festgestellt, dass die zweite Gruppe möglicherweise N-terminal verkürzt ist (das Peptid mit AS 13-20 wurden nicht gefunden) während die letzte Gruppe vermutlich C-terminal verkürzt ist (7 Peptide mit AS 425-522 fehlen). Die theoretisch berechneten MG und pI Werte für die verkürzten Formen waren dem Laufverhalten der entsprechenden Spots sehr ähnlich.

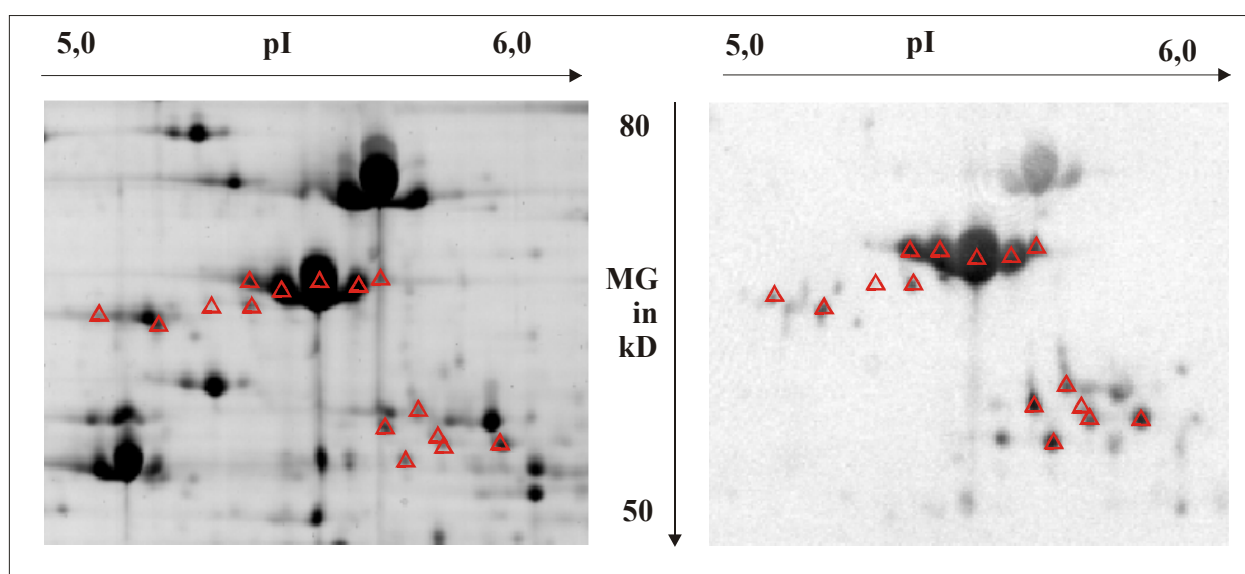


Abbildung 9: Verteilung von GroEL Proteinspezies in einem 2-DE Gel und Immunoblot. Das Gel (links) wurde mit CBB G-250 gefärbt und der Immunoblot (rechts) mit einem Magenkrebsserum inkubiert. Die roten Dreiecke zeigen die 15 Spots, deren Hauptkomponente GroEL darstellt. Alle diese Spots wurden immer gemeinsam von den Serum-AK erkannt.

Im folgenden wurde die Verteilung von GroEL im Gel noch weiter analysiert, indem die Peaklisten nach „GroEL-typischen“ Massen durchsucht wurden (s. auch [86]). Wurden die Peaklisten des Datensatzes nach dem intensivsten Peak des Hauptspots (1595,9 Da) durchsucht, konnte dieser in 33 verschiedenen Spots gefunden werden. Die Anwendung des strengeren Kriteriums, dass mindestens drei der fünf intensivsten Peaks (1595,9; 947,5; 1867,8; 1488,7; 1401,6) gefunden werden sollten, brachte immer noch 24 Spots. Drei dieser Massen gehören auch der Kontaminantenliste an (1595,9; 1867,8; 1488,7), d.h. diese wurden in 7, 6 bzw. 6% der Spektren gefunden. Die anderen beiden wurden nur in 4% der Spektren gefunden und sind somit nicht als Kontaminanten definiert worden. Die möglichen GroEL Peptide waren weit über das Gel verteilt, jedoch unterschied sich die Verteilung von Gel zu Gel. In den Gelen A, B und D

wurden 21, 12 bzw. 13 Spots mit drei der fünf GroEL Peaks gefunden ([Tabelle 6](#)).

Tabelle 6: Verteilung von GroEL Peaks.

Spot Nr.	GroEL Peaks		
	Gel A	Gel B	Gel D
154	x o	-	x
157	x	x	x
158	x	-	-
159	x	-	-
160	x	-	-
161	x	-	x
162	x	-	x
163	x	x	x
164	x	x	x
168	x	x	x
206	x	-	o
218	x	-	x
223	x o	o	o
224	-	x o	o
225	x	x	x
226	x	x	x
227	o	x	o
231	-	x	-
232	x	x	x
233	x	x	x
234	x	x	x
313	x	o	-
314	x o	o	o
372	x	-	-

x – Spots in den entsprechenden Gelen enthalten drei der fünf intensivsten GroEL Peaks; gestreift hinterlegt – Spots, die eindeutig mit GroEL als Hauptkomponente identifiziert wurden; o – diese Spots enthalten ein anderes Protein als Hauptkomponente (Spot 154 ist in Gel A ein Mix aus zwei Proteinen); - Spots wurden nicht identifiziert. Die Suche wurde mit dem MS-Screener mit dem Datensatz inklusive Kontaminanten durchgeführt.

3.2.5.2 Weitere Beispiele für Proteinspezies

Dimere von Alkyl Hydroperoxide Reductase

Der Spot 312 wurde als Alkyl Hydroperoxide Reductase identifiziert. Das sichtbare MG im Gel war allerdings etwa doppelt so groß wie das theoretische MG laut Datenbank. Ein weiterer Spot (413) mit dem korrekten MG wurde gefunden und ebenfalls als dieses Protein identifiziert. Daher konnte vermutet werden, dass es sich bei Spot 312 um Dimere des Spots 413 handeln

könnte. Beim Vergleich der Sequenzabdeckungen in den PMF wurden Unterschiede festgestellt ([Abbildung 10](#)). Beide im Protein vorkommenden Cysteine (AS 49 und 169) wurden im PMF des Hauptspots (413) zugeordnet und konnten nicht in Spot 312 gefunden werden. Das Peptid mit AS 44-58/59 wurde mit den folgenden Modifikationen im Hauptspot gefunden: Propionamid (1816,8 Da), eine übersprungene Spaltstelle und Propionamid (1973,0 Da) und ein zusätzlicher Methylester (1987,0 Da). Beide Modifikationen sind vermutlich Aufarbeitungsartefakte: Propionamid entsteht durch die Reaktion von Cystein mit unpolymerisiertem Acrylamid des Gels und Methylester an Aspartat oder Glutamat entstehen durch die fünf Tage dauernde CBB G-250 Färbung in methanolhaltiger Lösung. Das Peptid der AS 155-147 mit oxidiertem Methionin und Propionamid (2383,1 Da) wurde ebenfalls gefunden. Die Methioninoxidation ist auch ein typischer Aufarbeitungsartefakt. Zur Sicherheit wurden die Sequenzen der beider Peaks 1973,0 und 2383,1 mittels MS/MS bestätigt. Wegen der wesentlich niedrigeren Peakintensitäten des PMF von Spot 312 könnten schwache Peaks von Spot 413 nicht detektierbar sein, der Peak bei 1973,0 Da war allerdings intensiver als der Peak bei 1649,8 Da und wäre somit auf jeden Fall detektierbar gewesen. Aus diesen Fakten folgte, dass das Cystein-49 enthaltende Peptide nicht in Spot 312 gefunden werden konnte und deshalb vermutlich in die Disulfidverbrückung der Dimere involviert sein könnte. Da der zweite cysteinhaltige Peak im Rauschen vom PMF des Spots 312 versteckt sein könnte, war die Entscheidung, ob es sich um Hetero- oder Homodimere handelte, nicht möglich.

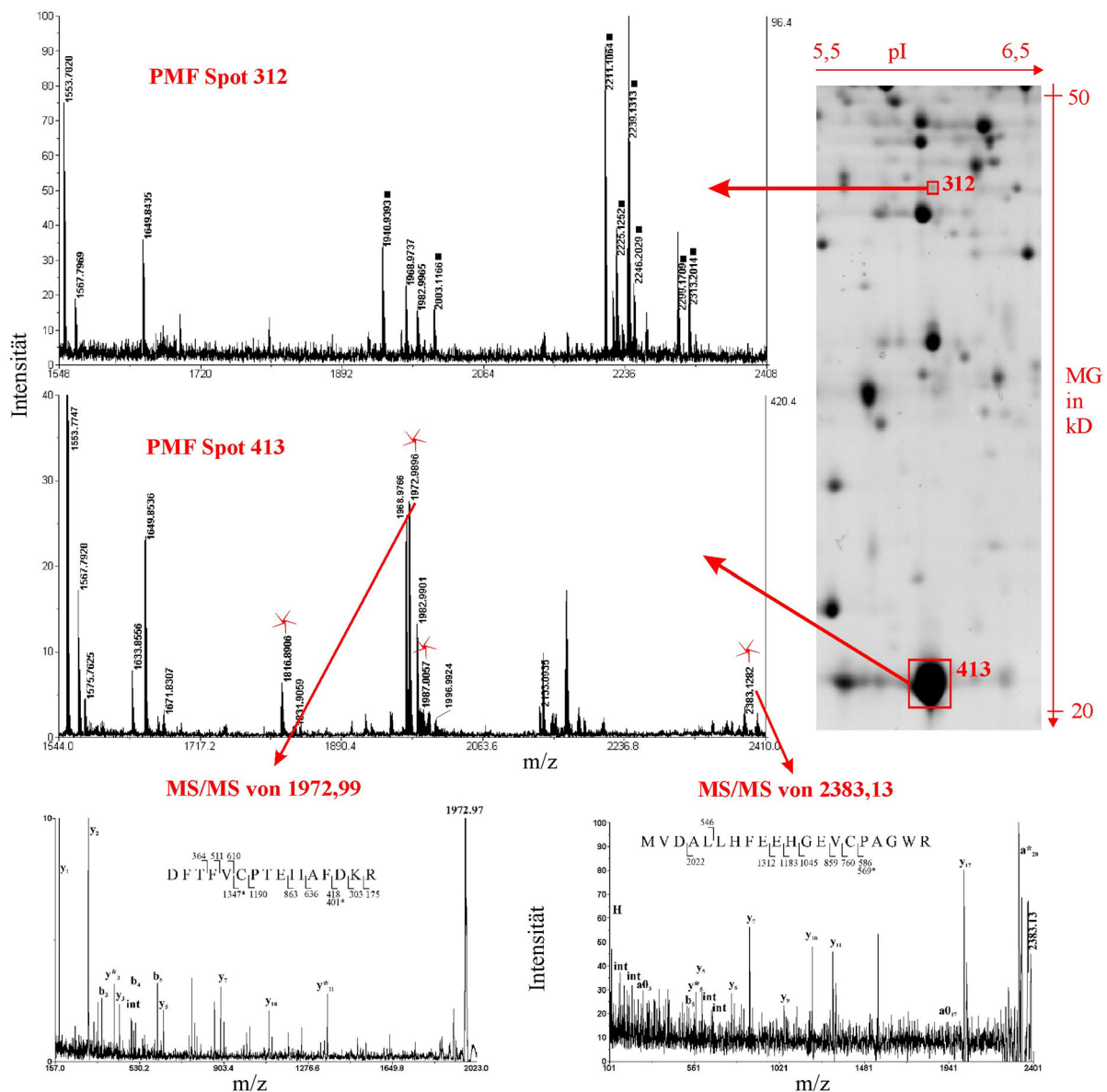


Abbildung 10: Ein Protein und sein Dimer. Ein Sektor des CBB G-250 gefärbten 2-DE Gels ist oben rechts zu sehen. Spot 312 enthält Dimere des Proteins aus Spot 413. In beiden Spots wurde Alkyl Hydroperoxide Reductase mit Sequenzabdeckungen von 48 bzw., 72% identifiziert (PMF Spektren links vom Gel). Die Sterne markieren die cysteinhaltigen Peptide, die nicht im Dimer detektiert wurden (Erläuterungen siehe Text). Die schwarzen Quadrate markieren Kontaminantenmassen im oberen Spektrum, die auftraten weil dieses Spektrum insgesamt sehr geringe Intensität aufwies. Zwei cysteinhaltige Peptide wurden mittels MALDI-TOF/TOF mit Mascotscores, die extensive Homologie indizieren, bestätigt (untere MS/MS Spektren). Die gefundenen Fragmente sind im Spektrum gelabelt und die y und b-Serien sind in der Sequenz markiert. Ein * markiert einen Verlust von NH_3 , eine 0 den Verlust an H_2O und int zeigt ein internes Fragment an.

Zwei γ -Glutamyltranspeptidase Fragmente

Ein weiteres Paar Spots mit unterschiedlichem MG und der gleichen Identifizierung (γ -Glutamyltranspeptidase) sind Spots 347 und 494. Durch Vergleich der Sequenzabdeckungen der beiden PMF konnte vermutet werden, dass es sich um zwei Fragmente des Proteins handelt,

deren Sequenzen sich gegenseitig ausschließen. Spot 347 deckte bis AS 368 ab und Spot 494 ab AS 427. Im Bereich zwischen den AS 369-426 wurde in beiden Spots kein Peptidmasse zugeordnet – hier konnte also die Schnittstelle vermutet werden. Bei Annahme der Schnittstelle bei AS 370 resultierten vergleichbare pI und MG Werte für die Berechnung und das Laufverhalten der beiden Fragmente (Angaben als pI/MG): Spot 347: im Gel 9,0/40,0 und theoretisch 9,5/39,8; Spot 494: im Gel 6,7/20,0 und theoretisch 6,3/21,0. Ein Spot mit dem ungeschnittenen Protein (theoretisch bei 61,2 kD) wurde nicht gefunden. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass der gesamte Gehalt an γ -Glutamyltranspeptidase in zwei Teile zerschnitten wurde.

3.2.6 Suche nach weiteren Spotkomponenten mittels Korrespondenzanalyse

Um Spotkomponenten in größeren Datensätzen zu finden wurde von uns die Software CorrAn weiterentwickelt, die es nun ermöglichte durch interaktives Setzen von Schwellen den Datensatz zu reduzieren und durch Wiederholen der KA schrittweise neue Zusammenhänge zwischen Spots zu finden. Die KA unter Verwendung des gesamten Datensatzes brachte u.a. eine Gruppe von fünf Spots zum Vorschein (Gruppe 1 in [Abbildung 11](#) oben), die von allen anderen Spots klar separiert lagen. Diese Spots waren auch im 2-DE Gel nahe beieinander liegend und enthielten alle das Protein Catalase. Im gesamten Gel gab es keinen weiteren Spot, der Catalase enthielt. Da es in der KA möglich ist, Objekte und Merkmale in denselben Faktorraum zu projizieren, konnten auch die acht charakteristischen Massen dieser Spotgruppe gefunden werden. Alle acht Massen konnten zu Catalase zugeordnet werden. Um weitere Spots mit Ähnlichkeiten in ihren PMFs zu finden, wurden die Massen des Datensatzes, die nur geringe Beiträge zum Clustern lieferten, durch manuelles Setzen von Schwellen gelöscht. Ein Beispiel für ein neu auftauchendes Spotcluster nach erneuter KA mit reduziertem Datensatz ist die Gruppe 2 in [Abbildung 11](#) unten. In beiden Spots wurden verschiedene Proteine identifiziert (Fumarase und Isocitrate Dehydrogenase). Der Grund, dass sie in einem Cluster gefunden wurden, war, dass beide Proteine im jeweils anderen Spot zusätzlich als Nebenkomponten auftraten. Die iterative Variante der KA ermöglicht also das Finden von Nebenkomponten in Spots ohne diese identifizieren zu müssen.

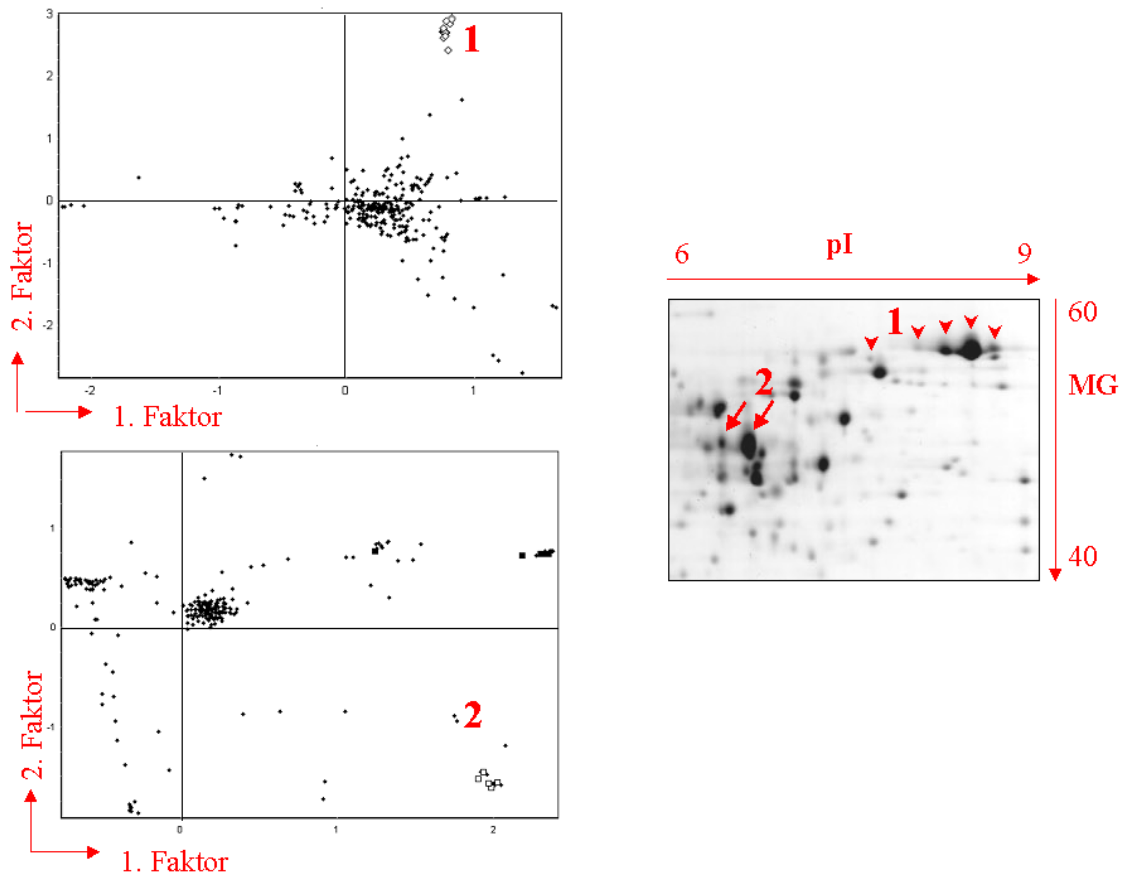


Abbildung 11: Ergebnisse der Korrespondenzanalyse. Links sind die zweidimensionalen Faktorräume eines aus 284 PMF Spektren bestehenden Datensatzes dargestellt. Links oben: Faktorraum mit gesamter Datenmatrix (284 Spots x 1888 Massen). Links unten: Faktorraum nach dem Löschen der Massen mit kleinen Clusterbeiträgen aus der Datenmatrix (284 Spots x 94 Massen). Rechts: Gelsektor eines CBB G-250 gefärbten *H. pylori* Gels. Die Spotgruppen 1 und 2 sind jeweils im Faktorraum und im Gel markiert. Gefüllte Punkte – Spots, ungefüllte Vierecke – charakteristische Massen.

3.2.7 Vervollständigung des *H. pylori* Proteoms

Ein zusätzlicher Aspekt dieser Arbeit war die Vervollständigung unserer institutseigenen Proteomdatenbank von *H. pylori* 26695. Mit dieser Studie wurden insgesamt 298 Spots (78% aller gemessenen Spots) identifiziert, die insgesamt 183 verschiedene ORFs repräsentierten. Vierundzwanzig ORFs davon sind neu und wurden in die Datenbank übernommen. Bei vier Spots stehen die Identifizierungen im Widerspruch zu den manuellen Ergebnissen, auf denen die Datenbankeinträge bisher ausschließlich beruhten. Die Gründe hierfür wurden in Toleranzen beim Ausstechen der Spots in Regionen hoher Spotdichte oder in Spots, die Proteingemische enthalten, vermutet. Eine Liste dieser neuen Proteine findet sich in [87].

3.2.8 Identifizierung von in-vivo exprimierten Proteinen von *S. enterica*

Aus Blinddärmen infizierter Mäuse gewonnene und mittels FACS sortierte Salmonellen wurden

aufgearbeitet und deren Proteine mittels hochauflösender 2-DE aufgetrennt. Zur Untersuchung der Stoffwechselaktivitäten in-vivo und zur Suche von Virulenzfaktoren war die Zielstellung des Projektes möglichst viele Proteine schnell und zuverlässig zu identifizieren. Da im FACS fluoreszenzmarkierte Einzelzellen sortiert werden, ist die Probenmenge begrenzt. Aus diesem Grunde waren im CBB G-250 gefärbten Gel nur knapp 200 oft schwach gefärbte Spots zu sehen. Manuell ausgestochen und verdaut wurden 194 verschiedene Spots und mit dem MALDI-TOF/TOF gemessen. Für jeden Spot wurde ein PMF aufgenommen und jeweils für die drei intensivsten Peaks zusätzliche Sequenzinformationen mittels MS/MS gewonnen. Ein kritischer Punkt bei der Probenaufarbeitung war das Auskristallisieren der Matrix mit den Probenmolekülen auf der MALDI-Platte. Hierfür ist das Verhältnis von Matrix zu Probe entscheidend, da nur gute Kristalle intensive Spektren liefern. Aus diesem Grund wurde ein Großteil der Proben in zwei verschiedenen Verhältnissen aufgetragen und dann jeweils das bessere Spektrum zur Analyse verwendet. Insgesamt konnten in diesem Datensatz 171 Spots (= 88%) identifiziert werden. Dieser hohe Anteil war nur durch die zu jedem PMF aufgenommenen MS/MS Spektren möglich. Selbst bei schwachen Spots gab es oft Peaks, deren Intensität für die MS/MS Analyse ausreichte. Bei einem Teil der Daten wurden die Identifizierungsergebnisse der PMF + MS/MS Spektren mit denen der reinen PMF Spektren verglichen, um die Bedeutung der MS/MS Spektren für die Spotidentifizierungen abzuschätzen. Von 56 Spots konnten mittels PMF nur 19 (= 34%) identifiziert werden. Bei zusätzlicher Verwendung der MS/MS Spektren wurden 37 (= 68%), also fast doppelt so viele identifiziert. Die FACS Sortierung der GFP markierten *S. enterica* Proteine war sehr effizient, da im gesamten Datensatz nur ein Mausprotein und sieben Proteine, die vermutlich von *E. coli* stammen, gefunden wurden. Die eindeutige Unterscheidung zwischen Proteinen von *S. enterica* und *E. coli* war nicht immer möglich, da große Sequenzhomologien bestehen und mit PMFs immer nur ein Teil der Sequenz abgedeckt wird.

3.3 Immunopräzipitation von *H. pylori* Antigenen

3.3.1 Abschätzung der nötigen IgG Menge für die Immunopräzipitation

Den IP Versuchen sind durch die geringe Menge an wertvollen Patientenseren von 250-500 µl enge Grenzen gesetzt. Aus diesem Grunde wurde in Kapitel 1.3.2 eine Abschätzung vorgenommen, welche Menge an AK nötig sei, um eine ausreichend große Menge an Ag zu präzipitieren. Danach können mit 500 µl Serum bis zu 65 µg Ag präzipitiert werden. Dies ist wenig, aber vorausgesetzt die Ausbeute wäre groß genug, könnte diese Menge z.B. für die Auftrennung der Präzipitate mit kleinen 2-DE Gelen ausreichen.

Die methodische Entwicklung der IP erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden *H.*

pylori spezifische AK angereichert, die dann an Protein-G Sepharose gebunden und kovalent gekoppelt wurden. Die eigentliche IP mit Bakterienlysat erfolgte im zweiten Schritt, wobei die präzipitierten Ag zur Optimierung der Methode vorerst mit 1-DE aufgetrennt wurden.

3.3.2 Affinitätsreinigung *H. pylori* spezifischer Antikörper

3.3.2.1 Affinitätsreinigung mittels Nitrocellulosepartikel

In diesem Ansatz wurden die *H. pylori* spezifischen AK aus dem Serum mittels an frisch hergestellten NC-Partikel gebundenem *H. pylori* Lysat aufgereinigt. Hierzu wurde in einer Reihe von Versuchen die Methode optimiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte letztlich in PBS, da der RIPA Puffer (s. Kap. 2.3.1) die Bindung der Lysatproteine an die NC-Partikel verhinderte. Für die Lyse wurden die Volumina an PBS und die Ultraschallparameter optimiert. Nach der Bindung der Bakterienproteine an die NC-Partikel und dem Wegwaschen überschüssiger Proteine wurde eine Inkubation mit Testserum durchgeführt. Die AK banden in diesem Schritt an die Bakterien-Ag. Im nächsten Schritt wurde das Serum gewaschen und die *H. pylori* spezifischen AK eluiert. Für diese Prozedur wurden die Lysatverdünnungen, Waschschritte, Inkubationszeiten und Serumverdünnungen optimiert. Die Elution der AK wurde mit sauren und basischen Puffern sowie solchen mit hoher und niedriger Ionenstärke getestet. Die besten Elutionsergebnisse konnten unter sauren Bedingungen erzielt werden (Elution Buffer aus dem SeizeX Kit). Da dieser Elutionspuffer durch den Gehalt an primären Aminen die kovalente Koppelung der IgG an die Protein-G Sepharose stört, mussten die Eluate umgepuffert werden. Hierzu wurden mit BSA abgesättigte Ultrafree Filter mit einem cut-off von 30 kD verwendet (die AK Menge im Durchlauf war sehr gering). Die als Alternative getestete TCA-Fällung hatte zu hohe Verluste, da die Proteinkonzentrationen sehr gering waren. Die Eluate wurden mit 1-DE Immunoblots auf das Vorhandensein von humanen AK in den Elutionsfraktionen getestet. Mittels ELISA wurden Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten für die *H. pylori* spezifischen AK bestimmt (Abbildung 12). Bei der Inkubation mit der NC wurden ca. 80% der *H. pylori* spezifischen AK gebunden. An den gesamt-IgG OD-Werten fiel auf, dass sich die Konzentration an gesamt-IgG in den Seren mit der Inkubation kaum änderte – es wurde also nur ein geringer Teil der IgG an die *H. pylori* Proteine der NC-Partikeln gebunden. Die Gesamtmengen an IgG in den Eluaten 1 und 2 unterschied sich jedoch fast um Faktor zehn – genauso wie die *H. pylori* spezifischen IgG, d.h. ein Großteil der eluierten AK ist tatsächlich *H. pylori* spezifisch. Unter optimalen Bedingungen (1:40 verdünntes Serum und Inkubation über Nacht auf Eis) wurde ein Anreicherungsfaktor der spezifischen AK gegenüber dem Serum von 133 und eine Ausbeute von 7% erreicht.

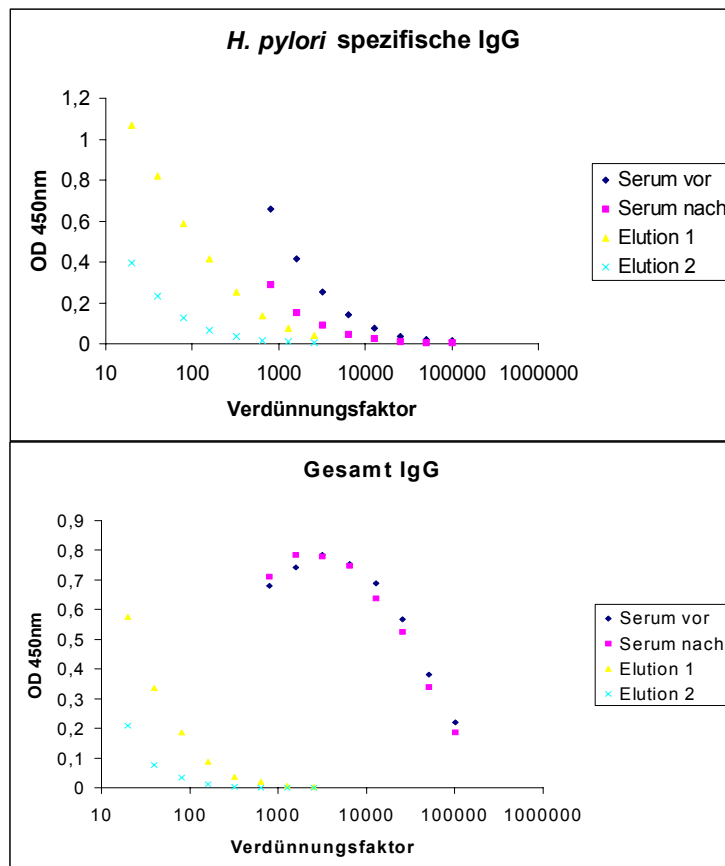


Abbildung 12: ELISA Ergebnisse zur Bestimmung der IgG Konzentrationen in den Eluaten. Es sind jeweils die OD Werte bei 450 nm für die verschiedenen Verdünnungen dargestellt. Zur Kontrolle wurde jeweils das Serum vor und nach der Inkubation mit den NC-Partikeln mitgemessen. Der obere Teil der Abbildung zeigt die OD für die *H. pylori* spezifischen IgG und unten werden die gesamt-IgG Werte gezeigt.

Ein quantitativer ELISA zur Bestimmung der IgG Konzentrationen ergab 2 ng/ μ l spezifische IgG im Eluat. Mit 500 μ l Patientenserum könnten also nach der Affinitätsreinigung ca. 10 μ g Ag präzipitiert werden.

3.3.2.2 Affinitätsreinigung mittels *H. pylori*

Im alternativen Ansatz sollten intakte Bakterienzellen zur Affinitätsreinigung der AK Verwendung finden. Patientenserum wurde mit den Zellen inkubiert, dann gewaschen und die AK wurden sauer eluiert. Dann wurden die AK mit Protein-G Sepharose aufgereinigt. Zusätzlich wurde auch statt der intakten Bakterien nur die ungereinigte Membranfraktion (Pellet nach der Lyse) getestet. Im ELISA wurde der *H. pylori* – spezifische Titer mit in den wells fixierten Bakterien getestet. Leider wurde mit beiden Varianten nur ein sehr geringer IgG Titer (0,2% Ausbeute an spezifischem IgG) in den Eluaten gefunden.

3.3.3 Präzipitation der Antigene

Nach dem Binden der spezifischen AK an die Protein-G Sepharose erfolgte die kovalente Kopplung mit dem Ziel, die Sepharose mehrfach verwenden zu können und somit Patientenserum zu sparen. Hierzu wurde die Lysatverdünnung für die IP optimiert. Zum Aufkonzentrieren der IP-Eluate wurden Ultrafree Filter (s.o.) verwendet. Die dreimalige Verwendung der kovalent gekoppelten Sepharose führte zur Präzipitation einer für die MS Analyse ausreichenden Menge an Ag (Abbildung 13). Als Vergleich zur IP wurde auch *H. pylori* Lysat mit aufgetragen. Die eingesetzte Menge ist allerdings zu gering gewesen um in der CBB G-250 Färbung viele Banden sehen zu können. Auch die Durchläufe diverser Waschschrte wurden mit auf das Gel aufgetragen – sie enthielten Banden, die sich von denen der IP deutlich unterschieden. Der Durchlauf durch das Ultrafree Röhrchen enthielt nur eine sichtbare Bande – die der intensivsten Bande der IP – so dass davon ausgegangen werden konnte, dass das Aufkonzentrieren der Eluate weitgehend ohne Verluste verlief. Das gepoolte Eluat der drei aufeinanderfolgenden IPs enthielt zehn gut sichtbare Banden, die mittels PMF identifiziert wurden (Tabelle 7). Die Banden 1-7 enthielten vermutlich alle BSA, welches zum Absättigen der Ultrafree-Röhrchen verwendet wurde. Die große Anzahl an BSA Banden erklärt sich aus dem in diesem Experiment irrtümlich verwendeten nicht-reduzierenden Probenpuffer für die SDS-PAGE, so dass die große Anzahl an Cysteinen im BSA Disulfidbrücken zwischen unterschiedlichen Positionen eingehen konnten und somit dem Protein vermutlich verschiedene Konformationen gaben, die Einfluss auf das Laufverhalten hatten. Ebenso entstanden auf diesem Wege möglicherweise Multimere (Banden 1-3). Die Banden 8-10 enthielten *H. pylori* Proteine, von denen drei bisher nicht in unserer 2-DE Datenbank verzeichnet waren. Dieser Befund war vielversprechend, allerdings wurden bei diesem Experiment noch keine Kontrollen durchgeführt.

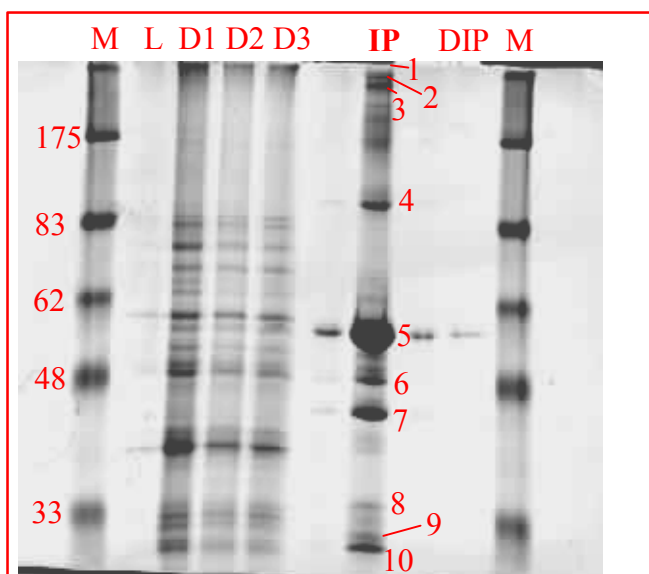


Abbildung 13: CBB G-250 gefärbtes Gel der IP mit NC-Partikeln angereicherter *H. pylori*-spezifischer AK (nicht-reduzierende Bedingungen). M – MG-Marker (Angaben in kD); L – 0,5 µl *H. pylori* Lysat; D1-D3 – je 5 µl der Durchläufe der Waschschriffe vor der Elution; IP – gesamte IP Elutionsfraktionen aus drei Wiederholungen gepoolt und aufkonzentriert (links und rechts davon befinden sich je eine leere Spur); DIP – Durchlauf durch Ultrafree Röhren beim Aufkonzentrieren. In der IP Spur sind zehn Banden eingezeichnet, deren Identifizierungsergebnisse in [Tabelle 7](#) aufgelistet sind.

Tabelle 7: PMF Identifizierungsergebnisse der IP Banden aus [Abbildung 13](#).

Bande	NCBI Accession/ TIGR Locus	Protein	MG lt. Daten- bank	Mascot Score	S.C. %	Peptide
1	-	Kein hit; 5 BSA Peaks				
2	gi 30794280	Albumin (Bos Taurus)	69kD	106	29	19/51
3	gi 30794280	Albumin (Bos Taurus)	69kD	131	26	20/45
4	gi 30794280	Albumin (Bos Taurus)	69kD	137	30	21/49
5	gi 30794280	Albumin (Bos Taurus)	69kD	123	28	18/40
6	-	Kein hit; 8 BSA Peaks				
7	gi 30794280	Albumin (Bos Taurus)	69kD	120	29	23/65
8	HP1316*	Ribosomal protein L2	30kD	63	41	10/56
	(HP1571)*	(Rare lipoprotein A)	35kD	37 [§]	16	7/46
9	HP0073#	Urease, alpha subunit	27kD	84	49	13/50
	HP0507*	conserved hypothetical prot.	24kD	47	15	7/50
10	HP0073#	Urease, alpha subunit	27kD	85	63	17/52

S.C. – Sequenzabdeckung. Die Mascot Scores beziehen sich für Banden 1-7 auf die Suche gegen NCBI (Scores>74 signifikant) und für Banden 8-10 auf die Suche gegen die *H. pylori* 26695 Datenbank von TIGR (Scores>45 signifikant). Die letzte Spalte kennzeichnet die Anzahl zum Protein zuordenbarer Peptide / Anzahl aller Peptide im PMF. § - dieser Scorewert ist nicht signifikant, das Protein also nur ein Kandidat. * Protein bisher nicht in unserer 2-DE Datenbank. # bekanntes Ag.

Aus der quantitativen Bestimmung der affinitätsgereinigten IgG Menge (Eluat 1: 2,2 ng/µl) und der bekannten Bindungskapazität der Protein-G Sepharose (11 mg IgG/ml) wurde berechnet, dass bei Einsatz der minimal handhabbaren Menge von 100 µl Sepharose (50% slurry) nur 0,5% der Bindungsstellen abgesättigt werden konnten. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an Protein-G oder Sepharose zu verhindern, wurde das Lysat daher vor der IP mit Sepharose präinkubiert. Wie in [Abbildung 14](#) links erkennbar ist, gab es große Unterschiede zwischen den Lysatbanden (leider sehr schwach) und den Banden des IP Eluats. Auffällig im Eluat war die intensive Bande, die vermutlich wieder von BSA stammte (diesmal unter reduzierenden Bedingungen). Leider wurde beim Vergleich von Eluat und Kontrolle (ohne AK) klar, dass die meisten Banden unspezifisch waren. Nur im unteren MG Bereich (<30 kD) gab es möglicherweise drei Banden, die nur im IP Eluat auftraten.

Am Ende wurde eine IP unter Verwendung aller IgG aus dem Testserum, also ohne jegliche

Affinitätsreinigung, getestet, womit eine Sepharoseabsättigung mit IgG von ca. 20% erreicht werden konnte. [Abbildung 14](#) rechts zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Wieder unterschieden sich Lysatbanden und IP Eluatbanden stark voneinander und ebenso war eine starke BSA Bande zu sehen. In diesem Versuch wurden drei IPs parallel gemacht: einmal wurde ein *H. pylori* positives Serum verwendet (Spur +), als Vergleich wurde in Spur - das Serum eines *H. pylori* negativen Patienten verwendet und als Kontrolle fungierte eine IP ohne AK (Spur K). Beim Vergleich der drei Spuren wurden keinerlei spezifische Banden gefunden.

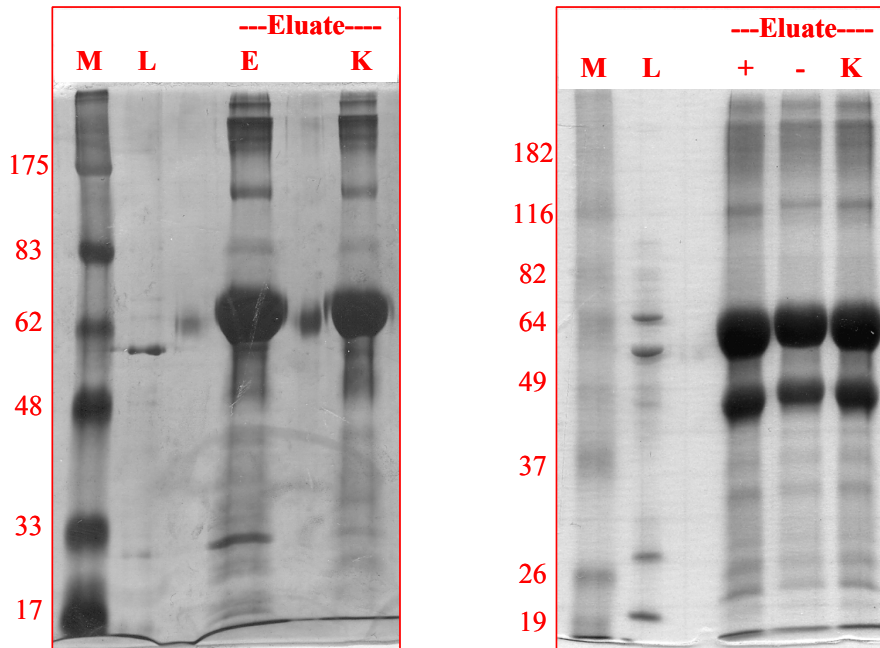


Abbildung 14: Links: Silbergefärbtes Gel der IP mit NC-Partikeln angereicherter *H. pylori*-spezifischer AK und mit in Sepharose präinkubiertem *H. pylori* Lysat. M – MG Marker (in kD); L – *H. pylori* Lysat; E – Eluat der IP; K – Kontrolle ohne AK; Rechts: CBB G-250 gefärbtes Gel der IP mit allen Serum-AK. M – MG Marker (in kD); L – *H. pylori* Lysat; + Eluat der IP mit *H. pylori* positivem Patientenserum; – Eluat der IP mit *H. pylori* negativem Patientenserum, K – Kontrolle ohne AK.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung Magenkrebs-assoziiierter Antigene mittels Immunoblots

H. pylori kann bei Menschen so unterschiedliche Erkrankungen wie das Magenkarzinom oder das Ulkus duodeni verursachen. Es ist bisher nicht geklärt, welche Faktoren den Ausgang dieser beiden divergierenden Erkrankungen determinieren. In dieser Studie wurde retrospektiv untersucht, ob Serummarker von diagnostischem Wert existieren, die den klinischen Status der Patienten reflektieren.

Die Ag-Erkennungsmuster von jeweils 30 Patientenseren pro Erkrankungsgruppe wurden mittels 2-DE Immunoblots von *H. pylori* Lysat verglichen. Dies war die erste Studie bei der hochauflösende Immunoblots (bis zu 5.000 Spots auftrennbar) eingesetzt und zusätzlich eine große Anzahl an Patientenseren verwendet wurde. Es wurde der komplett sequenzierte Stamm 26695 verwendet, der bekannte Virulenzfaktoren wie u.a. *cagA* und *vacA* in seinem variablen Genpool besitzt. Der Nachteil, dass die Patientenseren nicht mit den autologen Stämmen untersucht wurden, wird dadurch relativiert, dass diagnostische Marker konserviert sein müssen um ein Bevölkerungsscreening zu ermöglichen. Außerdem wurden bei einem Vergleich der Ag-Erkennungen verschiedener Patientenstämme nur geringe Unterschiede gefunden [35].

Da *H. pylori* die Magenschleimhaut besiedelt, wird vor Ort sekretorisches IgA gebildet, dessen Spezifität sich vermutlich von der des Serum IgA unterscheidet. Dieser Umstand musste hier allerdings nicht berücksichtigt werden, da das Ziel dieser Arbeit diagnostische Marker für einen nicht-invasiven Test sind – z.B. wäre eine einfache serologische Untersuchung ein geeignetes Format. Ein Vergleich der Reaktivitäten von Serum IgG und IgA fand keine qualitativen Unterschiede, jedoch zeigten IgG eine deutlich intensivere Reaktion [40]. Um trotzdem in diesem Experiment keine Ag zu verlieren, wurde ein sekundärer AK mit polyvalenter anti-humaner Spezifität verwendet, so dass Serum IgA, IgG und IgM erkannt wurden.

Die Erkennungsmuster der individuellen Seren waren sehr variabel, jedoch wurden in der Magenkrebsgruppe im Durchschnitt 49% mehr antigene Spots mit um 75% stärkeren Gesamtintensitäten gefunden. Eine Normierung der Daten konnte nicht durchgeführt werden, da es keine Grundlage für eine Auswahl nicht-variabler Ag gab, die als Normierungsstandards hätten genutzt werden können. Die hierarchische Clusteranalyse ermöglichte jedoch die Identifizierung von Patientengruppen mit klaren, charakteristischen Ag-Erkennungsmustern (z.B. eine diagonale Spotserie oder eine typische Spotgruppe, s. [Abbildung 6](#)). Obwohl diese Gruppen nicht mit dem klinischen Status der Patienten übereinstimmten, könnten die Cluster Charakteristika der Patientenstämme, wie z.B. Unterschiede in der Genexpression des variablen Genpools reflektieren. Eine Gruppierung verschiedener Patientenstämme durch hierarchisches

Clustering wurde bereits beschrieben [88], jedoch konnten auch dort die Gruppen nicht genau erklärt werden. Bei der Analyse der Verteilung von Proteinspezies in 2-DE Gelen (Kap. 3.2.5.1) konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der für die Patientencluster 2 und 5 typischen Spotgruppe (Spots 225, 226, 231, 232, 233, 234 aus [Tabelle 6](#)) vermutlich um C-terminal verkürzte GroEL Spezies handelt. In diesem Fall könnten auch überstandene Infektionen mit anderen stark GroEL exprimierenden bakteriellen Erregern zu der Gruppierung im Dendrogramm geführt haben, da GroEL bei Bakterien stark konserviert ist.

Die univariate statistische Analyse der einzelnen Spots ergab 14 signifikant mit Magenkrebs korrelierte Spots, die mindestens vier verschiedene ORFs repräsentieren ([Abbildung 7](#), [Tabelle 3](#)). Die relative strikte Signifikanzschwelle von $p < 0,01$ erschien aus den folgenden zwei Gründen gerechtfertigt: Erstens zeigten die Ag-Erkennungsmuster eine hohe Variabilität zwischen den individuellen Seren der gleichen Erkrankungsgruppe. Dieser Umstand wird dadurch illustriert, dass nur ein einziger Spot in allen 60 Blots vorkommt (der Hauptspot von GroEL). Zweitens korrelierte bei der gewählten Signifikanz kein Spot mit einem der anderen Patientenparameter (Alter, Kolonisierung, Geschlecht). Das Alter spielte hierbei eine besondere Rolle, da Magenkrebspatienten im Durchschnitt 19 Jahre älter waren als die Ulkuspatienten. Durch den Vergleich altersangepasster Subgruppen konnte für fünf eine Korrelation mit dem Alter nicht ausgeschlossen werden, die anderen neun jedoch wurden mit mindestens $p < 0,05$ bestätigt. Das Resultat einer Studie [81], in der die GroES Erkennung mit dem Alter korrelierte, konnte nicht durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Der Vergleich von Seren bereits erkrankter Patienten zielte auf Korrelationen zwischen den Erkrankungen und der Ag-Erkennung. Die hier gefundenen Unterschiede können folglich entweder durch die Erkrankung selbst oder durch eine ihrer Ursachen hervorgerufen worden sein. Nur eine prospektive Studie, in der die „Erkrankungsgeschichten“ *H. pylori* positiver Menschen ohne derzeitigen Befund über Jahre verfolgt werden, kann klären, ob die Markerkandidaten auch prognostisches Potential besitzen und somit bereits vor Ausbruch einer Erkrankung als Risikomarker verwendet werden könnten.

Die zehn identifizierten Proteinspezies stammen überraschenderweise nur von vier verschiedenen ORFs: *atpA*, *groEL*, *groES* und *hyuA*. Alle kodieren für relativ konservierte Proteine des zentralen Stoffwechsels bzw. der Proteinfaltung. Expressionsprodukte dieser ORFs sind dafür bekannt, AK Antworten in infizierten Patienten zu induzieren. In einer Studie [37] wurden keine Korrelationen von GroEL und GroES mit Magenkrebs bzw. Ulkus ventriculi / Ulkus gefunden. Dieses Resultat kann vermutlich mit der kleinen Anzahl von untersuchten Seren (4 bzw. 5) und der ungenauen Definition der Ulkusgruppe erklärt werden. In einer 1-DE Immunoblot Analyse [81] wurde bei dem Vergleich von 28 Magenkrebs mit 30 Ulkus-Patientenseren eine stärkere Reaktion der Magenkrebsseren mit GroEL festgestellt, was von

unseren Ergebnissen bestätigt wird – allerdings ist die Aussagekraft von 1-DE Immunoblots mit solch komplexen Proben unsicher, da jede Bande mehrere Proteine enthalten kann. Eine Studie aus unserer Gruppe [38] zeigte bereits mit der „Kleingeltechnik“ eine Magenkrebskorrelation von HyuA und einer Spezies von GroEL beim Vergleich von Ulkus- und Krebspatienten, was jetzt mit dieser umfangreicheren Studie bestätigt werden konnte.

In einigen Fällen gab es Unterschiede zwischen der Ag-Erkennung einzelner Spezies ein und desselben Proteins, d.h. für einzelne Spots von GroEL und AtpA wurde eine differentielle AK Antwort von Magenkrebs- und Ulkuspatienten gefunden. Von 15 identifizierten GroEL Spezies (Tabelle 6) wurden nur drei von Magenkrebspatientenseren signifikant stärker detektiert (SSP 2505, 2509, 2508 Abbildung 7). Diese gehören zu den Spots mit geringstem Proteingehalt, wenn man die Intensitäten der Silberfärbung aller GroEL Spots vergleicht. Aus diesem Grunde könnte die differentielle Detektion dieser Spots ein quantitativer Effekt sein; für Färbeintensitäten nahe an der Detektionsschwelle kann ein kleiner quantitativer Unterschied eine Signifikanz vortäuschen, da alle Intensitäten unterhalb der Detektionsgrenze gleich null gesetzt werden. Dieser Fakt trifft allerdings nicht auf AtpA zu, das durch insgesamt mindestens neun antigene Spezies vertreten war. Der AtpA Spot mit vermuteter differentieller Ag-Erkennung (SSP 2412 (aus Abbildung 7) = Spot 154 (aus Tabelle 5)) hatte eine mittlere Färbeintensität im Silbergel. Wenn sich Proteinspezies an bestimmten Epitopen durch AS Austausch, PTMs oder partielle Degradation unterscheiden, könnte dies Einfluss auf die Immunogenität derselben haben. Ein solcher Effekt wurde bereits für eine bestimmte Region von GroEL beim Vergleich von *H. pylori* infizierten mit nicht infizierten Patienten gefunden [89]. Mit meiner Studie zur Untersuchung der Spotkompositionen von Ag (Kap. 3.2.4) konnte jedoch gezeigt werden, dass der o.g. AtpA Spot zusätzlich GroEL enthält. Mehrere Spots in dieser Region des 2-DE Gels liegen nahe beieinander und enthalten entweder AtpA, GroEL oder einen Mix aus beiden Proteinen. In einem solchen Falle ist die Identifizierung eines antigenen Spots zusätzlich dadurch erschwert, dass diese auch von der korrekten Zuordnung der Spots vom Blot zum präparativen Gel abhängt. Eine Differenzierung gegen welches der beiden Spotkomponenten (oder gar beide) die AK Reaktionen gerichtet ist, ist auf der Proteinspezies-Ebene nicht möglich. Der Verdacht auf differentielle Immunogenität verschiedener AtpA Spezies und die Antigenität von AtpA überhaupt konnte also in diesem Falle nicht bestätigt werden. Dieses Beispiel zeigt eindrücklich, wie wichtig die exakte Analyse der Spotkomposition ist, speziell wenn hochsensitive Detektionsverfahren eingesetzt werden (s. Kap. 4.2).

Aus den 14 signifikant stärker von Magenkrebsseren erkannten Spots wurde manuell eine Subgruppe gesucht, die eine möglichst gute Diskriminierung beider Erkrankungsgruppen erlaubte – es wurde also ein hypothetischer serologischer Test simuliert. Eine solche Subgruppe

bildeten die Spots SSP 2509, 4003, 4005, 5708 und 4706 (s. * in [Tabelle 3](#)). Bei der retrospektiven Verwendung dieser fünf Spots als hypothetische Marker für unser Datenset von 60 Immunoblots konnten 77% Sensitivität und 83% Spezifität erreicht werden. Obwohl dieses Ergebnis bei weitem noch nicht für den sofortigen Einsatz in der Klinik ausreicht, unterstreicht es doch die prinzipielle Erreichbarkeit eines solchen Tests.

In der Literatur wurden folgende Faktoren, die den Infektionsverlauf mit *H. pylori* beeinflussen könnten, diskutiert: Expression von Virulenzfaktoren, Alter und Dauer der Infektion, Reaktion des Immunsystems, Säuresekretion sowie Umweltfaktoren [46,49,52]. Deren wahre Beiträge sind allerdings bis heute weitgehend unklar. Beim Vergleich zwischen Magenkrebs- und Ulkuspatienten fanden wir keine Assoziation zu einem der bekannten Virulenzfaktoren, was mit der aktuellen Auffassung übereinstimmt, dass die Präsenz der entsprechenden Gene (z.B. *vacA*, *cagA*, *iceA*) in den *H. pylori* Patientensstämmen nicht mit dem klinischen Status korreliert [45]. Da das Vorhandensein bakterieller Faktoren immer vom Immunsystem des Patienten „interpretiert“ wird, ist Immunoproteomics letztlich nicht in der Lage, zwischen Wirts- und Bakterienfaktoren zu unterscheiden. Außerdem könnten die krankheitsverursachenden Proteine nicht immunogen, d.h. für unsere Analyse gar nicht zugänglich sein. Allgemein wurde in dieser Arbeit eine Zunahme der Serumreaktivität bei Magenkrebspatienten festgestellt. Dieses Resultat wird durch den Befund unterstützt, dass proinflammatorische Allele des IL-1 β Locus mit erhöhtem Magenkrebsrisiko assoziiert sind [90] und eine verstärkte Entzündung vermutlich die AK Produktion fördert.

Im Gegensatz zur Untersuchung der Antigenität rekombinanter Proteine hat Immunoproteomics den Vorteil, dass die „in-vivo“ (hier in Zellkultur) vorhandene Proteinkomposition von *H. pylori* inklusive verschiedener posttranslationaler Modifikationen abgebildet wird. Es gibt zwar Unterschiede zur realen in-vivo Proteinkomposition der Bakterien im Patienten, es handelt sich dabei aber um ein realitätsnahes und durchführbares Modell. Ausreichende Mengen an *H. pylori* für die 2-DE können nicht direkt aus den Patienten, also ex-vivo, gewonnen werden. Die Unterschiede in der Abundanz der auf den Blots separierten Proteine könnten allerdings einen Nachteil darstellen. Der Befund, dass die intensiv erkannten Ag oft die in hoher Konzentration vorhandenen Proteine sind, könnte also ein systematischer Fehler der Methode sein. Im Gegensatz dazu könnte auch eine hohe Abundanz bedeuten, dass eine gute „Sichtbarkeit“ für das Immunsystem vorliegt und aus diesem Grunde viele AK mit hoher Avidität gebildet werden. Zur Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten könnte eine Expressionsbibliothek von *H. pylori* Proteinen, in der alle Proteine in ähnlicher Menge vorliegen, mit Patientenseren untersucht werden. Die Expressionsbibliothek könnte die verwendeten Immunoproteomics-Methoden somit ergänzen.

4.2 Detaillierte Analysen von Massenspektren

Methodische Entwicklungen zur Verbesserung von Spotidentifizierungen mittels PMFs, zur Bestätigung mittels Immunoproteomics entdeckter Ag und zur Erforschung der Verteilung von Proteinen in 2-DE Gelen wurden erstmalig mithilfe eines großen Datensatzes aus 384 Spots durchgeführt. Hierzu wurden alle sichtbaren Spots aus einem Sektor, der 2/3 eines *H. pylori* Gels umfasste, untersucht. Die 384 Spots wurden in dreifacher Wiederholung automatisch ausgestochen, verdaut und gemessen, so dass ein Datensatz von 960 auswertbaren Spektren entstand.

Im ersten Schritt wurden die Peakdetektions- und Suchparameter optimiert. Die automatische Detektion der Monoisotopen ist jedoch relativ fehleranfällig. Besonders im Massenbereich über $m/z = 2000$, wo die Monoisotopen von schwereren Isotopen überragt werden, ist eine gute Optimierung der Detektionsparameter mittels „Versuch und Irrtum“ nötig. Die Scorewerte für Datenbanksuchergebnisse, anhand derer die Sicherheit einer Identifizierung abgeschätzt werden kann, hängen auch von der Wahl der Suchparameter ab. Je mehr Peptidmodifikationen zugelassen werden, desto größer ist die Anzahl möglicher Peptide in der Datenbank und desto stärker sinkt der erreichbare Score. Es sollten also nur häufig im Datensatz auftretende Modifikationen verwendet werden, wie in diesem Falle nur die Oxidation von Methionin. Die Messung von mehrfachen Datensätzen kann die Identifizierungsquote deutlich erhöhen. In unserem Datensatz wurden durch die dreifache Wiederholung 75% aller Spots mindestens einmal eindeutig identifiziert.

Ein gutes Maß für die Verlässlichkeit der Identifizierungsergebnisse ist die Anzahl der Widersprüche in replizierten Datensätzen. Die folgenden Fehlerquellen können zu falsch-positiven Identifizierungen führen: Laufunterschiede zwischen verschiedenen 2-DE Gelen, Toleranzen beim Ausstechen der Spots, zufällige Unterschiede in der Verdauprozedur oder ungünstige Peakdetektions- bzw. Suchparameter. Im untersuchten Datensatz wurden nur bei 3% der Spots widersprüchliche Identifizierungen gefunden – dieser Fehler ist in der gleichen Größenordnung wie die angegebene Signifikanzschwelle der Mascotsuchergebnisse ($p < 0,05$, d.h. 5% Irrtumswahrscheinlichkeit). Viele dieser Spots lagen in dicht mit Spots besetzten Gebieten, weshalb fehlerhafte Identifizierungen vermutlich eher durch das Ausstechen als durch die Datenbanksuche verursacht wurden. In solchen Gebieten können bereits kleinere Abweichungen beim Ausstechen der Spots zum Picken der „Ausläufer“ eines Nachbarspots und somit zu einer falschen Identifizierung führen. Außerdem kann für einen Spot, der mehrere Komponenten in ähnlichen Konzentrationen enthält, zufällig einmal nur die eine und einmal nur eine andere Komponente identifiziert werden. Nur bei einem einzigen Spot war vermutlich tatsächlich die Datenbanksuche die Fehlerquelle – das zeigt, dass die Identifizierungen mit

Mascot im allgemeinen sehr zuverlässig funktionierten. Die ausschließliche Verwendung eines signifikanten Scorewertes als Akzeptanzkriterium für eine Identifizierung erscheint somit als ausreichend. Die geringe Fehlerrate zeigt zusätzlich die hohe Reproduzierbarkeit der Spotmuster in unseren 2-DE Gelen, denn bei Laufunterschieden kann z.B. die Fokussierung von Spots verschieden ausfallen, womit Schmiereffekte und somit NebenkompONENTEN in Nachbarspots beeinflusst wären.

Ein weiterer Aspekt dieses Teils der Studie war der Vergleich der automatischen mit der manuellen Identifizierungsprozedur. Zu diesem Zweck wurden 28 Spots zufällig ausgewählt und deren Identifizierungen durch PMFs verglichen. Dabei wurden nur für schwach gefärbte Spots deutliche Unterschiede gefunden. Manuell verdaut und gemessene Spektren von solchen Spots enthielten im Schnitt eine größere Anzahl Peaks von denen auch mehr dem identifizierten Protein zugeordnet werden konnten. Auch die Sequenzabdeckungen und Mascotscores waren höher. Dieses Ergebnis lässt sich vermutlich damit erklären, dass die manuelle Prozedur je nach Färbeintensität angepasst und somit letztlich eine höhere Sensitivität erreicht wurde. Es ist offensichtlich, dass automatische Prozeduren nicht für individuelle Spots angepasst werden können, insbesondere da sich der Proteingehalt von Spots in 2-DE Gelen um mehrere Größenordnungen unterscheiden kann. Eine solche Prozedur stellt also immer einen Kompromiss dar. Aus diesem Grunde ist speziell für sehr schwache Spots die manuelle Prozedur immer noch das Mittel der Wahl.

Zur Verbesserung der automatischen Identifizierungsergebnisse wurde die neu entwickelte Version des MS-Screener eingesetzt. Das Entfernen der Kontaminantenpeaks, also aller Peaks die häufiger als in 5% der Spektren vorkamen, resultierte in einer Erhöhung der Identifizierungsquote um 3% auf 78% der Spots. Dieser Effekt basiert auf der Tatsache, dass häufig in einem Datensatz auftauchende Massen keine spotspezifischen Informationen enthalten und somit nur das Rauschen vergrößern. Werden diese gelöscht, steigen im Allgemeinen die Scorewerte an und bei einigen Spots überschreiten diese dann die Signifikanzschwelle. Die 61 Kontaminantenmassen (Tabelle 4, Abbildung 8) wurden Matrixclustern, autolytischen Trypsinpeaks, HDPR Ausreißern oder Peptiden des abundantesten Proteins GroEL zugeordnet. Sieben Peaks waren fälschlicherweise detektierte Isotopenpeaks; bei schwachen Peaks höherer Massen markierte der Peakdetektionsalgorithmus den intensiveren zweiten Isotopenpeak anstelle des Monoisotopen. In solchen Fällen wurden in anderen Spektren auch die zugehörigen Monoisotopen gefunden, welche ebenfalls in der Kontaminantenliste zu finden sind. Obwohl die Quellen einer Reihe von Kontaminantenmassen unklar blieb, wurden jedenfalls keine Keratinpeaks gefunden. In einer früheren Studie [59], in der 480 manuell gemessene und analysierte PMFs untersucht wurden, konnten 69 Kontaminantenmassen im vergleichbaren

Bereich $m/z = 900-3.500$ gefunden werden – 47 davon waren Keratinpeptide. Eine weitere Studie [83] mit 118 Spektren fand 71 Massen öfter als in 5% der Spektren, wovon 53 Keratin zugeordnet wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz ähnlicher Anzahl an Kontaminanten-peaks die automatische Prozedur vom Ausstechen der Spots über den Verdau bis zum Auftragen auf die MALDI Platten sehr effizient die Verunreinigung mit Keratinen verhindern kann. Keratine können nicht nur von Hautschüppchen und Haaren der Labormitarbeiter stammen, sondern auch in Form von Staub durch Lüftungen oder Klimaanlage in die Proben gelangen und sind somit schwer zu verhindern. Die Festlegung der Schwelle, ab der Peptide als Kontaminanten definiert werden ist letztendlich willkürlich. Das Auftauchen von 3 GroEL Peaks zeigt, dass irrtümliche Zuordnungen nicht ausgeschlossen werden können. Die 5% Hürde stellte in unserem Datensatz einen guten Kompromiss dar, denn es sollten auf der einen Seite möglichst viele „informationslose“ Peaks entfernt werden, um die Identifizierungsquote zu erhöhen. Andererseits sollten allerdings möglichst wenige tatsächliche Peptidpeaks entfernt werden. Um die Identifizierungsquote zu verbessern, ist es ratsam in jedem größeren Datensatz die Kontaminanten vor der Datenbanksuche zu entfernen. Dabei gibt es meist für jedes Experiment typische Kontaminationen, so dass diese bei jedem Datensatz individuell bestimmt werden sollten – was ja mit unserer Software MS-Screener leicht möglich ist.

Von großem Interesse für diese Arbeit sind 2-DE separierte Spots, die mehrere Komponenten enthalten. Eine solche Komponente kann in ähnlicher Konzentration (Proteinmix oder zwei Hauptkomponenten), oder in deutlich geringerer Konzentration auftreten (Nebenkomponente). Dabei können Nebenkomponenten andere Spezies desselben Proteins oder gänzlich andere Proteine sein. Letztere können durch gleiche pI und MG Werte, bisher nicht nachgewiesene Protein-Protein Wechselwirkungen während der Elektrophorese oder durch Nachbarspotkontaminationen verursacht sein. In der Immunoproteomicsstudie (Kap. 4.1) wurden die Ag-Erkennungsmuster mittels 2-DE separierter *H. pylori* Proteine detektiert. Durch die hochspezifische und –sensitive Ag Erkennung der in den Patientenseren vorkommenden AK, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Nebenkomponenten einiger Spots detektiert wurden. Aus diesem Grunde sollten möglichst alle Komponenten der interessierenden Spots identifiziert werden. In dieser Analyse wurden jetzt 24 bekannte antigene Spots von *H. pylori* mittels MS-Screener und hierarchischem Clustern untersucht (Tabelle 5). Neun Spots enthielten vermutlich Nebenkomponenten, in sechs wurden keine solchen gefunden und in weiteren neun waren unbekannte Peaks vorhanden. Von den neun erstgenannten enthielten sieben Spots Peptidmassen von bekannten *H. pylori* Ag. Bei genauerer Analyse durch den Vergleich der Ag-Erkennung der betreffenden Spots mit den jeweiligen Hauptspots der Nebenkomponenten, zeigten drei Spots immer eine simultane Ag-Erkennung. Für diese muss ein Einfluss der Nebenkomponente auf die Antigenität des Spots vermutet werden (* in Tabelle 5). Zwei dieser drei Spots enthielten

allerdings ein Ag, das auch in anderen „sauberen“ Spots auftrat und somit letztlich doch bestätigt wurde. Am Ende blieb nur ein Spot übrig (Spot 278, Protease PqqE), wo mit hoher Sicherheit fälschlicherweise die Hauptkomponente als Ag identifiziert wurde. Falls eine differentielle Antigenität verschiedener Spezies dieses Proteins vorliegt, ist der Vergleich der Ag-Erkennung verschiedener Spots eines Proteins allerdings irreführend. In Zukunft ermöglicht die bessere Zugänglichkeit von Sequenzinformationen durch das MALDI-TOF/TOF eine noch detailliertere Untersuchung von Spotkompositionen. Hierzu muss allerdings die Sensitivität der MS/MS Messungen noch verbessert werden, um möglichst viele der nicht zur Hauptkomponente gehörenden Peaks untersuchen zu können.

Die verwendeten Methoden zum Auffinden von Nebenkomponten in Spots mussten neu entwickelt werden, da das Vorhandensein mehrerer Komponenten in 2-DE separierten Spots bisher wenig Beachtung fand. Die Notwendigkeit solcher Analysen wird klar, wenn man bedenkt, dass Spots oft mittels Färbungen quantifiziert werden oder hochspezifische Detektionsmethoden (AK oder radioaktive Markierungen) Verwendung finden. Geht man in solchen Fällen von der „1 Spot = 1 Protein“ Annahme aus, könnten in einigen Fällen falsche Schlüsse bzgl. quantitativer Änderungen bzw. Identifizierungen gefällt werden. Der MS-Screener bietet hier den Vorteil, dass große Sätze von Peaklisten schnell von Kontaminanten befreit, intervallisiert und in Form einer Matrix exportiert werden können. Dies schaffte die Voraussetzung für weitere Analysen mit verschiedenen multivariaten statistischen Methoden, die in dieser Arbeit für PMFs angewendet bzw. weiterentwickelt wurden.

Ein 2-DE separierter Spot kann nicht nur mehrere Komponenten enthalten, sondern umgekehrt kann auch ein Protein in mehreren Spots eines Gels in Form verschiedener Spezies auftreten. Ein gutes Beispiel hierfür ist GroEL. Dieses Hitzeschockprotein wurde in 15 verschiedenen Spots identifiziert und war in weiteren neun Spots ein Kandidat (s. Kap. 3.2.5.1). Von diesen 24 vermutlichen GroEL Spots wurden in den Immunoblots immer 21 Sports gleichzeitig von den Patientenseren erkannt ([Abbildung 9](#)). Für diese Spots wurde somit kein Anhaltspunkt für eine differentielle Antigenität verschiedener Proteinspezies gefunden; die anderen drei Spots liegen weit entfernt von den anderen GroEL Spots im Gel und sind vermutlich Falschpositive. GroEL stellt sicher auch kein geeignetes Untersuchungsobjekt für eine Untersuchung differentieller Antigenitäten dar, da es hochkonserviert in vielen Bakterien vorkommt und die Immunsysteme der Patienten vermutlich bereits mit GroEL mehrerer Bakterienspezies in Berührung kamen.

Während im Durchschnitt 1,6 Spots pro ORF gefunden wurden, wurde das am häufigsten vorkommende Protein des Datensatzes, GroEL, in 15 Spots eindeutig identifiziert ([Abbildung 9](#)). In zwei dieser Spots wurden Hinweise gefunden, dass diese N-terminal verkürzte Formen des Proteins sind. Bei weiteren sechs handelt es sich vermutlich um C-terminal verkürzte Formen.

Die Gründe für die genauen Positionierungen der Spots innerhalb dieser Subgruppen konnte jedoch nicht gefunden werden. Mögliche Ursachen könnten unterschiedliche Modifikationen, verschiedene Längen oder konformationelle Differenzen sein. Zusätzlich waren im Datensatz neun Spots, bei denen drei der fünf intensivsten Peaks von GroEL gefunden wurden (Tabelle 6), die also möglicherweise dieses Hitzeschockproteins ebenfalls in geringen Konzentrationen enthielten. In sechs Spots war GroEL wahrscheinlich Nebenkompone, da in diesen Spots jeweils ein anderes Protein als Hauptkomponente identifiziert wurde. In den anderen drei Spots könnte GroEL Haupt- oder Nebenkompone gewesen sein, da kein Protein eindeutig identifiziert werden konnte. Wie oben erwähnt wurden diese in den Immunoblots nicht gleichzeitig mit den anderen GroEL Spots erkannt und könnten somit Falschpositive sein. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass die GroEL-Peptidverteilung in den drei replizierten Gelen nicht völlig reproduzierbar war. Gründe hierfür könnten im Laufunterschied der Gele zu suchen sein. Möglicherweise könnte die geringe Proteinkonzentration dafür gesorgt haben, dass die Peptide in einigen Spots unter das Detektionslimit fielen. Eine weitere Erklärung wäre, dass das „drei der fünf intensivsten Peaks“ Kriterium zu schwach war, so dass auch falschpositive Spots zugeordnet wurden. Dies könnte durch MS/MS Analysen der betreffenden Peaks genauer analysiert werden.

Die Tatsache, dass so viele GroEL Spots gefunden wurden, wirft die Frage auf, ob die verkürzten Formen des Proteins Aufarbeitungsartefakte sind oder ob sie die in-vivo Situation widerspiegeln. Für erstere Vermutung spricht die starke Abundanz von GroEL; falls also viele andere Proteine auch eine größere Anzahl von Abbauartefakten aufwiesen, könnten diese möglicherweise unterhalb des Detektionslimits der Färbung liegen. Andererseits spricht die hohe Reproduzierbarkeit der Spotmuster gegen Aufarbeitungsartefakte, da ein unkontrollierter proteolytischer Abbau kaum exakt reproduzierbar sein dürfte. Möglicherweise liefern die 2-DE Gele hier ein Abbild tatsächlich in der Zelle vorhandener prozessierter Formen dieses Hitzeschockproteins. GroEL hilft als Chaperone bestimmten Proteinen bei der korrekten Faltung indem es vorübergehend einen Komplex mit diesen Proteinen bildet. Es gibt für *E. coli* Hinweise, dass GroEL auch die Funktion einer Qualitätskontrolle für die Faltung ausübt, d.h., dass GroEL bei nicht korrekt funktionierender Faltung den proteolytischen Abbau fördern kann [91]. Da das Chaperone einen Komplex mit dem betreffenden Protein formt, könnten dabei auch Teile des GroEL selbst prozessiert werden und so die oben beschriebenen N- bzw. C-terminal verkürzten Formen entstehen. Die Tatsache, dass dabei eine größere Anzahl prozessierter Spezies auftritt, könnte auch darauf hindeuten, dass an diesen GroEL Spezies noch Fragmente der abzubauenen Proteine hängen, welche die Unterschiede in MG und pI innerhalb der Spotgruppen erklären. Interessant wäre es, bei diesen Spots mit MS/MS gezielt nach Sequenzen anderer Proteine zu suchen und die genauen Schnittstellen in der GroEL Sequenz zu

identifizieren und zu überprüfen, ob diese typisch für *H. pylori* Proteasen sind.

Ein weiteres Beispiel für die Verteilung von Proteinspezies in Gelen war die Alkyl Hydroperoxid Reduktase, die in acht verschiedenen Spots identifiziert wurden. Ein Spot hatte nach der Gelposition ein etwa doppelt so großes MG wie der Hauptspot. Da zwei Cystein-haltige Peptide in diesem Spot nicht gefunden wurden, lag die Vermutung nahe, dass es sich um Dimere handelte ([Abbildung 10](#)). Hier stellt sich die Frage, ob die Dimerisierung in-vivo oder als Artefakt bei Probenaufarbeitung oder 2-DE auftrat. Eine Dimerisierung während des Laufs der zweiten Dimension kann dabei ausgeschlossen werden, da keine vertikalen Schmiereffekte auftraten. Da eine Dimerisierung nur einen kleinen Einfluss auf den pI hat, könnte diese während des Laufs der ersten Dimension stattgefunden haben. Das ist auch deshalb denkbar, weil die aktive Konzentration des Reduktionsmittels DTT während der IEF absinkt, so dass die Thiolgruppen zu Disulfidbrücken oxidiert werden könnten. Alternativ könnten die Dimere auch in-vivo geformt worden sein, falls die DTT Konzentration im Probenpuffer nicht für eine vollständige Reduktion ausreichte. Beim Vergleich der Färbeintensitäten der Spots fiel auf, dass nur ein geringer Anteil des Proteins dimerisiert vorlag. Der Umstand, dass keine weiteren Proteindimere im Gel gefunden wurden, unterstützt die Hypothese, dass es sich um in-vivo entstandene Dimere handeln könnte. Dies wird auch von der Tatsache gestützt, dass andere Mitglieder der Peroxiredoxin-Familie Homodimere oder sogar Dekamere formen [92].

Das Protein γ -Glutamyltranspeptidase wurde im Gel in zwei weit voneinander entfernten Spots identifiziert. Die von den PMFs abgedeckten Sequenzen zeigten keine Überlappung und die Summe der im Gel sichtbaren MG entsprach dem theoretischen Gesamtgewicht des ORFs. Aus diesen Gründen lag die Vermutung nahe, dass es sich um zwei Fragmente des Proteins handeln könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Literatur, nach der dieses Protein in Form zweier Fragmente auftritt [93,94]. Obwohl es sich um einen bekannten Virulenz- und Apoptose-induzierenden Faktor von *H. pylori* handelt, wurden beide Spots in den Immunoblots nur mit geringer Intensität erkannt. Zusätzlich wird in der Literatur vermutet, dass das Protein membranassoziiert ist [93], was sich mit der Beobachtung deckt, dass die ersten 36 AS nicht von den PMFs abgedeckt wurden und somit die Abspaltung einer Signalsequenz stattgefunden haben könnte.

Das in dieser Arbeit entwickelte Programm CorrAn wurde verwendet, um in großen Datensätzen mithilfe der wiederholten Anwendung der KA Spots zu finden, die Nebenkompenten enthielten. Wenn ein Protein in verschiedenen Spots als Haupt- oder Nebenkompente vorhanden ist, können Peptidmassen des Proteins zur Gruppierung dieser Spots führen. Die Voraussetzung dafür ist, dass zusätzlich vorhandene Komponenten der Spots das Clustern nicht stören. Mit der implementierten manuellen Schwellensetzung und der somit erfolgten

Datenreduktion konnten solche Gruppen gefunden und damit neue NebenkompONENTEN entdeckt werden. Obwohl die Schwellensetzung manuell erfolgt, ermöglicht die intuitive und schnelle Anwendbarkeit der Software ein zügiges Testen vieler verschiedener Schwellenwerte. Da es derzeit keine Standardmethode zum Auffinden von NebenkompONENTEN in 2-DE separierten Spots gibt, soll diese neue Methode noch mithilfe der Auswertung eines gesamten Datensatzes evaluiert und mit der Anwendung des von uns bereits verwendeten hierarchischen Clusterings [59,87] verglichen werden. Dabei besteht die Hoffnung, dass die Vorteile der KA gegenüber dem hierarchischen Clustern, wie z.B. die Bildung von Gruppen sehr unterschiedlicher Spotanzahlen sowie die automatische Darstellung der charakteristischen Massen einer jeden Spotgruppe, zum effektiveren Auffinden von NebenkompONENTEN in Spots führt. Der Nachteil der KA, dass nur wenige Spotgruppen je Analyse differenziert werden können, konnte durch die neu implementierte schrittweise Datenreduktion überwunden werden. Langfristig sollte das Ziel solcher methodischen Entwicklungen ein weitgehend automatisch ablaufender Prozess sein, der bereits in die Datenbanksuchen integriert werden kann.

Für die automatische Identifizierung von 194 *S. enterica* Spots wurden mit dem institutseigenen MALDI-TOF/TOF je ein PMF und drei MS/MS Spektren aufgenommen. Wichtige Faktoren für die Identifizierung waren hierbei das Auskristallisieren der Matrix auf der Probenplatte, die Qualität der gewonnenen Sequenzinformationen und die Parameter für Peakdetektion und Datenbanksuche. Die Optimierung der letzteren wurde bereits oben diskutiert. Für das optimale Auskristallisieren der Probe-Matrix Mischung, dass eine wichtige Voraussetzung für intensive Spektren darstellt, ist es günstig, Probe und Matrix in verschiedenen Verhältnissen aufzutragen, da die Probenkonzentration sehr unterschiedlich sind. Alle Proben wurden also in zwei verschiedenen Verhältnissen auf die MALDI-Platten aufgetragen. Da sowohl Messung als auch Datenbanksuche automatisch erfolgen, wurde im Anschluss das bessere der beiden Ergebnisse verwendet. Mit dieser Vorgehensweise wurde der manuelle Aufwand nur geringfügig erhöht. Die MS/MS Spektren trugen dabei ganz wesentlich zu einer hohen Identifizierungsquote bei. Im *S. enterica* Projekt wurden 88% aller Spots mit einem einzigen Datensatz identifiziert, wohingegen im *H. pylori* Projekt, wo nur PMFs gemessen wurden, in einem ähnlich großen Datensatz nur 57% der Spektren identifiziert werden konnten. Selbst durch die dreifache Wiederholung dieser PMF Messungen und das Abziehen der Kontaminantenpeaks wurde die Quote „nur“ auf 78% erhöht und liegt damit immer noch deutlich unter dem Wert des *S. enterica* Projekts. Aufgrund der Unterschiede zwischen den Proben können die Quoten zwar nicht direkt verglichen werden, jedoch wird deutlich, dass auf zusätzliche Sequenzinformationen auch bei der reinen Proteinidentifizierung nicht verzichtet werden sollte.

4.3 Immunopräzipitation von *H. pylori* Antigenen

Die IP kann als eine alternative hypothesefreie Methode zur Detektion von Ag verwendet werden. Sie hat den Vorteil, dass nicht nur sequenzielle sondern auch konformationelle Epitope von Ag detektiert werden können. Hierfür wurde der geringe Anteil *H. pylori* spezifischer AK im Patientenserum mittels verschiedener Methoden angereichert. Diese wurden dann an Protein-G Sepharose gebunden und kovalent quervernetzt, um mehrere IPs hintereinander zu ermöglichen und somit wertvolles Patientenserum zu sparen.

Die Herstellung des *H. pylori* Lysats erfolgte durch Ultraschallbehandlung in PBS Puffer. Die Verwendung von Detergenzien-haltigen Puffern scheiterte daran, dass diese die Bindung der Proteine an die NC-Partikel verhinderte. Schwer wasserlösliche Proteine sind dadurch im Lysat unterrepräsentiert bzw. gar nicht vorhanden. Dies ist ein Nachteil, da hydrophobe Proteine, die membranständig oder -assoziiert sind, durch die Oberflächenpräsentation dem Immunsystem leicht zugänglich sind und somit eine hohe Immunogenität besitzen können. Trotzdem ist der PBS-Lysepuffer verwendet worden, um die IP Methoden erst einmal zu etablieren.

Durch die Affinitätsreinigung mittels der NC-Partikel wurden die *H. pylori*-spezifischen IgG angereichert und dann an die Protein-G Sepharose gebunden. Dieser Schritt sollte die Crossreaktivitäten, die durch Homologien, zufällige Epitopähnlichkeiten oder gar Bindung außerhalb der Ag-Bindungsstelle zustande kommen können, minimieren. Durch ELISAs wurden sowohl Anreicherungsfaktoren als auch Ausbeuten für die verschiedenen getesteten experimentellen Bedingungen berechnet (Abbildung 12). Als maximale Anreicherung spezifischer IgG wurde ein Faktor von 133 erreicht. Dieser Wert demonstriert die Wirksamkeit der Affinitätsreinigung. Weniger zufriedenstellend war allerdings die Ausbeute. Mit 7% war diese viel zu gering, besonders da die Volumina der zur Verfügung stehenden Patientenseren sehr begrenzt waren. Hinzu kamen noch geringe Verluste durch das Umpuffern der AK Eluate mit den Ultrafree Filtern - einerseits durch Adsorption von AK an der Membran (trotz der Absättigung mit BSA) und andererseits durch eine geringe AK-Restdurchlässigkeit derselben.

Aus den o.g. Gründen wurden alternative Methoden zur Affinitätsreinigung getestet. Hierzu zählten die Verwendung von intakten Bakterienzellen und der ungereinigten Membranfraktion. Beide Ansätze haben die Vorteile, dass AK gegen die oft hoch-immunogenen Oberflächen-Ag angereichert werden und zusätzlich keinerlei Crossreaktivitäten mit cytoplasmatischen Proteinen stattfinden. Sekretierte Ag würden allerdings mit diesem Schritt verloren gehen. Leider erreichte die Ausbeute mit diesen Methoden noch nicht einmal die 1% Marke, so dass dieser Ansatz als gescheitert betrachtet werden musste.

Die mittels NC-Partikel affinitätsgereinigten IgG wurden an Protein-G Sepharose gebunden und

kovalent gekoppelt. Zur Identifizierung der immunopräzipitierten Ag wurden mit der Protein-G Sepharose drei aufeinanderfolgende IP-Läufe durchgeführt und die Präzipitate gepoolt, um eine ausreichende Proteinmenge zu erhalten. Nach der Auftrennung mittels 1-DE waren in der IP-Spur zehn Banden sichtbar. Diese unterschieden sich deutlich von den Banden des *H. pylori* Lysats. Auch die Durchläufe der Waschschriffe unmittelbar vor der IP zeigten ein anderes Bandenmuster als die IP, welches aber dem des Lysats sehr ähnelte. Diese Unterschiede deuteten auf eine hohe Spezifität der IP hin. Der Durchlauf der Ultrafree Röhrchen hatte nur eine Bande – die Verluste bei der Aufkonzentrierung der Eluate waren also gering. Alle zehn sichtbaren Banden wurden dann mittels MALDI-TOF MS identifiziert ([Abbildung 13](#), [Tabelle 7](#)). Die Banden 1-7 enthielten höchstwahrscheinlich BSA, welches durch die irrtümlich verwendeten nicht-reduzierenden Bedingungen der Probenaufarbeitung für die 1-DE in verschiedene Banden aufgetrennt wurde. Dies ist vermutlich durch unterschiedliche Konformationen zu erklären, die u.a. durch Disulfidbrücken zwischen einigen der 35 Cysteine des BSA stabilisiert wurden. Verschiedene Konformationen führen aufgrund der anderen räumlichen Strukturen zu Unterschieden im Laufverhalten. Viel interessanter war allerdings, dass die Banden 8-10 zwei bekannte *H. pylori* Ag und drei weitere *H. pylori* Proteine enthielten. Dieses Ergebnis zeigt, dass die IP prinzipiell funktionierte und dieser vielversprechende Befund noch durch Kontrollen abgesichert werden musste. Zur Beseitigung der störenden BSA Banden wurde ein Aufkonzentrieren der Eluate mittels Acetonfällung getestet, was aber aufgrund der sehr geringen Proteinkonzentrationen nicht gelang.

Aus der quantitativen Bestimmung der IgG Konzentrationen der AK Eluate konnte berechnet werden, dass damit maximal 1% der IgG Bindungsstellen der Protein-G Sepharose besetzt werden konnten. Um das unspezifische Binden von Proteinen an die Sepharose oder an das Protein-G zu verhindern, wurde das *H. pylori* Lysat vor der IP mit der Protein-G Sepharose präinkubiert. Die Ergebnisse der nun durchgeführten IP mit einer parallel durchgeführten Kontrolle ohne IgG ([Abbildung 14](#): links) zeigt ein Bandenmuster, dass sich deutlich von dem des Lysats unterscheidet. Die große Bande bei ca. 60 kD stammt vermutlich wieder vom BSA, dass hier unter reduzierenden Bedingungen lief. Leider waren fast alle Banden auch in der Kontrolle zu finden – nur im unteren MG Bereich sind drei eventuell spezifische Banden sichtbar. Dieses Ergebnis war enttäuschend, da es offensichtlich eine Anreicherung bestimmter Proteine gab, diese jedoch unspezifisch war, also nicht von Ag-AK Bindungen stammten. Die anfängliche Abschätzung des Anteils *H. pylori* spezifischer IgG in den Seren ([Kap. 1.3.2](#)) erwies sich in den ELISA Versuchen als korrekt ([Abbildung 12](#)): durch die NC Inkubation sank die Konzentration *H. pylori* spezifischer IgG um 80%, was kaum Einfluss auf die gesamt-IgG Konzentration hatte – es war also tatsächlich nur ein kleiner Anteil der IgG gegen *H. pylori* spezifisch. Für den Fall des Vorhandenseins einer ausreichenden Menge an hochspezifischen

AK, wie z.B. monoklonaler AK, ist die IP eine Standardmethode. Die geringe Menge an *H. pylori* spezifischen AK in den Patientenseren im Zusammenhang mit der kleinen Ausbeute der Affinitätsreinigung reichte hier jedoch nicht aus, eine hinreichende Menge an *H. pylori* spezifischen Ag zu präzipitieren.

Als „letzter Versuch“ wurde eine IP ohne jegliche Affinitätsreinigung durchgeführt, indem alle IgG des Patientenserums an die Protein-G Sepharose gebunden wurden ([Abbildung 14](#): rechts). Wieder unterschieden sich die Banden der IP stark von denen des *H. pylori* Lysats. Allerdings wurden keinerlei Unterschiede zwischen *H. pylori* positivem und negativem Serum gefunden. Auch zur Kontrolle ohne jegliche AK gab es keine Differenzen. Aus diesem Grunde musste dieser Ansatz wie erwartet als ungeeignet angesehen werden. Die Unterschiede der Lysatbanden zwischen der [Abbildung 14](#) links und rechts erklären sich daraus, dass Silberfärbung (links) und CBB G-250 Färbung (rechts) verschiedene Proteine unterschiedlich intensiv anfärben. Humane Seren wurden zwar bereits ohne jegliche Affinitätsreinigung in einer IP Studie eingesetzt, in der seropositive mit seronegativen *C. pneumoniae* Patientenseren verglichen wurden [95]. Die Ergebnisse zeigten jedoch trotz der hochsensitiven ³⁵S Detektion nur eine einzige angereicherte Bande, die zusätzlich keine besonders hohe Spezifität hatte, da sie auch von der Hälfte der negativen Seren erkannt wurde. Letztlich wurde damit bestätigt, dass der geringe Anteil Pathogen-spezifischer AK im humanen Serum eine IP sehr erschwert.

Referenzen

- [1] Marshall, B. J. und Warren, J. R. (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet* 1 [8390], Seite 1311-1315.
- [2] Warren, J. R. und Marshall, B. J. (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet* 1, Seite 1273-1275.
- [3] McNulty CAM (1999): The discovery of *Campylobacter*-like organisms., Westblom TU; Czinn SJ und Nedrud JG, *Gastrointestinal Disease and Helicobacter pylori* 241, Seite 1-9, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, ISBN: 3-350-65084-9.
- [4] Tomb, J. F.; White, O.; Kerlavage, A. R.; Clayton, R. A.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Ketchum, K. A.; Klenk, H. P.; Gill, S.; Dougherty, B. A.; Nelson, K.; Quackenbush, J.; Zhou, L.; Kirkness, E. F.; Peterson, S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H. G.; Glodek, A.; McKenney, K.; Fitzgerald, L. M.; Lee, N.; Adams, M. D.; Venter, J. C. und . (1997): The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature* 388 [6642], Seite 539-547.
- [5] Mitchell HM (1999): The Epidemiology of *Helicobacter pylori*, Westblom TU; Czinn SJ und Nedrud JG, *Gastrointestinal Disease and Helicobacter pylori* 241, Seite 11-30, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, ISBN: 3-350-65084-9.
- [6] Zevering, Y.; Jacob, L. und Meyer, T. F. (1999): Naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development, *Gut* 45 [3], Seite 465-474.
- [7] Falush, D.; Wirth, T.; Linz, B.; Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Kidd, M.; Blaser, M. J.; Graham, D. Y.; Vacher, S.; Perez-Perez, G. I.; Yamaoka, Y.; Megraud, F.; Otto, K.; Reichard, U.; Katzowitsch, E.; Wang, X.; Achtman, M. und Suerbaum, S. (2003): Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations, *Science* 299 [5612], Seite 1582-1585.
- [8] Ernst, P. B. und Gold, B. D. (2000): The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer, *Annu.Rev.Microbiol.* 54, Seite 615-640.
- [9] El Omar, E. M. (2001): The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease, *Gut* 48 [6], Seite 743-747.
- [10] Appelmek, B. J.; Monteiro, M. A.; Martin, S. L.; Moran, A. P. und Vandenbroucke-Grauls, C. M. (2000): Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens, *Trends Microbiol.* 8 [12], Seite 565-570.
- [11] Rasko, D. A.; Keelan, M.; Wilson, T. J. und Taylor, D. E. (2001): Lewis antigen expression by *Helicobacter pylori*, *J.Infect.Dis.* 184 [3], Seite 315-321.
- [12] Labenz J.; Meining A.; Tillenburger B. und Stolte M. (1999): *Helicobacteriose*: Update 1999, *Leber Magen Darm* 29 [2], Seite 80-92.
- [13] Sutton, P. (2001): Progress in vaccination against *Helicobacter pylori*, *Vaccine* 19 [17-19], Seite 2286-2290.
- [14] Loffeld, R. J. und van der Hulst, R. W. (2002): *Helicobacter pylori* and gastro-oesophageal reflux disease: association and clinical implications. To treat or not to treat with anti-H. pylori therapy?, *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* [236], Seite 15-18.
- [15] Peek, R. M., Jr. und Blaser, M. J. (2002): *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas, *Nat.Rev.Cancer* 2 [1], Seite 28-37.
- [16] Kotloff, K. L.; Sztein, M. B.; Wasserman, S. S.; Losonsky, G. A.; DiLorenzo, S. C. und Walker, R. I. (2001): Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection, *Infect.Immun.* 69 [6], Seite 3581-3590.
- [17] Aebischer, T.; Lucas, B.; Koesling, J.; Bumann, D. und Meyer, T. F. (2000): How CD4(+) T cells may eliminate extracellular gastric *Helicobacter*?, *J.Biotechnol.* 83 [1-2], Seite 77-84.
- [18] Bumann, D.; Holland, P.; Siejak, F.; Koesling, J.; Sabarth, N.; Lamer, S.; Zimny-Arndt, U.; Jungblut, P. R. und Meyer, T. F. (2002): A Comparison of Murine and Human Immunoproteomes of *Helicobacter pylori* Validates the Preclinical Murine Infection Model for Antigen Screening, *Infect.Immun.* 70 [11], Seite 6494-6498.
- [19] Jungblut, P. R. (2001): Proteome analysis of bacterial pathogens, *Microbes.Infect.* 3 [10], Seite 831-840.
- [20] Wasinger, V. C.; Cordwell, S. J.; Cerpa-Poljak, A.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Wilkins, M. R.; Duncan, M. W.; Harris, R.; Williams, K. L. und Humphery-Smith, I. (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*, *Electrophoresis* 16 [7], Seite 1090-1094.
- [21] Rabilloud, T. (2002): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains, *Proteomics.* 2 [1], Seite 3-10.

- [22] Klose, J. (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik*. 26 [3], Seite 231-243.
- [23] O'Farrell, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J.Biol.Chem.* 250 [10], Seite 4007-4021.
- [24] Jungblut, P.; Thiede, B.; Zimny-Arndt, U.; Muller, E. C.; Scheler, C.; Wittmann-Liebold, B. und Otto, A. (1996): Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels, *Electrophoresis* 17 [5], Seite 839-847.
- [25] Jungblut, P. R.; Bumann, D.; Haas, G.; Zimny-Arndt, U.; Holland, P.; Lamer, S.; Siejak, F.; Aebischer, A. und Meyer, T. F. (2000): Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*, *Mol.Microbiol.* 36 [3], Seite 710-725.
- [26] Pleissner, K. P.; Eifert, T.; Buettner, S.; Schmidt, F.; Boehme, M.; Meyer, T. F.; Kaufmann, S. H. und Jungblut, P. R. (2004): Web-accessible proteome databases for microbial research, *Proteomics*. 4 [5], Seite 1305-1313.
- [27] Bumann, D.; Aksu, S.; Wendland, M.; Janek, K.; Zimny-Arndt, U.; Sabarth, N.; Meyer, T. F. und Jungblut, P. R. (2002): Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Infect.Immun.* 70 [7], Seite 3396-3403.
- [28] Sabarth, N.; Lamer, S.; Zimny-Arndt, U.; Jungblut, P. R.; Meyer, T. F. und Bumann, D. (2002): Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis, *J.Biol.Chem.* 277 [31], Seite 27896-27902.
- [29] Bumann, D.; Metzger, W. G.; Mansouri, E.; Palme, O.; Wendland, M.; Hurwitz, R.; Haas, G.; Aebischer, T.; von Specht, B. U. und Meyer, T. F. (2001): Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers, *Vaccine* 20 [5-6], Seite 845-852.
- [30] Koesling, J.; Lucas, B.; Develioglou, L.; Aebischer, T. und Meyer, T. F. (2001): Vaccination of mice with live recombinant *Salmonella typhimurium aroA* against *H. pylori*: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy, *Vaccine* 20 [3-4], Seite 413-420.
- [31] Rizos, K.; Lattemann, C. T.; Bumann, D.; Meyer, T. F. und Aebischer, T. (2003): Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains, *Infect.Immun.* 71 [11], Seite 6320-6328.
- [32] Metzger, W. G.; Mansouri, E.; Kronawitter, M.; Diescher, S.; Soerensen, M.; Hurwitz, R.; Bumann, D.; Aebischer, T.; von Specht, B. U. und Meyer, T. F. (2004): Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant *Salmonella enterica* serovar typhi Ty21a vaccine expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers, *Vaccine* 22 [17-18], Seite 2273-2277.
- [33] Rollenhagen, C.; Sorensen, M.; Rizos, K.; Hurvitz, R. und Bumann, D. (2004): Antigen selection based on expression levels during infection facilitates vaccine development for an intracellular pathogen, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 [23], Seite 8739-8744.
- [34] Krah, A. und Jungblut, P. R. (2004): Immunoproteomics, *Methods Mol.Med.* 94, Seite 19-32.
- [35] McAtee, C. P.; Lim, M. Y.; Fung, K.; Velligan, M.; Fry, K.; Chow, T. und Berg, D. E. (1998): Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling, *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, Seite 537-542.
- [36] Bumann, D.; Meyer, T. F. und Jungblut, P. R. (2001): Proteome analysis of the common human pathogen *Helicobacter pylori*, *Proteomics*. 1 [4], Seite 473-479.
- [37] Kimmel, B.; Bosserhoff, A.; Frank, R.; Gross, R.; Goebel, W. und Beier, D. (2000): Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies, *Infect.Immun.* 68 [2], Seite 915-920.
- [38] Haas, G.; Karaali, G.; Ebermayer, K.; Metzger, W. G.; Lamer, S.; Zimny-Arndt, U.; Diescher, S.; Goebel, U. B.; Vogt, K.; Roznowski, A. B.; Wiedenmann, B. J.; Meyer, T. F.; Aebischer, T. und Jungblut, P. R. (2002): Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease, *Proteomics*. 2 [3], Seite 313-324.
- [39] Dunn, B. E.; Perez-Perez, G. I. und Blaser, M. J. (1989): Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter pylori* proteins, *Infect.Immun.* 57 [6], Seite 1825-1833.
- [40] Lock, R. A.; Coombs, G. W.; McWilliams, T. M.; Pearman, J. W.; Grubb, W. B.; Melrose, G. J. und Forbes, G. M. (2002): Proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*, *Helicobacter*. 7 [3], Seite 175-182.
- [41] McAtee, C. P.; Fry, K. E. und Berg, D. E. (1998): Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by "proteome" technologies, *Helicobacter*. 3 [3], Seite 163-169.
- [42] Utt, M.; Nilsson, I.; Ljungh, A. und Wadstrom, T. (2002): Identification of novel immunogenic proteins of

- Helicobacter pylori by proteome technology, J.Immunol.Methods 259 [1-2], Seite 1-10.
- [43] Sabarth, N.; Hurwitz, R.; Meyer, T. F. und Bumann, D. (2002): Multiparameter Selection of Helicobacter pylori Antigens Identifies Two Novel Antigens with High Protective Efficacy, Infect.Immun. 70 [11], Seite 6499-6503.
- [44] Nilsson, C.; Sillen, A.; Eriksson, L.; Strand, M. L.; Enroth, H.; Normark, S.; Falk, P. und Engstrand, L. (2003): Correlation between cag pathogenicity island composition and Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease, Infect.Immun. 71 [11], Seite 6573-6581.
- [45] Graham, D. Y. und Yamaoka, Y. (2000): Disease-specific Helicobacter pylori virulence factors: the unfulfilled promise, Helicobacter. 5 Suppl 1, Seite S3-S9.
- [46] Farthing, M. J.; Fitzgerald, R. und Zhang, Z. W. (2001): Acid, helicobacter and immunity: a new paradigm for oesophagogastric cancer, J.Physiol Paris 95 [1-6], Seite 423-427.
- [47] McColl, K. E. und el Omar, E. (1996): Helicobacter pylori and disturbance of gastric function associated with duodenal ulcer disease and gastric cancer, Scand.J.Gastroenterol.Suppl 215, Seite 32-37.
- [48] Hansson, L. E.; Nyren, O.; Hsing, A. W.; Bergstrom, R.; Josefsson, S.; Chow, W. H.; Fraumeni, J. F., Jr. und Adami, H. O. (1996): The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease, N.Engl.J.Med. 335 [4], Seite 242-249.
- [49] Graham, D. Y. (1997): Helicobacter pylori infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model, Gastroenterology 113 [6], Seite 1983-1991.
- [50] Parsonnet, J.; Friedman, G. D.; Vandersteen, D. P.; Chang, Y.; Vogelstein, J. H.; Orentreich, N. und Sibley, R. K. (1991): Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma, N.Engl.J.Med. 325 [16], Seite 1127-1131.
- [51] Uemura, N.; Okamoto, S.; Yamamoto, S.; Matsumura, N.; Yamaguchi, S.; Yamakido, M.; Taniyama, K.; Sasaki, N. und Schlemper, R. J. (2001): Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer, N.Engl.J.Med. 345 [11], Seite 784-789.
- [52] Calam, J. und Baron, J. H. (2001): ABC of the upper gastrointestinal tract: Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer, BMJ 323 [7319], Seite 980-982.
- [53] El Omar, E. M.; Oien, K.; El Nujumi, A.; Gillen, D.; Wirz, A.; Dahill, S.; Williams, C.; Ardill, J. E. und McColl, K. E. (1997): Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion, Gastroenterology 113 [1], Seite 15-24.
- [54] El Omar, E. M.; Carrington, M.; Chow, W. H.; McColl, K. E.; Bream, J. H.; Young, H. A.; Herrera, J.; Lissowska, J.; Yuan, C. C.; Rothman, N.; Lanyon, G.; Martin, M.; Fraumeni, J. F., Jr. und Rabkin, C. S. (2000): Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer, Nature 404 [6776], Seite 398-402.
- [55] Furuta, T.; El Omar, E. M.; Xiao, F.; Shirai, N.; Takashima, M.; Sugimura, H. und Sugimura, H. (2002): Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan, Gastroenterology 123 [1], Seite 92-105.
- [56] Alm, R. A.; Ling, L. S.; Moir, D. T.; King, B. L.; Brown, E. D.; Doig, P. C.; Smith, D. R.; Noonan, B.; Guild, B. C.; deJonge, B. L.; Carmel, G.; Tummino, P. J.; Caruso, A.; Uria-Nickelsen, M.; Mills, D. M.; Ives, C.; Gibson, R.; Merberg, D.; Mills, S. D.; Jiang, Q.; Taylor, D. E.; Vovis, G. F. und Trust, T. J. (1999): Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori, Nature 397 [6715], Seite 176-180.
- [57] Ogura, K.; Maeda, S.; Nakao, M.; Watanabe, T.; Tada, M.; Kyutoku, T.; Yoshida, H.; Shiratori, Y. und Omata, M. (2000): Virulence factors of Helicobacter pylori responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil, J.Exp.Med. 192 [11], Seite 1601-1610.
- [58] Joyce, E. A.; Chan, K.; Salama, N. R. und Falkow, S. (2002): Redefining bacterial populations: a post-genomic reformation, Nat.Rev.Genet. 3 [6], Seite 462-473.
- [59] Schmidt, F.; Schmid, M.; Jungblut, P. R.; Mattow, J.; Facius, A. und Pleissner, K. P. (2003): Iterative data analysis is the key for exhaustive analysis of peptide mass fingerprints from proteins separated by two-dimensional electrophoresis, J.Am.Soc.Mass Spectrom. 14 [9], Seite 943-956.
- [60] Chang, J. W.; Young, D. A.; Coleman, P. D. und O'Banion, M. K. (2001): Two-dimensional gel analysis of secreted proteins induced by interleukin-1 beta in rat astrocytes, Neurochem.Int. 39 [5-6], Seite 349-359.
- [61] Houry, W. A.; Frishman, D.; Eckerskorn, C.; Lottspeich, F. und Hartl, F. U. (1999): Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL, Nature 402 [6758], Seite 147-154.
- [62] Imam-Sghiouar, N.; Laude-Lemaire, I.; Labas, V.; Pflieger, D.; Le Caer, J. P.; Caron, M.; Nabias, D. K. und Joubert-Caron, R. (2002): Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: application to the study of B-lymphoblasts from a patient with Scott syndrome, Proteomics. 2 [7], Seite 828-838.

- [63] Stancato, L. F. und Petricoin, E. F., III (2001): Fingerprinting of signal transduction pathways using a combination of anti-phosphotyrosine immunoprecipitations and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, *Electrophoresis* 22 [10], Seite 2120-2124.
- [64] Steinitz, M. und Tamir, S. (1995): An improved method to create nitrocellulose particles suitable for the immobilization of antigen and antibody, *J.Immunol.Methods* 187 [1], Seite 171-177.
- [65] Fenn, J. B. et. al.:Proc 36th Annual Conference, Am. Soc. for Mass Spectrom., 05.-10.06.1988, San Francisco.
- [66] Tanaka, K., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., and Yoshida, T.:Proc. Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry 15.-18.09.1987 in Osaka, Japan.
- [67] Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal.Chem.* 60 [20], Seite 2299-2301.
- [68] Karas, M.; Gluckmann, M. und Schafer, J. (2000): Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors, *J.Mass Spectrom.* 35 [1], Seite 1-12.
- [69] Zolg, J. W. und Langen, H. (2004): How industry is approaching the search for new diagnostic markers and biomarkers, *Mol.Cell Proteomics.* 3 [4], Seite 345-354.
- [70] Mann M.:Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Applied Topics, Altana, GA.
- [71] Pleissner, K. P.; Regitz-Zagrosek, V.; Krudewagen, B.; Trenkner, J.; Hocher, B. und Fleck, E. (1998): Effects of renovascular hypertension on myocardial protein patterns: analysis by computer-assisted two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis* 19 [11], Seite 2043-2050.
- [72] Pun, T.; Hochstrasser, D. F.; Appel, R. D.; Funk, M.; Villars-Augsburger, V. und Pellegrini, C. (1988): Computerized classification of two-dimensional gel electrophoretograms by correspondence analysis and ascendant hierarchical clustering, *Appl.Theor.Electrophor.* 1 [1], Seite 3-9.
- [73] Schmid, H. R.; Schmitter, D.; Blum, P.; Miller, M. und Vonderschmitt, D. (1995): Lung tumor cells: a multivariate approach to cell classification using two-dimensional protein pattern, *Electrophoresis* 16 [10], Seite 1961-1968.
- [74] Krah, A.; Wessel, R. und Pleissner, K. P. (2004): Assessment of Protein Spot Components Applying Correspondence Analysis for Peptide Mass Fingerprint Data, *Proteomics.* in press.
- [75] Klade, C. S. (2002): Proteomics approaches towards antigen discovery and vaccine development, *Curr.Opin.Mol.Ther.* 4 [3], Seite 216-223.
- [76] Klose, J. und Kobalz, U. (1995): Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis* 16 [6], Seite 1034-1059.
- [77] Jungblut, P.; Eckerskorn, C.; Lottspeich, F. und Klose, J. (1990): Blotting efficiency investigated by using two-dimensional electrophoresis, hydrophobic membranes and proteins from different sources, *Electrophoresis* 11 [7], Seite 581-588.
- [78] Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M. und Cottrell, J. S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* 20 [18], Seite 3551-3567.
- [79] Barthel, M.; Hapfelmeier, S.; Quintanilla-Martinez, L.; Kremer, M.; Rohde, M.; Hogardt, M.; Pfeffer, K.; Russmann, H. und Hardt, W. D. (2003): Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host, *Infect.Immun.* 71 [5], Seite 2839-2858.
- [80] Jungblut, P. R. und Seifert, R. (1990): Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells, *J.Biochem.Biophys.Methods* 21 [1], Seite 47-58.
- [81] Iaquinto, G.; Todisco, A.; Giardullo, N.; D'Onofrio, V.; Pasquale, L.; De Luca, A.; Andriulli, A.; Perri, F.; Rega, C.; De Chiara, G.; Landi, M.; Taccone, W.; Leandro, G. und Figura, N. (2000): Antibody response to Helicobacter pylori CagA and heat-shock proteins in determining the risk of gastric cancer development, *Dig.Liver Dis.* 32 [5], Seite 378-383.
- [82] Keller, B. O. und Li, L. (2000): Discerning matrix-cluster peaks in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of dilute peptide mixtures, *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* 11 [1], Seite 88-93.
- [83] Ding, Q.; Xiao, L.; Xiong, S.; Jia, Y.; Que, H.; Guo, Y. und Liu, S. (2003): Unmatched masses in peptide mass fingerprints caused by cross-contamination: An updated statistical result, *Proteomics.* 3 [7], Seite 1313-1317.
- [84] Harris, W. A.; Janecki, D. J. und Reilly, J. P. (2002): Use of matrix clusters and trypsin autolysis fragments as mass calibrants in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 16 [18], Seite 1714-1722.
- [85] Krah, A.; Miehle, S.; Pleissner, K. P.; Zimny-Arndt, U.; Kirsch, C.; Lehn, N.; Meyer, T. F.; Jungblut, P. R. und Aebischer, T. (2004): Identification of candidate antigens for serologic detection of Helicobacter pylori-

- infected patients with gastric carcinoma, *Int.J.Cancer* 108 [3], Seite 456-463.
- [86] Schmidt, F.; Lueking, A.; Nordhoff, E.; Gobom, J.; Klose, J.; Seitz, H.; Egelhofer, V.; Eickhoff, H.; Lehrach, H. und Cahill, D. J. (2002): Generation of minimal protein identifiers of proteins from two-dimensional gels and recombinant proteins, *Electrophoresis* 23 [4], Seite 621-625.
- [87] Krah, A.; Schmidt, F.; Becher, D.; Schmid, M.; Albrecht, D.; Rack, A.; Buttner, K. und Jungblut, P. R. (2003): Analysis of Automatically Generated Peptide Mass Fingerprints of Cellular Proteins and Antigens from *Helicobacter pylori* 26695 Separated by Two-dimensional Electrophoresis, *Mol.Cell Proteomics*. 2 [12], Seite 1271-1283.
- [88] Enroth, H.; Akerlund, T.; Sillen, A. und Engstrand, L. (2000): Clustering of clinical strains of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gel electrophoresis, *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 7 [2], Seite 301-306.
- [89] Yamaguchi, H.; Osaki, T.; Kai, M.; Taguchi, H. und Kamiya, S. (2000): Immune response against a cross-reactive epitope on the heat shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*, *Infect.Immun.* 68 [6], Seite 3448-3454.
- [90] Gonzalez, C. A.; Sala, N. und Capella, G. (2002): Genetic susceptibility and gastric cancer risk, *Int.J.Cancer* 100 [3], Seite 249-260.
- [91] Kandror, O.; Busconi, L.; Sherman, M. und Goldberg, A. L. (1994): Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES, *J.Biol.Chem.* 269 [38], Seite 23575-23582.
- [92] Wood, Z. A.; Poole, L. B.; Hantgan, R. R. und Karplus, P. A. (2002): Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins, *Biochemistry* 41 [17], Seite 5493-5504.
- [93] Shibayama, K.; Kamachi, K.; Nagata, N.; Yagi, T.; Nada, T.; Doi, Y.; Shibata, N.; Yokoyama, K.; Yamane, K.; Kato, H.; Iinuma, Y. und Arakawa, Y. (2003): A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*, *Mol.Microbiol.* 47 [2], Seite 443-451.
- [94] McGovern, K. J.; Blanchard, T. G.; Gutierrez, J. A.; Czinn, S. J.; Krakowka, S. und Youngman, P. (2001): gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization, *Infect.Immun.* 69 [6], Seite 4168-4173.
- [95] Wolf, K.; Fischer, E.; Mead, D.; Zhong, G.; Peeling, R.; Whitmire, B. und Caldwell, H. D. (2001): *Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein is a surface-exposed antigen that elicits antibodies primarily directed against conformation- dependent determinants, *Infect.Immun.* 69 [5], Seite 3082-3091.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Thomas Meyer für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu promovieren, die mir gewährte Forschungsfreiheit und die Begutachtung meiner Dissertation.

Dr. Peter Jungblut danke ich für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit, zahlreiche anregende wissenschaftliche Diskussionen besonders in den Bereichen Proteinchemie und Massenspektrometrie sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Gruppe.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Toni Aebischer für die Betreuung und motivierenden Gespräche im Bereich der Helicobacter-Immunologie sowie die vielen praktischen Tipps, die zum Gelingen der Laborversuche wesentlich beitrugen.

Prof. Peter-Michael Kloetzel danke ich sehr für die wissenschaftliche Begleitung und die Begutachtung meiner Dissertation. Ebenso möchte ich dem weiteren Gutachter, Prof. Linscheid und den Mitgliedern des Promotionsausschusses herzlich danken.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den vielen statistischen Auswertungen danke ich Dr. Klaus-Peter Pleissner. Im Bereich der Salmonellen bin ich Dr. Dirk Bumann für die anregenden Diskussionen dankbar. Dr. Ursula Zimny-Arndt danke ich ganz herzlich für die Anfertigung der hervorragenden 2-DE Gele.

Meinen Teamkollegen der Proteomicsgruppe Frank Schmidt, Hajar Habibi, Karina Barthel, Monika Schmid, Renate Ackermann und Wolfgang Höhenwarter danke ich für die offene und äußerst freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Von der Universität Greifswald danke ich Dr. Dörte Becher, Knut Büttner und Dr. Dirk Albrecht für die erfolgreiche Kooperation. Ebenso danke ich Dr. Stephan Miehle von der TU Dresden für die Bereitstellung der Patientenseren.

Allen anderen Doktoranden und Mitarbeitern des MPIIB gilt mein Dank für die vielen guten Gespräche, die angenehme Atmosphäre und den Spaß bei der Arbeit.

Schließlich gilt meinen Eltern ganz besonderer Dank für ihre vielfältige Unterstützung, durch die meine lange Ausbildung erst möglich wurde. Britta danke ich für ihren unermüdlichen liebevollen Beistand.

Publikationsliste

1. Thiede B, Höhenwarter W, **Krah A**, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR: Peptide Mass Fingerprinting, Methods, in Druck
2. **Krah A**, Wessel R, Pleißner KP. (2004) Assessment of Protein Spot Components Applying Correspondence Analysis for Peptide Mass Fingerprint Data. *Proteomics* 4: 2982-2986
3. Aebischer T, **Krah A**, Bumann D, Jungblut PR and Meyer TF *Proteomics: Biomedical and Pharmaceuticals Applications. The Immunoproteome of H. pylori.* Kluwer Academic Publisher, in Druck
4. **Krah A**, Miehle S, Pleissner KP et al. (2004) Identification of candidate antigens for serologic detection of *Helicobacter pylori* infected patients with gastric carcinoma. *Int J Cancer* 108: 456-463
5. **Krah A**, Schmidt F, Becher D et al. (2003) Analysis of automatically generated peptide mass fingerprints of cellular proteins and antigens from *Helicobacter pylori* 26695 separated by two-dimensional electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 2: 1271-1283
6. **Krah A** and Jungblut PR (2003) Immunoproteomics. In: Decker, J. and Reischl, U. eds. *Methods in Molecular Medicine. Vol: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases.* Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc., pp. 19-32
7. Bennett M, **Krah A**, Wien F et al. (2000) A DNA-porphyrin minor-groove complex at atomic resolution: The structural consequences of porphyrin ruffling. *PNAS* 97: 9476-81

Erklärung

Hiermit erkläre ich die Dissertation selbständig
und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, den