

Quantitative Analyse des *Survival of Motor Neuron*(SMN)-Komplexes unter
Verwendung von Absoluter Quantifizierung SMN-Komplex-spezifischer
Peptide durch synthetische stabilisotopenmarkierte Peptidanaloga

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

des

Fachbereich Chemie der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Julia Wiesner

aus Eisenhüttenstadt (Brandenburg)

Dortmund 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Sickmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Spiteller

Tag der Abgabe: 10.08.2011

Tag des Promotionskolloquiums: 13.10.2011

In der Schule haben wir gelernt, dass Lehrerwissen absolutes Wissen ist. Doch Wissenschaft kann niemals absolut sein. Sie ist die Kunst der Annäherung. Sie definiert nicht, sondern kreist ein, zieht keine Trennlinien, sondern schafft Übergänge, kennt keine Dogmen, sondern Entwicklungen. Sie kann nichts verifizieren, sondern nur durch Wegstreichen von Variablen ein möglichst klares Bild entwerfen.

Frank Schätzing

Für meine Familie und liebsten Freunde...

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | 5 |
| Veröffentlichungen | 7 |
| Vorträge | 8 |
| Posterpräsentationen | 8 |
| Abkürzungen | 9 |
| Aminosäuren | 11 |
| Zusammenfassung | 14 |
| Summary | 15 |
| 1 Einleitung | 18 |
| 1.1 Spinale Muskelatrophie | 18 |
| 1.1.1 SMA-Typen | 18 |
| 1.1.2 Genetischer Hintergrund von SMA | 19 |
| 1.1.3 Diagnose von SMA | 21 |
| 1.1.4 Therapieansätze zur Behandlung von SMA | 22 |
| 1.2 Survival of Motor Neuron - Komplex | 23 |
| 1.2.1 SMN Protein | 23 |
| 1.2.2 Gemin2 | 25 |
| 1.2.3 Gemin3 | 26 |
| 1.2.4 Gemin4 | 26 |
| 1.2.5 Gemin5 | 26 |
| 1.2.6 Gemin6 | 27 |
| 1.2.7 Gemin7 | 27 |
| 1.2.8 Gemin8 | 28 |
| 1.2.9 Unrip | 28 |
| 1.2.10 <i>Methylsome</i> | 29 |
| 1.2.11 Sm-Proteine | 30 |
| 1.2.12 U snRNP Assemblierung | 30 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1.3 | Methoden der Massenspektrometrie zur Analyse von makromolekularen Proteinkomplexen | 33 |
| 1.3.1 | Umkehrphasenchromatographie | 34 |
| 1.3.2 | Das Massenspektrometer | 35 |
| 1.3.3 | Quantifizierung mittels LC-MS/MS | 41 |
| 1.4 | Aufgabenstellung | 51 |
| 2 | Materialien | 53 |
| 2.1 | Geräte | 53 |
| 2.2 | Software | 55 |
| 2.3 | Enzyme, Chemikalien, Kits | 56 |
| 3 | Methoden | 59 |
| 3.1 | Anreicherung von Proteinkomplexen | 59 |
| 3.1.1 | Zellkern-/Cytoplasmatrennung | 59 |
| 3.1.2 | Immunopräzipitation | 60 |
| 3.1.3 | Expression und Reinigung der rekombinanten Proteinkomplexe | 60 |
| 3.2 | Probenvorbereitung | 62 |
| 3.2.1 | Eindimensionale Gelelektrophorese | 62 |
| 3.2.2 | Silberfärbung nach Blum | 63 |
| 3.2.3 | Kolloidale Coomassiefärbung | 63 |
| 3.2.4 | In-Gel-Verdau | 64 |
| 3.2.5 | In-Lösung-Verdau | 64 |
| 3.2.6 | BCA | 65 |
| 3.2.7 | Fällung | 65 |
| 3.2.8 | Western Blot-Analyse | 65 |
| 3.2.9 | Aminosäureanalyse | 66 |
| 3.3 | LC-MS-Analyse | 68 |
| 3.3.1 | nanoHPLC | 68 |
| 3.3.2 | MS/MS | 69 |
| 3.3.3 | MRM | 70 |
| 3.3.4 | Datenbanksuche | 72 |
| 3.3.5 | Datenauswertung | 73 |
| 4 | Ergebnisse | 74 |
| 4.1 | Zellkern-Cytoplasma-Fraktionierung mittels eines modifizierten Roeder-Protokolls | 74 |
| 4.2 | Anreicherung des SMN-Komplexes durch Co-Immunopräzipitation | 76 |
| 4.3 | Expression und Reinigung des <i>in vitro</i> gebildeten rekombinanten SMN-Komplexes | 77 |
| 4.4 | Massenspektrometrische qualitative Analyse der angereicherten SMN-Komplexe | 80 |
| 4.4.1 | LC-MS/MS-Analyse des endogenen SMN-Komplexes mit der LTQ XL . | 80 |
| 4.4.2 | LC-MS/MS-Analyse der rekombinanten SMN-Komplexe mit der 4000 Q TRAP | 81 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.5 | Optimierung der Probenvorbereitung für die quantitative Analyse | 82 |
| 4.5.1 | Elution von der Präzipitationsmatrix | 82 |
| 4.5.2 | Abreicherung von LC-MS-inkompatiblen Detergentien bei der Probenvorbereitung | 85 |
| 4.5.3 | Optimierung des tryptischen Verdaus | 85 |
| 4.5.4 | Verringerung von Adsorptionseffekten niedrig abundanter Peptide an Oberflächen | 90 |
| 4.6 | Quantifizierung des endogenen SMN-Komplexes | 92 |
| 4.6.1 | S/MRM-Analyse mit dem 4000 Q TRAP | 98 |
| 4.6.2 | S/MRM-Analyse mit dem TSQ Vantage | 98 |
| 4.6.3 | Markierungsfreie quantitative Analyse mit dem LTQ <i>Orbitrap</i> Velos . . | 102 |
| 4.7 | Quantifizierung der rekombinanten SMN-Komplexe | 104 |
| 4.7.1 | S/MRM-Analyse mit dem 4000 Q TRAP | 104 |
| 4.7.2 | S/MRM-Analyse mit dem TSQ Vantage | 106 |
| 4.7.3 | Markierungsfreie quantitative Analyse mit dem LTQ <i>Orbitrap</i> Velos . . | 107 |
| 5 | Diskussion | 109 |
| 5.1 | Zellkern-Cytoplasma-Fraktionierung mittels eines modifizierten Roeder-Protokolls | 109 |
| 5.2 | Anreicherung des SMN-Komplexes durch Co-Immunopräzipitation | 111 |
| 5.3 | Expression und Reinigung des <i>in vitro</i> gebildeten rekombinanten SMN-Komplexes | 114 |
| 5.4 | Optimierung der Probenvorbereitung für die quantitative Analyse | 115 |
| 5.4.1 | Elution von der Präzipitationsmatrix | 115 |
| 5.4.2 | Entfernen von LC-MS-inkompatiblen Detergentien in der Probe | 116 |
| 5.4.3 | Minimierung von Adsorptionseffekten niedrig abundanter Peptide an Oberflächen | 118 |
| 5.4.4 | Vorbereitung der synthetisch erzeugten AQUA-Peptide | 119 |
| 5.4.5 | Sprayinstabilitäten der 4000 Q Trap | 120 |
| 5.5 | Quantifizierung des endogenen SMN-Komplexes | 121 |
| 5.5.1 | Evaluierung der Ergebnisse aus Messungen mit 4000 Q TRAP, TSQ Vantage sowie markierungsfrei mit der LTQ <i>Orbitrap</i> Velos | 124 |
| 5.6 | Quantifizierung der rekombinanten SMN-Komplexe | 127 |
| 5.6.1 | Evaluierung der verschiedenen Ansätze durch Messung mit dem 4000 Q TRAP, TSQ Vantage und markierungsfrei mit der LTQ <i>Orbitrap</i> Velos . | 127 |
| 5.7 | Schlußfolgerung und Ausblick | 128 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 131 |
| 7 | Anhang | 146 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| Abb. 1.1 | SMA-Phänotyp am Beispiel von Zebrafischen | 18 |
| Abb. 1.2 | SMA-Patienten | 20 |
| Abb. 1.3 | Genkarte von <i>SMN1</i> und <i>SMN2</i> | 20 |
| Abb. 1.4 | Spleißmechanismus der <i>SMN1</i> und <i>SMN2</i> mRNA | 22 |
| Abb. 1.5 | Lokalisation von SMN in HeLa-Zellen | 24 |
| Abb. 1.6 | Interaktionskarte des SMN-Komplexes | 25 |
| Abb. 1.7 | U snRNP-Assemblierung | 32 |
| Abb. 1.8 | Ionenpaarreaktion | 35 |
| Abb. 1.9 | LTQ <i>Orbitrap</i> Velos - Thermo Fisher | 41 |
| Abb. 1.10 | Schema AQUA-Peptid | 45 |
| Abb. 1.11 | Schema Triple Quadrupol Massenspektrometer | 46 |
| Abb. 1.12 | Schema Ionenspuren vom synthetischen und endogenen Peptid | 47 |
| | | |
| Abb. 3.1 | Hydrolyse-Evakuierungsgefäß | 67 |
| Abb. 3.2 | Reaktionsmechanismus von ACQ bei der ASA | 67 |
| Abb. 3.3 | LC-Gradient | 68 |
| | | |
| Abb. 4.1 | Schema Roeder-Protokoll | 74 |
| Abb. 4.2 | Schema chemische Lyse mit NP40 | 75 |
| Abb. 4.3 | Western Blot Zellkern-Cytoplasma | 76 |
| Abb. 4.4 | Western Blot SMN-IPs | 77 |
| Abb. 4.5 | Western Blot 7B10-IP [1] | 77 |
| Abb. 4.6 | LC-MS-Analyse der SMN-IP vor und nach Waschen | 78 |
| Abb. 4.7 | Prinzip des GST- <i>Pull Downs</i> | 79 |
| Abb. 4.8 | 1D-PAGE-Analyse der rekombinanten SMN-Komplexe (WT, E134K, Y272C) | 80 |
| Abb. 4.9 | Proteinlokalisierung der Kern- und Cytoplasmafraktion | 81 |
| Abb. 4.10 | Überschneidung Kern- und Cytoplasmafraktion | 81 |
| Abb. 4.11 | 1D-PAGE der Kern- und Cytoplasmafraktion. | 82 |
| Abb. 4.12 | 1D-PAGE-Analyse der getesteten Elutionspuffer | 83 |
| Abb. 4.13 | LC-MS/MS-Analyse der Glycin/HCL- und SDS-Elution | 84 |
| Abb. 4.14 | 1D-PAGE, tryptischer Verdau der Komplexe von der Matrix | 84 |
| Abb. 4.15 | 1D-PAGE-Analyse der Fällungsoptimierung an Standardproteinen | 86 |
| Abb. 4.16 | Verdauoptimierung | 88 |
| Abb. 4.17 | Semi-tryptisches Peptid von SMN1 | 88 |
| Abb. 4.18 | Einfluß von hydrophoben Additiven auf die Signalintensität von Peptiden | 91 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 4.19 MRM-Analyse des AQUA-Peptids DFTPELGR (1 fmol) ohne und mit Zusatz von Glucagon. | 92 |
| Abb. 4.20 Konzentrationsreihen ausgewählter AQUA-Peptide mit und ohne Melittin | 93 |
| Abb. 4.21 1D-PAGE Analyse der einzelnen Probenvorbereitungsschritte zur Aufarbeitung des nativen SMN-Komplexes | 96 |
| Abb. 4.22 Vergleich der AQUA-Peptide nach Gefriertrocknung, Resolubilisierung in ACN und Ultraschallbehandlung | 96 |
| Abb. 4.23 Verdünnungsreihe des AQUA-Peptids DFTPELGR | 97 |
| Abb. 4.24 Einfluß von Ultraschall auf AQUA-Peptide | 97 |
| Abb. 4.25 1D-PAGE Analyse der einzelnen Probenvorbereitungsschritte zur Aufarbeitung der rekombinanten SMN-Komplexe | 104 |
| | |
| Abb. 5.1 Western Blot Analyse des SMN-Komplex hinsichtlich Stabilität bei steigenden Salzkonzentration [2] | 111 |
| | |
| Abb. 7.1 Western Blot Zellkern-Cytoplasma - Original | 147 |
| Abb. 7.2 Western Blot SMN-IPs - Original | 147 |
| Abb. 7.3 ImageJ Auswertung Proteinpräzipitation Amicon | 154 |
| Abb. 7.4 ImageJ Auswertung Proteinpräzipitation ACN | 155 |
| Abb. 7.5 ImageJ Auswertung Proteinpräzipitation TCA | 156 |
| Abb. 7.6 Proteinsequenzen des SMN-Komplexes | 158 |
| Abb. 7.7 Verdünnungsreihen der AQUA-Peptide | 167 |

Veröffentlichungen

1. Zahedi RP, Lewandrowski U, **Wiesner J**, Wortelkamp S, Moebius J, Schütz C, Walter U, Gambaryan S, Sickmann A. *Phosphoproteome of Resting Human Platelets*. **J Proteome Res.** 2007 Dec;197(2):526-34.
2. Markert A, Grimm M, Martinez J, **Wiesner J**, Meyerhans A, Meyuhas O, Sickmann A, Fischer U. *The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes*. **EMBO Rep.** 2008 Jun;9(6):569-75.
3. Kroiss M, Schultz J, **Wiesner J**, Chari A, Sickmann A, Fischer U. *Evolution of an RNP assembly system: a minimal SMN complex facilitates formation of UsnRNPs in *Drosophila melanogaster**. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008 Jul 22;105(29):10045-50.
4. **Wiesner J**, Premisler T, Sickmann A. *Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications*. **Proteomics.** 2008 Nov;8(21):4466-83.
5. Kroiss M, Brünger KM, **Wiesner J**, Grimmel M, Sickmann A, Fischer U. *Native purification of protein and RNA-protein complexes using a novel affinity procedure*. **Fly.** 2009 Aug;3(3):221-8.
6. Schäffler K, Schulz K, Hirmer K, **Wiesner J**, Grimm M, Sickmann A, Fischer U. *A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation* **RNA.** 2010 Aug;16(8):1488-99.
7. Guderian G, Peter C, **Wiesner J**, Sickmann A, Schulze-Osthoff K, Fischer U, Grimmel M. *Mutually Exclusive Binding of pICln and the novel PRMT5 methyltransferase complex component RioK1 modulates PRMT5 Complex Composition and Methyltransferase Substrate Specificity* **J Biol Chem.** 2011 Jan;286(3):1976-86
8. **Wiesner J**, Zahedi RP, Englbrecht C, Fischer U, Sickmann A *Absolute Quantification of the human Survival of Motor Neuron Complex by stabile isotope-labelled peptide analogues*
In Vorbereitung

Vorträge

1. “*The phosphoproteome of human platelets*”, International Platelet Meeting, Halle-Wittenberg, Deutschland, Oktober 2007
2. “*Protein stoichiometry of the human SMN complex determined by AQUA*”, 15th Lorne Proteomics Symposium, Lorne, Australien, Februar 2010

Poster

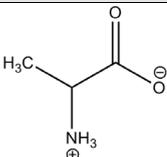
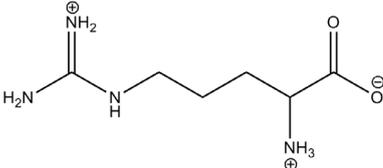
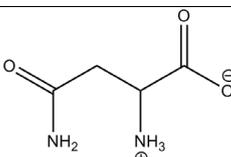
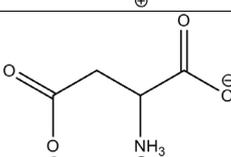
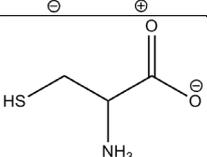
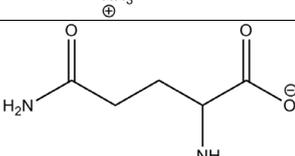
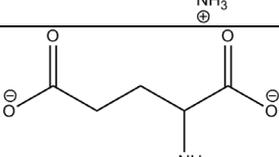
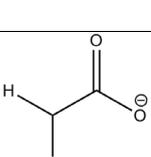
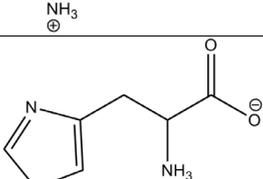
1. “*Protein stoichiometry of the human SMN complex determined by AQUA*”, 35th Lorne Conference on Protein Structure and Function, Lorne, Australien, Februar 2010
2. “*Protein stoichiometry of the human SMN complex determined by AQUA*”, 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Halle/Saale, Deutschland, März 2010

Abkürzungen

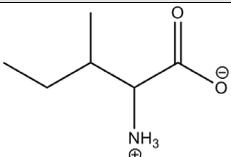
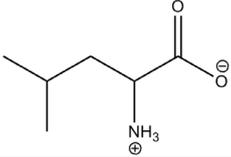
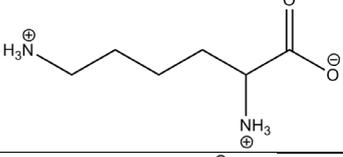
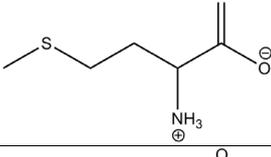
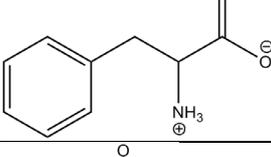
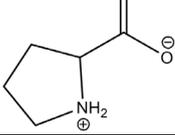
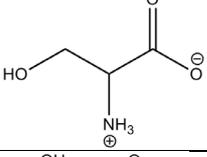
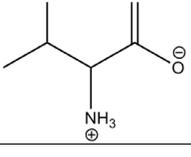
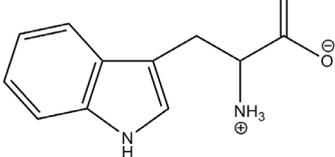
| | |
|---------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| AQUA | Absolute Quantifizierung |
| ASF | <i>Alternative Splicing Factor</i> |
| BN-PAGE | <i>Blue Native PAGE</i> |
| C | Cytidin |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| DMP | <i>Dimethylpimelimidate hydrochloride</i> - Dimethylheptan-1,7-diimidatdihydrochlorid |
| EMG | Elektromyographie |
| (em)PAI | (exponentiell modifizierter) <i>Protein Abundance Index</i> |
| ESE | <i>Exon Splicing Enhancer</i> Sequenz |
| ESI | Elektrosprayionisation |
| ESS | <i>Exon Splicing Silencer</i> Sequenz |
| FT-ICR | Fourier-Transformation-Ionencyclotronresonanz |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HeLa-Zellen | Henrietta Lacks-Zellen |
| ICAT | <i>Isotope Coded Affinity Tag</i> |
| iTRAQ | <i>isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation</i> |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| LDS | <i>Lithium Dodecyl Sulfate</i> - Lithiumdodecylsulfat |
| LOD | <i>Limit of detection</i> - Nachweisgrenze |
| LOQ | <i>Limit of quantification</i> - Bestimmungsgrenze |
| MALDI | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> |
| MS | Massenspektrometrie |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie |
| NSAF | <i>Normalized Spectral Abundance Factor</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| pI | isolektrischer Punkt |
| (prä-)mRNA | (Präkursor) <i>messenger RNA</i> |
| Q | Quadrupol |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RP | <i>Reversed Phase</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| S/MRM | <i>Selected/Multiple Reaction Monitoring</i> |
| SDS | <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Natriumdodecylsulfat |
| SEC | <i>Size Exclusion Chromatography</i> - Größenausschlusschromatographie |
| SF2 | <i>Splicing factor 2</i> |
| SILAC | <i>Stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i> |

| | |
|------------|--|
| SLE | Systemisches Lupus Erythematodus |
| Sm | Smith-Antigen |
| SMA | Spinale Muskelatrophie |
| SMN | <i>Survival of Motor Neuron</i> Protein |
| <i>SMN</i> | <i>Survival of Motor Neuron</i> Gen |
| T | Thymidin |
| TFA | <i>Trifluoroacetic acid</i> - Trifluoressigsäure |
| TOF | <i>Time Of Flight</i> |
| (UHP)LC | <i>(Ultra High Performance) Liquid Chromatography</i> |
| (U) snRNA | <i>(Uridine-rich) small nuclear Ribonucleic Acid</i> |
| (U) snRNP | <i>(Uridine-rich) small nuclear Ribonucleo Protein</i> |
| U | Uridin |

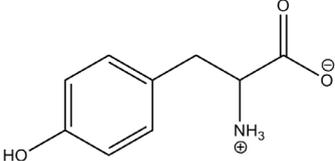
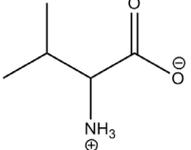
Tab. 0.1: Aminosäuren

| Name | Buchstaben-codes | Strukturformel [pI] | Monoisotopische Masse (-H ₂ O) [Da] [3] |
|------------------|------------------|---|--|
| L-Alanin | Ala, A |  | 71,03711 |
| L-Arginin | Arg, R |  | 156,10111 |
| L-Asparagin | Asn, N |  | 114,04293 |
| L-Asparaginsäure | Asp, D |  | 115,02694 |
| L-Cystein | Cys, C |  | 103,00919 |
| L-Glutamin | Gln, Q |  | 128,05858 |
| L-Glutaminsäure | Glu, E |  | 129,04259 |
| L-Glycin | Gly, G |  | 57,02146 |
| L-Histidin | His, H |  | 137,05891 |

Tab. 0.1: Fortsetzung

| Name | Buchstaben-codes | Strukturformel [pI] | Monoisotopische Masse (-H ₂ O) [Da] [3] |
|----------------|------------------|---|--|
| L-Isoleucin | Ile, I |  | 113,08406 |
| L-Leucin | Leu, L |  | 113,08406 |
| L-Lysin | Lys, K |  | 128,09496 |
| L-Methionin | Met, M |  | 131,04049 |
| L-Phenylalanin | Phe, F |  | 147,06841 |
| L-Prolin | Pro, P |  | 97,05276 |
| L-Serin | Ser, S |  | 87,03203 |
| L-Threonin | Thr, T |  | 101,04768 |
| L-Tryptophan | Trp, W |  | 186,07931 |

Tab. 0.1: Fortsetzung

| Name | Buchstaben-codes | Strukturformel [pI] | Monoisotopische Masse (-H ₂ O) [Da] [3] |
|-----------|------------------|---|--|
| L-Tyrosin | Tyr, Y |  | 163,06333 |
| L-Valin | Val, V |  | 99,06841 |

Zusammenfassung

Der SMN-Komplex ist eine makromolekulare Einheit, die aus neun festen Untereinheiten (SMN, Gemin2-Gemin8, Unrip) und verschiedenen transienten Faktoren (SmB/B', SmE, SmF, SmG, SmD1-D3) aufgebaut ist. Die Hauptaufgabe des ubiquitären Komplexes umfasst die Assemblierung der U snRNPs im Cytoplasma und ihre Translokation in den Zellkern, wo sie am Aufbau des Spleißosoms beteiligt sind. Durch Mutation oder Deletion des *SMN1*-Gens kann dieser Prozess gestört sein und dadurch Spinale Muskelatrophie (SMA) auslösen. SMA ist die zweithäufigste autosomal rezessiv vererbte Krankheit mit Todesfolge nach Mukoviszidose, die zu einer Degeneration der α -Motorneuronen des Rückenmarks und damit zu einer Schwächung und einem Abbau der Muskulatur führt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des humanen *Survival of Motor Neuron*-Komplex (SMN) hinsichtlich Zusammensetzung und Stöchiometrie mittels Anwendung von massenspektrometrischen Methoden. In diesem Zusammenhang wurde die native stöchiometrische Zusammensetzung des zentralen SMN-Komplexes mit zwei rekombinanten Komplexen verglichen, die beide eine in Verbindung mit SMA bekannte Mutation (Y272C, E134K) integriert hatten. Zu diesem Zweck wurden Wildtyp-SMN und die mutierten SMN-Analoga als GST-Fusions-Proteine zusammen mit Wildtyp-Gemin2, -Gemin6, -Gemin7 und -Gemin8 in *Escherichia coli* exprimiert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde SMN auf einer Glutathion-Sepharose-Matrix angereichert und anschließend mittels verschiedener Methoden (Carbamidomethylierung, Trypsin-Verdau) für die massenspektrometrische quantitative Analyse vorbereitet. Des Weiteren wurden die Unterschiede zwischen dem cytoplasmatischen und dem nukleären SMN-Komplex, welche durch Zellkern-Cytoplasma-Trennung von HeLa-Zellen mittels eines modifizierten Roeder-Protokolls und anschließende Co-Immunopräzipitation gegen den SMN-spezifischen Antikörper 7B10 erhalten wurden, untersucht.

Für die Quantifizierung der SMN-Komplexe wurde Absolute Quantifizierung (AQUA) angewendet. Synthetische stabilisotopenmarkierte Peptidanaloga wurden mit den nativen Proben in definierten Konzentrationen verdünnt und konnten während der massenspektrometrischen Analyse durch ihre Massendifferenz von 6 bis 10 Dalton im Vergleich zu den endogenen Peptiden detektiert werden. Zuvor mussten jedoch geeignete Peptidsequenzen ausgewählt werden, um eine reproduzierbare Quantifizierung zu gewährleisten. Dazu mussten die Peptide definierten Spezifikationen entsprechen (z.B. keine leicht modifizierbaren Aminosäuren oder keine überlesenen tryptischen Schnittstellen beinhalten). Die MS-Analyse wurde mittels *Selected Reaction Monitoring* (S/MRM) auf zwei unterschiedlichen Triple-Quadrupol-Systemen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Übergänge und Systemparameter (*Declustering* Potential und Kollisionsenergie) für jedes einzelne Peptid optimiert und festgelegt.

Alternativ wurde markierungsfreie Quantifizierung auf einem LTQ Orbitrap Velos System ange-

wandt. Die hohe Massengenauigkeit und Sensitivität des Hybrid-FT-MS-Systems erlaubt eine Quantifizierung der entsprechenden Mutterionen direkt aus der MS1-Spur (ohne Anwendung von Tandem-MS-Experimenten).

Beide Strategien, S/MRM und MS1, erlauben eine Quantifizierung von Peptiden mit Konzentrationen bis 250 amol. Durch Optimierung des dargestellten Protokolls, war es möglich den Einfluss bekannter Patientenmutationen des *SMN1*-Gens auf die Stöchiometrie des SMN-Komplexes zu untersuchen, sowie den Unterschied zwischen SMN-Komplexen des Cytoplasmas und des Zellkerns zu bestimmen.

Dieses Projekt kann dazu beitragen sowohl die Assemblierung der U snRNPs besser zu verstehen, als auch neue Zielmoleküle für Diagnose und Therapie von genetischen Krankheiten wie SMA bereitzustellen.

Summary

The SMN complex is a macromolecular protein entity consisting of nine fixed subunits (SMN, Gemin2-Gemin8, Unrip) and several transient factors (SmB/B', SmE, SmF, SmG, SmD1-D3). The main function of this housekeeping complex comprises the assembly of U snRNPs in the cytoplasm and their export to the nucleus where they build up the spliceosome. As a result of mutations in the *SMN1* gene this process can be defective and elicits Spinal Muscular Atrophy (SMA). SMA is the second most common autosomal recessive hereditary disease beside cystic fibrosis resulting in death. It leads to a degeneration of the α -motor neurons of the spinal cord and subsequently to muscular weakness and wasting.

The aim of this study was the characterization of the human Survival of Motor Neuron (SMN) complex composition and stoichiometry by mass spectrometry. In this context, the native stoichiometric composition of the SMN core complex was compared with two recombinant complexes, each incorporating a known mutation (Y272C, E134K) involved in SMA. For this purpose wildtype SMN and mutated versions thereof were expressed as GST-fusion proteins together with full length Gemin2, Gemin6, Gemin7 and Gemin8 in *E. coli*. After harvesting and lysis of the cells the SMN complex was enriched on a glutathione-sepharose resin and further prepared by carbamidomethylation and tryptic digestion for a quantitative massspectrometric analysis. Furthermore, the differences between the cytoplasmic and the nuclear SMN complex both derived from nuclei-cytoplasm separation of HeLa cells by a modified Roeder protocol and subsequent Co-immunoprecipitations against the SMN-specific antibody 7B19 were examined .

In order to quantify the SMN core complex absolute quantification (AQUA) was applied. Stable-isotope labeled peptide analogs were spiked to the native sample in defined amounts thus introducing a mass difference of 6-10 Da during the massspectrometric analysis. Preliminarily, appropriate peptides that meet several conditions (e.g. no labile amino acids, no missed tryptic digestion sites) to allow for a confident quantification were chosen. As MS-analysis was performed by Selected Reaction Monitoring (S/MRM) on two different triple quadrupol systems, transitions and parameters (Declustering Potential and Collision Energy) for each respective peptide were optimized .

Alternatively, label-free quantitation on the LTQ Orbitrap Velos was applied. The high mass accuracy and sensitivity of this hybrid FT MS allows quantifying the respective parent ions directly from the MS1 trace.

Both strategies, S/MRM and MS1, provide a linear quantification of peptides down to a concentration of 250 amol. By optimizing the current workflow, it was possible to determine the stoichiometry of SMN-complexes containing several known patient mutations within the *SMN1* gene as well as discovering the differences between SMN-complexes originating either from cytoplasm or from nucleus.

This project may help to throw a light on the assembly of U snRNPs and provide new targets in diagnosis and therapy for genetic diseases like SMA.

1 Einleitung

1.1 Spinale Muskelatrophie

Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch eine homozygote Genalteration (Deletion, Konversion oder Punktmutation) im *Survival of Motor Neuron 1 (SMN1)* Gen [Entrez Gene ID Nr. 6606] hervorgerufen wird [4–6]. Diese neurodegenerative Störung ist charakterisiert durch die Rückbildung spinaler (im Rückenmark gelegener) α -Motorneuronen [siehe Abb. 1.1]. SMA verursacht im Verlauf der Krankheit sekundäre Leiden wie Hypotonie und Muskelschwäche und führt abhängig vom klinischen SMA-Typ [siehe Kap. 1.1.1] in den meisten Fällen zu einem frühen Tod [4]. Die Inzidenz liegt bei ca. einer von 6.000 bis 10.000 Lebendgeburten mit einer Trägerhäufigkeit von 1:50 [4]. SMA ist damit eine der häufigsten genetischen Ursachen für Säuglingssterblichkeit nach Mukoviszidose.

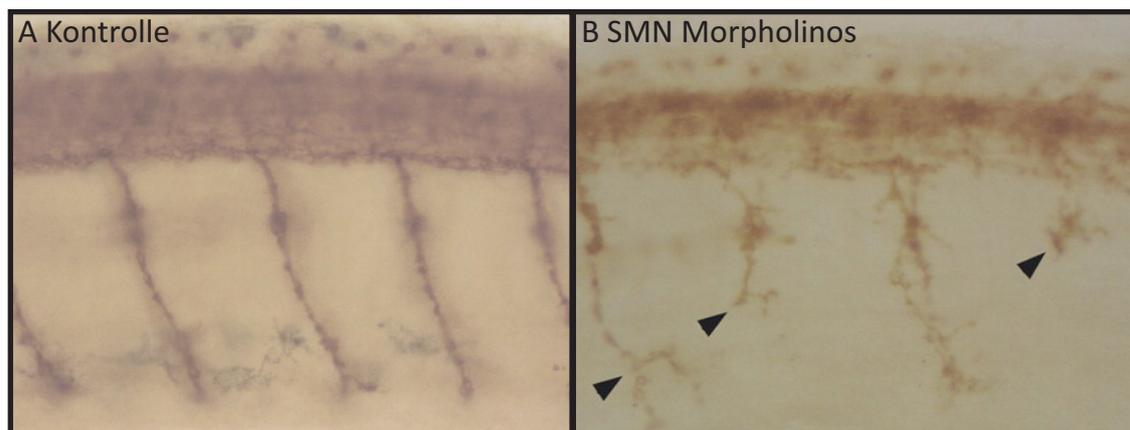


Abb. 1.1: SMA-Phänotyp am Beispiel des Tiermodells Zebrafisch - seitliche Ansicht auf das Rückenmark der Fische mit den Motoraxonen **A** Gesunder Embryo mit geraden, unverzweigten Motoraxonen **B** SMN-defizienter Embryo durch Injektion von SMN-Morpholinos (entsprechen kurzen RNA-Oligos, die die Translation des *SMN*-Gens unterdrücken). Die Motoraxonen werden verkürzt und verzweigt ausgebildet. In Anlehnung an Winkler *et al.* [6].

1.1.1 SMA-Typen

Im Allgemeinen wird SMA in vier verschiedene klinische Varianten eingeteilt: Typ I (Werdnig-Hoffmann) [7, 8], Typ II [9], Typ III (Kugelberg-Welander) und eine adulte Form der Störung Typ IV [10].

Typ I bezeichnet dabei die schwerwiegendste und gleichzeitig häufigste Variante (>50% aller SMA-Patienten) von SMA. Sie tritt meistens bereits im Fötus oder innerhalb der ersten drei

Lebensmonate auf und ist durch eine Lebenserwartung von unter 2 Jahren gekennzeichnet. Patienten leiden zumeist an schwerer Hypotonie und Lähmungserscheinungen. Sie sind nicht in der Lage, Kopfbewegungen zu kontrollieren und erlernen niemals das Sitzen ohne Unterstützung. Weitere Einschränkungen zeigen sich im bulbären System, d.h. Lähmungen der Zunge, Gesichtsmuskeln und Lippen, die zu Schwierigkeiten beim Saugen und Schlucken führen. Die schwach ausgeprägten Muskeln im Brustkorb führen oftmals zu schweren Atemstörungen und Verformungen des oberen Torsos (Glockenform)[siehe Abb. 1.2]. Bulbärscheinungen und Aspirationsschwierigkeiten erhöhen das Risiko von Lungenentzündungen und sind eine der häufigsten direkten Todesursachen beim SMA Typ I [11].

Typ II kennzeichnet eine intermediäre Störung von SMA. Charakteristisch ist ein Auftreten der Krankheit zwischen dem 7. und 18. Lebensmonat. TypII-Patienten sind in der Lage zu sitzen, einige können sogar mit Unterstützung stehen, aber ein eigenständiges Laufen gelingt auch diesen Betroffenen nicht. Bei vielen entwickelt sich durch die progressive Degeneration der Motorneuronen und dem damit einhergehenden Muskelabbau eine Skoliose, d.h. eine Deformation der Wirbelsäule, so dass häufig chirurgische oder orthopädische Eingriffe erforderlich sind [siehe Abb. 1.2]. Auch beim Typ II beobachtet man häufig leichte Schluckbeschwerden, was oft Untergewicht zur Folge hat. Des Weiteren treten bei dieser klinischen SMA-Variante ebenfalls Atemstörungen mit vermindertem Abhusten der Atemwege auf, so dass auch hier Pneumonie als eine der häufigsten Todesursachen festzustellen ist. Der Todeszeitpunkt der Patienten liegt meistens in der Pubertät [12].

Typ III SMA beschreibt eine mildere Form und zeigt eine hohe Heterogenität an Krankheitssymptomen. Charakteristisch ist ein Auftreten der Krankheit im jugendlichen Alter. Patienten können in Bezug auf ihre körperliche Entwicklung alle Stufen bis zum eigenständigen Laufen erreichen. Nur wenige benötigen in der Kindheit einen Rollstuhl. Analog zum Typ II entwickeln auch diese Betroffenen in vielen Fällen eine Skoliose, die ärztlicher Behandlung bedarf. Im Allgemeinen haben Typ III-Patienten eine normale Lebenserwartung [13].

Typ IV-SMA bezieht sich auf eine spätauftretende Form im Erwachsenenalter. Ähnlich wie bei Typ III sind die meistens Krankheitssymptome nur sehr mild ausgeprägt, so dass auch diese Patienten in der Regel laufen können und eine normale Lebenserwartung haben [14].

1.1.2 Genetischer Hintergrund von SMA

Mehrere Studien zur Genotypisierung von Patienten belegen, dass der Schweregrad von SMA davon abhängt, wie viele Kopien des zu *SMN1* homologen Gens, *SMN2* [Entrez Gene ID Nr. 6607] [siehe Abb. 1.3], gefunden werden können. Je mehr *SMN2*-Kopien vorhanden sind, desto weniger ausgeprägt sind die einzelnen Krankheitssymptome und desto höher ist der Einstufungsgrad (Typ I bis Typ IV) der Krankheit. Hierbei ist es allerdings nicht möglich, eine exakte Einstufung in Bezug auf Anzahl der *SMN2*-Kopien vorzunehmen. Die Beobachtung gibt lediglich einen Trend wieder, der aber durch die Vielzahl an Krankheitssymptomen nicht genau festzulegen ist. Außerdem wird vermutet, dass noch weitere Gene eine Abmilderung des Phänotyps beeinflussen könnten [16].

Eine Erklärung für den partiellen substituierenden Effekt von *SMN2* liegt der Sequenz beider

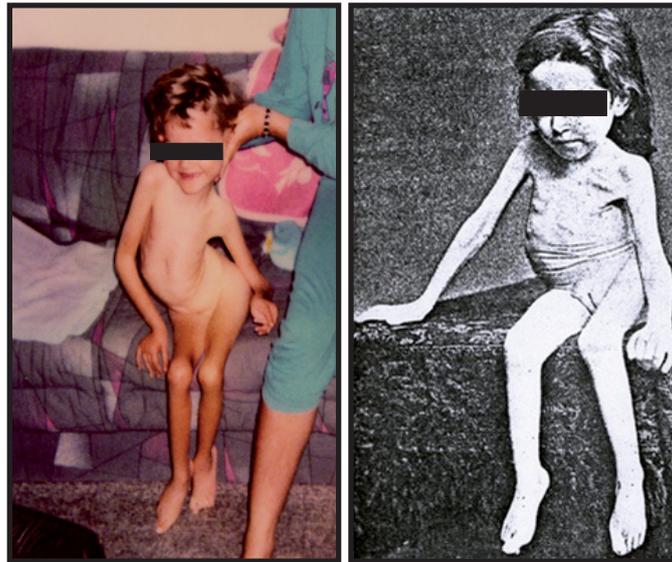


Abb. 1.2: SMA-Patienten, die eine typische Deformation des oberen Torsos sowie Muskelschwund an allen Gliedmaßen aufgrund der Motorneuronenatrophie aufweisen. Linke Abbildung: Quelle unbekannt. Rechte Abbildung: Quelle nach Hoffmann [15].

Gene (*SMN1*, *SMN2*) zugrunde. Beide Gensequenzen befinden sich auf Chromosom 5q13, wobei *SMN1* im Telomerbereich (lineare Chromosomenden) des Chromosoms zu finden ist, während *SMN2* im Centromer (Zentrum des Chromosoms) liegt [17]. *SMN1* und *SMN2* unterscheiden sich lediglich in fünf Nukleotiden, wobei jedoch nur eine Cytidin (C) → Thymidin (T) Transition an Position 6 im Exon 7 im kodierenden Bereich des Gens liegt und keine Änderung der vorhergesagten Aminosäuresequenz zur Folge hat [18]. Beide Gene besitzen neun Exons und acht Introns, die eine 20 kb große Gensequenz umfassen [siehe Abb. 1.3]. *SMN1* kodiert für ein 38 kDa großes Protein [SMN Uniprot Accession Nr. Q16637-1], welches aus 294 Aminosäuren besteht und in allen somatischen Geweben exprimiert wird [siehe Kap. 1.2.1]. Es ist bei Eukaryoten hochkonserviert [19, 20].

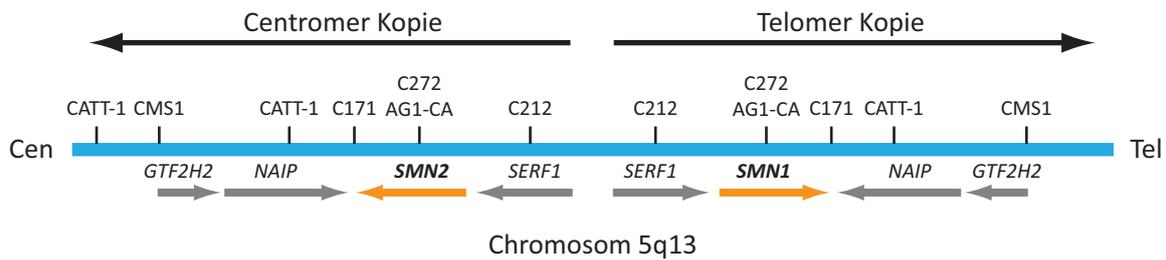


Abb. 1.3: Genkarte Chromosom 5q13 mit den Genen *SMN1* und *SMN2*. In Anlehnung an Lunn *et al.* [4].

SMN2 ist einzigartig im Menschen, andere Eukaryoten besitzen entweder nur eine *Smn*-Kopie (Maus) oder mehrere Kopien desselben *SMN* Gens (Affen) [21]. *SMN2* wird durch die bereits erwähnte C-T-Transition alternativ gespleißt [22,23]. Dieser Basenunterschied zerstört eine sogenannte *Exon Splicing Enhancer Sequenz* (ESE), was wiederum die Bindung des Serin/Argininreichen-Proteins *Splicing factor 2* (SF2), auch genannt *Alternative Splicing Factor* (ASF), verhindert. Unter normalen Umständen interagiert SF2/ASF mit U2 snRNPs und dem Hilfsfaktor

U2AF am Verzweigungspunkt innerhalb von Intron 6. Dadurch wird ein korrektes prä-mRNA Spleißen des *SMN1* Transkripts gewährleistet [siehe Abb. 1.4]. Es wurde gezeigt, dass durch a) Inversion des C zu T im *SMN2*-Gen oder b) Effektormoleküle, die die Funktion der SF2/ASF-Proteine imitieren, der normale Spleißvorgang unter Beibehaltung von Exon 7 wiederhergestellt werden kann [24].

Zusätzlich entsteht durch das Uridin (U) im *SMN2*-mRNA-Transkript anstelle des C eine sogenannte *Exon Splicing Silencer* Sequenz, welche wiederum die Bindung des inhibierenden Faktors hnRNP A1/A2 unterstützt. Damit wird das *SMN2* Exon7 nicht durch den Intronerkennungskomplex des Spleißosoms erkannt [siehe Abb. 1.4]. Experimente mit Interferenz-RNA (RNAi) zum *Knockdown* von hnRNP A1/A2 konnten den korrekten Spleißvorgang der *SMN2*-Transkripte [25] wiederherstellen.

Durch das Zusammenwirken beider genannter Faktoren fehlt dem resultierenden Transkript Exon7. Das wiederum resultiert nach der Translation in einem inaktiven SMN Δ 7-Protein [UniProt Accession Nr. Q1667-3], welches sehr schnell abgebaut wird [26]. Nur 10% bis maximal 50% der Original-*SMN2*-prä-mRNA werden korrekt gespleißt und anschließend zur aktiven SMN-Proteinisoform translatiert [siehe Kap. 1.2.1] [27].

Diese Beobachtung erklärt zum einen das Überleben der SMA-betroffenen Embryos. Der geringe Anteil von aktivem SMN-Protein ist ausreichend, um eine normale Entwicklung im Uterus zu gewährleisten. Um allerdings das Überleben der Motorneuronen [siehe Abb. 1.1] im Rückenmark nach der Geburt zu sichern, ist der Anteil an aktivem SMN zu gering. Dementsprechend korreliert das erste Auftreten von Symptomen mit der Zahl der vorhandenen *SMN2*-Kopien, da diese Zahl gleichbedeutend mit einem höheren Anteil an aktivem SMN-Protein ist [4,28].

Zum anderen findet man in dieser Erklärung auch die Ursache für den gewebespezifischen primären Phänotyp, der sich nur auf die Degeneration der α -Motorneuronen im Rückenmark bezieht [siehe Abb. 1.1]. Diese Zellen weisen eine sehr hohe Spleißaktivität auf und sind deshalb von der Unterversorgung mit SMN-Protein besonders betroffen. Für alle anderen Zellen ist der geringe Anteil an Protein, der durch Expression des *SMN2*-Gens erbracht wird, ausreichend [5].

1.1.3 Diagnose von SMA

Eine Diagnose von SMA erfolgt zunächst durch Elektromyographie (EMG) zur Einschätzung der Muskelaktivität und anhand von Muskelbiopsien. Charakteristisch für EMG-Aufnahmen von SMA Patienten sind spontane Muskelaktivitäten mit positiven Spitzen, Flimmern und Faszikulationen (unwillkürliche Muskelbewegungen kleinerer Muskelgruppen). Aktionspotentiale von Muskeln des Bewegungsapparates weisen über lange Zeitspannen hohe Amplituden mit geringer Verstärkung des Muskelimpulses auf. Histopathologisch zeigt die Skelettmuskulatur gewöhnlich atrophische Fasern mit hypertrophischen Inseln; im Rückenmark sind schwerwiegende Verluste von Motorneuronen im Bereich des Vorderhorns feststellbar [29] [siehe Abb. 1.1].

Heutzutage kann die Krankheit schnell und sensitiv über genetische Analysen nachgewiesen werden. Zunächst wird mittels PCR-Analyse (engl. *Polymerase Chain Reaction*) und anschließendem Restriktionsverdau überprüft, ob eine homozygote Gendeletion von *SMN1* vorliegt.

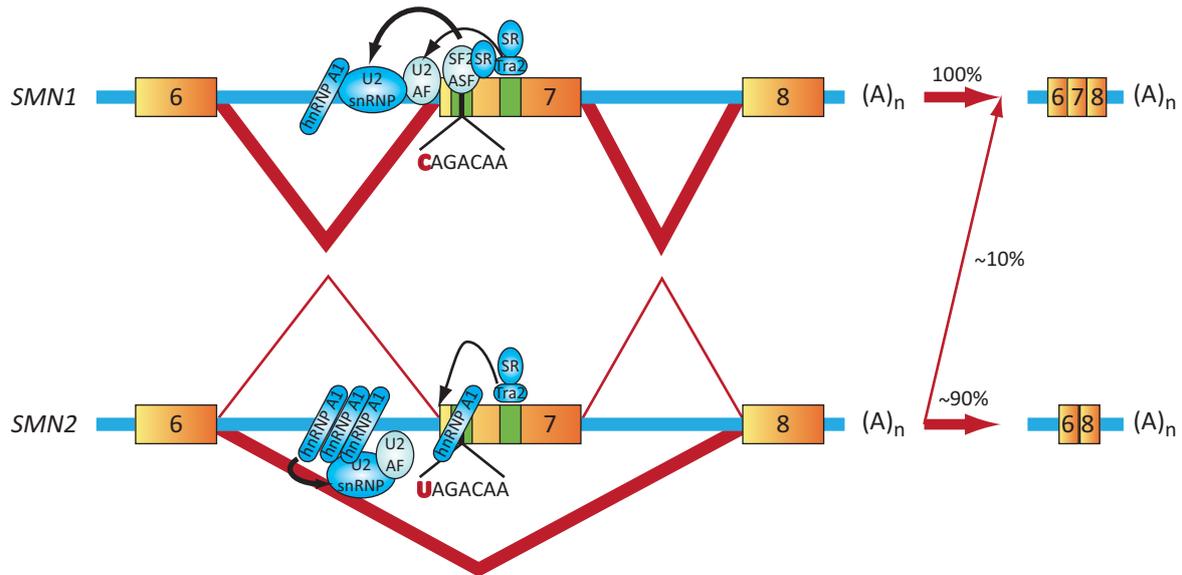


Abb. 1.4: Spleißmechanismus der RNA-Transkripte von *SMN1* und *SMN2*. In Anlehnung an Lunn *et al.* [4]. Durch einen Nukleotidunterschied (C zu T) im *SMN2*-Gen wird dieses nur zu 10% korrekt gespleißt. Ungefähr 90% der Transkripte fehlt Exon7 und führt nach der Translation zu dem inaktivem SMN2-Protein.

Dabei kann auch untersucht werden, in welchem Verhältnis *SMN1* und *SMN2* im Chromosom vorliegen. Wird eine Kopie von *SMN1* gefunden, muss die Analyse für die Suche nach Mutationen in diesem Gen ausgeweitet werden, in dem eine Gensequenzierung vorgenommen wird. Bei einer Feststellung von mehreren *SMN1*-Kopien liegt meist eine andere Krankheit den Symptomen zugrunde, z.B. eine spinobulbäre Muskelatrophie vom Typ Kennedy, die ihren Ursprung in einer Mutation im Chromosom Xq12 hat oder auch eine amyotrophe Lateralsklerose, bei der beide Typen der Motorneuronen betroffen sind [4, 30].

1.1.4 Therapieansätze zur Behandlung von SMA

Aktuelle Bemühungen zur Entwicklung von SMA-Therapeutika widmen sich vornehmlich dem Ziel, den Anteil an SMN-Protein [siehe Kap. 1.2.1] durch Erhöhung des Anteils an *SMN2*-Transkript einschließlich Exon7 zu steigern. Dabei werden entweder Methoden gewählt, welche die Transkription direkt beeinflussen oder indirekt eine Einflußnahme über post-transkriptionale Modifikationen ausüben [4].

Untersuchungen im Zusammenhang mit dem *serine-arginine-rich-like* Spleißfaktor Htra2- β 1 ergaben eine Stimulation der Expression von korrekt gespleißten *SMN2* durch Interaktion mit ESEs. Die SMN-Gene sind diesbezüglich die einzigen bekannten Zielsequenzen dieses Spleißfaktors. Eine Behandlung durch Hochregulation von Htra2- β 1 und der damit einhergehenden Expression von *SMN2* könnte für SMA-Patienten einen therapeutischen Effekt haben.

Ein weiterer Behandlungsansatz basiert auf der Verabreichung von Valproinsäure mit dem Ziel, Histondeacetylierungen zu inhibieren. In 2% aller menschlichen Gene kann eine Histonacetylierung ein Gen flankierende DNA strukturell entspannen und damit der Transkriptionsmaschinerie einen Zugang ermöglichen. Dies führt zu einer erhöhten Expression dieses Gens. Experimente

in Mäusen zeigten, dass so auch die *SMN2*-Expression durch Aktivierung des *SMN2*-Promotors hochreguliert und die Translation von komplettem SMN-Transkript unterstützt wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die positiven Spleißfaktoren Htra2- β 1 und SF2/AG durch Verabreichung von Valproinsäure hochreguliert werden. Im Zuge einer Pilotstudie mit Valproinsäure konnten eine Verbesserung von Lungen- und Muskelfunktion, sowie eine Zunahme an Körpergewicht festgestellt werden. Weitere klinische Testreihen mit randomisierten Placebokontrollgruppen sind jedoch notwendig, um eine Wirksamkeit von Valproinsäure entgültig nachzuweisen, sowie unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen [31, 32].

Eine Behandlung mit Hydroxycarbamid führt zu einer Verschiebung des *SMN1* zu *SMN2* mRNA-Transkripts Verhältnisses. Bei unveränderter Menge an SMN mRNA ist somit eine Zunahme von vollständigem SMN-Transkript begleitet von einer Abnahme an verkürzter SMN mRNA. Hydroxycarbamid eignet sich ausgesprochen gut für die klinische Behandlung, zum einen durch seine gute Verträglichkeit, die Möglichkeit der oralen Applikation, sowie durch seine hohe Bioverfügbarkeit. Während einer 8-wöchigen klein angelegten klinischen Testphase mit Hydroxycarbamid konnte jedoch bislang weder eine verbesserte Lungenfunktion, noch ein signifikanter Anstieg an Muskelfunktion nachgewiesen werden. Größere und Placebo-kontrollierte klinische Testphasen sind daher notwendig, um die in *in vitro* Experimenten nachgewiesene Wirkung auch *in vivo* aufzuzeigen [33].

Momentan stehen die Bemühungen, SMA zu heilen bzw. die Symptome abzumildern noch am Anfang. In naher Zukunft wird es jedoch durch technologische Fortschritte möglich sein, kleine, nicht-toxische, hochpotente Wirkstoffe zu entwickeln, die den Spleißvorgang von *SMN2* stimulieren und modifizieren. Es gibt auch Überlegungen, *SMN1* im Rahmen einer alternativen Gentherapie mittels viraler Vektoren direkt in den Körper einzuschleusen. Des Weiteren wurden in Laborversuchen Motorneuronen aus Stammzellen gezüchtet, die bereits in Tierversuchen vielversprechende Ergebnisse erbrachten [34]. Diese könnten später möglicherweise Patienten als Transplantat dienen und den Krankheitsverlauf von SMA verzögern.

1.2 Survival of Motor Neuron - Komplex

1.2.1 SMN Protein

Das SMN-Protein besteht aus 294 Aminosäuren und wird ubiquitär produziert. Damit nimmt das *SMN1*-Gen die Rolle eines sogenannten Haushaltsgens (engl. *housekeeping gene*) ein, das unabhängig vom Zelltyp, des Zellstadiums sowie äußeren Umwelteinflüssen exprimiert wird. Generell werden konstitutiv aktive Gene dem Grundstoffwechsel von Zellen zugeordnet und sind oftmals essentiell zur Erhaltung der Zellviabilität [35].

In somatischen Zellen wird *SMN1* sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern exprimiert [siehe Abb. 1.5]. Das im Nukleus auftretende SMN wird in speziellen Subkompartimenten, den sogenannten Gems, lokalisiert. Diese Granulate beinhalten mehr als zweihundert Proteine, die für das prä-mRNA-Spleißen notwendig sind. Gems befinden sich zudem in direkter Nachbarschaft zu anderen Kernstrukturen, den *Cajal Bodies*, mit denen sie bei Bedarf verschmelzen können [37–40]. Untersuchungen zeigten, dass die zelluläre Distribution von SMN abhängig von

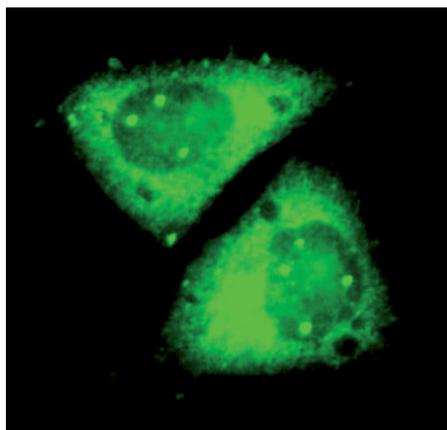


Abb. 1.5: Die Lokalisation von SMN in HeLa-Zellen wird gezeigt anhand Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung von 7B10 (anti-SMN) als primären Antikörper. Das SMN-Protein ist sowohl homogen im Cytoplasma verteilt, als auch angereichert in diskreten Kompartimenten des Zellkerns (sogenannte Gems). Nach Grimmer *et al.* [36].

dessen Phosphorylierungsmuster ist. Modifikationen der Serine 28 und 31 können die Aktivität des SMN-Komplexes beeinflussen. So ist der Komplex in phosphoryliertem Status fähig, U snRNPs zusammenzulagern, während er in nicht phosphoryliertem Zustand im Zellkern vorliegt und nicht an der U snRNP-Assemblierung teilnimmt. Untersuchungen konnten belegen, dass für die Dephosphorylierung im Kern die Phosphatase PPM1G zuständig ist [41, 42].

SMN liegt in den Zellen assoziiert mit weiteren Proteinen (Gemin2 bis Gemin8, Unrip [siehe Kap. 1.2.2-1.2.9]) in einem makromolekularen Komplex vor [43] [siehe Abb. 1.6], der unter Verwendung von Dichtegradientenzentrifugation in heteroverteilten Partikeln zwischen 30S und 70S sedimentiert [44]. Die benannten Proteine koloalisieren mit SMN im Cytoplasma sowie im Nukleus, allerdings mit unterschiedlichen Verteilungen [siehe Abb. 1.5]. So sind Gemin3, Gemin4 und Gemin5 im Nukleus unterrepräsentiert [35], wobei Gemin4 das einzige Protein ist, welches zusätzlich auch im Nukleolus zu finden ist. Mittels Co-Immunopräzipitationen [siehe Kap. 1.3.3.3] können alle Bestandteile als assoziierter Proteinkomplex isoliert werden [siehe Abb. 1.6], der selbst unter stringenten Salzbedingungen (bis zu 750 mM NaCl) stabil vorliegt. Die Proteine Gemin2, Gemin3 und Gemin8 interagieren direkt mit dem SMN-Protein. Gemin8 wiederum bindet das Gemin6/7-Heterodimer und Gemin7 rekrutiert zusätzlich das Protein Unrip durch direkte Interaktion. Gemin5 wird als peripherer Faktor betrachtet, da er im Gegensatz zu allen anderen Proteinen schon durch geringe Salzkonzentrationen dissoziiert. Er wird über schwache Interaktionen durch Gemin2 gebunden [2]. Neben diesen stöchiometrischen Interaktionen interagiert SMN außerdem mit transienten Proteinfaktoren, den sogenannten Sm-Proteinen [siehe Kap. 1.2.11]. Die stärkste Affinität liegt hierbei gegenüber den Sm-Proteinen D1, D3 und B/B' vor. Alle drei Proteine weisen C-terminale Arginin-Glycin-Motive auf, die durch einen weiteren Proteinkomplex, das *Methylsome* [siehe Kap. 1.2.10], symmetrisch dimethyliert werden, um dadurch die Affinität zu SMN zu erhöhen [45].

Betrachtet man SMN bezüglich struktureller Merkmale, fällt vor Allem eine zentrale Tudordomäne ins Auge. Diese ist verantwortlich für die genannten SMN-Sm-Protein-Interaktionen. Die

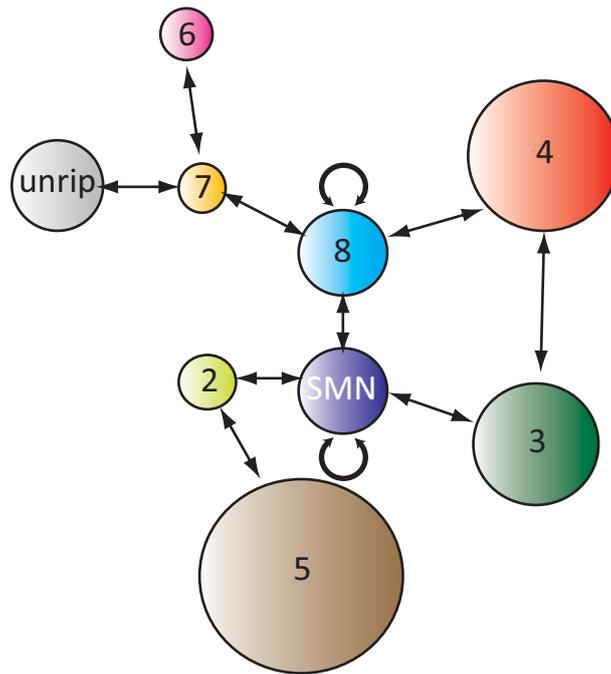


Abb. 1.6: Interaktionskarte des SMN-Komplexes einschließlich der Proteine SMN, Gemin2 bis Gemin8 sowie Unrip. Durch die Pfeile zwischen verschiedenen Proteinen werden Interaktionen verdeutlicht, die mittels verschiedener *in vitro* molekularbiologischer Techniken ermittelt wurden. SMN und Gemin8 sind außerdem durch Selbst-Oligomerisierung charakterisiert. In Anlehnung an Otter *et al.* [2].

Tudordomäne ist ein konserviertes Motiv aus fünfzig Aminosäuren, deren Oberfläche hauptsächlich negative Ladungen aufweist. Die Faltung der Domäne ähnelt trotz fehlender Sequenzmerkmale, strukturell den Sm-Proteinen [siehe Kap. 1.2.11]. Durch Punktmutationen innerhalb des *SMN1* Gens von SMA Patienten kann die Ladungsverteilung der Domäne durch pathogene Aminosäuresubstitution (z.B. E134K) zerstört werden, so dass die Interaktion zu den Sm-Proteinen verloren geht [45].

1.2.2 Gemin2

Gemin2 [Uniprot Accession Nr. O14893, 30 kDa] ist das am höchsten konservierte Protein des SMN-Komplexes (Maus:Mensch 94% Sequenzhomologie). Studien zur Evolution des SMN-Komplexes offenbarten eine SMN-Gemin2-Grundstruktur [siehe Abb. 1.6], erst im Laufe der Entwicklung wurden dann blockweise andere Faktoren hinzugefügt. Dieser SMN-Gemin2 Grundkomplex ist bereits fähig, U snRNPs zu assemblieren [siehe Kap. 1.2.12], was darauf schließen lässt, dass alle weiteren Faktoren des SMN-Komplexes nicht notwendig für die eigentliche Assemblierungsreaktion sind, sondern andere wichtige Funktionen im Rahmen der weiteren Biogenese der U snRNPs bis hin zu ihrem Transport in den Nukleus inne haben [1, 46, 47] [siehe Kap. 1.2.12.2].

Vor diesem Hintergrund nimmt Gemin2 somit eine wichtige Rolle innerhalb des makromolekularen Proteinkomplexes ein. Es trägt zur Stabilisierung des Komplexes bei, in dem es sowohl das SMN-Protein [siehe Kap. 1.2.1], als auch weitere Untereinheiten strukturell fixiert. Unter Einfluß von Gemin2 wird sowohl die aminoterminal Oligomerisierung von SMN-Proteinen

unterstützt, als auch die Komplexaktivität während der Assemblierungsreaktion [siehe Kap. 1.2.12.2] aufrechterhalten. Ähnlich wie das SMN-Protein oligomerisiert auch Gemin2 durch Homo-Dimerisierung. In Folge der Interaktion mit SMN ergibt sich so ein quaternärer Komplex. Im Gegensatz zu allen anderen Gemins weist Gemin2 allerdings keinerlei Interaktion zu den Sm-Proteinen auf [48].

1.2.3 Gemin3

Gemin3 [Uniprot Accession Nr. Q9UHI6, 92 kDa] bildet durch direkte C-terminale Interaktion einen stabilen Komplex mit SMN [siehe Kap. 1.2.1]. Es kolokalisiert mit SMN sowohl im Cytoplasma, als auch in den nuklearen Gems [siehe Abb. 1.5]. Gleichzeitig co-immunopräzipitiert es mit verschiedenen Sm-Proteinen (SmB/B' und SmD3) [siehe Kap. 1.2.11]. Das DEAD-Box-Motiv kennzeichnet Gemin3 als RNA-Helikase, zudem besitzt das Protein ATP-bindende Domänen. Es wird vermutet, dass Gemin3 für die enzymatische Aktivität des SMN-Komplexes von Bedeutung ist, die eine strukturelle Transition der RNA-Targets verursacht. Bekannte Mutationen innerhalb des *SMN1* Gens rufen Aminosäuresubstitutionen (z.B. Y272C) hervor, welche die Bindung zu Gemin3 schwächen und gleichzeitig die Aktivität des Komplexes negativ beeinflussen [49–51].

1.2.4 Gemin4

Gemin4 [Uniprot Accession Nr. P57678, 97 kDa] ist sowohl im Cytoplasma, als auch im Nukleus zu finden [siehe Abb. 1.5]. In beiden Kompartimenten kann es assoziiert mit dem SMN-Komplex vorliegen. Diese Bindung erfolgt nicht direkt, sondern indirekt über Bindung zu Gemin3 [siehe Kap. 1.2.3]. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Gemin4 ein Co-Faktor für die putative RNA-Helikase Gemin3 ist. Neben der Lokalisation in den nuklearen Gems wird Gemin4 als bisher einziges Protein des SMN-Komplexes auch in den Nukleoli angereichert, was eine Verknüpfung mit der Assemblierung von snoRNPs bzw. mit der Biogenese von Ribosomen vermuten lässt. *PullDown*-Experimente zeigten außerdem direkte Interaktionen mit U snRNAs und Sm-*Core*-Proteinen (SmB, SmD1, SmD2, SmD3, SmE) [siehe Kap. 1.2.11]. Daraus lässt sich schließen, dass Gemin4 die Assemblierung der U snRNPs fördert [siehe Kap. 1.2.12.2], in dem es eine Verbindung zwischen den RNA- und Proteinkomponenten bereitstellt. Kürzlich wurde in Gemin4 eine bekannte nukleäre Importsequenz entdeckt und damit erstmalig funktionale Nuklei-Importsequenzen innerhalb des SMN-Komplexes nachgewiesen [52]. Die Autoren spekulieren, dass Gemin4 direkt im nukleären Import der assemblierten U snRNPs involviert ist. Trotz fehlender eindeutiger Domänen innerhalb der Proteinsequenz ist Gemin4 neben der U snRNP-Assemblierung außerdem bei weiteren wichtigen zellulären Aufgaben beteiligt, z.B. der Apoptose, der Transkription sowie innerhalb von RNAi-Mechanismen [52, 53].

1.2.5 Gemin5

Gemin5 [Uniprot Accession Nr. Q8TEQ6, 196 kDa] ist ein sogenanntes WD *repeats* Protein, welches Tryptophan-Asparaginsäure-Wiederholungen innerhalb der Sequenz aufweist. Die Häu-

figkeit dieses Motivs innerhalb einer Proteinsequenz schwankt zwischen 4 und 16 Kopien. WD *repeats* sind bekannte Protein-Protein-Interaktionsdomänen und bestehen aus einem 40-60 langen Aminosäurekern, der von GH- oder WD-Dipeptiden eingeschlossen ist. Dabei sind jedoch weder die GH- noch die WD-Sequenzen hochkonserviert, die einzelnen Aminosäuren können vielmehr auch durch solche ersetzt werden, welche die Tertiärstruktur unverändert lassen. Diese, auch als Propellerstruktur beschriebene Tertiärstruktur, steht als Assemblierungsplattform zur Verfügung und unterstützt die eigentliche Bindung der Proteintargets. Experimentell zeigt sich jedoch, dass Gemin5 keine Protein-Protein-Interaktion, sondern Protein-snRNA-Interaktionen aufweist. Reduktion von Gemin5 in der Zelle führt zu einer Schwächung sowohl der Bindung von snRNAs an den SMN-Komplex, als auch der U snRNP-Assemblierungsreaktion [siehe Kap. 1.2.12.2]. Folglich ist die Anwesenheit von Gemin5 für die spezifische Rekrutierung der snRNA an den SMN-Komplex von Bedeutung [54, 55].

Neben der prägnanten Propellerstruktur enthält Gemin5 eine *Coiled-Coil*-Domäne (engl. Doppelwendel). Solche Domänen stehen häufig im Zusammenhang mit funktionellen Proteinen des Cytoskelett, mit Membran-Fusions-Proteinen oder mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie. Tatsächlich liegt ein großer Anteil des Gemin5 ungebunden im Cytoplasma vor und könnte ein Indiz für weitere Aufgaben unabhängig von der U snRNP-Assemblierung innerhalb der Zelle darstellen.

Die Bindung von Gemin5 an SMN ist im Vergleich der anderen Gemin5 sehr schwach ausgeprägt und kann bereits durch Salzkonzentrationen von 500 mM aufgelöst werden. Im Zellkern ist Gemin5 unterrepräsentiert, beispielsweise enthalten HeLa-Zellen nur <1% der Gesamtproteinmenge an Gemin5 in den nukleären Gemin5 [siehe Abb. 1.5]. Die Vermutung liegt nahe, dass Gemin5 nach erfolgreicher Assemblierung und Transport der U snRNPs in den Zellkern keine tragende Rolle mehr innerhalb des SMN-Komplexes spielt und deshalb nur noch schwach oder gar nicht gebunden vorliegt [56, 57].

1.2.6 Gemin6

Gemin6 [Uniprot Accession Nr. Q8WXD5, 16 kDa] kolokalisiert mit SMN [siehe Kap. 1.2.1] im Cytoplasma wie auch in den nukleären Gemin5 [siehe Abb. 1.5]. Die Bindung an den SMN-Komplex erfolgt hierbei nicht über SMN selbst, sondern über Gemin7 [siehe Kap. 1.2.7] und Gemin8 [siehe Kap. 1.2.8]. Daneben interagiert Gemin6 spezifisch mit den Sm-Proteinen SmD2 und SmE und, in einem geringeren Maß, mit SmD1, SmF und SmG [58] [siehe Kap. 1.2.11].

1.2.7 Gemin7

Gemin7 [Uniprot Accession Nr. Q9H840, 15 kDa] kolokalisiert ebenfalls mit SMN [siehe Kap. 1.2.1] im Cytoplasma und in den nukleären Gemin5 [siehe Abb. 1.5]. Es liegt schwach assoziiert mit SMN vor, wobei die Bindung vermutlich über symmetrisch dimethylierte N-terminale RG-Dipeptidsequenzen erleichtert wird. Die konservierte YG-Domäne des SMN-Proteins unterstützt ebenfalls die Bindung an Gemin7. Eine stärkere Affinität besitzt Gemin7 sowohl zu Gemin6 [siehe Kap. 1.2.6], als auch zu Gemin8 [siehe Kap. 1.2.8], über welches es ebenfalls assoziativ an SMN gebunden wird. Des Weiteren interagiert Gemin7 mit den Sm-Proteinen [siehe Kap.

1.2.11], die stärkste Assoziation besteht hier mit SmE. Außerdem bindet Gemin7 schwach an SmB/B', SmD2 und SmD3 [59].

Gemin7 und Gemin6 [siehe Kap. 1.2.6] allein weisen keinerlei Sequenzhomologien zu den Sm-Proteinen auf, anders jedoch die Kristallstruktur des Gemin6/Gemin7-Heterodimers. Im Detail ähnelt diese der Sm-Faltung, einer fünfsträngigen anti-parallelen β -Faltblattstruktur, welche von einer N-terminalen Helix flankiert wird. Insbesondere gilt dies im Vergleich der Gemin6/Gemin7-Heterodimere zu den Sm-Proteindimeren SmD1/SmD2 sowie SmB/SmD3 [siehe Kap. 1.2.11]. So dimerisieren Gemin6 und Gemin7 ebenfalls Kopf-an-Schwanz und bilden eine zehnsträngige β -Faltblattstruktur aus. Diese Unterstruktur lässt vermuten, dass individuelle Sm-Proteine (oder deren Subkomplexe) an das Gemin6/Gemin7-Dimer binden und einen offenen oder sogar einen heptameren Ring ähnlich dem Sm-Ring ausbilden. Diese Zwischenstruktur kann dann die Bindung an die snRNA oder weitere Sm-Proteine unterstützen [60].

1.2.8 Gemin8

Gemin8 [Uniprot Accession Nr. Q9NWZ8, 32 kDa] co-sedimentiert im Saccharosegradienten zusammen mit anderen Komponenten des SMN-Komplexes. Dies gilt sowohl für Fraktionen des Cytoplasma, als auch von Zellkern-angereicherten Fraktionen [siehe Abb. 1.5]. *In vitro* Bindungsstudien zeigten eine direkte Interaktion von Gemin8 mit dem Gemin6/Gemin7-Heterodimer [siehe Kap. 1.2.6 und 1.2.7] sowie mit SMN [siehe Kap. 1.2.1]. Ein *Knockdown* von SMN verursacht eine starke Reduktion des Gemin8-Proteinlevels. Umgekehrt bedingt eine Reduktion von Gemin8 eine Hemmung der U snRNP-Assemblierungsreaktion [siehe Kap. 1.2.12.2]. Dies kann damit erklärt werden, dass durch fehlendes Gemin8 keine Verbindung zwischen dem Gemin6/Gemin7-Heterodimer und SMN ausgebildet werden kann und somit deren funktionelle Eigenschaften innerhalb der U snRNP-Assemblierung verloren gehen. Beide Fakten zeigen die Bedeutung von Gemin8 als integralen Bestandteil des SMN-Komplexes, der zur Architektur des makromolekularen Komplexes einen wesentlichen Beitrag leistet [61, 62].

1.2.9 Unrip

Unrip [Uniprot Accession Nr. Q9Y3F4, 38 kDa] ist ein Protein der GH-WD-Repeat Familie. Es ist hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, kann aber auch im Nukleus gefunden werden [siehe Abb. 1.5]. Interessanterweise weist Unrip keine Kolo-kalisation mit SMN [siehe Kap. 1.2.1] in den nukleären Gems auf. Interaktionsstudien zeigten eine direkte Bindung an Gemin7 [siehe Kap. 1.2.7], sowie eine schwache Bindung an Gemin6. Da ansonsten keine Assoziationen zu weiteren SMN-Komplex-Bestandteilen nachgewiesen werden konnten, erfolgt die Bindung an den SMN-Komplex vermutlich über das Gemin6/Gemin7-Heterodimer [siehe Kap. 1.2.6 und 1.2.7]. Des Weiteren bildet Unrip eine starke Bindung zu den Sm-Proteinen SmB, SmD2 und SmD3 aus, zeigt jedoch nur eine schwache Bindung zu SmE [siehe Kap. 1.2.11]. In diesem Zusammenhang kommt Unrip als Bestandteil des SMN-Komplexes, eine Bedeutung für die Ausbildung der Sm-Kernstruktur zu. Ein *Knockdown* von Unrip führt jedoch nicht nur zu einer reduzierten U snRNP-Assemblierungsreaktion [siehe Kap. 1.2.12.2], sondern auch zu einer Akkumulation von SMN im Zellkern, die sich durch eine gehäufte Formation von Gems im Nukleus äußert

[siehe Abb. 1.5]. Unrip spielt also auch in der zellulären Verteilung des SMN-Komplexes eine große Rolle [36,63].

1.2.10 *Methylsome*

Wie bereits erwähnt, erleichtert die symmetrische Dimethylierung der Arginine in den C-terminalen Domänen von SmD1, SmD3 und SmB/B' die Bindung an den SMN-Komplex und ihre finale Assemblierung zu U snRNPs. Diese posttranslationale Modifikation wird vor der Interaktion mit dem SMN-Komplex durch einen weiteren Proteinkomplex, das *Methylsome*, übertragen [64].

Das *Methylsome* ist ein makromolekularer Komplex, der innerhalb eines Saccharosegradienten bei 20S sedimentiert. Er besteht aus den Proteinen pICln [Uniprot Accession Nr. P54105], PRMT5 [Uniprot Accession Nr. O14744] und MEP50 [Uniprot Accession Nr. Q9BQA1].

PRMT5 ist eine Argininmethyltransferase II, welche die Sm-Proteine B/B', D1 und D3 innerhalb ihrer C-terminalen Domänen symmetrisch dimethyliert. Die Bindung dieser Sm-Proteine erfolgt über deren C-terminale RG-Domänen [65].

PICln ist ein 26 kDa großes Phosphoprotein, das im Cytoplasma lokalisiert ist und sowohl direkt an PRMT5 bindet, als auch in einem kleineren 6S-Komplex an Sm-Proteine assoziiert ist. Die Bindung an die Sm-Proteine erfolgt über die Sm-Domäne. PICln wird einerseits die Funktion zugesprochen, Sm-Proteine für den *Methylsome*-Komplex zu rekrutieren, als auch als Assemblierungschaperon für die Ausbildung der Sm-Kernstruktur zu fungieren. Damit erleichtert es sowohl die Bindung der Sm-Proteine an PRMT5, als auch an den SMN-Komplex [66–68].

MEP50 ist ein WD *repeat*-Protein, das Interaktionen mit PRMT5 und einem Teil der Sm-Proteine aufweist. Durch die genannten WD-Domänen bietet MEP50 eine großflächige Plattform für die gleichzeitige Anlagerung mehrerer Proteine. Diese Protein-Protein-Interaktionsdomäne kann als Verbindung zwischen den Sm-Proteinen und dem PRMT5-Proteinen genutzt werden. Es wird vermutet, dass nicht nur eine einfache Bindung der Sm-Proteine an MEP50 erfolgt, sondern dass MEP50 zudem eine vorläufige Ausrichtung der Sm-Proteine bewirkt. Die hohe Anzahl an Argininen in den RG-Domänen der verschiedenen Sm-Substrate erfordert eine ausgeprägte Organisation, um eine vollständige Umsetzung der Proteine zu gewährleisten. Somit stellen alle drei Bestandteile wichtige Komponenten für die Aktivität des *Methylsomes* dar [69].

Erst kürzlich wurde eine weitere Komponente des *Methylsomes* identifiziert, RioK1 [70]. Das *Methylsome* bindet jedoch entweder nur pICln oder RioK1. Demzufolge kann für RioK1 eine ähnliche Rolle wie für pICln vermutet werden. Als Adapterprotein bindet es jedoch anstelle der Sm-Proteine das Protein Nucleolin, um es für eine symmetrische Dimethylierung durch PRMT5 zu rekrutieren. Diese exklusive Komplexbildung, mit PRMT5/MEP50 als Kernstruktur sowie RioK1/pICln als Interaktoren, ermöglichte die erste mechanistische Studie von Methyltransferasen und deren Unterscheidung verschiedener Substratproteine [70].

1.2.11 Sm-Proteine

Die Bausteine des Spleißosoms U1, U2, U4/U6 sowie U5 [siehe Kap. 1.2.12.1] sind aus verschiedenen Proteinen und RNA-Molekülen aufgebaut. Die wichtigsten Bausteine dieser U snRNPs sind die Sm-Proteine SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF und SmG [71][siehe Tabelle 1.1].

Tab. 1.1: Übersicht der Sm-Proteine

| Name | Molekulargewicht [kDa] | Uniprot ID |
|--------|------------------------|------------|
| SmB/B' | 28/29 | P14678 |
| SmD1 | 16 | P62314 |
| SmD2 | 16,5 | P62316 |
| SmD3 | 18 | P62318 |
| SmE | 12 | P62304 |
| SmF | 11 | P62306 |
| SmG | 9 | P62308 |

Sie bilden auch die Antigene der bei SLE (Systemisches Lupus Erythematodus) gebildeten Autoantikörper. Der Name der Sm-Proteine stammt von der ersten Patientin ab, deren Erkrankung auf die neu entdeckten Proteine zurückzuführen war: Stephanie Smith [72].

Durch vergleichende Untersuchungen der Sm-Protein-Sequenzen mit Sequenzen bekannter RNA-Bindungsdomänen konnten keine Homologien festgestellt werden. Wahrscheinlich ist die Bindung an das snRNA-*Target* erst nach Ausbildung des bereits erwähnten heptameren Rings während der Assemblierung möglich [siehe Kap. 1.2.12.2]. Dennoch besitzen die Proteinsequenzen der Sm-Proteine zwei hochkonservierte Sequenzmotive. Die Sm-Motive 1 und 2 sind jeweils 32 bzw. 14 Aminosäuren lang und liegen in allen zu humanen Sm-Proteinen homologen Proteinen vor. Es hat sich herausgestellt, dass genau diese Motive von Bedeutung für die Komplexbildung innerhalb des heptameren Rings sind. Besonders spezifische Interaktionen findet man zwischen den Sm-Proteinen B/B' und D3, sowie zwischen D1 und D2 [73, 74].

Bis auf SmF mit einem pI von 4.6 sind alle weiteren Sm-Proteine basisch. Dieser Umstand erschwert die Analyse des SMN-Komplex mittels *Blue Native* PAGE (BN-PAGE) [siehe Kap. 1.3.3.3].

1.2.12 U snRNP Assemblierung

In Zusammenhang mit dem ubiquitär exprimierten *SMN1* Gen [siehe Abb. 1.3] stellt sich die Frage, weshalb im Fall von SMA ein α -Motorneuronen-spezifischer Phänotyp [siehe Abb. 1.1] auftritt. Anfänglich wurden bezüglich dieses Zelltyps spezielle Funktionen des SMNs vermutet. Obwohl verschiedene Untersuchungen mit SMN eine Reihe von Zelltyp-abhängigen Funktionen beweisen, trägt letztendlich ein allgemeiner Vorgang des SMN zur Pathogenese von SMA

bei. Diese Funktion besteht in der Assemblierung von U snRNPs [siehe Abb. 1.7]. Diese RNA-Proteinkomplexe sind direkt am Aufbau des Spleißosoms [siehe Kap. 1.2.12.1] beteiligt. Die Vermutung liegt nahe, dass Motorneuronen entweder einen besonders hohen Umsatz an U snRNPs durch erhöhte Spleißaktivität dieser Zellen haben oder spezielle prä-mRNA-Transkripte besitzen, die bereits unter normalen zellulären Bedingungen unzureichend prozessiert werden. Im Gegensatz dazu können alle anderen Zellen den durchschnittlichen Verbrauch an U snRNPs durch das geringe SMN-Vorkommen aus *SMN2*-Expression aufrechterhalten [43].

1.2.12.1 Das Spleißosom und U snRNP-Bausteine

Das Spleißosom ist ein makromolekularer Ribonukleoproteinkomplex (ca. 2 MDa), der aus mehr als 100 Proteinen und Ribonukleoproteinen besteht. Die einzelnen Bestandteile sind in definierte Funktionsmodule zusammengefasst. Die bekanntesten Vertreter dieser Strukturen sind die bereits erwähnten U snRNPs.

Die Funktion des Spleißosoms umfasst das Entfernen der nicht-codierenden Bereiche der prä-mRNA (Introns) unter gleichzeitigem Zusammenfügen der codierenden Bereiche (Exons) zum finalen mRNA-Transkript durch zwei aufeinanderfolgende Transesterifizierungsreaktionen. Damit einhergehend ist das Spleißosom ein integraler Bestandteil der Proteinbiosynthese und entscheidend für das Überleben der Zelle. Nur korrekt gespleißte, reife mRNA-Transkripte werden ins Cytoplasma transportiert und durch das Ribosom erkannt und prozessiert [75].

1.2.12.2 U snRNP-Biogenese

Alle U snRNPs besitzen ein Set von sieben gemeinsamen Sm-Proteinen (SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF und SmG) [siehe Kap. 1.2.11], eine kleine nicht-codierende RNA (U snRNA) sowie verschiedene andere Proteine, die jedoch spezifisch für jeden einzelnen U snRNP sind. Insgesamt gibt es vier verschiedene U snRNPs (U1, U2, U4/6 und U5), deren Zusammensetzung zwischen den einzelnen Vertretern leicht variiert, z.B. im Fall von U4/6 sind zwei statt nur einem nicht-codierenden RNA-Transkript enthalten [76, 77].

Die snRNA-Transkripte haben bei Eukaryoten eine Länge von 100-250 Nukleotiden und besitzen ausgeprägte Sekundärstrukturen. Es gibt zwei charakteristische Merkmale, in denen sich die verschiedenen U snRNAs gleichen (Ausnahme: U6 snRNA). Zum einen die 5'-terminale Struktur der Transkripte, die Trimethylguanosin ($m_3^{2,2,7}$ -G-Cap) enthält und als m_3 G-Cap bezeichnet wird. Des Weiteren verfügen alle U snRNAs über eine einzelsträngige Sm-spezifische Bindungsstelle (Konsensussequenz: $NAU_{n=3-6}GN N = A/G$), die ihrerseits von Haarnadelstrukturen flankiert wird. An diese Uridin-reiche Sequenz binden die bereits erwähnten Sm-Proteine in Form eines heptameren Rings und bilden damit die Sm-*Core*-Domäne, ein strukturelles Grundgerüst, das allen U snRNPs gemeinsam ist [76].

Im Gegensatz dazu besitzt die U6 snRNA eine methylierte γ -Phosphatgruppe (γ -me-Cap) und rekrutiert LSm-Proteine (*Like* Sm Proteine), die ihrerseits ein N-terminales Sm-Motiv besitzen. Auch die LSm2- bis 8-Proteine werden in einer heptameren Ringstruktur angeordnet und ähneln damit der Sm-*Core*-Struktur [74].

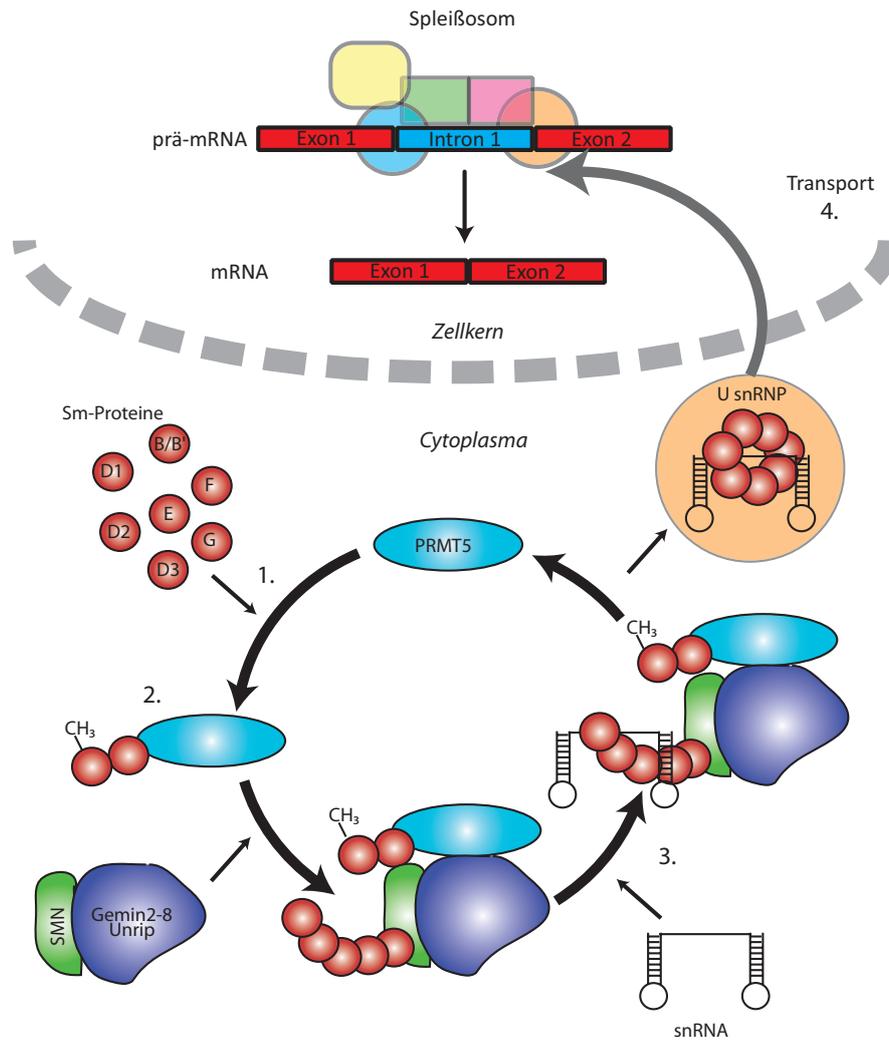


Abb. 1.7: Assemblierungsreaktion der U snRNPs: **1.** Sm-Proteine werden vom *Methylsome* methyliert **2.** Anschließend werden die Sm-Proteine vom SMN-Komplex rekrutiert **3.** Nach Ausbildung eines heptameren Rings wird die snRNA assembliert **4.** Schließlich wird das fertige U snRNP zum Spleißosom in den Zellkern transportiert. In Anlehnung an Meister *et al.* [76].

Die Biogenese der U snRNPs wurde eingehend in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht. Zunächst werden die m₇G-modifizierte U snRNA-Transkripte vom Zellkern ins Cytoplasma transportiert. Dort assoziieren sie mit den im Überschuss vorhandenen Sm-Proteinen unter Ausbildung der beschriebenen Sm-Core-Domänen. Durch anschließende Modifikationen entsteht die m₃G-Cap-Struktur. Der als Hypermethylierung bezeichnete Vorgang ist streng von der vorherigen Ausbildung der Sm-Core-Struktur abhängig. Anschließend werden die fertig prozessierten U snRNPs-Vorläufer in den Zellkern transportiert und assoziieren dort mit weiteren Proteinen zum finalen U snRNP-Partikel [siehe Abb. 1.7] [43, 66, 76, 77].

1.3 Methoden der Massenspektrometrie zur Analyse von makromolekularen Proteinkomplexen

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine maßgebliche Technik in der Bioanalytik und hat sich als unentbehrliches Werkzeug für die Proteomforschung erwiesen. Aufgrund des Bestrebens, immer detailliertere Einsichten in das Proteom zu gewinnen, hat sich die MS in den letzten Jahren hinsichtlich neuer Technologien und Applikationen stark weiterentwickelt. Diese Fortschritte umfassen sowohl die Einführung verbesserter Typen von Massenanalysatoren (z.B. LTQ *Orbitrap* Velos [Thermo Fisher] [siehe Abb. 1.9]), als auch neuartige Dissoziationsmethoden wie beispielsweise die Elektronentransferdissoziation [78], welche eine besonders effektive Methode zur Analyse von labilen post-translationalen Modifikationen darstellt. Das Ziel der Proteomforschung, alle Proteine einer spezifischen Probe zu einem definierten Zeitpunkt umfassend zu charakterisieren, besteht seit deren Beginn vor 25 Jahren. Zu dem breitem Spektrum an Merkmalen, die ein Protein beschreiben, gehören der Expressionslevel, post-translationale Modifikationen, Interaktionen mit anderen Biomolekülen, Lokalisation in der Zelle etc. [79, 80].

Die Proteincharakterisierung mittels MS erfolgt überwiegend durch die Analyse von enzymatisch erzeugten Peptiden (*bottom-up*), obwohl es auch möglich ist, sogenannte *top-down* oder *middle-down* Methoden zu benutzen, die längere Peptide oder sogar ganze Proteine verwenden [81]. Eine automatisierte Analyse ist jedoch innerhalb der beiden letzten genannten Methoden beeinträchtigt, da unter anderem die saubere Trennung von Proteinmischungen im Vergleich zu Peptidmixturen erschwert ist, sowie die Bestimmung der Ladungszustände von vollständigen Proteinionen, hochauflösende MS-Geräte (z.B. *Orbitrap* [Thermo Fisher], FT-ICR) verlangt.

Für die *bottom-up* Analyse werden die Proteine mittels eines proteolytischen Enzyms, vorwiegend Trypsin, verdaut. Die Serinprotease Trypsin schneidet spezifisch am C-Terminus der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, kann aber dabei durch ein C-terminal-angrenzendes Prolin oder eine phosphorylierte Aminosäure sterisch behindert werden, so dass nur ein Teil der betroffenen Aminosäuresequenz prozessiert wird [82, 83]. Die nach dem Verdau entstandenen Peptide können nun durch HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) [siehe Kap. 1.3.1] aufgetrennt und mittels eines Massenspektrometers [siehe Kap. 1.3.2] identifiziert werden. Durch massenspektrometrische Methoden wird anstelle der Masse stets das Masse-Ladungsverhältnis eines Analyten bestimmt. Dazu werden die Peptide durch ein Elektrospray ionisiert (ESI) [84–86], wobei sie vorrangig eine zweifache Ladung erhalten. Dies ist durch die Anwesenheit der N-terminalen Aminogruppe, sowie der basischen C-terminalen Seitenketten-gruppe (von Lysin oder Arginin) der tryptischen Peptide zu erklären. Überlesene Schnittstellen, Histidin-enthaltene Peptidsequenzen, oder modifizierte Aminosäuren können die Ladung allerdings verschieben. In allen Fällen beobachtet man jedoch stets ein Gleichgewicht verschiedener Ladungen, d.h. dass das betroffene Peptidion nicht nur eine definierte Ladung trägt, sondern Masse zu Ladungsverhältnisse $[m/z]$ verschiedener Ladungszustände desselben Peptids beobachtbar sind.

Nachdem zunächst das m/z des zu analysierenden Peptidions (‘Mutterions’) bestimmt wurde, wird dieses anschließend im Massenspektrometer fragmentiert. Im Allgemeinen geschieht dies

durch stoßaktivierten Zerfall, d.h. nach Kollision mit einem reaktionsträgen oder inerten Stoßgas (z.B. Stickstoff, Argon) [87]. Die vom Detektor aufgenommenen Fragmentspektren können im Anschluss mit verschiedenen Suchalgorithmen (z.B. Mascot, OMSSA, Sequest) ausgewertet werden, die aus vorhandenen Proteindatenbanken (z.B. SwissProt, IPI) *in silico* verdaute Peptidsequenzen und deren theoretische Fragmentspektren erstellen. Nach Abgleich der hypothetischen Fragmentationenspektren mit den Spektren der gemessenen Peptide, werden Zuordnungen aufgrund von Wahrscheinlichkeiten vorgenommen. Je mehr Fragmente abgedeckt sind, desto höher ist die Sicherheit der Identifizierung [88, 89]. Verschiedene Methoden erlauben des Weiteren eine Quantifizierung [siehe Kap. 1.3.3] der MS-Signale und damit, abhängig von der verwendeten Technik, eine relative oder absolute Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Peptide.

1.3.1 Umkehrphasenchromatographie

Die durch proteolytischen Verdau entstandenen Peptide werden, wie bereits erwähnt, mittels chromatographischer Methoden aufgetrennt. Dazu kann man sich Eigenschaften wie z.B. Größe, Ladung, Diffusionseigenschaften oder Chiralität (um nur einige zu nennen) der Analyten zu Nutze machen. Da innerhalb der bioanalytischen Forschung in den meisten Fällen mit sehr geringen Probenmengen (ng - μ g) gearbeitet wird, erfolgt die Separierung in der Regel mit miniaturisierten Chromatographiesäulen, deren Innendurchmesser im Mikrometerbereich (z.B. 75 μ m) liegen. Die Nachweisgrenze (LOD) der Analyten wird bei Verwendung von nanoHPLC stark verbessert (d.h. LOD sinkt), da im Vergleich zu analytischer HPLC sowohl Probenvolumina, als auch Elutionsvolumina sehr klein sind und sich die Konzentration der Peptide in der mobilen Phase durch die Auftrennung erhöht [90–92].

Die Säulen enthalten das Chromatographiematerial bzw. die stationäre Phase. Eine der gebräuchlichsten Methoden zur Peptidauftrennung ist die Umkehrphasenchromatographie (RPLC - engl. *Reversed Phase Chromatography*). Hierbei wird die Wechselwirkung der Peptide mit den unpolaren Resten der stationären Phase ausgenutzt. Dabei besteht die stationäre Phase aus polaren Kieselgelpartikeln, deren freie Hydroxylgruppen mit langen Kohlenstoffketten (C₂ - C₁₈) durch Veretherung modifiziert sind. Mit diesen Kohlenstoffketten interagieren die Peptide und werden in einer polaren mobilen Phase auf der Säule retardiert. Mit ansteigendem organischen Anteil der mobilen Phase wird die Polarität der mobilen Phase stetig herabgesetzt. Abhängig von der Hydrophobizität der Peptide wechselwirken diese schwächer oder stärker mit der mobilen Phase innerhalb des Lösungsmittelgradienten und werden letztendlich von der Säule eluiert. Bei der Anwendung von RPLC wird meistens auf Acetonitril (ACN) als organisches Lösungsmittel zurückgegriffen. Gründe für die Verwendung von ACN sind dessen physikalische Eigenschaften, wie z.B. eine geringe Viskosität und die damit verbundenen geringen Gegenstände während der Auftrennung. Ein weiterer Grund ist die geringe Absorption im UV-Bereich von 214 nm (Absorptionsmaximum der Amidbindung), die eine UV-Detektion der Analyten ermöglicht. Acetonitril ist bis Wellenlängen von ca. 200 nm UV-transparent (darunter sinkt die UV/VIS-Transmissionsrate rapide ab - bei 190 nm nur noch ca. 20%).

Zusätzlich zum organischen Anteil der mobilen Phase ist dem Lösungsmittel noch ein Ionen-

paarreagenz (z.B. Trifluoressigsäure oder Ameisensäure) zugesetzt. Dieses geladene Reagenz bildet zusammen mit dem Analyten über dessen Aminogruppen starke Ionenpaare und verhindert dadurch deren ionische Wechselwirkung mit den polaren freien Silanolgruppen (R-Si-O⁻) der stationären Phase, indem es die Polarität der Analyten herabsetzt. Zum anderen hilft das Ionenpaarreagenz bei der Einstellung eines stabilen sauren pHs innerhalb des Lösungsmittelgemischs, so dass gewährleistet ist, dass die basischen Aminogruppen der Peptide protoniert vorliegen. Insgesamt erhöht sich durch Zugabe von Ionenpaarreagenz die Selektivität der Auftrennung, die nun hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase und Analyt (je unpolarer das Peptid, desto stärkere Wechselwirkung mit der unpolaren stationären Phase) basiert. Aufgrund der Ladung des Ionenpaarreagenz bindet dieses selbst nicht an die stationäre Phase [93, 94] [siehe Abb. 1.8].

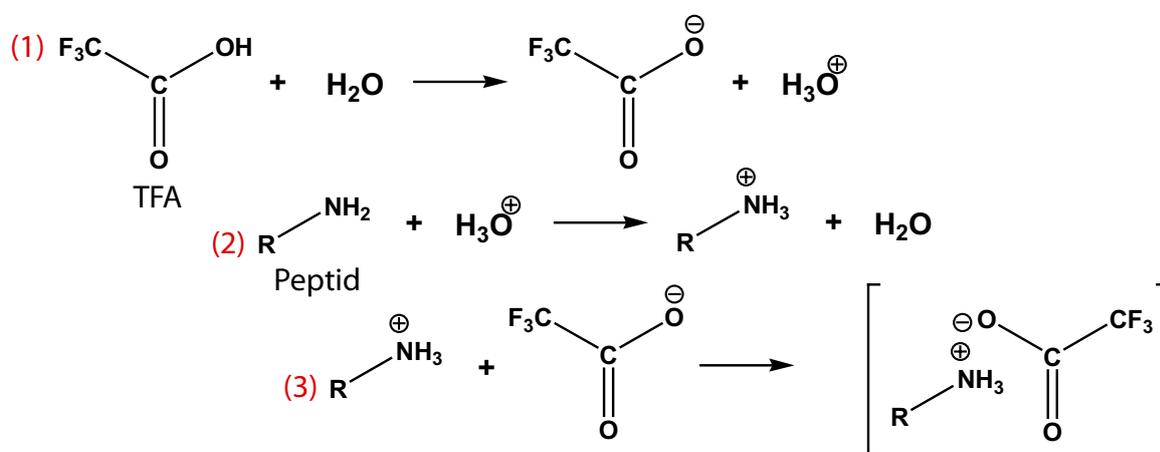


Abb. 1.8: Komplexbildung von Ionenpaarreagenz (in diesem Beispiel - TFA) und Peptid - (1) Zugabe von TFA in einer wässrigen Lösung bewirkt die Freisetzung von Hydroniumionen. (2) Diese führen zur Protonierung der basischen Seitenkettengruppen sowie N-terminalen Aminogruppen der Peptide. (3) Die positiv-geladenen Peptide bilden mit den negativ-geladenen Trifluoracetat-Ionen neutrale Komplexe.

1.3.2 Das Massenspektrometer

Häufig wird in der Bioanalytik die chromatographische Trennung [siehe Kap. 1.3.1] direkt mit dem Massenspektrometer gekoppelt. Diese Kopplung erlaubt eine sensitive und schnelle Identifizierung der eluierten Peptide. Abhängig vom Gerätetyp liegen die Nachweisgrenzen im unteren Femtomol- (10^{-15} mol) bis Attomolbereich (10^{-18} mol) und die Akquisitionsgeschwindigkeiten erreichen bis zu 10 Hz.

Generell sind Massenspektrometer wie folgt aufgebaut: Das erste Modul stellt die Ionenquelle dar. Innerhalb der Peptidanalytik macht man sich hauptsächlich MALDI (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) oder ESI zu Nutze, da diese beiden Ionisationsarten sehr milde Bedingungen für die Ionisierung von größeren, labilen Biomolekülen bieten, ohne diese dabei zu modifizieren oder zu fragmentieren. MALDI beruht auf der Co-Kristallisation des Analyten mit einer Matrix auf einem speziellen Träger (engl. *Target*) aus rostfreiem Edelstahl oder Plas-

tik (sogenannte Einweg-*Anchorchip-Targets*). Die Matrix ist dabei in einem großen Überschuss vorhanden und besteht aus kleinen organischen Molekülen (z.B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure, α -Cyano-4-hydroxymethylsäure). Diese sind in der Lage, Energie einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren, welche durch pulsartigen Laserbeschuss freigesetzt wird. Es kommt zu explosionsartigen Matrixablösungen von der Kristalloberfläche. Eingeschlossener Analyt wird dabei ebenfalls herausgelöst und kann massenspektrometrisch analysiert werden. Obwohl lange Zeit zwei Theorien existierten, um die Ionisierung während des MALDI-Prozesses zu erklären, wurde erst vor Kurzem eines dieser Modelle - das *Lucky Survivor* Modell - manifestiert [95]. Dieses besagt, dass durch das für die MALDI-Präparation unumgängliche Ionenpaarreagenz (z.B. Trifluoressigsäure [TFA]) Ladungen auf den Analyten übertragen werden. Die protonierte Analytspezies bleibt auch während der Kristallation in die Festphase erhalten. Im Verlauf der Kristallablösung verdampft die Matrix, der Analyt wird desolvatisiert und liegt schließlich als einfach geladenes Analytium $[MH^+]$ vor [96, 97].

Im ursprünglichen ESI-Prozess werden die Analyten durch eine Kapillare geleitet, an der eine Spannung anliegt. Über eine Gegenelektrode entsteht ein elektrisches Feld zwischen Kapillarspitze und dem Einlass des Massenspektrometers. Im Verlauf der ESI bewegen sich gleichgeladene solvatisierte Analytionen auf die Gegenelektrode zu und bilden einen sogenannten *Taylor-Konus* aus. Von diesem reißen filamentartig Tröpfchen ab, die durch Desolvatisierung immer kleiner werden, bis sie das sogenannte *Rayleigh-Limit* erreichen und aufgrund der Ladungsabstoßung innerhalb der Tropfen zu kleineren Tröpfchen zerfallen (*Coulomb-Explosionen*) [84, 85, 98]. Auch für den ESI-Prozess existieren zwei Theorien, die die Bildung freier Ionen in der Gasphase erklären. Im *Charge Residue* Modell geht man davon aus, dass der Prozess der Evaporation und der Bildung immer kleinerer Tropfen soweit vorangetrieben wird, bis letztlich nur noch ein einziges Analytium pro Tropfen vorliegt [85]. Beim *Ion Evaporation* Modell setzt man voraus, dass aus größeren Tropfen einzelne Analytionen in die Gasphase emittiert werden [98]. Um die Sensitivität zu erhöhen und die Probenhandhabung zu verbessern wird intensiv an neuen ESI-Emitter-Geometrien gearbeitet. Die Entwicklung geht u.a. hin zu Multielektrospray-Emittern, die es ermöglichen gleichzeitig multiple *Taylor-Konen* auszubilden [99].

Nach der Ionisation gelangen die Analytionen in den Massenanalysator. Die verfügbaren Geräte verwenden dabei unterschiedlichste Methoden und Techniken zur massenspektrometrischen Analyse. Generell werden jedoch nicht Massen detektiert, sondern stets Masse-Ladungsverhältnisse (m/z). Eine Ausnahme ist die Kombination mit MALDI, da hier im Wesentlichen nur einfach geladene Ionen erzeugt werden und somit das m/z gleich der Masse des Ions ist. In seltenen Fällen werden auch mehrfach geladene Ionen detektiert, die jedoch auf Molekülen mit höherer Masse basieren.

Ein Beispiel eines Massenanalysators ist das Flugzeitmassenspektrometer, welches zur Analyse die Flugzeit der Ionen in der sogenannten feldfreien Driftstrecke, die von der Quelle bis zum Detektor reicht, berechnet. Über die Flugzeit kann dann die Masse der Ionen ermittelt werden, da sich die Flugzeit quadratisch proportional zum m/z verhält. Da bei der Ionisierung mittels MALDI hauptsächlich nur einfach geladene Ionen entstehen, kann die Peptidmasse über den Energieerhaltungssatz (Gleichung 1.4) berechnet werden [100]:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad (1.1)$$

$$E_{pot} = z \cdot z \cdot e \cdot U \quad (1.2)$$

$$E_{kin} = E_{pot} \quad (1.3)$$

$$m = \frac{2 \cdot z \cdot U \cdot t^2}{d^2} \quad (1.4)$$

E_{kin} = kinetische Energie

E_{pot} = potentielle Energie

v = Geschwindigkeit

e = Elementarladung = $1,602176487(40) \cdot 10^{-19}$ C

m = Masse

z = Ladung

U = Spannung

t = Zeit

d = Wegstrecke

Der in Gleichung 1.4 dargestellte Zusammenhang verlangt, dass alle Ionen sowohl zur gleichen Zeit entstehen, als auch dieselbe Stärke des elektrischen Feldes wahrnehmen. Durch Abschirmungseffekte und verzögerte Desorption/Ionisation der Teilchen besitzen diese jedoch unterschiedliche Geschwindigkeiten bzw. kinetische Energie. Dies hat eine Verbreiterung der Signale zur Folge und setzt die Auflösung der Geräte stark herab. Eine Methode, um die Unschärfe in Zeit, Energie und Ort zu umgehen und das Auflösungsvermögen zu verbessern, ist die „verzögerte“ Extraktion (engl. *delayed extraction*). Dazu wird die Zeit zwischen Laserimpuls und Anlegen der Beschleunigungsspannung heraufgesetzt (von Nanosekunden auf Microsekunden). Die Energieaufnahme der Ionen ist nur noch abhängig von der Position innerhalb der Ionenquelle, wodurch die unterschiedlichen Anfangsbeschleunigungen von Ionen gleicher Masse kompensiert werden und eine Fokussierung der Ionen statt findet [101]. Eine weitere Methode zur Verbesserung der Auflösung wird durch den Einsatz von Reflektoren gewährleistet. Dieser befindet sich am Ende der Driftstrecke des Flugrohrs und reflektiert die eintreffenden Ionen durch ein elektrisches Gegenfeld. Ionen gleicher Masse mit höherer Geschwindigkeit dringen dabei tiefer in das angelegte Feld ein, als langsamere Ionen derselben Masse. Der Weg, der durch die schnelleren Ionen zurückgelegt wird, ist also länger. Sie holen die langsameren Ionen, die bereits früher reflektiert werden an einem bestimmten Punkt wieder ein, an welchem vorzugsweise der Detektor sitzt. Dadurch können sehr scharfe, hochaufgelöste Signale erhalten werden [102]. Die Auflösung von TOF-Geräten (engl. *Time of flight*) kann momentan einen maximalen Wert von 60.000 erreichen [103].

Eine andere Variante von Massenspektrometern ist der Quadrupol-Massenfilter. Dieser ist aus vier Quadrupolstäben aufgebaut. Die sich jeweils gegenüberliegenden Quadrupolstäbe besitzen

dasselbe Potential. Dadurch wird ein zweidimensionales elektrisches Feld erzeugt. An den jeweils gegenüberliegenden Quadrupolstäben liegt eine Gleichspannung und eine hochfrequente Wechselspannung an [siehe Abb. 1.11]. Die Gleichspannung ist an beiden Stabpaaren entgegengesetzt und die Wechselspannung um 180° verschoben, so dass Gleichung 1.5 für das Potential an den jeweiligen Stabpaaren gilt. Abhängig vom Verhältnis der Frequenz (ω) und Amplitude der Wechselspannung (V), sowie der Höhe der überlagerten Gleichspannung (U), können nur Ionen bestimmter m/z den Quadrupol (Q) auf stabilen sinusförmigen Bahnen durchqueren. Ionen mit abweichenden m/z -Werten laufen zwar auf sinusförmigen, aber instabilen Bahnen. Die Amplituden der Bewegung dieser Ionen nehmen immer mehr zu und führen letztlich zu einer Kollision mit einem der Quadrupolstäbe. Die Bahn von Ionen innerhalb des elektromagnetischen Quadrupolfeldes lässt sich als Lösung der Mathieschen Differentialgleichung [104] aus der Newtonschen Bewegungsgleichung und dem Potential [siehe Gleichung 1.5] des Quadrupols bestimmen. Transmittierte Ionen treffen schließlich am Detektor auf, der den Ionenstrom misst.

$$\pm \phi_o = U + V \cos \omega t \quad (1.5)$$

U = Gleichspannung

$V \cos \omega$ = Wechselspannung

V = Amplitude

ω = Frequenz

ϕ_o = Potential

Weitere Massenspektrometer sind Ionenfallen. Hier unterscheidet man verschiedene Typen: die dreidimensionale Quadrupol-Falle (3D-Ionenfalle), die lineare Ionenfalle, die FT-ICR-Falle und die *Orbitrap* [siehe Abb. 1.9]. Im Gegensatz zum kontinuierlichen Verfahren im Quadrupol, arbeitet die 3D-Ionenfalle sequentiell, in dem sie die Ionen zunächst speichert und anschließend gezielt ausstößt. Das Feld der 3D-Ionenfalle wird durch drei Elektroden erzeugt, einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden. Nach Erreichen der Analytione-spezifischen Frequenz wird dieses aus der Falle geschleudert und gelangt zum Detektor [105]. Vorteile der 3D-Ionenfalle sind eine hohe Speicherkapazität einhergehend mit einer hohen Nachweisempfindlichkeit, sowie eine hohe Aufnahmegeschwindigkeit. Ein Nachteil von 3D-Ionenfallen sind die geringen Auflösungen. Die lineare Ionenfalle ist ähnlich aufgebaut wie der Quadrupol-Massenfilter. An den Enden der Ionenfalle sind jedoch zusätzliche Randfelder angelegt, die eine Speicherung der Ionen in der Falle ermöglichen [106]. Damit ähnelt ihre Funktionsweise der 3D-Ionenfalle, allerdings mit der Unterscheidung, dass in der linearen Ionenfalle nur ein zweidimensionales Hochfrequenzfeld angelegt ist. Lineare Ionenfallen haben ähnlich Eigenschaften bzgl. Empfindlichkeit und Schnelligkeit, sowie eine ähnlich geringe Auflösung wie 3D-Ionenfallen.

In einem Fourier-Transformation-Ionencyclotron-Resonanz-Massenspektrometer (FT-ICR) ist statt eines elektrischen ein magnetisches Feld vorhanden. Dieses zwingt die Analytione in der Falle, bestimmte m/z -abhängige Umlaufbahnen einzunehmen. Die Frequenz dieser Bewegung wird Cyclotron-Kreisfrequenz genannt und ist einzigartig für jedes Ion. Für die Messung dieser Frequenzen wird senkrecht zum Magnetfeld ein elektrisches Wechselfeld angelegt. Stimmt die

Frequenz des elektrischen Feldes mit der Cyclotron-Kreisfrequenz eines bestimmten Analytens überein, so kommt es zur Resonanz mit der sich der Radius der Umlaufbahn des Analyten durch Aufnahme von Energie aus dem Wechselfeld vergrößert. Diese Veränderungen können über Detektoren des Massenspektrometers erfasst werden. Durch Variation des elektrischen Feldes können nach und nach alle Ionen analysiert werden. Die gemessenen Signale werden zur Spektrengenerierung fouriertransformiert. FT-ICR-Geräte verfügen über enorme Auflösungen (bis zwei Millionen), die durch besonders homogene Magnetfelder mit Feldstärken bis 21 Tesla (momentan in der Entwicklung am *National High Magnetic Field Laboratory*) erreicht werden. Die Akquirierung der Spektren bei hoher Auflösung ist jedoch sehr langsam (1-2 s) und eignet sich weniger gut für *online*-Kopplung mit schneller, hochauflösender HPLC [siehe Kap. 1.3.1], die häufig Peakhalbwertsbreiten zwischen 5 und 7 Sekunden erreicht [107].

Das Auflösungsvermögen R eines FT-ICR-Massenspektrometers kann über Gleichung 1.6 [107] beschrieben werden. Die bedeutet, dass R sich indirekt proportional zu m/z verhält und mit steigendem m/z sinkt (bei konstanter Aquisitionsgeschwindigkeit).

$$R = \frac{m}{\Delta m_{50\%}} = - \frac{q \cdot B_0}{m \cdot \Delta \omega_{50\%}} \quad (1.6)$$

Im Gegensatz dazu ist das Auflösungsvermögen R der *Orbitrap*-Ionenfalle indirekt proportional zur Wurzel aus m/z (siehe Gleichung 1.7 [108], sinkt also entsprechend langsamer mit steigendem m/z als bei einem FT-ICR-MS (ebenfalls bei der gleichen Aufzeichnungsrage).

$$R = \frac{m}{\Delta m_{50\%}} = \frac{1}{2\Delta \omega_{50\%}} \cdot \sqrt{\frac{k \cdot q}{m}} \quad (1.7)$$

R = Auflösungsvermögen

m = Masse

$\Delta m_{50\%}$ = Massen-Halbwertsbreite

$\Delta \omega_{50\%}$ = Frequenz-Halbwertsbreite

q = Ladung

B_0 = Feldstärke

k = axiale Rückstellkraft

Die *Orbitrap* ist die zur Zeit modernste Ionenfalle [siehe Abb. 1.9] und ist aus einer spindel-förmigen Elektrode aufgebaut. Analytationen werden über eine zweite Ionenfalle, die sogenannte *C-Trap*, tangential und dezentral (*Off*-äquatorial) in die *Orbitrap* geleitet. Dadurch nehmen, ähnlich wie im FT-ICR-Massenanalysator, die Ionen spezifischer m/z stabile Kreisbahnen um die Elektrode ein. Durch einen Anstieg der Spannung an der Elektrode werden die Ionenpakete näher zur zentralen Elektrode gedrückt („elektrodynamisches Quetschen“). Der Radius der Kreisbahnen verringert sich und verhindert ein Zusammenstoßen der Ionenpakete mit den äußeren Elektroden. In der axialen Richtung sind die Ionen bemüht, sich weg von der engen Lücke an den „Polen“ hin zur weiteren Lücke am Äquator zu bewegen. Aus diesen Gründen werden axiale Oszillationen induziert, ohne dass eine weitere Anregung der Ionen notwendig ist (Anregung durch Injektion). Die Injektionszeit ist dabei abhängig vom m/z der Ionen. Leichtere Ionen dringen früher in die *Orbitrap* ein, so dass sowohl der finale Radius ihrer Kreisbewegung, als auch

die Amplitude der axialen Oszillation geringer ist, als die von schweren Ionen, die erst später in die Falle gelangen und damit erst später den Einfluss der Spannung erfahren und sich erst später Richtung Äquator bewegen. Sobald die Spannung ihr Maximum erreicht hat, bilden die Ionentrajektorien stabile Spiralenbahnen um die zentrale Elektrode herum. Die Frequenzen der Bewegungen sind wie beschrieben m/z -abhängig und erzeugen auf den äußeren Detektorplatten spezifische Ströme. Durch die Überlagerung von Ionenfrequenzen unterschiedlicher m/z entstehen komplizierte Signale, die durch Fouriertransformation in Spektren umgewandelt werden können.

Bei einer angenommenen Aquisitionsgeschwindigkeit von 1 Hz und einem Masse-Ladungsverhältnis von 400 m/z besitzt ein 7T FT-ICR-Gerät eine Auflösungsrate von ca. 100.000 und die LTQ *Orbitrap* Velos eine Auflösungsrate von ca. 60.000. Damit übertrifft die *Orbitrap Velos* das FT-ICR-Gerät bereits bei 1600 m/z , da das 7T FT-ICR nun nur noch eine Auflösungsrate von ca. 25.000 und die *Orbitrap* von ca. 30.000 besitzt. Die neueste Generation der *Orbitrap* (LTQ *Orbitrap* Elite) erreicht selbst bei 1600 m/z noch eine Auflösung von bis zu 120.000 [109, 110]. Der Nachweis zuvor separierter Analytione (im Flugzeitmassenspektrometer, Quadrupol, linearer oder 3D-Ionenfalle) erfolgt mittels eines Detektors. In der Regel werden Sekundärelektronenvervielfacher verwendet, denen häufig eine Konversionsdynode vorgeschaltet ist. An der Dynode liegt ein hohes Potential an, welches den Analytione entgegengesetzt ist. Dadurch wird nach Auftreffen der Analytione ein Sekundärelektronenstrom erzeugt. Dieser wird weitergeleitet an nachfolgende angeschlossene Dynoden, deren Potentiale wiederum höher liegen als das der jeweiligen vorgeschalteten Dynode. In diesem Prozess wird durch eine Vielzahl zusammenhängender Dynoden eine Elektronenkaskade freigesetzt. Dieser Elektronenstrom wird durch einen Vorverstärker an einen Transientenrekorder übertragen und gemessen. Die analogen Signale werden anschließend an den Computer übermittelt.

FT-ICR-Geräte sowie die *Orbitrap* [siehe Abb. 1.9] hingegen messen Elektronenströme. Diese werden durch die Bewegung der Analytione in der entsprechenden Ionenfalle verursacht und von Detektorplatten aufgezeichnet. Da in diesem Fall die Ionen also nicht verbraucht werden und ihre Zahl in der Ionenfalle während der Messung konstant bleibt, weil sie nicht von Detektoren absorbiert werden, ist eine kontinuierliche Messung möglich. Diese Eigenschaft trägt maßgeblich zur hohen Massengenauigkeit beider Geräte bei [111, 112].

Häufig werden in der Proteomforschung Hybridmassenspektrometer (z.B. QStar XL [Ab Sciex] - Hybrid aus Quadrupol und TOF, LTQ-*Orbitrap* [Thermo Fisher] - Hybrid aus linearer Ionenfalle und *Orbitrap*) verwendet, welche die positiven Eigenschaften verschiedener Massenanalysatoren vereinen [114]. Aus diesem Grund kombiniert man oft schnellere Analysatoren wie lineare Ionenfalle oder Quadrupol mit hoch-auflösenden Massenanalysatoren wie *Orbitrap*, TOF oder FT-ICR. In den „einfachen“ Ionenfallen werden die Vorläuferionen selektiert und fragmentiert. Die „fortgeschrittenen“ MS-Analysatoren dienen zur Analyse und Detektion der Vorläufer- und/oder Fragmentionen mit hoher Auflösung und Massengenauigkeit.

Die Fragmentierung der Peptide mittels stoßinduzierter Dissoziation (engl. *Collision Induced Dissociation* CID) wird durch ein Kollisionsgas (z.B. Argon, Helium oder Stickstoff) hervorgerufen. Dazu wird zwischen zwei Analysatoren entweder eine Kollisionszelle zwischengeschaltet

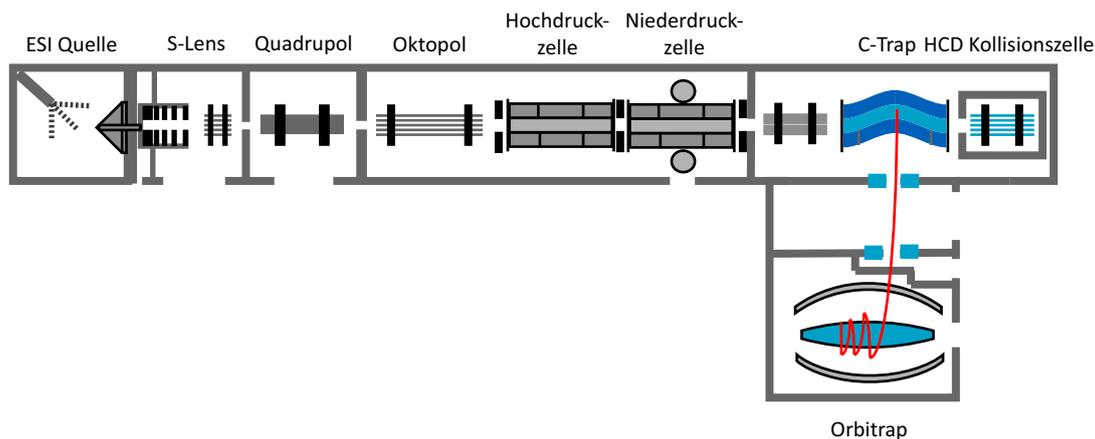


Abb. 1.9: LTQ *Orbitrap* Velos [Thermo Fisher]: Die Peptide werden über die ESI-Quelle ionisiert und gelangen in das Gerät. Über verschiedene Geometrien und Elemente (z.B. *S-Lens* oder *C-Trap*) werden die Ionen durch das Massenspektrometer geführt. Standardmäßig werden m/z der Peptidionen zunächst über die hochauflösende *Orbitrap* ausgelesen. Ihre Fragmentierung und die Detektion der Fragmentionen erfolgt in der LTQ, welche aus Hoch- und Niederdruckzelle besteht. Abb. nach [113].

wie z.B. beim Triple Quadrupol Gerät: im ersten Quadrupol (Q1) werden die Vorläuferionen selektiert, dem zweiten Quadrupol (Q2) zugeführt und dort fragmentiert und die Fragmentionen im dritten Quadrupol erneut selektiert und anschließend über den Detektor detektiert. Oder aber man arbeitet mit Ionenfallen, wo zunächst das Vorläuferion in der Falle isoliert wird, danach in eben dieser Falle fragmentiert und anschließend die Fragmentionen detektiert werden. Durch die Kollision mit einem Stoßgas werden definierte Bindungsbrüche im Peptidrückgrat hervorgerufen. Durch den Bruch der Amidbindung entstehen hauptsächlich N-terminale y - oder C-terminale b -Ionen [83]. In den meisten Fällen wird nur eine Amidbindung pro Peptidmolekül gebrochen, allerdings werden die einzelnen Kopien desselben Peptids immer an unterschiedlichen Amidbindungen fragmentiert, so dass man eine statistische Verteilung von unterschiedlichen Fragmenten desselben Peptids erhält. Diese Fragmentspektren werden dann im Anschluss an die Analyse mittels Datenbanken ausgewertet. Ist die Übereinstimmung zwischen dem beobachteten Spektrum mit einem theoretischen Spektrum signifikant höher, als zu allen anderen möglichen Spektren, so wird dies als positive Peptididentifikation gewertet. Natürlich sind inzwischen auch andere Dissoziationsmethoden bekannt, um Peptide anzuregen und zu fragmentieren. Elektronentransferdissoziation (ETD) beispielsweise wird angewandt, um labile posttranslationale Modifikationen während der Analyse zu erhalten [78]. Diese gehen bei der herkömmlichen CID-Methode häufig als erstes verloren. Im Allgemeinen dienen die Peptidfragmentationen heutzutage nicht nur der Identifikation des Peptids/Proteins, sondern auch immer häufiger der Quantifizierung des Peptids und damit bedingt des untersuchten Proteins.

1.3.3 Quantifizierung mittels LC-MS/MS

Die Quantifizierung von Proteinexpressionsunterschieden zwischen zwei oder mehr physiologischen Zuständen eines biologischen Systems stellt sowohl eines der wichtigsten Werkzeuge, gleichzeitig jedoch auch die anspruchsvollste Anwendung, innerhalb der Proteomforschung dar.

Differentielle zweidimensionale Proteingelelektrophorese, eine bewährte Methode zur Proteinquantifizierung erlaubt die simultane Analyse von bis zu drei Proben auf einem einzigen Gel, ist jedoch beschränkt auf verhältnismäßig abundante (≥ 1 ng/Protein Spot; bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen) und lösliche Proteine. Der größte Nachteil besteht in der fehlenden Identifizierung der quantifizierten Proteine [115]. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Verwendung von *Western-Blots* eine höhere Sensitivität ($\geq 0,15$ ng/Proteinbande; abhängig von der Qualität des verwendeten Antikörpers) und auch eine Identifikation des detektierten Proteins durch die Spezifität des Antikörpers. Nachteile dieser Methode sind jedoch ein sehr hoher Zeitaufwand, die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper, sowie die Beschränkung auf nur wenige Proteine innerhalb eines Experiments (ein spezifischer Antikörper pro Protein; die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzkonjugate der Sekundärantikörper erlaubt die Detektion mehrerer Proteine auf einem angefertigten Blot).

In den letzten Jahren haben in diesem Zusammenhang deshalb immer mehr LC-MS/MS-basierte Techniken an Bedeutung gewonnen, die in der Lage sind auch niedrig abundante Proteine zu quantifizieren und gleichzeitig (aufgrund der Quantifizierung auf Peptidebene) zu identifizieren. Massenspektrometrie ist jedoch nicht uneingeschränkt quantitativ nutzbar, denn proteolytische Peptide sind charakterisiert durch eine Vielzahl verschiedener physikochemischer Eigenschaften, wie z.B. Masse, Ladung und Hydrophobizität, durch welche der Ionisierungsgrad der Peptide stark beeinflusst wird. Damit einhergehend erzeugen unterschiedliche Peptide verschiedene Signale und Signalintensitäten bei der massenspektrometrischen Detektion. Für eine akkurate Quantifizierung ist es also unabdingbar, nur identische Peptide miteinander zu vergleichen. Die meisten massenspektrometrischen Methoden verwenden dazu die Verdünnung der unbekannt Probe mit stabilisotopenmarkierten Analoga [siehe Kap. 1.3.3.1]. Unterschiedlich stabilisotopenmarkierte Peptide gleicher Sequenz sind chemisch und physikalisch identisch und verhalten sich somit sowohl während der chromatographischen Auftrennung, als auch bei der massenspektrometrischen Analyse analog. Eine Ausnahme betrifft die Verwendung von Deuterium als Wasserstoffisotop. Durch die geringe Masse des Wasserstoffs kommt hier der Isotopeneffekt zum Tragen. Deuterium (^2H oder D) ist doppelt so schwer wie das natürlich am häufigsten vorkommende Wasserstoffisotop Protium (^1H) und besitzt dadurch stark abweichende chemische und physikalische Eigenschaften. Dieser Effekt wird deutlich durch eine Retentionszeitverschiebung bei der chromatographischen Auftrennung von Wasserstoff-Isotopenmarkierten Peptiden. Deuterierte Peptide eluieren generell früher als ihre nicht-deuterierten Gegenstücke, da die C-D-Bindung stärker polarisiert ist, als die entsprechende C-H-Bindung.

Zur Markierung werden deshalb am häufigsten Stickstoff- oder Kohlenstoffisotopen-Massen-*Tags* benutzt, die enzymatisch, chemisch, metabolisch oder auch durch synthetisch markierte Peptide bereit gestellt werden. Die Limitierungen dieser Methoden beinhalten eine zeitaufwändige und komplexe Probenaufarbeitung, häufig die Notwendigkeit größerer Mengen an Ausgangsmaterial, einen hohen Kostenfaktor für die Reagenzien, eine unvollständige Umsetzung der Proteine/ Peptide mit diesen Reagenzien sowie den Bedarf nach geeigneter Software zum Auswerten der quantitativen Daten. Aufgründdessen wurden in den letzten Jahren auch markierungsfreie (engl. *label-free*) Methoden entwickelt [siehe Kap. 1.3.3.2], die, abhängig von der massenspek-

trometrischen Signalintensität oder der Häufigkeit von Sequenzierungsereignissen während eines LC-MS/MS-Laufs, sowohl eine relative, als auch absolute Quantifizierung erlauben [116–120] [siehe Kap. 1.3.3.1].

Obwohl es heutzutage eine Vielzahl an Protokollen zur Quantifizierung von Proteinen gibt, sind die limitierenden Faktoren sehr häufig eine reproduzierbare Probenvorbereitung sowie eine zuverlässige Datenauswertung. Die Menge und Komplexität der Daten, die während eines Proteomexperiments generiert werden, macht in den meisten Fällen eine manuelle Auswertung unmöglich, so dass auf verschiedene Softwarelösungen zurückgegriffen werden muss: z.B. OpenMS [121,122] - geeignet für globale Experimente; Multiquant [AB Sciex], Pinpoint [Thermo Fisher] oder Skyline [MacCoss Lab Software] - alle drei werden verwendet für S/MRM-Experimente. Die Wahl der Quantifizierungssoftware an die Anforderungen der erzeugten Daten anzupassen, ist dabei von entscheidender Bedeutung.

1.3.3.1 Quantifizierung mittels Stabilisotopenmarkierung

Eine absolute Quantifizierung mit Stabilisotopenmarkierung ist häufig auf wenige Proteine/Peptide beschränkt, da für jedes Protein/Peptid ein entsprechender Standard mit bekannter Konzentration vorhanden sein muss. Im Gegensatz dazu kann eine relative Quantifizierung zwischen verschiedenen Systemzuständen mittels Stabilisotopenmarkierung innerhalb von globalen Proteomanalysen angewendet werden. Für beide Anwendungen wird eine Markierung von Proteinen/Peptiden mit einem oder mehreren stabilen Isotopen durchgeführt. Die unterschiedlich markierten Proben werden vereint und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Durch Vergleich der Signalintensitäten identischer Peptide unterschiedlicher Markierung können relative Häufigkeiten zwischen verschiedenen Proben bestimmt werden.

Die metabolische Markierung verwendet stabilisotopenmarkierte essentielle Aminosäuren, die bereits während der Zellkultur in die Proteine integriert werden. Die sogenannte SILAC-Methode (engl. *Stable Isotope Labeling of Amino Acids in Cell Culture*) [123] ist deshalb beschränkt auf Studien, deren Proben über Zellkulturen generiert wurden und schließt eine Analytik von Gewebeproben aus. Aktuell werden allerdings auch Tiermodelle (z.B. *Mus musculus* [124], *Drosophila melanogaster* [125], *Aspergillus flavus* [126]) etabliert, deren kompletter Organismus durch Fütterung mit entsprechend behandelter Tiernahrung vollständig mit stabilisotopenmarkierten Aminosäuren substituiert werden kann. Außerdem wurde von Geiger *et al.* ein sogenannter Super-SILAC-Mix entwickelt, der aus fünf SILAC-markierten Zelllinien besteht und zur Proteomanalyse von Geweben als interner Standard eingesetzt werden kann [127]. Ein großer Vorteil von SILAC ist die Vermengung der zu betrachtenden Proben bereits auf Zellebene, so dass mögliche Fehlerquellen während der Probenprozessierung nahezu ausgeschlossen werden können. Allerdings ist diese Methode sowohl sehr kosten-, als auch zeitaufwendig. Ein weiterer Nachteil besteht in der Tatsache, dass Aminosäuren zum Teil innerhalb der Zellen metabolisiert werden und dadurch zu komplizierten Datensätzen führen können, deren Auswertung sehr schwierig und zeitintensiv ist [123,128,129].

Bei der chemischen Markierung von Peptiden/Proteinen werden unterschiedlich stabilisotopenmarkierte Moleküle gleicher Struktur verwendet, die durch chemische Reaktion mit den

entsprechenden Peptiden verknüpft werden. Nach der chemischen Derivatisierung von reaktiven Gruppen innerhalb der Peptide, werden die Proben vereint und massenspektrometrisch analysiert. In den meisten Fällen werden die Seitenkettengruppen von Cysteinen (z.B. ICAT - engl. *Isotope Coded Affinity Tag* [130]) oder primäre Amine (Lysin, N-Terminus) umgesetzt. Eine der umfangreichsten und effizientesten Methoden zur Quantifizierung von Peptiden ist die sogenannte iTRAQ-Methode (engl. *isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*) [131, 132]. In diesem Fall werden alle freien primären Amine mittels der sehr spezifischen N-Hydroxysuccinimidchemie markiert. Die verwendeten Moleküle besitzen neben der aminospezifischen reaktiven Gruppe noch eine Massenausgleichs- (*Balancer*-), sowie eine Reportergruppe. Sowohl in die *Balancer*-, als auch in die Reportergruppe sind verschiedene Isotope integriert. Die Kombination dieser Isotope ($^{12/13}\text{C}$, $^{14/15}\text{N}$, $^{16/18}\text{O}$) ist dabei stets so gewählt, dass das gesamte Molekül die gleiche, also nahezu isobare, Masse besitzt. Da sich die Moleküle bis auf die Isotope chemisch nicht unterscheiden, können markierte Proben kombiniert und mittels LC-MS/MS ohne Steigerung der Komplexität der Probe analysiert werden. Identische Peptide unterschiedlicher Markierungen haben dabei dieselbe Retentionszeit während einer chromatographischen Trennung [siehe Kap. 1.3.1] und zeigen das gleiche Verhalten bzgl. Ionisierung, Fragmentierung und Detektion [siehe Kap. 1.3.2]. Während der Fragmentierung entstehen aus den verschiedenen isotopenmarkierten Reportergruppen unterschiedliche Fragmente, die im niedrigen m/z -Bereich des MS/MS-Spektrums des jeweiligen Peptids aufgezeichnet werden. Deren Signalintensitäten beinhalten die quantitative Information, während das restliche MS/MS-Spektrum die nötigen Informationen zur Identifizierung liefert. Kommerziell sind inzwischen 8-plex Reagenzien erhältlich, die es erlauben acht unterschiedliche Proben in einem einzigen LC-MS/MS-Lauf direkt miteinander zu vergleichen [131, 132].

Eine enzymatische Markierung von Peptiden erfolgt durch proteolytischen Verdau in isotopenmarkiertem Wasser (H_2^{18}O). Dadurch können ein (Lys-N) oder bis zu zwei (Trypsin, Lys-C, Glu-C) schwere Sauerstoffisotope am C-Terminus der Peptide eingebaut werden. Durch Kombination gleicher Mengen der markierten mit einer unmarkierten Probe kann eine relative Quantifizierung erfolgen. Nachteil der Methode ist der häufig beobachtete Austausch der schweren Sauerstoffisotope gegen leichte Isotope durch Restaktivität der verwendeten Protease [133], sowie der geringe Abstand der Isotopenmuster (2 - 4 Da) beider Peptidspezies während der MS-Analyse, der zur Überlagerung führen kann und damit eine Quantifizierung erschwert.

Absolute Quantifizierung (AQUA) mittels synthetischer, stabilisotopenmarkierter Peptide in Kombination mit *Multiple/Selected Reaction Monitoring* (S/MRM) Eine spezielle Variante der Stabilisotopenmarkierung, die absolute Quantifizierung (AQUA) mittels Kontrollstandards bekannter Konzentration, soll im Folgenden genauer erläutert werden. Die Verwendung synthetischer, stabilisotopenmarkierter Standards zur Quantifizierung von Zielmolekülen durch MS-Analyse wird bereits seit den frühen 1930er Jahren [134] als „Isotopenverdünnung“ (engl. *isotopic dilution*) genutzt. Innerhalb der Proteomforschung ist es jedoch eine relativ neue Methode, die es erlaubt, Peptide und Proteine zu quantifizieren. Dazu werden einem Proteinverdau synthetisch generierte stabilisotopenmarkierte Peptide [siehe Abb. 1.10] bekannter Konzentration beigemischt, deren Sequenzen mit definierten Peptiden des Proteinverdaus

identisch sind, und die resultierenden MS-Signale relativ verglichen [siehe Abb. 1.12] [135]. Da es sich um eine sehr zielgerichtete Methode handelt, ist ihre Anwendung auf nur wenige ausgewählte Proteine beschränkt. Die Auswahl und Synthese der Peptide ist dabei sowohl zeit- als auch kostenaufwendig und eignet sich daher nur bedingt für globale Ansätze.

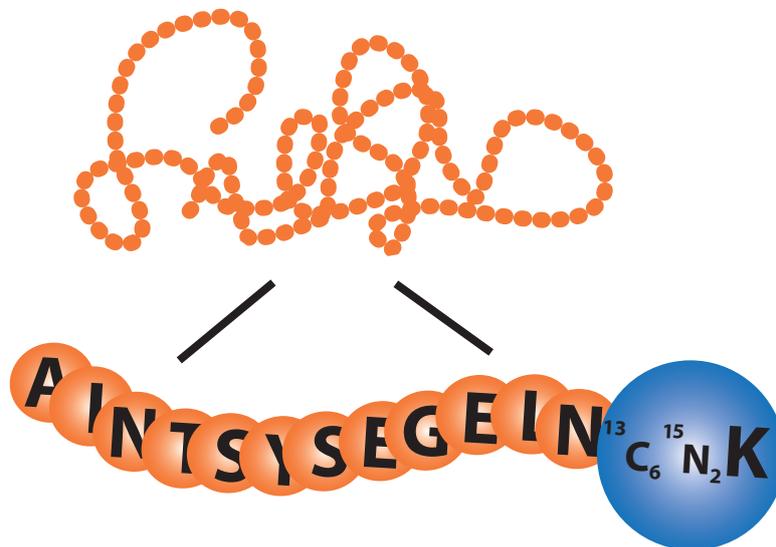


Abb. 1.10: Darstellung eines schematisches AQUA-Peptids: Aus einer gegebenen Proteinsequenz werden passende Peptide ausgewählt und nachsynthetisiert. Eine der Aminosäuren wird dabei spezifisch durch eine stabilisotopenmarkierte ersetzt.

Nachteil der Methode ist die erst sehr spät erfolgende Zugabe der synthetischen Peptide im Zuge der Probenvorbereitung, was unter Umständen zu falschen Aussagen durch Fehler während der Probenaufarbeitung und des proteolytischen Verdau führen kann. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde die Methode durch Generierung synthetischer Gene, die die Standardpeptide zusammenhängend als ein synthetisches Protein exprimieren, weiterentwickelt. Der Vorteil ist, dass dieses synthetische Protein bereits vor dem proteolytischen Verdau zur Probe gegeben werden kann. Jedoch ist auch hier nicht auszuschließen, dass sich das synthetische Protein aufgrund fehlender struktureller Merkmale während des Verdau anders verhält als das native, und dementsprechend die Effizienz des Verdauenzym zwischen dem nativen und dem synthetischen Protein variiert.

Das Auftreten von isobaren Peptiden in einer komplexen Probe ist häufig nicht vermeidbar, aus diesem Grund ist es nicht ausreichend die MS-Signale zwischen endogenem und synthetischen Peptid zu vergleichen. Es müssen Techniken angewandt werden, die es ermöglichen Signale der Zielpeptide zu filtern und zu quantifizieren. Diesem Sachverhalt wird beispielsweise durch Verwendung von *Multiple/Selected Reaction Monitoring* (S/MRM) Rechnung getragen [136, 137]. Während der S/MRM-Methode wird durch das Triple Quadrupol Gerät [siehe Abb. 1.11] das intakte Peptidion heraus gefiltert und Signale spezifischer Fragmentionen aufgezeichnet, wohingegen alle unspezifischen bzw. ungewollten Signale unbeachtet bleiben. Dazu müssen zunächst die Vorläuferionen im Q1 selektiert und der Fragmentierung im Q2 zugeführt werden. Im Q3 werden die erzeugten Fragmentionen ebenfalls gefiltert und die spezifischen Signale am Detektor aufgezeichnet. Die Auswahl geeigneter Peptidion/Fragmention-Übergänge in Kombination

mit der Retentionszeit aus der chromatographischen Trennung [siehe Kap. 1.3.1] erlauben eine Quantifizierung in einem linearen Bereich von vier bis fünf Größenordnungen [138]. Die Betrachtung spezifischer m/z -Übergänge und das Ausblenden des restlichen m/z -Bereichs bewirken ein optimales Signal/Rausch-Verhältnis sowie eine hohe Sensitivität. In modernen Triple Quadrupol Geräten kann damit simultan eine hohe Zahl an Übergängen analysiert werden. Bei Verwendung von sogenannten sMRM-Methoden (engl. *scheduled* MRM), im Zuge derer das Gerät Übergänge Retentionszeit-abhängig aufzeichnet, können einige hundert Peptidion/Fragmention-Paare in einem einzigen Lauf detektiert werden [136, 137].

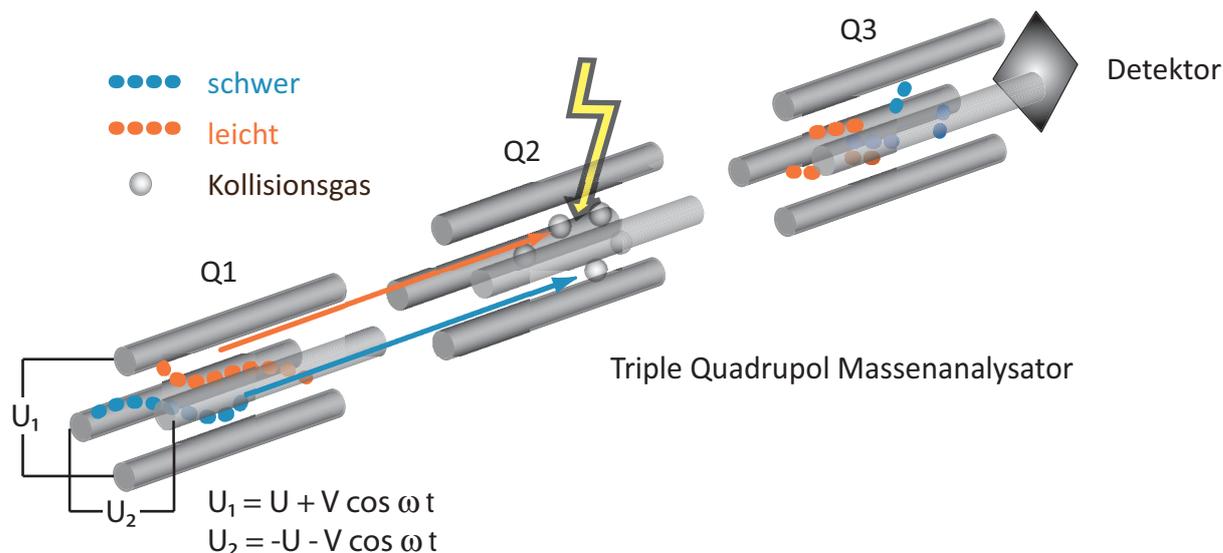


Abb. 1.11: Triple Quadrupol Massenanalysator: Peptidionen werden zunächst in Q1 selektiert, anschließend durch Stoßgaskollision in Q2 fragmentiert und letztlich werden die spezifischen Fragmentionen in Q3 selektiert und am Detektor gemessen.

Die Auswahl geeigneter Peptide ist zweifellos der kritischste Punkt bei der AQUA-Methode. Dazu müssen sowohl MS-bezogene, als auch biologische Überlegungen in Betracht gezogen werden. Faktoren, die unbedingt zu beachten sind, sind die Einzigartigkeit des Peptids innerhalb der verwendeten Probe oder Spezies, sowie die Abwesenheit instabiler oder leicht modifizierbarer Aminosäuren, als auch post-translationaler Modifikationen. Außerdem spielen die physikochemischen Eigenschaften des Peptids eine wichtige Rolle. Peptide sollten während der chromatographischen Trennung weder zu hydrophil noch zu hydrophob sein, so dass sie innerhalb des verwendeten Gradienten eluieren. Des Weiteren sollten Peptide vollständig von der verwendeten Protease aus dem Protein freigesetzt werden. Dieser Punkt ist jedoch schwer zu validieren und lediglich flankierende kritische Aminosäuresequenzen (KP, RP, KK, RR, KR, RK) können in die Betrachtungen mit einbezogen werden. Häufig enthalten die zu analysierenden Proteinsequenzen keine geeigneten Peptide, so dass sich eine Auswahl als sehr schwierig gestalten kann [139].

Die stabilisotopenmarkierten Peptide werden auf herkömmlichem Weg durch chemische Synthese hergestellt, anschließend mittels HPLC gereinigt und über Aminosäureanalyse quantifi-

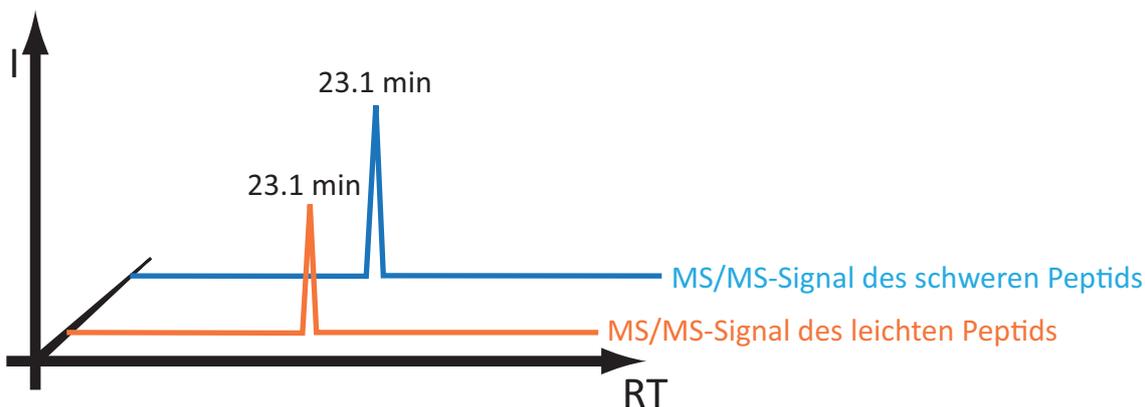


Abb. 1.12: Fragmentationspuren eines leichten und des korrespondierenden schweren Peptidfragments. Retentionszeiten sowie Intensitäten bei gleicher Konzentration sind identisch. Es tritt lediglich eine Veränderung des m/z des Vorläuferpeptidions von $8(*K)-10(*R)$ Da auf. Fragmentationen haben nicht zwangsläufig unterschiedliche m/z (nur y -Ionen).

ziert [140–142].

1.3.3.2 Weitere markierungsfreie MS-Methoden zur Quantifizierung von Peptiden

Derzeit sind, neben der bereits beschriebenen MRM-Technik, zwei Methoden der markierungsfreien Quantifizierung von Peptiden gängig, die sich jedoch grundlegend unterscheiden [143]. Die erste Methode misst die Signalintensitäten der Vorläuferionen über die Zeit ohne Generierung von MS/MS-Spektren. Über diese Flächen kann dann zwischen zwei oder mehr Proben relativ quantifiziert werden. Beim Vergleich mehrerer LC-MS-Läufe sollte jedoch stets eine Normalisierung der Werte in Betracht gezogen werden, da bereits kleinste Unterschiede in der chromatographischen Trennung oder Elektrosprayinstabilität zu Abweichungen führen können. Von Vorteil ist zum Beispiel die Beimengung eines oder mehrerer interner Standards, die in allen Proben die gleiche Menge aufweisen sollten. Mit Hilfe dieser Standards können dann Signalintensitäten angepasst werden. Wichtig bei Verwendung dieser Methode ist die Benutzung von hochauflösenden Massenspektrometern [siehe z.B. Abb. 1.9]. Diese Massenanalysatoren können die Spezifität der gemessenen Werte gewährleisten, in dem sie sehr akkurate m/z -Werte wiedergeben und es darüber hinaus ermöglichen, Isotopenmuster aufzuzeichnen und die Verteilung der Isotopen den jeweiligen Peptiden zuzuordnen. Werden beispielsweise Ionenfallen eingesetzt, gestaltet sich die Quantifizierung von komplexeren Proben kompliziert. Häufig treten in einer Probe isobare Peptidionen auf, zwischen denen aufgrund fehlender MS/MS-Spektren zur Identifizierung schwer unterschieden werden kann. Außerdem kann es aufgrund sehr ähnlicher m/z -Werte und Retentionszeiten zu Interferenzen der aufgezeichneten Ionenspuren kommen, die eine Quantifizierung der einzelnen Peptide unmöglich machen. Eine Alternative wäre in diesem Falle die Kombination von einem LC-MS/MS-Lauf mit nachfolgenden MS-Läufen. Eine Unabdingbarkeit ist in jedem Fall eine hoch reproduzierbare chromatographische Trennung [144] [siehe Kap. 1.3.1].

Bei der zweiten Methode der markierungsfreien Quantifizierung werden MS/MS-Spektren gezählt [145]. Die Methode basiert auf der empirischen Beobachtung, dass die Anzahl der Spektren

direkt mit der Menge an Protein in der Probe korreliert. Dies kann sowohl genutzt werden, um dasselbe Protein relativ zwischen verschiedenen Läufen zu quantifizieren, aber auch, um innerhalb eines LC-MS/MS-Laufs verschiedene Proteine relativ zu quantifizieren. Bei Anwendung dieser Methode sind entscheidende Faktoren zu beachten. Es müssen auch hier die gemessenen Werte normalisiert und statistisch ausgewertet werden. Für die Normalisierung verschiedener MS/MS-Läufe hat sich eine Strategie etabliert, welche die Gesamtzahl an Spektren innerhalb eines Laufs berücksichtigt. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass größere Proteine mehr Peptide und damit einhergehend mehr Spektren produzieren, als kleinere Proteine. Auch hier finden verschiedene Vorgehensweisen Anwendung, welche die Proteinmasse einbeziehen. Für den NSAF (engl. *Normalized Spectral Abundance Factor*) muss die Anzahl an Spektren dividiert werden durch die Länge des Proteins und wiederum dividiert werden durch die Gesamtzahl gemessener Spektren. Beim sogenannten PAI (engl. *Protein Abundance Index*) wird hingegen kalkuliert, wie viele einzigartige Peptide pro Protein theoretisch gemessen werden können, unter Ausschluss von Peptiden mit überlesenen Schnittstellen. Die tatsächliche Zahl an gemessenen Peptiden wird dann durch die theoretische Anzahl dividiert und ergibt den besagten PAI. In der Praxis wird heutzutage der exponentiell modifizierte Index emPAI verwendet [siehe Gleichung 1.8] [146].

$$emPAI = 10^{\frac{N_{b, beobachtet}}{N_{b, beobachtbar}}} - 1 \quad (1.8)$$

Markierungsfreie Methoden erlauben also eine Quantifizierung innerhalb globaler Proteomanalysen und häufig haben sie dabei einen höheren dynamischen Bereich als stabilisotopenbasierte Techniken [siehe Kap. 1.3.3.1]. Dieser Vorteil geht jedoch auf Kosten von Linearität und Genauigkeit. Daher sollte markierungsfreie Quantifizierung nur bei Proben angewandt werden, bei denen Stabilisotopenmarkierung entweder unmöglich oder zu aufwendig ist [143] oder als Strategie während der Entwicklungsphase, um Peptidion/Fragmention-Übergänge festzulegen, die dann im Anschluss mittels S/MRM validiert werden.

1.3.3.3 Bestimmung der Stöchiometrie von angereicherten Proteinkomplexen

Für eine nachfolgende MS-Analyse ist es zunächst erforderlich, die zu untersuchenden Proteinkomplexe spezifisch anzureichern. Das Ziel dieses Schrittes ist es, die Kernstruktur des Proteinkomplexes mit einem Minimum an Kontaminationen und unspezifischen Bindungspartnern zu isolieren, ohne dabei jedoch die Integrität der nativen Bindungspartner zu zerstören oder abzuschwächen. Häufig ist es so, dass der gesuchte Proteinkomplex nicht gleichmäßig in der Zelle verteilt ist, sondern in bestimmten Kompartimenten angereichert vorliegt [siehe Abb. 1.5]. Des Weiteren ist es möglich, dass ein Protein an verschiedenen Aufgaben innerhalb der Zelle beteiligt ist und damit einhergehend in mehreren unterschiedlichen Proteinkomplexen vorliegt. Da in einer Vielzahl der Fälle die molekulare Komposition von der Lokalisation des Komplexes abhängt, sollte ein erster Schritt in der Reinigung von Proteinkomplexen eine akkurate Zellfraktionierung sein, um ein Vermischen verschiedener Komplexe desselben Proteins zu verhindern. Nach Lyse und Homogenisierung der Zellen werden Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Zellkerne) durch differentielle oder Dichtegradientenzentrifugation von der cytoplasmatischen

Fraktion abgetrennt [147, 148]. Aus den erhaltenen Fraktionen kann dann anschließend der Proteinkomplex durch unterschiedliche Strategien angereichert werden. Die bekanntesten Techniken in diesem Zusammenhang sind die Co-Immunopräzipitation, das Epitop-*Tagging* oder der *GST-Pulldown*.

Co-Immunopräzipitation ist die am häufigsten angewandte Methode bei der Isolierung von Proteinkomplexen. Voraussetzung ist das Vorhandensein eines hochspezifischen Antikörpers gegen eine der Komplexuntereinheiten. Das Prinzip basiert darauf, dass alle weiteren Komponenten des Komplexes durch direkte oder indirekte (Bindung über andere Komplexpartner als das präzipitierte Protein) Affinität an das präzipitierte Protein gebunden sind und folglich ebenfalls mit diesem angereichert werden. Die Isolation des Komplexes in einem Zustand, der dem physiologischen am ehesten entspricht, ist einer der größten Vorteile dieser Methode. Des Weiteren erlaubt Co-Immunopräzipitation eine schnelle und effiziente Reinigung von Proteinkomplexen, ohne die Notwendigkeit, einzelne Komponenten zu klonieren und zu exprimieren. Bedingung ist jedoch stets die Existenz entsprechender hochaffiner Antikörper. Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen resultieren häufig in einem hohen Hintergrund, der gegebenenfalls die Detektion und Quantifizierung von niedrig abundanten Komplexkomponenten verhindert. Durch Waschen mit höher konzentrierten physiologischen Salzlösungen können ungewollte Kontaminationen reduziert werden, gleichzeitig kann dies jedoch auch zum Verlust von schwach interagierenden relevanten Komplexkomponenten führen [149] [siehe Kap. 1.2.5]. Ein anderer Nachteil ist die mögliche räumliche oder sequenzspezifische (Bindungsdomäne in Nähe des Epitops) Verdrängung von Interaktionspartnern durch Bindung des Antikörpers.

Eine weitere Methode der Komplexanreicherung bietet das Epitop-*Tagging* („Epitop-Markierung“) [150]. Es erlaubt eine *in vivo* Isolation von Proteinkomplexen. Dafür wird ein ausgewähltes Protein des Komplexes mit einem Epitop-*Tag* durch molekularbiologische Manipulation der zugrundeliegenden DNA-Sequenz versehen und in der Wirtszelle exprimiert. Nach Lyse der Zellen kann der Proteinkomplex durch Anreicherung an einer Affinitätsmatrix, die spezifisch auf das gewählte Epitop reagiert, isoliert werden. Häufig macht man sich ein Epitopanalagon zur spezifischen und sanften Elution zu Nutze. Bei Verwendung herkömmlicher *Tags* (z.B. Flag [151], His [152], Streptavidin [153]) ist in vielen Fällen diese Art der Elution wenig effizient, so dass auf denaturierende Elutionsbedingungen zurückgegriffen werden muss, die jedoch eine funktionelle und strukturelle Untersuchung der Proteinkomplexe verhindern. Um diese Nachteile zu überwinden, entwickelten Kroiss *et al.* eine neue Affinitätsreinigungsstrategie namens *TagIt*, welche sich ein neues 30-Aminosäuren-Epitop am N-Terminus des SMN-Proteins zu Nutze macht. Dieses wird durch einen hochaffinen und spezifischen Antikörper gebunden und erlaubt des Weiteren die kompetitive Elution der angereicherten Proteine unter nativen Bedingungen durch Zugabe des entsprechenden Epitop-Peptids [154].

Ein Nachteil der Epitop-*Tagging* Methode ist der Umstand, dass artifiziell eingeführte *Tags* sich nachteilig auf die Struktur des Proteins auswirken können. So wird u.a. eine korrekte Faltung des Proteins verhindert oder auch Interaktionsdomänen zu anderen Komplexpartnern zerstört. Es ist daher immer sinnvoll, eine C- sowie N-terminale Variante des Fusionsproteins herzustellen und beide Resultate gegenüber zustellen.

Auch die Methode des *GST-Pulldown* verwendet artifiziell eingeführte *Tags* [155]. Dazu wird der Komplex jedoch nicht *in vivo*, sondern *in vitro* gebildet. Ein Proteinkomplexbestandteil wird zunächst z.B. in *Escherichia coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert. Anschließend wird es aufgereinigt an eine Affinitätsmatrix gebunden und mit Zellysat inkubiert, so dass sich Proteinkomplexe mit dem Fusionsprotein ausbilden können. Nach intensivem Waschen der Matrix kann der Komplex entweder denaturierend (z.B. mit SDS) oder physiologisch mit Glutathion eluiert werden. Nachteile der Methode sind die bereits hinsichtlich des *Epitop-Tagging* Methode erwähnten strukturellen Abweichungen sowie häufige unspezifische Interaktionen. Hinzu kommt, dass viele Proteine sich nur schwer in *E.coli* Zellen in löslicher Form produzieren lassen, sowie durch Proteinsynthese in heterologen Zellsystemen physiologische post-translationale Modifikationen nicht ausgebildet werden, die eventuell unabkömmlich für bestehende Protein-Protein-Interaktionen sein könnten.

Nach spezifischer Anreicherung von Proteinkomplexen liegen diese häufig in einer Population von verschiedenen Assemblierungsuntereinheiten vor, so dass weitere Schritte unternommen werden müssen, um diese unvollständigen Subkomplexe abzutrennen. Die drei bekanntesten Methoden dazu sind *Blue Native-PAGE* (BN-PAGE), Saccharosegradientenzentrifugation sowie Größenausschlusschromatographie (SEC - engl. *Size Exclusion Chromatography*).

BN-PAGE nutzt anstelle des üblicherweise verwendeten ionischen Detergenz (SDS, BAC) einen anionischen Farbstoff (Coomassieblau G-250), der den Multiproteinkomplexen eine negative Gesamtladung überträgt, ohne die Interaktionen zu zerstören. Im Anschluss können die Multiproteinkomplexe elektrophoretisch aufgetrennt und separiert werden [156, 157].

Saccharosegradientenzentrifugation beruht auf dem Prinzip unterschiedlicher Dichten in abweichenden Proteinkomplexen, so dass sich diese auf verschiedenen Ebenen innerhalb des Saccharosegradienten konzentrieren und demzufolge separiert werden können [158].

Bei Verwendung von SEC werden unterschiedlich große Proteinkomplexe zu unterschiedlichen Zeiten von der Säulenmatrix eluiert. Da große Proteinkomplexe weniger in die kleinen Poren der stationären Phase eindringen können, eluieren diese früher von der Säule. Kleinere Proteinkomplexe haben durch intensive Interaktion mit dem Säulenmaterial längere Verweilzeiten während der Chromatographie [159].

Im Anschluss an die Anreicherung der Proteinkomplexe werden diese analysiert. Bisher gibt es nur wenige Methoden, die einen Zugang zur Stöchiometrie dieser Komplexe zulassen. Analytische Ultrazentrifugation kann dazu verwendet werden, Informationen über die Größe des Komplexes zu erhalten. Allerdings muss hierzu die Größe der einzelnen Komponenten inklusive ihrer post-translationalen Modifikationen im Vorfeld genau bekannt sein. Außerdem kann die tertiäre Struktur des Komplexes das Ergebnis verfälschen.

Eine weitere Methode zur Charakterisierung von Proteinkomplexstöchiometrien ist die Kombination von BN-PAGE mit herkömmlicher SDS-PAGE. Nach Auftrennung der Proteinkomplexe über BN-PAGE kann die Komposition, Abundanz und Identität der einzelnen Komponenten mittels SDS-PAGE (und ggf. MS/MS-Analyse) festgestellt werden [157].

Sanfte Ionisationsmethoden wie ESI oder MALDI initiieren den Zugang zu komplexen Fragestellungen durch MS. Durch Kopplung dieser Ionisationstechniken mit hochauflösenden Mas-

senspektrometern ist man in der Lage, genauere Masseninformationen zu bekommen. Allerdings ist es bei größeren Proteinkomplexen, bestehend aus einer Vielzahl von Untereinheiten, kaum möglich, eine genaue Stöchiometrie zu bestimmen [160]. Des Weiteren können diese Methoden nur bei Proteinkomplexen mit niedrigen Dissoziationskonstanten angewandt werden, da ansonsten eine Dissoziation in der Gasphase nicht auszuschließen ist. Um diese Nachteile zu umgehen, erfolgt heutzutage der Zugang zu quantitativen Informationen über proteotypische Peptide [161].

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Stöchiometrie wurde von Hochleitner *et al.* entwickelt [162,163]. Dazu werden die nach proteolytischem Verdau entstandenen Peptide mit einem Fluorophor derivatisiert und durch Flüssigkeitschromatographie [siehe Kap. 1.3.1] aufgetrennt. Die Fluoreszenzsignalintensitäten werden detektiert und die Peptide mittels MS identifiziert. Die Fläche eines Peptidsignals ist dabei direkt proportional zu der Menge dieses Peptids, unabhängig von dessen Sequenz. Ein Nachteil dieser Anwendung ist jedoch die Beschränkung auf wenig komplexe Proteinmultimere, da andernfalls unterschiedliche Peptide miteinander überlappen könnten und somit eine akkurate Quantifizierung verhindern würden [162,163].

Die fortschrittlichste Methode, um Peptide absolut zu quantifizieren, ist die Verwendung von AQUA-Peptiden [siehe Kap. 1.3.3.1]. Schmidt *et al.* bestimmten so aktuell die Stöchiometrie eines Proteinkomplexes, der aktiv an der Bildung des Spleißosoms [siehe Kap. 1.2.12.1] beteiligt ist [139]. Sie konnten feststellen, dass der limitierende Schritt dieser Methode der proteolytische Verdau ist. Leider existieren zur Zeit nur wenige Techniken (z.B. chromatographische Auftrennung mittels RP-Monolithen), um den Verdau hinsichtlich Vollständigkeit und Spezifität akkurat zu evaluieren.

Ein weiterer kritischer Punkt während der quantitativen Analyse ist die exakte Konzentrationsbestimmung der AQUA-Peptide, sowie deren Löslichkeit in Stocklösungen [139]. Holzmann *et al.* haben eine Methode entwickelt, die diese Beeinträchtigung umgehen kann. Vor Verwendung der Stocklösungen werden diese über sogenannte *Equalizer*-Peptide, welche mit den eigentlichen Standardpeptiden über tryptische Schnittstellen verknüpft sind, eingestellt, so dass in allen verwendeten Stocklösungen, die gleiche Konzentration des verwendeten *Equalizer*-Peptid vorliegt [164]. Allerdings muss auch bei dieser Methode beachtet werden, dass die Effizienz des enzymatischen Verdaus sowohl von der spezifischen Schnittstelle, als auch von der Sekundärstruktur des Peptids abhängig ist und demnach zwischen unterschiedlichen Peptiden variieren kann.

Nichtsdestotrotz ist es von entscheidender Bedeutung, alle Prozessschritte bis hin zu Bestimmung der Stöchiometrie genau aufzuzeichnen und zu optimieren. Auch das Vorliegen sehr kleiner Proteinkomponenten (< 10 kDa) kann eine genaue quantitative Aussage durch Fehlen geeigneter Standardpeptide verhindern.

1.4 Aufgabenstellung

Spinale Muskelatrophie (SMA) ist die zweithäufigste autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit Todesfolge, die gekennzeichnet ist durch die Degeneration der α -Motorneuronen im

Vorderhorn des Rückenmarks. SMA-Patienten leiden an Hypotonie und Muskelschwäche und sind abhängig vom klinischen Typ (I-IV) betroffen von einem sehr frühen Tod. Ursache von SMA ist eine Deletion oder Mutation des *SMN1*-Gens, welches ubiquitär exprimiert wird. Das resultierende Protein *Survival of Motor Neuron* (SMN) ist in somatischen Zellen sowohl im Cytoplasma, als auch in definierten Kompartimenten des Zellkerns angereichert. SMN bildet dort einen makromolekularen Proteinkomplex mit verschiedenen anderen Proteinen (Gemins, Sm-Proteinen etc.), dessen Funktion die Synthese sogenannter U snRNP-Bausteine ist. Diese bilden nach Translokation vom Cytoplasma in den Zellkern das Spleißosom aus und werden für den Spleißvorgang der mRNA-Transkripte benötigt.

Der SMN-Proteinkomplex sollte in der vorliegenden Arbeit mittels verschiedener massenspektrometrischer Methoden charakterisiert und quantifiziert werden. Unterschiedliche Stöchiometrien zwischen dem im Zellkern- und im Cytoplasma-angesiedelten Komplex sollten durch Verwendung humaner Zelllinien (HeLa) quantitativ erarbeitet werden. Außerdem sollten in *E.coli* exprimierte Subkomplexe mit verschiedenen bekannten SMN-Punktmutationen (E134K, Y272C) mit dem Wildtyp verglichen und der Einfluß der Mutationen auf die Komplex-Stöchiometrie bestimmt werden.

Dazu war es zunächst notwendig den SMN-Komplex reproduzierbar anzureichern. Für die Anreicherung der nativen Proteinkomplexe aus HeLa-Zellen musste eine optimale Zellkern-Cytoplasma-Trennung entwickelt werden, sowie eine quantitative Anreicherung mittels Immunopräzipitation erfolgen. Zudem mussten die resultierenden Proben kompatibel mit den anschließenden LC-MS-Analysen sein, um eine akkurate Quantifizierung zu gewährleisten. Dazu war es wiederum notwendig, die Probenvorbereitung für die quantitative Analyse hinsichtlich Verlust von Proteinen/Peptiden und Interferenz mit HPLC und MS zu optimieren.

Für die Bestimmung der Stöchiometrie mussten des Weiteren Strategien erarbeitet werden, die es ermöglichten, die unterschiedlichen Proteinkomplexe quantitativ zu erfassen. Auch hier galt es unter Einsatz verschiedener LC-MS-Systeme und Anwendung der AQUA-Methode (Absolute Quantifizierung mittels synthetischer Peptidanaloga) die individuellen Proteinkomplexe stöchiometrisch zu untersuchen. Eine wichtige Voraussetzung der Methode ist die Auswahl geeigneter Peptidsequenzen aus den eigentlichen Zielmolekülen. Dazu mussten die einzelnen Proteinbestandteile des SMN-Komplex umfassend massenspektrometrisch und hinsichtlich chromatographischer Eigenschaften examiniert werden.

Ziel war es einen detaillierteren Einblick in den Aufbau des SMN-Komplexes zu erhalten, um somit eine Grundlage zu schaffen, neue Diagnosemöglichkeiten oder Therapieansätze für die Heilung von SMA zu entwickeln.

2 Materialien

2.1 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

| Geräte | Typenbezeichnung | Hersteller |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 1D-PAGE-Apparatur | XCell SureLock [®] | Invitrogen |
| Blotapparatur | XCell II | Invitrogen |
| Brutschrank | INB300 / INB100 | Memmert |
| Digitale Pipetten | Research pro | Eppendorf |
| Feinwaage | RC210D | Sartorius |
| Filmentwicklung | X-OMAT-1000 | Kodak |
| Gefriertrockner | Beta 2+4 LDplusLT | Martin Christ |
| Hochvakuumpumpe | RC6 | Vacuubrand |
| HPLC | U3000 nanoHPLC-System | Dionex |
| Kühlfalle | Savant RVT4104 | Thermo Fisher |
| Mikrotiterplattenphotometer | Multiskan FC | Thermo Fisher |
| Mikrotiterplattenschüttler | PHMP | Grant-Bio |
| Magnetrührer | COMBIMAG RET | IKA |
| Massenspektrometer | 4000 Q TRAP | AB Sciex |
| Massenspektrometer | LTQ XL | Thermo Fisher |
| Massenspektrometer | LTQ XL <i>Orbitrap</i> | Thermo Fisher |
| Massenspektrometer | LTQ <i>Orbitrap</i> Velos | Thermo Fisher |
| Massenspektrometer | TSQ <i>Vantage</i> | Thermo Fisher |
| Netzgerät | EPS-3501 XL | Amersham |
| Pipetten | Research | Eppendorf |
| Reinstwasser | Purelab Ultra / Purelab Prima | ELGA |
| Scanner | Power Look 2100XL | UMAX |
| Schüttler | HS 260 basic | IKA |
| Thermoschüttler | Thermomixer Comfort | Eppendorf |
| Ultraschallbad | Ultrasonic Cleaner USC600TH | VWR |
| Ultraschalllanze | Sonifier 250 | Branson |
| Ultrazentrifuge | Optima L-80 XP | Beckman-Coulter |
| UPLC | ACQUITY UPLC | Waters |
| Vakuumzentrifuge | Savant SPD121P | Thermo Fisher |
| Vortexer | Vortex Genie2(T) | Scientific Industries |
| Waage | 572 | Kern |

Tab. 2.1: Fortsetzung

| Geräte | Typenbezeichnung | Hersteller |
|---------------|-------------------------------|-------------------|
| Zentrifuge | 5810R / 5424 / 5417R | Eppendorf |
| Zentrifuge | L8-80M / Avanti J20-XP / J6-B | Beckman |

2.2 Software

Folgende Software wurde verwendet:

Tab. 2.2: Verwendete Software

| Name | Hersteller | kurze Erläuterung |
|---------------------------|----------------------|---|
| Chromeleon 6.8 SR8 | Dionex Softron | HPLC Bedienungssoftware |
| Analyst 1.4 | AB Sciex | MS-Bedienungssoftware der 4000 Q TRAP |
| Xcalibur 2.1.0 build 1139 | Thermo Fisher | MS-Bedienungssoftware der LTQ XL, LTQ <i>Orbitrap</i> XL, LTQ <i>Orbitrap</i> Velos, TSQ <i>Vantage</i> |
| Multiquant 1.2.0.1 | AB Sciex | Auswertung der 4000 Q TRAP MRM-Daten |
| Pinpoint 1.0 | Thermo Fisher | Auswertung der TSQ <i>Vantage</i> MRM-Daten |
| Mascot Deamon 2.2.0.2 | Matrix Sciences | Oberfläche zur Benutzung des Mascot Servers |
| Mascot Server 2.2.04 | Matrix Sciences | Suchalgorithmus für MS/MS-Spektren |
| SkanIt 2.5.1 | Thermo Fisher | Bedienung des Multiskan FC |
| Silverfast Ai 6.0.2r36 | Lasersoft Imaging AG | Bedienung des UMAX Scanners |

2.3 Enzyme, Chemikalien, Kits

Tab. 2-3: Verwendete Enzyme, Chemikalien, Kits

| Produkte | Hersteller (Herkunft) | CAS-Nummer |
|---|---------------------------------------|------------|
| 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF) | Applichem (Darmstadt) | 30827-99-7 |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Merck (Darmstadt) | 3483-12-3 |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Applichem (Darmstadt) | 7365-45-9 |
| 2-Iodacetamid (IAA) | Merck (Darmstadt) | 144-48-9 |
| Aceton | Merck (Darmstadt) | 67-64-1 |
| Acetonitril (Lichrosolv) (ACN) | Merck (Darmstadt) | 75-05-8 |
| Acetonitril (ULC/MS) (ACN) | Biosolve (Valkenswaard/NL) | 75-05-8 |
| Agar | Oxoid (Wesel) | 9002-18-0 |
| Ameisensäure | Merck (Darmstadt) | 64-18-6 |
| Ameisensäure | Biosolve (Valkenswaard/NL) | 64-18-6 |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Merck (Darmstadt) | 1066-33-7 |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Fluka (Steinheim) | 1066-33-7 |
| Ammoniumsulfat (reinst) | Merck (Darmstadt) | 7783-20-2 |
| Ampicillin | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) | 69-52-3 |
| Aprotinin | Sigma (Deisenhofen) | 9087-70-1 |
| Bactotrypton | Oxoid (Wesel) | 91079-40-2 |
| BCA Proteinbestimmungs-kit | Pierce (Bonn) | - |
| Betain | Sigma (Deisenhofen) | 107-43-7 |
| Chloramphenicol | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) | 56-75-7 |
| Complete Mini TM | Roche (Mannheim) | - |
| Coomassie TM Brilliant Blue G-250 | Sigma (München) | 6104-58-1 |
| CL-X Posure | Pierce (Bonn) | - |
| Dimethylheptan-1,7-diimidatdihydrochlorid | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) | 58537-94-3 |
| ECL Kit | Pierce (Bonn) | - |

Tab. 2.3: Fortsetzung

| Produkte | Hersteller (Herkunft) | CAS-Nummer |
|---|---------------------------------------|-------------|
| Eisessig (Essigsäure 100%) | Fluka (München) | 50-01-1 |
| Ethanol p.a. | Merck (Darmstadt) | 64-17-5 |
| Ethanolamin | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) | 141-43-5 |
| Formaldehyd-Lösung (37%) | Sigma (Deisenhofen) | 10034-99-8 |
| Glutathion-Sepharose | GE Life Sciences (München) | - |
| Glycerol | Merck (Darmstadt) | 56-81-5 |
| Glukose | Merck (Darmstadt) | 14431-43-7 |
| Hefeextrakt | Difco (Detroit, USA) | 8013-01-2 |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | Roth (Karlsruhe) | 367-93-1 |
| Kaliumchlorid | Merck (Darmstadt) | 7447-40-7 |
| Kaliumhydrogenphosphat | Merck (Darmstadt) | 7758-11-4 |
| Kaliumhydroxid | Merck (Darmstadt) | 1310-58-3 |
| Kanamycin | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) | 59-01-8 |
| LDS-Probenpuffer (4x) | Invitrogen (Karlsruhe) | - |
| Leupeptin | Sigma (Deisenhofen) | 24125-16-4 |
| Magnesiumchlorid | Fluka (Steinheim) | 7786-30-3 |
| Mark12 TM Proteinstandard | Invitrogen (Karlsruhe) | - |
| Methanol (Lichrosolv) | Merck (Darmstadt) | - |
| Milchpulver | Applichem (Darmstadt) | 999999-99-4 |
| 3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS) | Invitrogen (Karlsruhe) | 1132-61-2 |
| Natriumcarbonat (wasserfrei) | Sigma (Deisenhofen) | 34620-78-5 |
| Natriumborat | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) | 1303-96-4 |
| Natriumchlorid (Empore [®]) | Merck (Darmstadt) | 7647-14-5 |
| Natriumhydrogenphosphat | Merck (Darmstadt) | 231-449-2 |
| Natriumthiosulfat-Pentahydrat (reinst) | Merck (Darmstadt) | 75-05-8 |
| 4-Nonylphenyl-polyethylene glycol (NP40) | Fluka (Steinheim) | 9016-45-9 |

Tab. 2.3: Fortsetzung

| Produkte | Hersteller (Herkunft) | CAS-Nummer |
|--|-----------------------------|------------|
| NuPAGE® Bis-Tris 4-12% | Invitrogen (Karlsruhe) | - |
| Pepstatin | Sigma (Deisenhofen) | 26305-03-3 |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) | Sigma (Deisenhofen) | 329-98-6 |
| Protein G Sepharose | Amersham (München) | - |
| Phosphorsäure (98%) | Merck (Darmstadt) | 7664-38-2 |
| PVDF-Membran | Amersham (München) | - |
| SeeBlue Plus2 | Invitrogen (Karlsruhe) | - |
| Silbernitrat (p.a.) | Fluka (München) | 64-18-6 |
| Sorbitol | Merck (Darmstadt) | 50-70-4 |
| Saccharose | Merck (Darmstadt) | 57-50-1 |
| Synergi HydroRP 4 μm Partikelgröße, 80 Å Porengröße | Phenomenex (Aschaffenburg) | - |
| Synergi HydroRP 2 μm Partikelgröße, 80 Å Porengröße | Phenomenex (Aschaffenburg) | - |
| TEV-Protease | Invitrogen (Karlsruhe) | - |
| Titriplex III (EDTA) | Merck (Darmstadt) | 6381-92-6 |
| NuPAGE® Transferpuffer | Invitrogen (Karlsruhe) | - |
| Trichloressigsäure | Roth (Karlsruhe) | 64-17-5 |
| Trifluoressigsäure | Merck (Darmstadt) | 7791-18-6 |
| Trifluoressigsäure | Biosolve (Valkenswaard/NL) | 7791-18-6 |
| Trypsin Gold | Promega (Mannheim) | - |
| Trypsin | Fluka (Steinheim) | - |
| Tween (Polyoxyethylenorbitan monolaurate) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) | 9005-64-5 |
| Whatman 3MM Filterpapier | Millipore (Molsheim) | - |

3 Methoden

3.1 Anreicherung von Proteinkomplexen

3.1.1 Zellkern-/Cytoplasmatrennung

| 1xPBS pH 7.4 | |
|---------------------|----------------------------------|
| 137 mM | NaCl |
| 2.7 mM | KCl |
| 100 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 2 mM | KH ₂ PO ₄ |

| Roeder C low pH 7.9 | |
|----------------------------|-------------------|
| 20 mM | HEPES/KOH |
| 420 mM | KCl |
| 1.5 mM | MgCl ₂ |
| + | miniComplete |
| 5% | Glycerol |

| Roeder A pH 7.9 | |
|------------------------|---------------------------|
| 10 mM | HEPES/ KOH |
| 10 mM | KCl |
| 1.5 mM | MgCl ₂ |
| 0.2 mM | EDTA |
| + | miniComplete ^a |
| 0.3% | NP40 |

^a1 Tablette/10 mL Puffer

| Roeder D pH 7.9 | |
|------------------------|-------------------|
| 20 mM | HEPES/KOH |
| 100 mM | KCl |
| 1.5 mM | MgCl ₂ |
| 20% | Glycerol |

Für die Zellkern-/Cytoplasmatrennung wurden jeweils sechs Liter fermentierte HeLa-Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) kultiviert und geerntet. Dazu wurden jeweils 1 L-Fractionen in Zentrifugenbehältern gesammelt und zentrifugiert (1000 x g, 10 min, 4°C). Danach wurden immer zwei der erhaltenen Zellpellets mit jeweils 20 mL 1xPBS gewaschen und zusammen in 50 mL Greinerröhrchen überführt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert. Nach Einwaage der Zellen wurde entsprechend 1,25 pvc (Masse x 0.96 = pcv; pcv x 0.03 = Zellzahl) Roeder Puffer A, sowie 0,5 mM DTT (2 M DTT Stock) zugegeben. Die Zellen wurden 30 bis 60 min unter ständigem langsamen Rühren auf Eis inkubiert. Das Fortschreiten der Zellyse wurde am Mikroskop überprüft. Im Anschluß erfolgte Zugabe von 250 mM Saccharose (2M Saccharose Stock) und ein erneuter Zentrifugationsschritt (1500 x g, 10 min, 4°C). Der Cytoplasmaüberstand wurde abgenommen und bei 4°C gelagert. Um verbliebene intakte Zellen aufzubrechen, wurde das Pellet erneut in Roeder Puffer A resuspendiert und mit einem *Douncer* behandelt. Nach ca. 10 bis 15 Stößen wurde die Suspension mit dem Mikroskop überprüft. Gegebenenfalls musste eine weitere Behandlung mit dem *Douncer* angeschlossen werden. Schließlich wurde erneut zentrifugiert (1500 x g, 10 min, 4°C), um die Zellkerne vom Cytoplasma abzutrennen. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, da bereits einige Zellkerne lysiert waren. Das

Zellkernpellet wurde mit ca. 10 mL Roeder Puffer A in Zentrifugationsröhrchen überführt und ultrazentrifugiert (25000 x g, 10 min, 4°C). Nun wurde das Zellkernpellet eingewogen und in 1,3 pcv Roeder C low Puffer mit 0,5 mM DTT (2 M DTT Stock) resuspendiert. Die Zellkerne wurde ebenfalls mit dem *Douncer* durch ca. 25 Stößen aufgebrochen. Die Suspension wurde anschließend in ein Becherglas überführt und ca. 40 min bei 4°C gerührt. Das Fortschreiten der Zellkernlyse wurde ebenfalls mit dem Mikroskop überprüft. Alle erhaltenen Fraktionen wurden in Polycarbonat-Röhrchen überführt (V = 26,30 mL) und die Probe mit Heptan im Verhältnis (1 : 10 n-Heptan : Probe) überschichtet. Nach Ultrazentrifugation (120000 x g, 30 min, 4°C) wurde die wässrige Phase von der Lipidschicht und dem Detritus abgenommen. Alle Fraktionen wurde gegen Roeder Puffer D über Nacht dialysiert und Zelllysate bis zur weiteren Verwendung bei -80°C weggefroren.

3.1.2 Immunopräzipitation

Zunächst musste der monoklonale anti-SMN Antikörper 7B10 an die verwendete Protein-G-Sepharose-Matrix gekoppelt werden. Dazu wurden 250 μ L Matrix zuvor viermal mit 1xPBS und 0,01% NP40 [3.1.1] gewaschen. Nach Zugabe des PBS-Puffers und Invertieren der Suspension folgte jeweils ein Zentrifugationsschritt (2000 x g, 5 min, 4°C). Im Anschluss wurden ca. 1 mg des Antikörpers 7B10 mit der Sepharose-Matrix gekoppelt. Dazu wurden die Beads in 15 mL PBS-Puffer resuspendiert und mindestens eine Stunde bei RT (Raumtemperatur) im Rotor inkubiert. Die Antikörper-gekoppelte Matrix wurde dann zweimal mit 15 mL 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) gewaschen. Nach erneuter Resuspension in 15 mL Natriumboratpuffer wurden 30 mM Dimethylpimelimidat (DMP) zugegeben, um den Antikörper kovalent an die Matrix zu binden. Die funktionellen Imidoestergruppen des DMP reagieren unter basischen Bedingungen (pH 8-10) mit den primären Aminen von Proteinen unter Bildung von Amidbindungen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT im Rotor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gestoppt. Nach Zentrifugation (2000 x g, 5 min, 4°C) wurde die Matrix erneut im Ethanolaminpuffer resuspendiert und über Nacht bei RT inkubiert, um alle freien DMP-Moleküle bzw. freien Imidoestergruppen vollständig abzufangen. Im Anschluß folgten drei Waschschrte mit PBS-Puffer. Die Zellextrakte wurden nach dem Auftauen zunächst für eine Stunde bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Verwendung von aseptischen Filtern (0,45 μ m) geklärt. Es folgte ein Inkubationsschritt der Zellextrakte mit der Antikörpergekoppelten Matrix für drei Stunden bei 4°C im Rotor. Nach beendeter Präzipitation wurde die Matrix intensiv mit PBS-Puffer (ohne NP40) gewaschen, außerdem folgten drei Waschschrte mit 2xPBS-Puffer, um unspezifische Interaktionen zu verringern.

3.1.3 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteinkomplexe

| Waschpuffer I pH 7.5 | | Waschpuffer II pH 7.5 | |
|----------------------|-------|-----------------------|-------|
| 20 mM | HEPES | 20 mM | HEPES |
| 500 mM | NaCl | 300 mM | NaCl |
| 5 mM | DTT | 5 mM | DTT |

Waschpuffer I pH 7.5

| | |
|--------|------------|
| 20 mM | HEPES |
| 500 mM | NaCl |
| 5 mM | DTT |
| 20 mM | Glutathion |

Super-Broth-Medium

| | | |
|------|-------|-------------|
| 3,2% | (w/v) | Trypton |
| 2% | (w/v) | Hefeextrakt |
| 0,5% | (w/v) | NaCl |
| 0,5% | (v/v) | 1,0 M NaOH |

LB-Medium

| | | |
|-----------------------------|-------|-------------------|
| 1% | (w/v) | Bactotrypton |
| 0,5% | (w/v) | Hefeextrakt |
| 1% | (w/v) | NaCl |
| (1,4% | (w/v) | Agar für LB-Agar) |
| 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | | Ampicillin |
| 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | | Kanamycin |
| 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | | Chloramphenicol |

Für die Expression der Proteinkonstrukte wurden 100 μL BL21*(DE3) {pLysS}, pRARE, His₆-Gemin6-Gemin7 [165] in pET21a RbCl kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. BL21(DE3) {pLysS} kompetente Zellen erlauben eine effiziente Proteinexpression von Genen, die unter der Kontrolle eines T7 Promoters stehen und eine ribosomale Bindungsstelle aufweisen. BL21(DE3) {pLysS} sind lysogen für λ -DE3, eine Phage, die das T7 Bakteriophagen-Gen I enthält und für die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des Lac UV5-Promoters kodiert. Außerdem enthalten die Zellen ein Plasmid, pLysS, welches T7 Lysozym exprimiert. Dadurch wird der Expressionshintergrund durch *E.coli*-Gene im Vergleich zum eigentlichen Zielgen verringert. Das zusätzlich enthaltene Plasmid pRARE kodiert für verschiedene tRNAs, die nur geringfügig bzw. gar nicht in *E.coli*-Zellen vorkommen, für bestimmte eukaryotische Proteine jedoch unabdingbar sind. Das eigentlich Zielgen ist in dem pET21a-Vektor enthalten. Dieses kodiert für die Proteine Gemin6 und Gemin7. Außerdem trägt das fertige Proteinprodukt Gemin6 noch einen N-terminalen His₆-tag mit einer Thrombinschnittstelle, die zusammen folgende Sequenz ergeben: H₆KVPRGS-Gemin6.

Nach dem Auftauen wurden 100 ng des Plasmids GST-TEV-SMN(WT)_Gemin8_Gemin2 in pET28b* [165], für die E134K- und Y272C-Mutanten Gemin2_Gemin8_GST-TEV-SMN-(E134K/Y272C) respektiv, zu den Zellen gegeben. Nach 25 minütiger Inkubation der Zellen auf Eis erfolgte die Hitzeschocktransformation. Dazu wurden die Zellen für 45 s auf 42°C erhitzt, anschließend 2 min auf Eis inkubiert und dann mit 900 μL LB-Medium versetzt. Die Zellen wurden nun 1 Stunde bei 37°C inkubiert und im Anschluß auf einer LB-Agarplatte mit Kanamycin (Kan), Ampicillin (Amp) und Chloramphenicol (Cm) ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden einzelne Kolonien ausgewählt und in 200 mL Super-Broth-Medium mit Amp, Kan und Cm, 500 mM Sorbitol und 2% Glukose angeimpft. Die Kulturen wurde bei 37°C über Nacht gezüchtet, bis sie eine optische Dichte ($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$) von 1,0 bis 1,5 aufwiesen. Jeweils 25 mL dieser Starterkultur wurden dann auf 6 x 2 L-Suber-Broth-Medium (+ Amp + Kan + Cm + 500 mM Sorbitol + 2% Glukose + 1 mM Betain) verteilt. Nach Inkubation bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ von 0,3 wurden die Zellen auf 15°C abgekühlt und mit 0,5 mM

IPTG bei einer OD von 0,4 induziert. Im Anschluß wurden die Zellen für 20 Stunden bei 15°C kultiviert.

Nun folgte eine Zentrifugation der Zellen bei 4000 x g für 15 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die einzelnen Zellpellets in je 40 mL Waschpuffer I resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Greinerröhrchen transferiert und mit 1 mL 0,1 M PMSF, 1 mL Leupeptin/Pepstatin, 1 mL AEBSF und 1 mL Aprotinin versetzt. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Ultraschalllanze (Branson Sonifier 250) in der Einstellung 8, 50% Leistung (entspricht 10 kHz). Dazu wurde jeweils 5 min sonifiziert und 5 min auf Eis abgekühlt. Der Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 25000 rpm in einem 45Ti-Rotor für 60 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und in 50 mL Greinerröhrchen überführt. Jedes Probengefäß wurde mit 2 mL Glutathion-Sepharose versetzt und mit Waschpuffer I auf 50 mL aufgefüllt. Der Zellüberstand wurde nun für 2 h mit der Matrix bei 4°C in einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (2000 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und die Matrix der einzelnen Greinerröhrchen in einer Leersäule vereinigt. Nun wurde die Matrix dreimal mit je 50 mL Waschpuffer I gewaschen, anschließend folgten zwei sukzessive Waschräume mit Puffer II. Die Matrix wurde nun in zwei 15 mL Greinerröhrchen überführt, mit 500 µL TEV-Protease (0,9 mg/mL) versetzt und mit Waschpuffer II aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation im Drehrad von 40 Stunden bei 4°C. Die Suspensionen wurden danach zentrifugiert (2000 x g, 4°C, 10 min) und der Überstand abgenommen. Anschließend folgte eine Resuspension der Matrix und erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde abgenommen und der gesamte Vorgang dreimal wiederholt.

Zur Kontrolle des TEV-Verdaus wurden verbleibende Proteine von der Matrix durch Zugabe von Glutathion eluiert. Auch dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Alle Fraktionen wurden mit 1D-PAGE (Eindimensionale Gelelektrophorese) analysiert.

3.2 Probenvorbereitung

3.2.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der 1D-PAGE wurden die Proben zunächst in 1x Lithiumdodecylsulfat-Puffer [LDS, Invitrogen] für 10 min bei 95°C aufgekocht und anschließend kurz bei RT zentrifugiert. Um eine Kontamination mit Keratin zu verringern, wurden stets vorgefertigte Gele der Firma Invitrogen verwendet (z.B. NuPAGE®-Gradienten-Gele mit Acrylamidgradienten von 4-12%). Abhängig vom verwendeten Gel wurden zwischen 20 (*12well*) und 30 µL (*10well*) Probe aufgetragen. Zusätzlich wurden immer 5 µL eines Proteinmolekulargewichtsstandard [Mark12, Invitrogen] aufgetrennt. Nach Einlaufen der Proben bei 50 V für ca. 20 min wurde die Spannung auf 200 V heraufgesetzt und die 1D-PAGE solange weitergeführt, bis die Farbfront des Puffers das Ende des Gels erreicht hatte. Während der Auftrennung befand sich die Gelapparatur stets bei 4°C. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele entsprechend dem verwendeten Färbeprotokoll behandelt.

3.2.2 Silberfärbung nach Blum

| Fixierer | | | | Waschlösung | | | |
|-------------------------|-------|---|----------|--------------------|-------|---------------------|---------|
| 40% | (v/v) | Ethanol | 80 mL | 30% | (v/v) | Ethanol | 60 mL |
| 10% | (v/v) | Essigsäure (100%ig) | 20 mL | | ad | H ₂ O | 200 mL |
| | | ad H ₂ O | 200 mL | | | | |
| Sensibilisierung | | | | Färbung | | | |
| 0,02% | (w/v) | Na ₂ S ₂ O ₃ x5 H ₂ O | 0,0313 g | 0,1% | (w/v) | AgNO ₃ | 0,1 g |
| | | ad H ₂ O | 100 mL | | | ad H ₂ O | 200 mL |
| Entwicklung | | | | Stoppen | | | |
| 3% | (w/v) | Na ₂ CO ₃ | 6 g | 0,05 M | | EDTA | 1,862 g |
| | | 0,05% Formaldehyd | 100 µL | | | ad H ₂ O | 100 mL |
| | | ad H ₂ O | 200 mL | | | | |

Zur Fixierung der Proteine im Gel wurden diese mindestens 1 Stunde bzw. über Nacht in 40% EtOH, 10% Essigsäure inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschstapen für jeweils 20 min in 30% EtOH. Zum Abschluß wurde das Gel nochmals für weitere 20 min in Wasser gewaschen. Die Sensibilisierung erfolgte für eine Minute mit 0,02% Natriumthiosulfat x 5 H₂O. Anschließend wurde dreimal je 20 s mit Wasser gewaschen. Die Gele wurden dann bei 4°C für 20 min mit 0,1% Silbernitratlösung gefärbt. Auch nach diesem Schritt wurde erneut dreimal je 20 s mit Wasser gewaschen. Zur Verringerung des Hintergrunds nach der Entwicklung wurde das Glasgefäß gewechselt und das Gel abschließend einmal für 1 min mit Wasser gespült. Die Entwicklung erfolgte mit 3% Na₂CO₃, 0,05% Formaldehyd für maximal 10 min, dabei wurde die Lösung nach Gelbfärbung einmal gewechselt. Ein Abstoppen der Reaktion wurde durch Inkubation in 0,05 M EDTA bewirkt.

3.2.3 Kolloidale Coomassiefärbung

| Coomassielösung | | | |
|------------------------|-------|-----------------------|---------|
| 34% | (v/v) | Methanol | 68 mL |
| 2% | (v/v) | Phosphorsäure (89%ig) | 4,49 mL |
| 17% | (w/v) | Ammoniumsulfat | 34 g |
| 0,066% | (w/v) | Coomassie G-250 | 1,32 g |
| | | ad H ₂ O | 200 mL |

Die Anwendung von kolloidalem Coomassie bewirkte sowohl die Fixierung der Proteine im Gel, als auch eine Blaufärbung der einzelnen Proteinbanden. Beim Ansetzen der Färbelösung war zu beachten, dass zunächst Methanol, Phosphorsäure und Coomassie vereint wurden. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser auf 140 mL aufgefüllt. Es folgte eine langsame Zugabe des Ammoniumsulfats unter kräftigem Rühren. Schließlich wurde die Lösung mit Wasser auf 200 mL aufgefüllt. Das Gel wurde mindestens 2 Stunden oder über Nacht mit der Lösung inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde das Gel mehrere Stunden mit Wasser geschwenkt.

Dabei wurde das Wasser mehrfach gewechselt.

3.2.4 In-Gel-Verdau

| | | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------------------|---------|--|--------------------------|-------------|---------|--|
| Puffer A | | | | Puffer B | | | |
| 50 mM | NH ₄ HCO ₃ | 0,8 g | | 50% (v/v) | Puffer A | 50 mL | |
| | ad H ₂ O | 200 mL | | 50% (v/v) | Acetonitril | 50 mL | |
| Dithiothreitol [DTT] | | | | Iodacetamid [IAA] | | | |
| 10 mM | DTT | 0,038 g | | 5 mM | IAA | 0,0285g | |
| | ad Puffer A | 25 mL | | | ad Puffer A | 25 mL | |

Nach Ausschneiden der Proteinbanden aus den angefärbten Gelen wurden diese in Verdauerröhrchen überführt. Zunächst mussten die Gelbanden intensiv gewaschen werden, um SDS, Coomassie und andere für den proteolytischen Verdau und die anschließende LC-MS-Analyse interferierenden Substanzen zu entfernen. Dazu wurden die Gelbanden im ersten Schritt mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat für 10 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurde dieser durch 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 50% ACN ersetzt und die Gelbanden erneut für 10 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Beide Schritte wurden einmal wiederholt. Im Anschluss erfolgte eine Reduktion der vorhandenen Cysteinbrücken zu freien Thiolen, sowie in einem zweiten Schritt eine irreversible Alkylierung aller Cysteine. Dazu wurden die Gelbanden zunächst eine halbe Stunde bei 56°C mit 10 mM DTT-Puffer in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat inkubiert. Die freien Sulfhydrylgruppen wurden danach durch Zugabe einer 5 mM IAA-Lösung in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat und Inkubation bei RT 30 min im Dunkeln carbamidomethyliert. Um u.a. DTT und IAA aus den Gelbanden zu entfernen, mussten diese erneut durch zweimalige alternierende Wiederholung der ersten beiden beschriebenen Schritte gewaschen werden. Für alle bisher genannten Arbeitsschritte wurde stets ein Volumen von 50 μ L verwendet. Im Anschluss wurden die Gelbanden im Vakuum getrocknet und gegebenenfalls bei -80°C gelagert. Für den tryptischen Verdau wurden 10 μ L einer Trypsinlösung [12,5 ng/ μ L 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat] auf die getrockneten Gelbanden gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C zum Quellen der Banden wurde der Überstand entfernt. Die Gelbanden wurden danach über Nacht bei 37°C proteolytisch verdaut.

Am nächsten Tag wurden die tryptischen Peptide mit 15 μ L einer 0,1% TFA-Lösung für 15 min bei 37°C aus den Gelbanden extrahiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Abschließend erfolgte eine Extraktion sehr hydrophober Peptide durch Inkubation mit 0,05% TFA, 50% ACN. Alle Extrakte wurde vereint und mittels Vakuumzentrifugation auf 15 μ L eingengt. Die Extrakte konnten nun bei -80°C gelagert oder direkt im Anschluß durch LC-MS analysiert werden.

3.2.5 In-Lösung-Verdau

Zur Vorbereitung auf den In-Lösung-Verdau mussten die Proteine zunächst carbamidomethyliert werden. Dazu wurde die Proteinlösung in 10 mM DTT für 30 min bei 56°C inkubiert.

Dann erfolgte Zugabe von 30 mM IAA. Die Proteine wurden nun für weitere 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion und Umsetzung von überschüssigem IAA wurden erneut 10 mM DTT zugesetzt und die Proteinlösung 15 min bei 56°C inkubiert.

Anschließend folgte der tryptische Verdau. Dazu wurde Trypsin in einem Verhältnis Trypsin zu Proteinmenge von 1:20 zu der Lösung zugegeben. Der Verdau wurde bei 37°C über Nacht durchgeführt und mittels 1D-PAGE kontrolliert.

3.2.6 BCA

Zur Bestimmung der Proteinmenge der rekombinanten Proteinlösungen wurde ein *BCA-Assay* durchgeführt. Dazu wurden drei verschiedene Verdünnungen der Proteinlösung mit einem Gesamtvolumen von je 100 μL angesetzt. Die Verdünnungen wurde in einer Mikrotiterplatte zu jeweils drei Replikaten à 25 μL verteilt. Zur Kalibrierung wurden fünf verschiedene Verdünnungen einer BSA-Proteinlösung eingesetzt. Auch von diesen wurden drei Replikate à 25 μL verwendet. Für die Detektion wurde eine Reagenzlösung benutzt, die zu je 200 μL zeitnah zu den Proben gegeben wurde. Diese Lösung bestand aus den Reagenzien A (Bicinchonininsäure) und B (Kupfer(II)sulfat), die im Verhältnis 50 (A) : 1 (B) gemischt wurden. Die Proteine bildeten mit den Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex. Dazu wurde die Mikrotiterplatte bei 60°C für eine halbe Stunde inkubiert. Nach Chelatisierung und Reduktion (Cu^{2+} zu Cu^+) durch die Bicinchonininsäure (BCA) entstand ein violetter Komplex. Dieser konnte durch photometrische Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden. Die Konzentrationsbestimmung der unbekanntenen Proteinprobe erfolgte im Vergleich zur BSA-Standardkurve.

3.2.7 Fällung

Zur Entfernung von Detergentien vor dem tryptischen Verdau und der LC-MS-Analyse wurden die Proteine präzipitiert. Dazu wurde zu einem definierten Volumen der Proteinlösung die fünffache Menge eiskaltes ACN (-20°C) gegeben. Nach Invertieren wurde die Lösung 30 min bei 0°C auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte eine halbstündige Zentrifugation bei 20200 x g bei 4°C. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgenommen und das Proteinpellet mit 100 μL eiskaltem Aceton (-20°C) gewaschen. Abschließend folgte eine erneute Zentrifugation für 10 min (20200 x g, 4°C). Das Aceton wurde entfernt, das Pellet bei 37°C für 1-2 min getrocknet und zur Resolubilisierung in 200 mM Guanidiniumhydrochlorid in 50 mM-Ammoniumhydrogencarbonat aufgenommen. Die Suspension wurde nun für 30 min bei 37°C inkubiert, um eine quantitative Auflösung des Pellets zu gewährleisten. Anschließend folgten Carbamidomethylierung und der tryptische Verdau.

3.2.8 Western Blot-Analyse

Zunächst wurde ein 1D-Gel der einzelnen Fraktionen angefertigt. Als Molekulargewichtsmarker diente der bereits gefärbte Proteinmarker SeeBlue[®] Plus2 [Invitrogen]. Direkt im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Dazu wurden das Gel, sowie Blotting Pads und Whatman-Papiere im Transfer-Puffer [NuPAGE[®], Invitrogen] äqui-

libriert. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol aktiviert. Für den Blotvorgang wurde die XCell II™-Apparatur von Invitrogen verwendet. Auf die Blotting Pads wurde ein Whatman-Papier gelegt, darauf folgte das Gel, welches wiederum von einem weiteren Whatman-Papier bedeckt wurde und anschließend wurde das ganze mit zwei weiteren Blotting Pads abgeschlossen. Nach Belegen der Apparatur wurde diese mit Transfer-Puffer befüllt. Es wurde eine Spannung von 30 V für eine Stunde angelegt, um die Proteine vom Gel auf die Membran zu übertragen. Anschließend wurde die Membran eine Stunde in Blockpuffer [5% Milchpulver in 1xPBS-T (0,01% Tween)] inkubiert, um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren. Die Membran wurde dann dreimal für je 5 min in 1xPBS-T gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (7B10, PRP31, pICln) inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran erneut dreimal für je 5 min mit 1xPBS-T gewaschen. Nun folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG) für eine Stunde bei RT. Für die Entwicklung des Western Blots wurde das ECL Kit [Pierce] verwendet. Dazu wurden die Lösungen A (Peroxid) und B (Luminol) im Verhältnis 1:1 vermischt und für ca. 1-2 Minuten mit der Blotmembran inkubiert. Es folgte Auflegen der Membran auf einen lichtsensitiven Röntgenfilm im Dunkeln und eine kurze, von der Sensitivität des Antikörpers abhängige Inkubationsphase. Die Entwicklung der Filme [CL-X Posure™, Pierce] wurde mit dem KODAK X-OMAT-1000-Prozessor durchgeführt.

3.2.9 Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalysen zur Gehalts- und Reinheitsbestimmung der synthetischen Peptide wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein Peptidaliquot ($200 \mu\text{L}$ à $5 \text{ pmol}/\mu\text{L}$) mittels dedizierten Pipetten und Pipettenspitzen in ein Hydrolysegefäß überführt. Die Proben wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Im Anschluß wurde ein speziell für die Aminosäureanalytik entwickeltes Evakuierungsgefäß [siehe Abb. 3.1] mit maximal zehn Hydrolysegefäßen bestückt und mit $400 \mu\text{L}$ 6 N HCl sowie 0,1% Phenol befüllt. Die Proben waren dabei nicht in direktem Kontakt mit der Hydrolyselösung. Das Evakuierungsgefäß wurde zunächst dreimal evakuiert und danach für 24h bei 110°C inkubiert. Unter den gewählten Bedingungen wurden die Peptide in ihre einzelnen Aminosäurenbausteine zerlegt (hydrolysiert). Die Aminosäuren W und C wurden jedoch zerstört und standen dementsprechend nicht mehr für eine Quantifizierung zur Verfügung. Die Aminosäuren Q und N wurden zu E bzw. D hydrolysiert. Nach Abschluß der Hydrolyse wurden die Evakuierungsgefäße zur Entfernung der verbliebenen Hydrolyselösung evakuiert. Die Proben wurden nun mit interner Standardlösung (10 pmol Norvalin/ Injektion Boratpuffer [Waters]) sowie 20 mM HCl versetzt. Nach kurzem und sanften Schütteln (max. 700 U/min) im Thermomixer wurde das Derivatisierungsreagenz AccQ-Fluor [Waters; 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidylcarbonat] hinzugegeben.

Dieses bindete unter Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid kovalent an die freien Aminogruppen der Aminosäuren unter Bildung fluoreszierender Amidderivate. Überschüssiges Reagenz wurde mit einer Halbwertszeit von weniger als 15 Sekunden sehr schnell unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid hydrolysiert, so dass bereits nach einer Minute keine weitere Derivatisierungsreaktionen mehr statt fanden [siehe Abb. 3.2]. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 55°C wurden die Proben mittels UPLC [engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*; Wa-

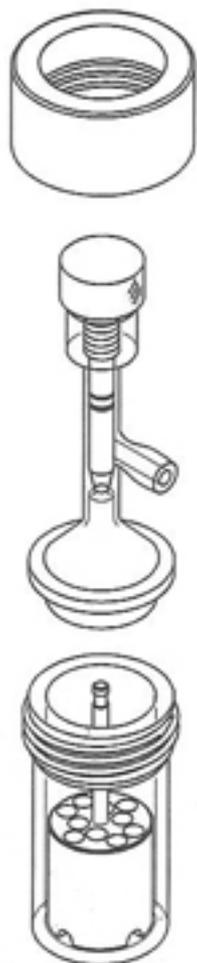
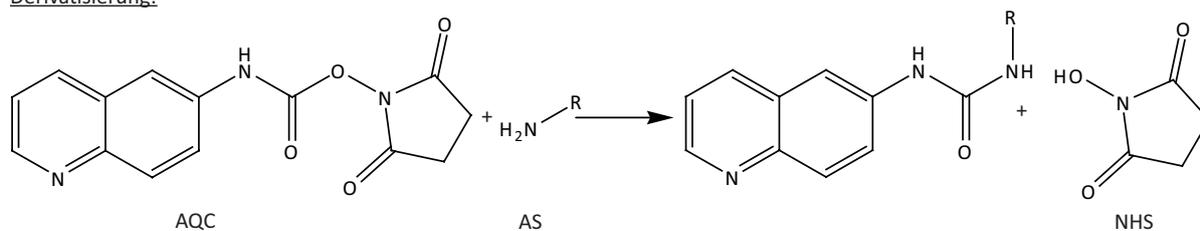


Abb. 3.1: Hydrolyse-Evakuierungsgefäß für die Aminosäureanalytik. Quelle: Cooper *et al.* [166]

Derivatisierung:



Reagenz Hydrolyse:

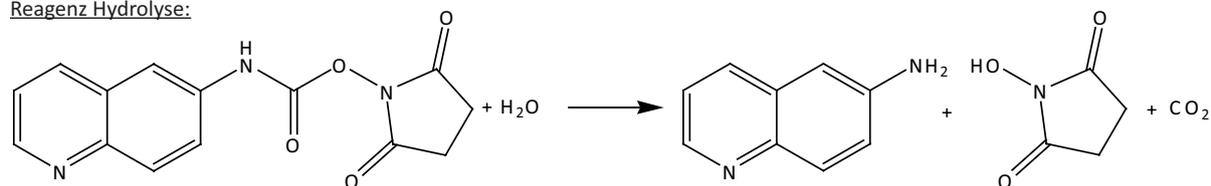


Abb. 3.2: Reaktionsmechanismus von 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidylcarbonat mit den freien Aminosäuren sowie Hydrolyse von überschüssigem Reagenz. Während der Umsetzung mit AQC werden die Aminogruppen unter Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid (NHS) mit dem Reagenz derivatisiert. Die AQC-Hydrolyse erfolgt unter Abspaltung von NHS und CO₂.

ters] aufgetrennt und detektiert. Das Injektionsvolumen betrug dabei 1 μL . Die Auftrennung erfolgte mittels einer 2,1 x 100 mm Umkehrphasen-Trennsäule aus C18 Material [AccQ-Tag Ultra Column; Waters]. Zur Elution der Aminosäuren wurde ein binärer Gradient mit ansteigendem ACN-Gehalt angewendet. Lösungsmittel A bestand dazu aus einer Natriumacetat-Trihydrat-Lösung (Waters) und Lösungsmittel B aus 100% Acetonitril. Zur Detektion mittels eines Fluoreszenzdetektors wurde der Durchfluß bei 250 nm angeregt (Anregungswellenlänge) und die Emission der Moleküle bei 395 nm aufgenommen (Emissionswellenlänge).

Die Kalibrierung des Gerätes wurde zunächst mittels eines standardisiertem Aminosäuremix vorgenommen, welches alle detektierbaren Aminosäuren mit einer Konzentration von 10 pmol/Injektion enthielt. Dies diente sowohl zur Ermittlung der spezifischen Retentionszeiten der einzelnen Aminosäuren, als auch zur Kalibrierung der Quantifizierung über die Signalfächen. Zur Auswertung der unbekanntenen Proben wurden die ermittelten Signalfächen der Aminosäuren durch die Fläche des internen Norvalin-Standards dividiert und mit der enthaltenen Menge Norvalin (10 pmol) multipliziert.

3.3 LC-MS-Analyse

3.3.1 nanoHPLC

Die Peptidtrennung erfolgte mit einem U3000 nanoHPLC-System [Dionex]. Dazu wurden die Proben zunächst mittels eines automatischen Probengebers [WPS, Dionex] in 0,1% TFA auf eine Vorsäule [HydroRP, 3 cm L., 100 μm i.D.] bei einem Fluß von 6 bis 12 $\mu\text{L}/\text{min}$ (abhängig vom Gegendruck der verwendeten Vorsäule; der Vorsäulendruck wurde stets mit dem Druck auf der Hauptsäule abgeglichen) appliziert. Dies bewirkte sowohl eine Aufkonzentrierung der Peptide auf der Säulenmatrix, als auch ein Waschen der Probe, um diese von interferierenden Salzen zu befreien. Anschließend wurde die Probe über eine Hauptsäule [HydroRP, 30 cm i.L., 75 μm i.D.] bei 250 nL/min mittels eines binären Gradientensystems aufgetrennt. Als Lösungsmittel A wurde 0,2% Ameisensäure [FA], als Lösungsmittel B 0,2% FA, 84 % ACN benutzt. Die Separierung der Peptide erfolgte mittels eines linearen Gradienten, der beginnend bei 5% B innerhalb von 40 min auf 50% B anstieg. Im Anschluß erfolgte ein Spülen der Säule mit 95% B für 5 min und eine Äquilibrierungsphase mit 5% B für 15 min. Zwischen allen Probenläufen wurden 15 μL 0,1% TFA injiziert und Leerläufe (engl. *Blanks*) durchgeführt, um die Säule ausgiebig zu waschen und ein Übertragen von Peptiden in die folgende Probe zu verhindern.

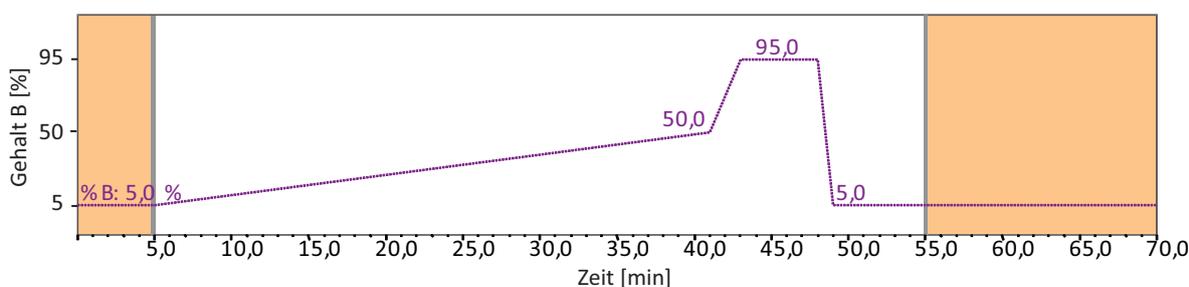


Abb. 3.3: Im orange eingefärbten Bereich ist die Vorsäule nicht im Hauptsäulenfluß. Gezeigt ist der Gehalt an Lösungsmittel B (0,1% FA, 84% ACN).

3.3.2 MS/MS

Für die MS/MS-Analyse der endogenen SMN-Komplexe wurde ein LTQ XL System [Thermo Fisher] genutzt. Der verwendete Scanbereich dieses Massenanalysators lag im Bereich von 350 bis 2000 m/z. Nach Aufzeichnung eines Übersichtsscans wurden die fünf intensivsten Ionen ausgewählt und einer CID-Fragmentierung unterzogen. Für einen Messzyklus, bestehend aus Übersichtsscan und Fragmentationenspektren, benötigte das Gerät 0,5 s. Die m/z-Werte von fragmentierten Ionen wurden für 30 s auf eine Ausschlussliste gesetzt, um mehrmaliges Messen desselben Ions zu verhindern. Theoretisch ist es möglich, dass in dem festgelegten Zeitraum Ionen mit identischem m/z in den Massenanalysator gelangten und daraufhin nicht fragmentiert wurden. Allerdings konnte durch das dynamische Ausschlussverfahren gewährleistet werden, dass auch niedrig abundante Peptide anstelle der fünf intensivsten Ionen fragmentiert wurden, und sich der dynamische Bereich der Analyse damit vergrößerte.

Die MS/MS-Analyse der rekombinanten SMN-Komplexe erfolgte mit einem 4000 Q TRAP [AB Sciex]. Dieses arbeitete in einem Bereich von 380 bis 1500 m/z. Nach Aufnahme eines Übersichtsscans wurden hier die drei intensivsten Ionen ausgewählt und ihr Ladungszustand zunächst mittels eines *Enhanced Resolution Scans* bestimmt. Anschließend wurde die gewählten Ionen sukzessive fragmentiert und ihre MS/MS-Spektren am Detektor aufgezeichnet. Auch dieser Massenanalysator verwendete einen dynamischen Ausschluss von m/z-Werten bereits fragmentierter Ionen. Diese wurden nach zweimaligem Messen für 10 s auf eine Ausschlussliste gesetzt. Für einen Zyklus (1 Übersichtsscan, 3 Fragmentspektren) benötigte die Q TRAP 1,4 s. Die LTQ *Orbitrap* XL und LTQ *Orbitrap* Velos zeichnen sich durch sehr hohe Sensitivität und Auflösung aus. Daher wurden diese Massenanalysatoren zur Identifizierung semi-tryptischer Schnittstellen verwendet. Beide Geräte arbeiteten in einem Massenbereich von 350 bis 2000 m/z. Die Übersichtsspektren wurden mit einer Auflösung von 60.000 akquiriert. Polydimethylcyclosiloxan $[(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6\text{H}^+]$ mit einem m/z von 445,120030 wurde als *lock mass* zur internen Kalibrierung genutzt. Dadurch konnte die bereits sehr hohe Massengenauigkeit beider Geräten (< 10 ppm ohne *lock mass*) nochmals signifikant verbessert werden (< 2 ppm mit *lock mass*). Ähnlich wie beim LTQ XL wurde stets ein Übersichtsscan mit fünf Fragmentationenspektren aufgezeichnet, wobei die Aufzeichnung von MS und MS/MS-Spektren durch Verwendung von Orbitrap (MS) und LTQ (MS/MS) parallel erfolgt. Die dynamische Ausschlusszeit betrug bei beiden Geräten 20 s nachdem ein Ion einmal fragmentiert wurde. Für einen Scanzzyklus benötigen beide Orbitrap-Instrumente weit unter 2 s. Allerdings erlaubt die LTQ Orbitrap Velos eine nahezu doppelt so schnelle MS/MS-Akquisition durch Wegfall des *Prescans*, der bei der LTQ Orbitrap XL zur Bestimmung der Ioneninjektionszeit angewandt wurde, sowie durch schnellere Isolierung der Ionen in der Niedrigdruckionenfalle und effizientere Fragmentierung in der Hochdruckfalle und verbesserte Ionentransmissionsraten aufgrund der Implementierung einer neuen Ionoptik (*S-lens*) [siehe Abb. 1.9] [113].

Neben der Generierung von MS/MS-Spektren wurden beide *Orbitrap*-Geräte dazu verwendet, markierungsfreie Quantifizierung durchzuführen. Dazu wurden stetig Übersichtsscans (*Full-MS* Modus) aufgezeichnet ohne die Ionen zu fragmentieren und entsprechende MS/MS-Spektren zu akquirieren. Die Spektren wurden im Anschluss mit dem Qualbrowser der Xcalibur Software

[Thermo Fisher] ausgewertet.

3.3.3 MRM

Selected/Multiple Reaction Monitoring ist eine Analysemethode mit hoher Spezifität und Selektivität. Für diese Anwendung benötigt man Triple Quadrupol Geräte, wie das 4000 Q TRAP oder das TSQ Vantage. Im Vorfeld der Messung werden spezifische Peptidion/Fragmention-Paare, sogenannte Übergänge, definiert. Innerhalb des ersten Quadrupols selektiert das Gerät nach den m/z der definierten Peptidionen indem es Wechsel- und Gleichspannung entsprechend der m/z -Frequenz anpasst. Alle weiteren unspezifischen Peptidionen werden nicht berücksichtigt, da sie aufgrund instabiler Flugbahnen den ersten Quadrupol nicht passieren können. Nachdem die Peptidionen den ersten Quadrupol durchlaufen haben, gelangen sie in den zweiten der insgesamt drei Quadrupole. Dort erfolgt die Fragmentierung der Mutterionen durch Kollision mit einem Stoßgas (Stickstoff). Analog zum ersten Quadrupol wählt der dritte Quadrupol das vorher definierte Fragmention aus. Unspezifische Fragmente können diesen Quadrupol nicht passieren. Nach Durchquerung der dritten Zelle gelangt das Ion in den Detektor und erzeugt dort ein Signal, welches an einen Computer übermittelt wird [siehe Abb. 1.11].

3.3.3.1 4000 Q TRAP

Abhängig von der Auflösung des ersten und letzten Quadrupols ist die Selektivität eines MRM-Übergangs variabel. Je niedriger die Auflösung, desto mehr unspezifische Ionen gelangen zum Detektor. Beim Q TRAP Massenanalysator waren beide Quadrupole auf *unit* kalibriert. Dies bedeutet eine Auflösung von etwa 1700 mit einer Signalthalbwertsbreite von 0,6 Da bei einem m/z von 1000. Häufig konnten unspezifische Signale beobachtet werden, die eine Interpretation und akkurate Quantifizierung der Spektren erschwerten. Eine zu hohe Auflösung führte jedoch im Gegensatz dazu, zu Signalintensitätsverlusten, wodurch die Detektion niedrig abundanter Ionen erschwert wurde.

Die *Dwell Time*, die Zeit, die das Gerät pro MRM-Übergang benötigt, betrug für alle MRM-Übergänge 20 ms. Je höher diese Zeit ist, desto länger akkumuliert das Massenspektrometer die Signale der Ionen am Detektor, dementsprechend wird das Signal/Rauschverhältnis verbessert und Interferenzen niedrig-abundanter Ionen mit unspezifischen Ionen werden verringert. Allerdings verliert man durch zu hohe *Dwell Time*-Werte auch Datenpunkte für die einzelnen Elutionspeaks, da pro Zeiteinheit weniger Datenpunkte aufgezeichnet werden können. Damit einhergehend verliert man gegebenenfalls wichtige Informationen für die Genauigkeit der Quantifizierung (reale Signalförmigkeit für eine exakte Integration des Peaks). Die *Dwell Time* sollte also entsprechend mit der Qualität der Auflösung der vorgeschalteten nano-HPLC abgeglichen werden, so dass man ca. 10 Datenpunkte pro Peptidpeak erhält. Außerdem muss die Anzahl an definierten Peptidion/Fragmention-Paaren berücksichtigt und möglicherweise eingeschränkt werden, so dass ein Gesamtzyklus nicht länger als ca. 1,5 s dauert (entspricht ungefähr 75 MRM-Übergängen à 20 ms *Dwell time*) [137, 139].

Die Verwendung von *scheduled* MRM (sMRM) erlaubt eine retentionszeitabhängige Aufzeichnung und damit eine Erfassung von hunderten MRM-Übergängen innerhalb eines einzigen Laufs.

Voraussetzung ist aber die Kenntnis der Retentionszeit sowie eine reproduzierbare nano-HPLC, die es erlaubt möglichst kleine Zeitfenster zu definieren. Da in dieser Arbeit nur insgesamt 19 verschiedene Peptide beobachtet wurden mit jeweils 3 bis max. 6 Übergängen (abhängig vom Peptid), war eine retentionszeitabhängige Analyse nicht notwendig. Außerdem erschwerte die Verwendung von nicht-kommerziellen (nicht geprüften) Vor- und Hauptsäulen die Anwendung dieser Methode, da für jede neue Säule zunächst die Retentionszeiten der einzelnen Peptide neu erfasst werden müssten.

MRM-Übergänge für die Messung am 4000 Q TRAP wurden u.a. festgelegt durch MS/MS-Akquirierung des zu betrachtenden Peptids und die Auswertung der erhaltenen Spektren hinsichtlich intensiver Signale mit möglichst hohen m/z -Werten (wenn möglich $> 400 m/z$) von y - oder b -Ionen. Die Wahrscheinlichkeit unspezifische, nicht Peptid-zugehörige Signale aufzuzeichnen, steigt mit sinkendem m/z -Wert aufgrund der Korrelation mit der Zahl enthaltener Aminosäuren und der wahrscheinlichen Übereinstimmung sehr kurzer Sequenzen mit anderen Peptiden. Die Einzigartigkeit eines Peptids hinsichtlich m/z und Aminosäuresequenz steigt mit höheren m/z -Werten.

Konnten durch diese Vorgehensweise keine idealen MRM-Übergänge definiert werden, wurde der MS-Product Algorithmus des ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/>) zur Vorhersage der möglichen y - und b -Ionen verwendet. Diese wurden dann sukzessive am 4000 Q TRAP Gerät auf ihre Spezifität und Signalintensität getestet.

Im weiteren Vorgehen wurde jeder einzelne Übergang durch Direkteinspritzung der synthetischen AQUA-Peptide hinsichtlich Kollisionsenergie (CE) und *Declustering Potential* (DP) optimiert, um eine ideale Peptidfragmentierung, sowie maximale Signalintensitäten zu erreichen. Zur Optimierung der CE wurden beide Quadrupole auf den jeweiligen Übergang festgelegt (m/z von Vorläufer- und Fragmention) und die CE unter gleichzeitigem Aufzeichnen der Signalintensität sukzessive erhöht. Die daraufhin erzeugte Auftragung „Intensität in Abhängigkeit der CE“ erlaubte das Ablesen des Signalmaximums und die Zuordnung der entsprechenden CE. Ähnlich wurde für das Festlegen des DP-Optimums verfahren. Das DP bezeichnet dabei den Prozess der Dissoziation von Peptidionenclustern in der *Orifice* Region des Massenanalysators (Einlass). Dementsprechend wurde nur die Intensität des m/z des Vorläuferions aufgezeichnet und die Höhe des DP sukzessive verändert, um ein entsprechendes Signalmaximum zu erhalten. Mit den erhaltenen Werten bzgl. m/z von Vorläufer- und Fragmentionen, CE und DP wurden entsprechende Methoden programmiert, die zur weiteren Analytik des SMN-Komplexes angewandt wurden.

Weitere Optimierungen betrafen die ESI-Spraystabilität des 4000 Q TRAP. Dazu wurde sowohl der Stickstoffstrom, als auch die angelegte Spannung der Nadel vor jeder Analytik (zusammengehöriger Block von LC-MS-Läufen) und beim Wechsel der Nadel neu eingestellt. Außerdem wurde durch ein T-Stück ein konstanter Fluss von ca. 100 nL/min 0,2% FA, 84% ACN *post column* über eine zweite HPLC-Pumpe mit *Flow Splitter* zugeführt, um ein Einbrechen des Sprays bei niedrigem organischem Anteil und durch den Durchbruch der Vorsäule (0,1% TFA) zu verhindern.

Um den linearen Bereich der jeweiligen Peptide festzulegen, wurden Verdünnungsreihen der

Peptide angefertigt, mit der Multiquant-Software ausgewertet (Bestimmung der Peakflächen) und mit MS Excel die lineare Regression bestimmt. Für einige Peptide war bei einer Konzentration > 200 fmol/15 μ L 0,1% TFA eine Sättigung des Systems (nano-LC und MS-Gerät) zu erkennen bzw. bei einer Konzentration < 10 fmol/15 μ L 0,1% TFA nur unzureichende Signalintensitäten festzustellen. Aus diesem Grund wurde für die Analytik des SMN-Komplexes nur mit Konzentrationen zwischen 10 bis 200 fmol AQUA-Peptid pro Injektion gearbeitet. Für die quantitative Analyse der nativen Peptide wurden jeweils MRM-Läufe von 3 bis 4 Injektionen mit unterschiedlichen Konzentrationen an zugespikten AQUA-Peptiden akquiriert und ausgewertet.

3.3.3.2 TSQ Vantage

Das TSQ Vantage besitzt eine höhere Auflösung als das 4000 Q TRAP. Eine hohe Auflösung geht allerdings häufig auf Kosten der Signalintensität. Aus diesem Grund wurde nur der erste Quadrupol des TSQ Vantage auf eine Peakhalbwertsbreite von 0,2 m/z gesetzt, während der dritte Quadrupol eine Einstellung von 0,7 m/z besaß. Die Scanzeit pro Übergang wurde auf 10 ms eingestellt. Im Vergleich zu den 4000 Q TRAP Messungen waren die Spektren wesentlich rauschärmer und die Sensitivität um eine Größenordnung höher [siehe 4].

Die Festlegung von MRM-Übergängen am TSQ Vantage erfolgte durch Direkteinspritzung der synthetischen AQUA-Peptide, da mittels diesen Geräts keine MS/MS-Spektren zur Auswertung erzeugt und ausgewertet werden konnten. Zur Ermittlung von optimalen MRM-Übergängen wurde zunächst eine maximale CE sowie das entsprechende m/z des Vorläuferions festgelegt. Ein Algorithmus erhöhte nun in definierten Schritten die CE bis zum festgelegten Maximum und ermittelte die m/z-Werte aller erhaltenen Fragmentionen. Im direkten Anschluss wurden die intensivsten Fragmentionen automatisch ausgewählt (die Anzahl war abhängig von der Einstellung durch den Benutzer) und die einzelnen Übergänge hinsichtlich CE optimiert. Als Ergebnis erhielt man eine Aufstellung mit allen ermittelten Werten, die wiederum dazu dienten entsprechende Methoden für die nachfolgende Analytik zu programmieren.

3.3.4 Datenbanksuche

Für die Spektreninterpretation der MS/MS-Analysen wurde der Rohdatensatz zunächst in das sogenannte *Mascot Generic File* (mgf)-Datenformat umgewandelt. Für die Umwandlung der 4000 Q TRAP-Daten wurde ein Plugin der Software Analyst 1.4 [Ab Sciex] verwendet (mascot.dll plug-in 1.6b5). Ionen mit Ladungen $> +5$ wurden entfernt, ebenso Spektren mit 0,1% der Maximalintensität oder weniger als fünf Signalen. Die Signale wurden zentroidiert und deisotopisiert. Die mgf-Generierung der LTQ *Orbitrap* XL-, LTQ *Orbitrap* Velos- sowie der LTQ XL-Daten erfolgte mittels des Xcalibur [Thermo Fisher] Plugins *extract_msn*. Analog der Parameter des Analyst 1.4 Plugins wurden auch hier nur Spektren mit mehr als fünf Signalen ausgewählt. Statt einer Minimalintensität wurde hier ein Minimum Signal/Rausch-Verhältnis von 3 angegeben.

Die generierten mgf-Dateien konnten im Anschluss mit Hilfe des Suchalgorithmus MASCOTTM (MASCOT Deamon 2.2.2) gegen eine Datenbank gesucht werden. Im Allgemeinen wurde hier

die SwissProt-Datenbank (Nov.2009: 512994 Einträge) verwendet. Als Taxonomie wurde generell, mit Ausnahme der MS/MS-Analyse der rekombinanten SMN-Komplexe, *Homo Sapiens* ausgewählt. Die Zahl der überlesenen Schnittstellen lag bei eins. Methioninoxidation wurde als „variable“ und Cysteincarbamidomethylierung als „fixe“ Modifikation selektiert. Es wurden nur zwei- und dreifach geladenen Ionen betrachtet. Der Fehler für m/z der Peptidvorläufer- und der Fragmentationen war abhängig von der Wahl des Massenanalysators. Die 4000 Q TRAP-Daten wurden mit je (Mutter- und Fragmentationen) einem Fenster von 0,4 Da gesucht. Im Gegensatz dazu wurden Daten der Orbitrap-Geräte mit einer Massenabweichung von 10 ppm bezogen auf die Peptidvorläufer analysiert. Für die Auswertung der MS/MS-Daten von LTQ XL, LTQ Orbitrap XL und LTQ Orbitrap Velos ein Fenster von 0,5 Da gewählt.

3.3.5 Datenauswertung

3.3.5.1 MS/MS

Für die MS/MS-Identifizierungen wurden nur Peptide oberhalb eines bestimmten MASCOT Schwellenwertes S_P *Threshold Score* betrachtet. Dieser Wert bedeutet, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 5% eine falsch-positive Identifikation erhalten werden kann. Aufgrund des logarithmischen Zusammenhangs $-10 \times \text{LOG}_{10}(P)$ (P = Wahrscheinlichkeit für eine falsch-positive Identifizierung) tendiert die Wahrscheinlichkeit mit steigendem MASCOT *Score* weiter gegen Null ($S_P + 10$ entspricht nur noch einer Wahrscheinlichkeit von 0,5%).

Der Wert S_P ist abhängig von den ausgewählten Parametern im Zuge der Datenbanksuche. Der Wert steigt mit der Datenbankgröße, als auch mit der Anzahl der zu berücksichtigten, variablen Modifikationen sowie mit sinkender Messgenauigkeit.

Für die Orbitrap-Daten lag dieser Wert meistens bei ca. 25, die Q TRAP Daten hingegen zeigten einen Schwellenwert von 45. Die Auswertung der LTQ-Daten bezog sich auf einen *Score* von ca. 35.

Für die Proteinidentifizierung wurden nur solche Treffer berücksichtigt, die durch mindestens zwei unterschiedliche Peptide mit dem genannten *Score* verifiziert werden konnten. Peptidspektren von Proteinen mit weniger als fünf verschiedenen Peptididentifikationen wurden manuell validiert. Dazu wurde die Qualität der Spektren hinsichtlich Identifizierung aller hohen m/z-Signale des Spektrums, sowie möglichst vollständiger y- und b-Ionenserien mit entsprechenden Intensitäten (Signal-Rausch-Verhältnis) eingeschätzt.

3.3.5.2 MRM

Die Auswertung der MRM-Daten erfolgte mittels der Softwares Multiquant 1.2 [Ab Sciex] und Pinpoint 1.0 [Thermo Fisher]. Dazu wurden Rohdaten geladen und die zugeordneten Peakflächen hinsichtlich Retentionszeit manuell validiert. Die Flächen der einzelnen Übergänge wurden aufsummiert und die Listen in MS Excel 2007 exportiert. Für die Quantifizierung wurden die Werte der leichten Peptide relativ mit denen der AQUA-Peptide verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkern-Cytoplasma-Fraktionierung mittels eines modifizierten Roeder-Protokolls

Da der SMN-Komplex laut verschiedener Publikationen sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma lokalisiert ist und seine verschiedenen Komponenten dabei unterschiedliche Lokalisationsmuster aufweisen, d.h. abweichende Stöchiometrien für Zellkern und Cytoplasma festzustellen sind, ist es essentiell, vor der Anreicherung des Komplexes die nukleäre und die cytoplasmatische Fraktion zu trennen. Damit kann eine Differenzierung der womöglich unterschiedlich konstituierten SMN-Komplexe gewährleistet werden.

Die Fraktionierung erfolgte nach einem modifizierten Roeder-Protokoll von Dignam *et al.* [167]. Dieses beruht auf der mechanischen Lyse der Zellen mit Hilfe eines sogenannten *Douncers* [engl. Glaspistill]. Scherkräfte, die beim Homogenisieren entstehen, zerstören sowohl Zellen als auch Zellkerne [siehe Abb. 4.1]. Im ersten Schritt werden zunächst nur die Zellwände aufgebrochen. Die Zellen liegen während dieser Behandlung in einem hypotonen Niedrigsalzpuffer vor, der aufgrund von Osmose diese zum Quellen bringt. Nach anschließender Zentrifugation und Pelletierung der zurückbleibenden intakten Zellen und Zellkerne werden diese in einem hypertonen Hochsalzpuffer resuspendiert. Während dieser Hochsalzextraktion werden alle löslichen Komponenten osmotisch aus den Zellkernen freigesetzt. Der Aufschluss wird durch eine weitere mechanische Behandlung mit dem *Douncer* unterstützt, verbleibende Zelltrümmer werden durch erneute Zentrifugation entfernt.

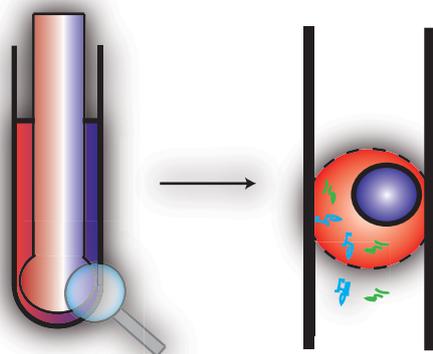


Abb. 4.1: Unter Verwendung eines *Douncers* werden die Zellen/Zellkerne aufgrund mechanischer Scherkräfte lysiert und die Proteine freigesetzt [167].

Zunächst wurde das Protokoll hinsichtlich Reinheit der einzelnen Fraktionen mittels Western Blot getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine ausschließlich mechanische Lyse der

HeLa-Zellen nicht den erwünschten Erfolg zeigt, da bereits beim Aufbrechen der Zellwände ein signifikanter Anteil an Zellkernen zerstört wird und sich die Fraktionen dementsprechend durchmischen. Deshalb wurden verschiedene Detergentien für die chemisch-physikalische Lyse der Zellen getestet. Als idealer Lysepuffer bewährte sich dabei der Zusatz von 0,3% Nonylphenoxypolyethoxyethanol [NP40] bewährt [siehe Abb. 4.2] [168]. Nach Optimierung des Protokolls wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten jeweils sechs Liter HeLa-Zellen geerntet. Die Suspensionen wurden zentrifugiert und die Zellen mit 1xPBS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in Anlehnung an das modifizierte Roeder-Protokoll aufgearbeitet. Die Zugabe von NP40 bewirkt eine sanfte Lyse der Zellen, in dem das nicht-ionische lipophile Detergenz die Zellwände durch Bildung von Mischmizellen solubilisiert. Dazu wurde die Zellsuspension eine halbe Stunde bei 4°C langsam gerührt. Das Fortschreiten der Zellyse wurde mit dem Mikroskop überprüft. Aufgrund der sanften chemisch-physikalischen Lyse blieben stets auch intakte Zellen zurück. Um diese zusammen mit den Zellkernen von der cytoplasmatischen Fraktion abzutrennen, wurde die Suspension zentrifugiert. Anschließend mussten nun die im Pellet verbleibenden intakten Zellen von den Zellkernen getrennt werden. Dazu wurde das Zell/Zellkern-Material nochmals in hypotonen Lysepuffer resuspendiert und erneut homogenisiert (*Douncer*), sowie in einem weiteren Zentrifugationsschritt die intakten Zellkerne abgetrennt. Diese wurden im einem hypertonen Puffer resuspendiert und nach einer Inkubationsphase mit dem *Douncer* behandelt. Um den resultierenden nukleoplasmatischen bzw. cytoplasmatischen Überstand von restlichen Zelltrümmern und Lipiden zu befreien, wurden beide Fraktionen nach Zugabe von n-Heptan ultrazentrifugiert. Die hydrophoben Lipide (z.B. Fettsäuren) lösten sich dabei in der organischen Phase, während sich die membranbildenden Lipide (z.B. Phospholipide oder Sphingolipide) in der Interphase zwischen organischer und wässriger Phase absetzten. Letztere wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in einen Dialyseschlauch umgefüllt. Die Entfernung störender Lysepufferkomponenten erfolgte durch Dialyse über Nacht gegen einen physiologischen 1xPBS-Puffer (pH 7,4) [siehe Kap. 3.1.1].

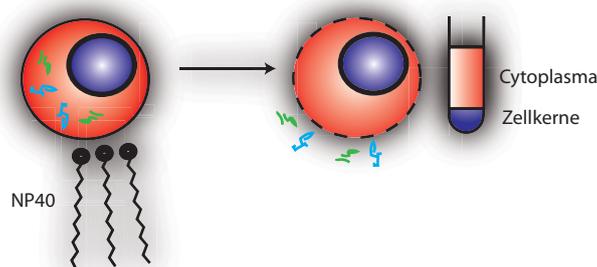


Abb. 4.2: Unter Verwendung von autophilen Detergentien wie NP40 werden die Zellen lysiert, während die Zellkerne stabil bleiben [168].

Die so erhaltenen Fraktionen wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht und die Proteinkonzentrationen durch Bradford-Bestimmung ermittelt. Es wurden jeweils Antikörper eines nukleären Markes [PRP31, Uniprot Accession Nummer Q8WWY3] und ein Antikörper gegen ein cytoplasmatisches Protein [pICln, siehe Kap.1.2.10] verwendet.

Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen ist, konnte unter Anwendung dieser Methoden eine akkurate

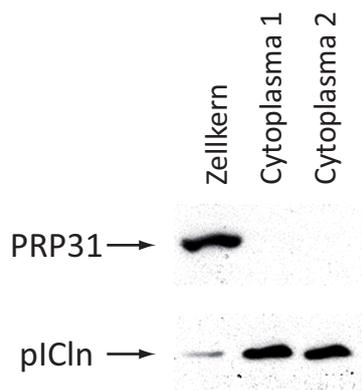


Abb. 4.3: Western-Blot-Analyse der Zellkern- und Cytoplasmafraktionen mittels Antikörper gegen einen cytoplasmatischen (pICln) und einen Kernmarker (PRP31) [Original siehe Abb. 7.1 in Kap. 7].

Zellkern-Cytoplasma-Trennung erreicht werden.

4.2 Anreicherung des SMN-Komplexes durch Co-Immunopräzipitation

Eine Anreicherung des SMN-Komplexes erfolgte anhand von Co-Immunopräzipitation. Dazu wurde eine Protein-G-Sepharose-Matrix verwendet, die nach Äquilibrierung in 1xPBS mit 0,01% NP40 mit dem 7B10-Antikörper gegen SMN inkubiert wurde. Durch Zugabe von Dimethylheptan-1,7-diimidatdihydrochlorid [DMP] erfolgte eine kovalente Kopplung des Antikörpers an die Matrix. Dieser Schritt ist aufgrund der stabilen Bindung der Antikörper (F_c -Teil) an die Matrix nicht zwingend erforderlich, er verhindert im weiteren Verlauf jedoch eine zu hohe Konzentration störender IgG-Peptide und erleichtert so nach Elution und tryptischem Verdau des Proteinkomplexes die LC-MS-Analyse. Im Anschluß an ein abermaliges Waschen mit 1xPBS + 0,01% NP40 folgte die Inkubation der Matrix mit den zuvor aus HeLa-Zellen gewonnenen Zellkern- und Cytoplasmafraktionen. Abschließend wurde erneut intensiv mit 1xPBS gewaschen. Auf NP40, welches ähnlich wie das Detergenz Triton, enorm mit den folgenden LC-MS-Analysen interferiert, indem es zum einen das Säulenmaterial belegt und desweiteren durch intensive Signale zu einer Überlagerung des LC-MS-Chromatogramms führt, wurde in diesem Fall verzichtet. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Western-Blot-Analyse [siehe Abb. 4.4] gegen SMN getestet und mit Hilfe von 1D-PAGE analysiert. Da im Laufe der qualitativen LC-MS/MS-Analyse ein sehr hoher Hintergrund unspezifischer Proteine und geringe Signalstärken der eigentlichen SMN-Komplex-Peptide identifiziert wurde, mussten weitere Waschschrte mit höheren NaCl-Konzentrationen (280 mM) angeschlossen werden, um diese unspezifischen Interaktionen zu verringern. Im Vergleich zum Hintergrund wären die Konzentrationen der gesuchten Peptide sehr niedrig ausgefallen und hätten so nicht akkurat quantifiziert werden können, da aufgrund einer Überladung des Säulenmaterials nur eine begrenzte Menge Probenmaterial eingesetzt werden konnte. Die Verwendung höherer Salzkonzentrationen hingegen half, den Hintergrund unspezifischer Interaktionen zu verringern, wobei die Komplexkomponenten weiterhin stabil vorlagen

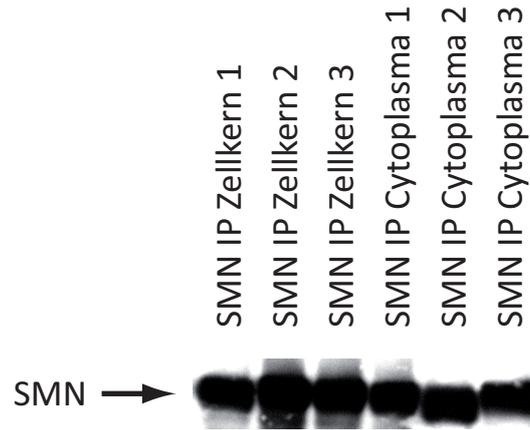


Abb. 4.4: Western-Blot-Analyse (anti-SMN Antikörper 7B10) der durch Co-Immunopräzipitationen angereicherten SMN-Komplexe aus den Zellkern- und Cytoplasmafraktionen [Original siehe Abb. 7.2 in Kapitel 7].

und nicht mit abgereichert wurden [siehe Abb. 4.6]. Aus Publikationen ist bekannt, dass fast alle Komponenten des SMN-Komplex bei NaCl-Konzentrationen von bis zu 500 mM stabil assoziiert vorliegen [2]. Ausnahmen sind die Sm-Proteine SmB/B' und D3 sowie das Protein Gemin5, die bei 500 mM (SmB/B', SmD3) bzw. 1,5 M (Gemin5) NaCl fast vollständig dissoziieren.

4.3 Expression und Reinigung des *in vitro* gebildeten rekombinanten SMN-Komplexes

Die Expression und Reinigung des rekombinanten SMN-Komplexes erfolgte in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Utz Fischer [Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg]. Es wurde ein *E. coli*-Stamm verwendet, der bereits das kodierende Plasmid für das Gemin6-Gemin7-Heterodimer enthielt (B121*(DE3) {pLysS}, pRARE, His₆-Gemin6-Gemin7 in pEt21a). Dieser *E. coli*-Stamm wurde durch Hitzeschock mit einem Plasmid (GST-TEV-SMN(WT)_Gemin8_Gemin2 in pET28b), welches für die Proteine SMN, Gemin2 und Gemin8 kodiert, transformiert. Das enthaltene SMN-Konstrukt exprimiert ein Fusionsprotein aus *Full length*-SMN und

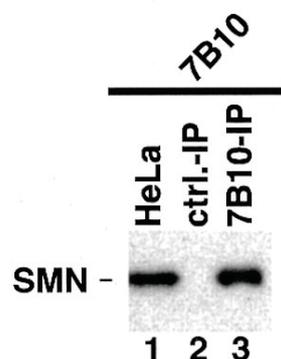


Abb. 4.5: Western Blot 7B10-IP [Abb. nach Meister *et al.* [1]]: Meister *et al.* zeigten eindeutig die Spezifität des Antikörpers 7B10 gegen SMN. 1 WB gegen Komplet-HeLa-Lysat 2 Kontroll-IP ohne 7B10 3 7B10-IP.

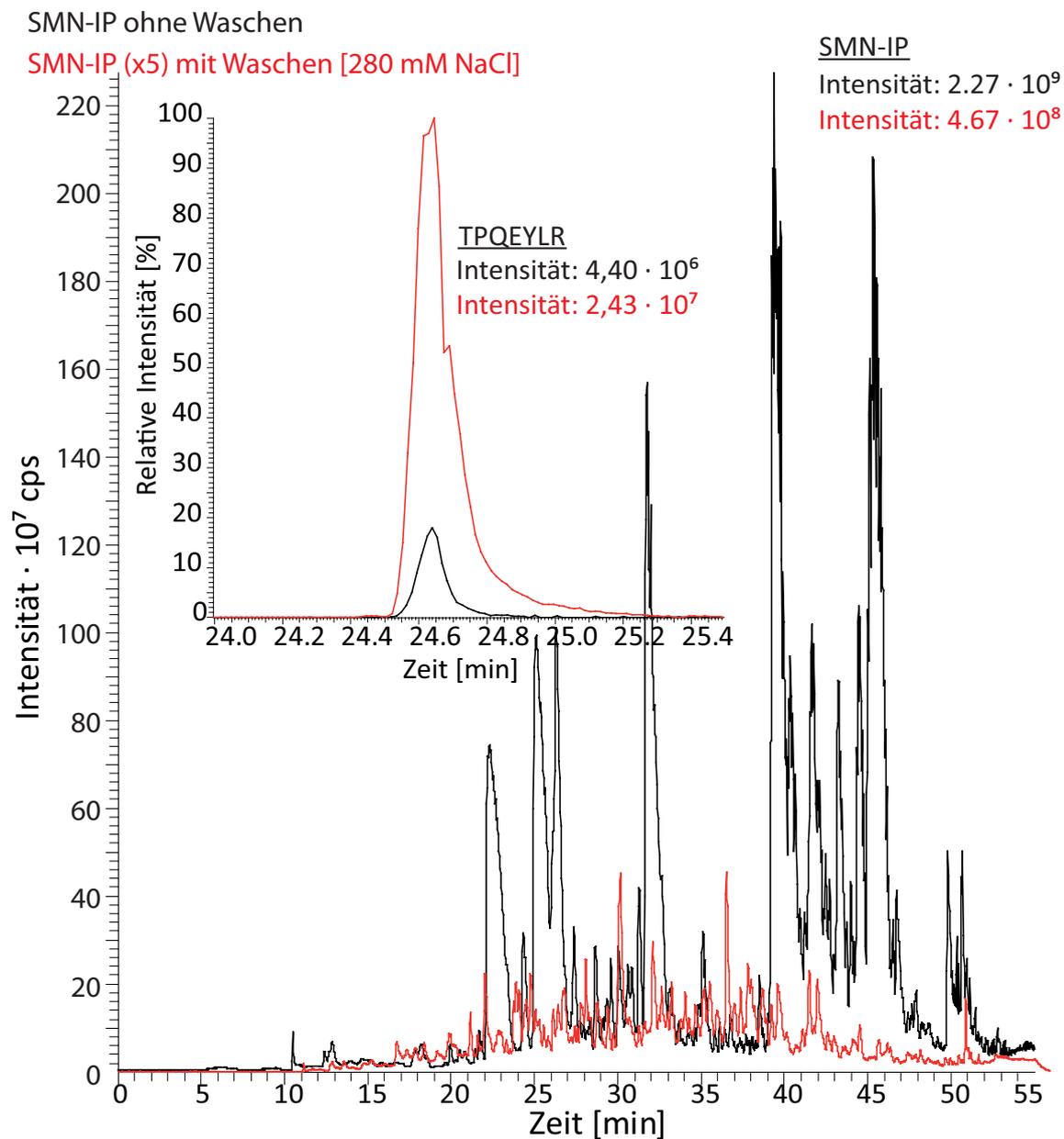


Abb. 4.6: LC-MS-Analyse der SMN-IP vor und nach Waschen: Der Hintergrund unspezifischer Interaktionen ist vor dem Waschen (schwarz) mit erhöhter NaCl-Konzentration wesentlich höher. Nach dem Waschen (rot) ist der Hintergrund signifikant verringert trotz Einsatz von bis zu fünffacher Menge an Probenmaterial und damit höheren SMN-Komplex-Peptid-Konzentrationen (siehe Beispiel TPQEYLR).

Glutathion-S-Transferase, zusätzlich beinhaltet das Proteinprodukt eine TEV-Protease-Erkennungssequenz. Nach Anzucht auf Agarselektionsplatten wurden Plasmid-positive Kolonien ausgewählt, in einem Superbroth-Medium angeimpft und die Expression durch Zugabe von IPTG über Nacht induziert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde das Zellysate mit einer Glutathion-Sepharose-Matrix inkubiert und der so angereicherte pentamere SMN-Komplex anschließend durch Zugabe von TEV-Protease wieder von dieser eluiert [siehe Abb. 4.7]. Die TEV-Protease ist eine aus dem *Tobacco Etch Virus* gewonnene Cystein-Protease, die mit sehr hoher Spezifität und hoher Umsetzungsrate an der Sequenz ENLYFQG zwischen den Aminosäuren Q und G schneidet.

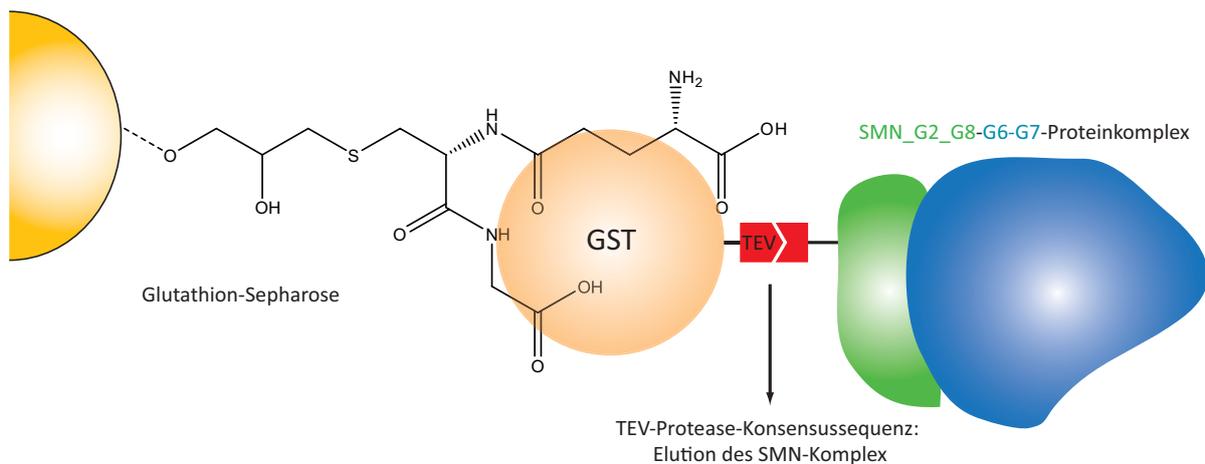


Abb. 4.7: Prinzip des GST-Pull Downs: GST-SMN bindet an die Glutathion-Matrix. Der SMN-Komplex kann dann durch Zugabe von TEV-Protease nativ eluiert werden.

Neben einem Wildtyp-Komplex (WT) wurden auch zwei SMN-Komplexe mit bekannten Punktmutationen im Zusammenhang mit spinaler Muskelatrophie (E134K [Tudordomäne] und Y272C [keine bekannte Domäne, möglicherweise Zusammenhang mit Gemin3]) exprimiert und gereinigt. Im Anschluss erfolgte, zur Entfernung von Proteinverunreinigungen aus den *E. coli*-Zellen sowie der verwendeten TEV-Protease, zunächst ein weiterer Reinigungsschritt mittels Saccharosegradientenzentrifugation (15-45%). Im Laufe der Analysen erwies sich jedoch, dass Saccharose inhibierend auf den tryptischen Verdau wirkt. Da für die qualitative Analyse hauptsächlich zielgerichtete Methoden wie S/MRM verwendet wurden, die unspezifischen Hintergrund ausblenden, wurde somit auf diesen Schritt verzichtet. Die Konzentration der gesuchten Peptide war dennoch ausreichend, um eine akkurate Quantifizierung zu erzielen.

Die gewonnenen Komplexe wurden mittels 1D-PAGE und anschließender MS/MS-Identifikation untersucht. Bereits durch 1D-PAGE-Analyse ließ sich dabei aufzeigen, dass Gemin6 und Gemin7 in der Y272C-Mutante unterrepräsentiert sind. Da Gemin8 ein ähnliches Molekulargewicht wie Gemin2 aufweist und damit während der 1D-PAGE-Analyse mit diesem co-migriert, konnten keine eindeutigen Unterschiede der beiden Proteine für die drei verschiedenen Komplexe festgestellt werden. Die SMN-Abundanz ist für alle rekombinanten Komplexe analog [siehe Abb. 4.8].

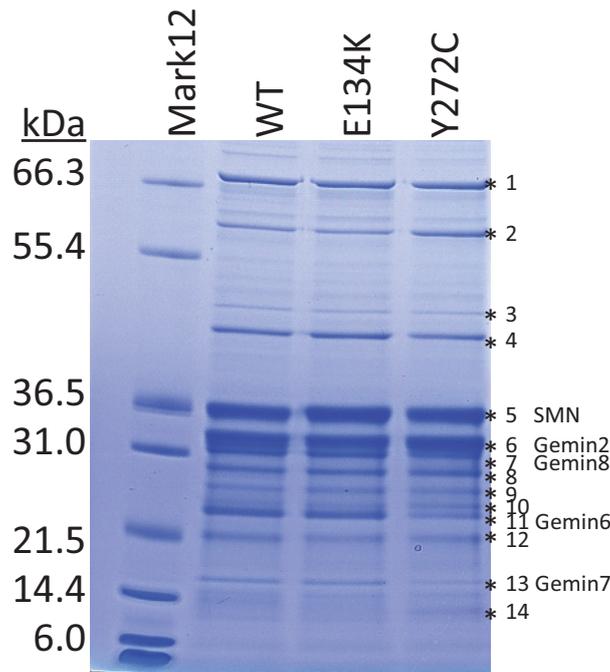


Abb. 4.8: 1D-PAGE-Analyse der rekombinanten Komplexe (WT, E134K, Y272C). Die markierten Proteinbanden wurden am 4000 Q TRAP analysiert [siehe Tabelle 7.2 in Kap. 7]

4.4 Massenspektrometrische qualitative Analyse der angereicherten SMN-Komplexe

4.4.1 LC-MS/MS-Analyse des endogenen SMN-Komplexes mit der LTQ XL

Für die massenspektrometrische Analyse der nativen Komplexe aus Zellkern und Cytoplasma wurden zunächst alle Replikate mit 1D-PAGE aufgetrennt und gemäß Winkler *et al.* silbergefärbt [169]. Alle erkennbaren Proteinbanden wurden ausgeschnitten, gewaschen und tryptisch verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden aus den Gelbanden extrahiert, auf einem U3000-nanoHPLC-System separiert und *online* mit einem LTQ XL Massenanalysator identifiziert [siehe Tab. 7.1]. Die erhaltenen Fragmentationsspektren wurden mittels des MASCOTTM-Algorithmus gegen eine humane SwissProt-Datenbank (Version 57.10 von 04.11.2009 mit 512205 Einträgen) gesucht.

Die LC-MS/MS-Analyse beider Komplexe konnte die Aussage der Western-Blot-Analyse bzgl. der Zellkern-Cytoplasma-Fraktionierung bestätigen und der Hauptteil an unspezifischen Interaktionspartnern der jeweiligen Zellfraktion zugeordnet werden [siehe Tab. 7.1 in Kap. 7]. Insgesamt wurden in der Zellkernfraktion 97 Proteine identifiziert, 26 hiervon waren rein nukleären Ursprungs (laut Uniprot-Klassifikation), 47 Proteine waren sowohl dem Cytoplasma, als auch dem Zellkern zugeordnet, und lediglich 17 weitere Proteine wurden aus anderen Subkompartimenten wie Cytoskelett, Mitochondrien oder Endoplasmatischen Retikulum (ER) angereichert. Die Anzahl cytoplasmatischer Proteine belief sich auf 7.

Ein ähnliches Ergebnis konnte für die cytoplasmatische Fraktion (99 Proteine) erzielt werden. 20 Proteine waren laut der Datenbanksuche rein cytoplasmatische Proteine, 49 Proteine waren

sowohl dem Zellkern, als auch dem Cytoplasma zugeordnet. 26 Proteine resultieren aus anderen Subkompartimenten (Cytoskelett, Mitochondrien oder ER). Lediglich 4 Proteine waren hier rein nukleär.

Ein Vergleich beider Kompartimente (Zellkern und Cytoplasma) zeigte eine Übereinstimmung von insgesamt 60 verschiedenen Proteinen [siehe Abb. 4.10]. Unter diesen Proteinen konnten alle Bestandteile des SMN-Komplexes wiedergefunden werden, als auch Proteine, die im direkten Zusammenhang mit der Funktion des SMN-Komplexes stehen (z.B. U1 snRNP 70 kDa, snRNA Exporterprotein, LSm11, U1 snRNP A, NCBP1). Außerdem wurde unspezifische Interaktoren identifiziert, die häufig in Zusammenhang mit Co-IPs angereichert werden (durch die Sepharosematrix oder IgG-Interaktionen) wie z.B. Tubuline, Actin und Chaperone. Desweiteren wurden Proteine gefunden, die ebenfalls mit Domänen ähnlich derer des SMN-Komplexes wechselwirken (z.B. DDB1 wird im Zusammenhang mit *WD-repeat*-Proteinen genannt, besitzt selbst aber keine *WD-repeats*).

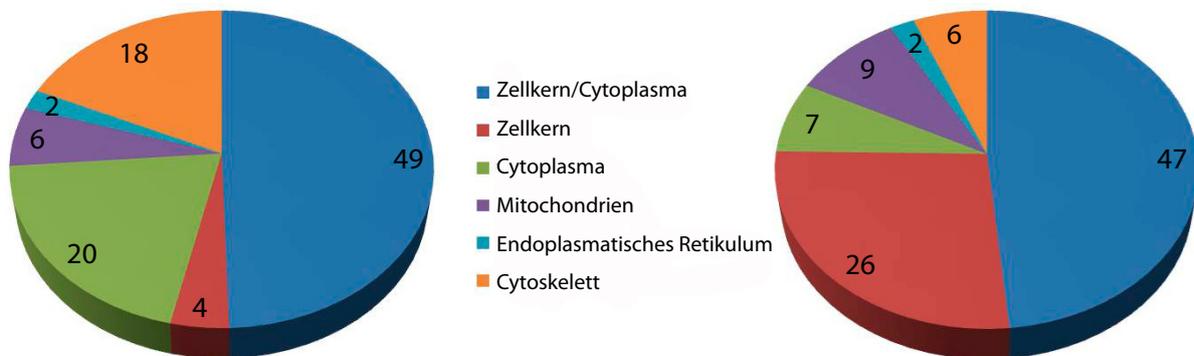


Abb. 4.9: Lokalisation der identifizierten Proteine von cytoplasmatischer (links) und nukleärer Fraktion (rechts). Eine Auflistung der Proteine ist in Tab. 7.1 in Kap. 7 zu finden.

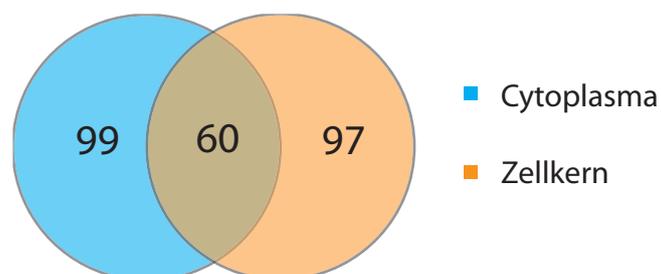


Abb. 4.10: Anzahl der identifizierten Proteine in Kern- und/oder Cytoplasmafraktion. Sechzig Proteine beider Fraktionen sind identisch und könnten entsprechend eine direkte oder indirekte Assoziation mit dem SMN-Komplex andeuten.

4.4.2 LC-MS/MS-Analyse der rekombinanten SMN-Komplexe mit der 4000 Q TRAP

Die rekombinant exprimierten und angereicherten Proteinkomplexe wurden ebenfalls mittels LC-MS/MS untersucht. Dazu erfolgte zunächst eine Proteinkonzentrationsbestimmung über einen *BCA-Assay*. Anschließend wurden die Proben mittels 1D-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt [siehe Abb. 4.8]. Die entsprechenden Proteinbanden wurden aus-

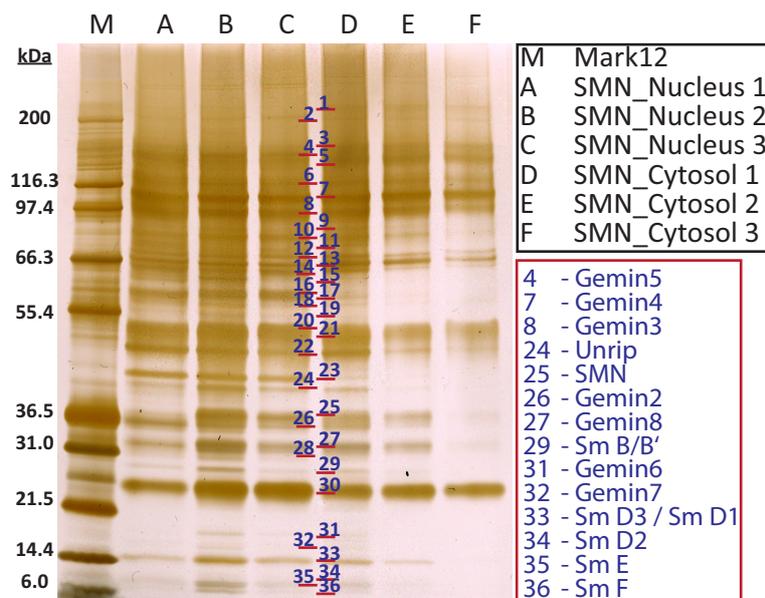


Abb. 4.11: 1D-PAGE der Kern- und Cytoplasmafraktion. Die gekennzeichneten Proteinbanden wurden über LC-MS/MS analysiert.

geschnitten und gewaschen. Es folgten Reduktion und Alkylierung der Cysteinbrücken, sowie tryptischer Verdau über Nacht. Die entstandenen Peptide wurden am Folgetag extrahiert, die Peptidlösung mittels eines U3000-nanoHPLC-Systems separiert und über *online*-Kopplung mit einem 4000 Q TRAP Massenspektrometer analysiert. Die Auswertung der erhaltenen MS/MS-Spektren erfolgte unter Zuhilfenahme des MASCOT™-Suchalgorithmus ohne Eingrenzung der Taxonomie gegen die SwissProt-Datenbank [siehe Tab. 7.2].

Alle fünf Bestandteile des SMN-*Core*-Komplexes konnten identifiziert werden. Die Analyse resultierte außerdem in der Identifikation verschiedener *E.coli*-Proteine, die überwiegend am Translationsapparat beteiligt sind. Außerdem konnte noch ein Fragment der TEV-Protease identifiziert werden, welche zur Spaltung des angereicherten Komplex von der GST-Sepharosematrix diente.

4.5 Optimierung der Probenvorbereitung für die quantitative Analyse

4.5.1 Elution von der Präzipitationsmatrix

Für die Optimierung der Elution der angereicherten nativen Proteine von der Antikörpergekoppelten Matrix wurden verschiedene Protokolle getestet [siehe Abb.4.12]. Die verwendeten Elutionspuffer sollten dabei hinsichtlich ihrer Effizienz ähnliche Ausbeuten wie die klassische Elution mit SDS aufweisen, außerdem im Gegensatz zum ionischen Detergenz SDS kompatibel mit den anschließenden LC-MS-Analysen sein. SDS hat zudem den Nachteil, dass eine zu hohe Konzentration durch Denaturierung des Verdauenzym inhibierend auf den tryptischen Verdau wirkt (sehr geringe Konzentration von SDS bis 0,1% können die Enzymaktivität sogar

heraufsetzen), sowie zu starken Retentionszeitshifts während der HPLC-Auftrennung führen kann.

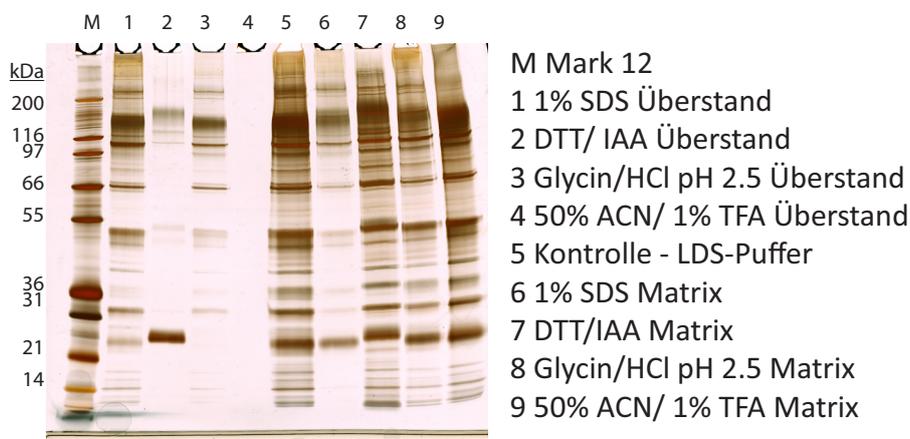


Abb. 4.12: 1D-PAGE-Analyse der getesteten Elutionspuffer. Es wurden sowohl die Überstände nach Elution, sowie die verbleibende Matrix aufgetragen. Als Kontrolle diente eine Probe, die in LDS-Puffer [Invitrogen] aufgeköcht und anschließend inklusive der Matrix auf das Gel aufgetragen wurde.

Es wurde unter anderem ein Glycin/HCl-Puffer verwendet, der durch starke Verringerung des pHs zur Denaturierung der Proteine und damit zu deren Elution führen sollte. Ein anderer Ansatz hatte das Ziel, durch Reduktion mit DTT und anschließender Alkylierung mit IAA sowohl die Cysteinbrücken im angereicherten Proteinkomplex zu zerstören und dadurch eine strukturelle Entfaltung zu bewirken, als auch die Bindung der schweren und leichten Ketten des 7B10-Antikörper untereinander, welche ebenfalls wie in allen Antikörpern über Cysteinbrücken erfolgt, zu lösen. In einem dritten Ansatz wurde ein Puffer mit hohem organischem Anteil sowie hoher Konzentration an Ionenpaarreagenz getestet (50% ACN, 0,1% TFA), der ebenfalls eine Denaturierungs-bedingte Elution herbeiführen sollte.

Es zeigte sich, dass sowohl der Weg über die Reduktion und Alkylierung, als auch die Verwendung von stark organischem Elutionspuffer keine effizienten Methoden darstellen, um den angereicherten Proteinkomplex von der Matrix zu eluieren.

Behandlung mit Glycin/HCl-Puffer führte zwar zur Elution des Proteinkomplexes, allerdings war diese nicht effizient genug, um eine vollständige, quantitative Elution des Komplexes zu bewirken. So zeigte ein Vergleich mit herkömmlicher SDS-Elution (inkl. Entsalzung mittels SPE(*Solid Phase Extraction*)-Kartuschen) per LC-MS/MS-Analyse, dass die betrachteten Proteine/Peptide in der Elution mit Glycin/HCl eine wesentlich niedrigere Abundanz aufwiesen im Vergleich zur SDS-Elution bei gleicher Menge an Probenmaterial [siehe Abb. 4.13].

In einem weiteren Experiment wurde der SMN-Komplex direkt auf der Matrix über Nacht tryptisch verdaut. Nach anschließender 1D-PAGE-Analyse der Matrix wurde festgestellt, dass eine markante Fraktion unverdauter Proteine noch auf der Matrix zu finden war [siehe Abb. 4.14]. Auch eine MRM-Analyse der Trypsin-Elution im Vergleich zur SDS-Elution zeigte, dass die Konzentration der gesuchten Peptide zu niedrig für eine akkurate Quantifizierung war.

Als Konsequenz dieser Analysen wurde daher die herkömmliche Methode der SDS-Elution gewählt, um den Proteinkomplex von der Matrix zu lösen. Zur Vermeidung der bereits genannten

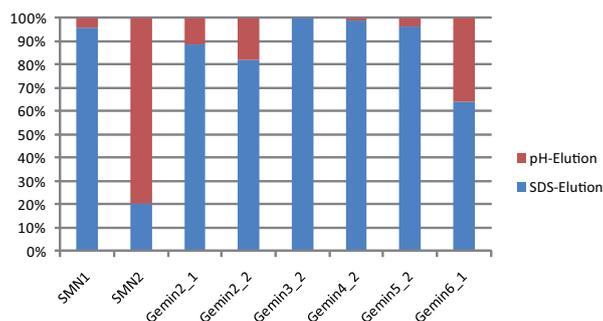


Abb. 4.13: LC-MS/MS-Analyse der Glycin/HCL- und SDS-Elution. Beide Fraktionen wurden mit der *Orbitrap* XL analysiert. Eine Auswahl an betrachteten Peptiden wurde mit dem Qual Browser ausgewertet und die jeweiligen Höhen der Signalintensitäten (keine Peakflächen, da MS/MS-Ansatz) normiert auf Gesamtintensität von 100% dargestellt. Im Vergleich zur SDS-Elution werden durch eine pH-Erniedrigung nur geringe Ausbeuten (Signalintensitäten) der betrachteten Proteine erreicht.

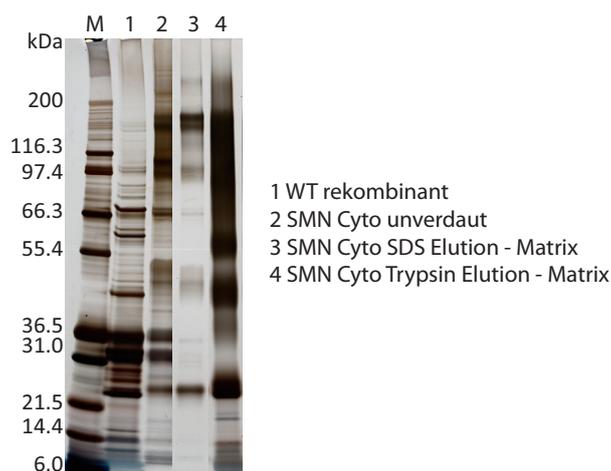


Abb. 4.14: 1D-PAGE Tryptischer Verdau der Komplexe von der Matrix: Die SMN-Komplex-gekoppelte Matrix wurde mit Trypsin versetzt und über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Matrix mittels 1D-PAGE analysiert (4). Zum Vergleich wurde eine analoge Probenmatrix mit dem SDS-Elutionspuffer behandelt. Der Überstand wurde ebenfalls abgenommen und der verbliebene Matrix mit 1D-PAGE analysiert (3). Zum Vergleich wurde der pentamere rekombinante Wildtypkomplex (1), sowie der unverdaute Überstand der SDS-Elution (2) mitaufgetragen. Der tryptische Verdau von der Matrix ist unvollständig.

Nachteile hinsichtlich LC-MS-Kompatibilität sowie Inhibierung des tryptischen Verdaus, wurden Methoden getestet (Proteinfällung, Proteinaufkonzentrierung), um das SDS weitestgehend quantitativ zu entfernen. Zusätzlich wurde die Methodik mit SDS noch verfeinert, um eine vollständige Elution zu gewährleisten. Dazu wurde die Affinitätsmatrix 15 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend der Überstand mit sogenannten *Gelloader*-Spitzen vollständig abgenommen. Für die 1D-PAGE-Analyse wurde die Matrix zuvor nochmals mit 1xPBS gewaschen [siehe Abb. 4.21 in Abschnitt 4.6].

4.5.2 Abreicherung von LC-MS-inkompatiblen Detergentien bei der Probenvorbereitung

Detergentien wie SDS können bei Probenaufarbeitung Probleme verursachen. Unter anderem resultieren sie in einer Inhibierung des tryptischen Verdaus oder verschieben die Retentionszeiten bei der anschließenden nanoHPLC-Auftrennung. Um diese negativen Effekte zu verhindern, müssen die Detergentien im Zuge der Probenaufarbeitung entfernt werden. Dafür gibt es zum einen die Möglichkeit der Proteinfällung, bei der die Proteine einer Probe nach Zugabe von beispielsweise organischen Reagentien präzipitiert werden. Die Detergentien bleiben in Lösung und können nach Zentrifugation mit dem Überstand entfernt werden. Des Weiteren kann ein Pufferaustausch angewendet werden. Zu diesem Zweck werden Probengefäße mit einer Filtereinheit (Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 Membrane, 10 kDa; Fa. MILLIPORE) genutzt. Während der Zentrifugation werden die Proteine auf dem Filter zurückgehalten, die Pufferlösung jedoch entfernt. Nach häufigem Verdünnen mit Detergenz-freiem Puffer kann die Konzentration der unerwünschten Chemikalien soweit verringert werden, dass sie bei der Probenaufarbeitung keine interferierenden Effekte mehr verursachen. Für eine quantitative Analyse ist es jedoch von Bedeutung, dass die Proteine während bzw. nach diesen Arbeitsschritten vollständig resolubilisiert werden können. Häufig beobachtet man jedoch Verluste von kleineren Proteinen (≤ 10 kDa, abhängig von deren Sekundärstruktur können diese den Filter passieren), weshalb eine Optimierung der gängigen Protokolle unter Verwendung von Standardproteinen (BSA, Carbonic Anhydrase, α -Casein, β -Lactoglobulin) durchgeführt wurde.

Für die Fällungen wurde das entsprechende Reagenz zur Proteinlösung gegeben, gemischt und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine halbstündige Zentrifugation bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und das Proteinpellet mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in einem geeigneten Puffer (200 mM Guanidinium-HCl, 50 mM NH_4HCO_3) resolubilisiert. Für die verwendeten Fällungspuffer wurden zunächst verschiedene Reagenz:Probe-Verhältnisse untersucht und mittels 1D-PAGE (hier nicht gezeigt) analysiert. Die Präzipitation mittels TCA zeigte ein Optimum bei einem Verhältnis Reagenz:Probe von 1:5. Fällungen mit ACN wurden mit der fünffachen Menge an ACN im Vergleich zum Probenvolumen durchgeführt.

Bei Verwendung von 72%-Trichloressigsäure (TCA) zeigte sich, dass kleinere Proteine nicht quantitativ präzipitieren. Dieser Nachteil konnte bei Gebrauch von Acetonitril umgangen werden. Auch ließ sich zwar ein Verlust von Proteinen beobachten, dieser war jedoch für alle Proteine, unabhängig ihres Molekulargewichts, relativ konstant (Mittelwert = 77%). Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von Filtereinheiten zwar zu einem geringeren Verlust von Proteinen höheren Molekulargewichts; ähnlich der TCA-Präzipitation wurden kleinere Proteine jedoch nicht quantitativ auf dem Filter zurückgehalten. Diese Methode erwies sich also ebenfalls als nicht praktikabel [siehe Abb.4.15].

4.5.3 Optimierung des tryptischen Verdaus

Eine quantitative Analyse beruht auf der Annahme eines vollständigen und spezifischen proteolytischen Verdaus. Daher ist es von großer Bedeutung, diesen Prozessschritt zu optimieren

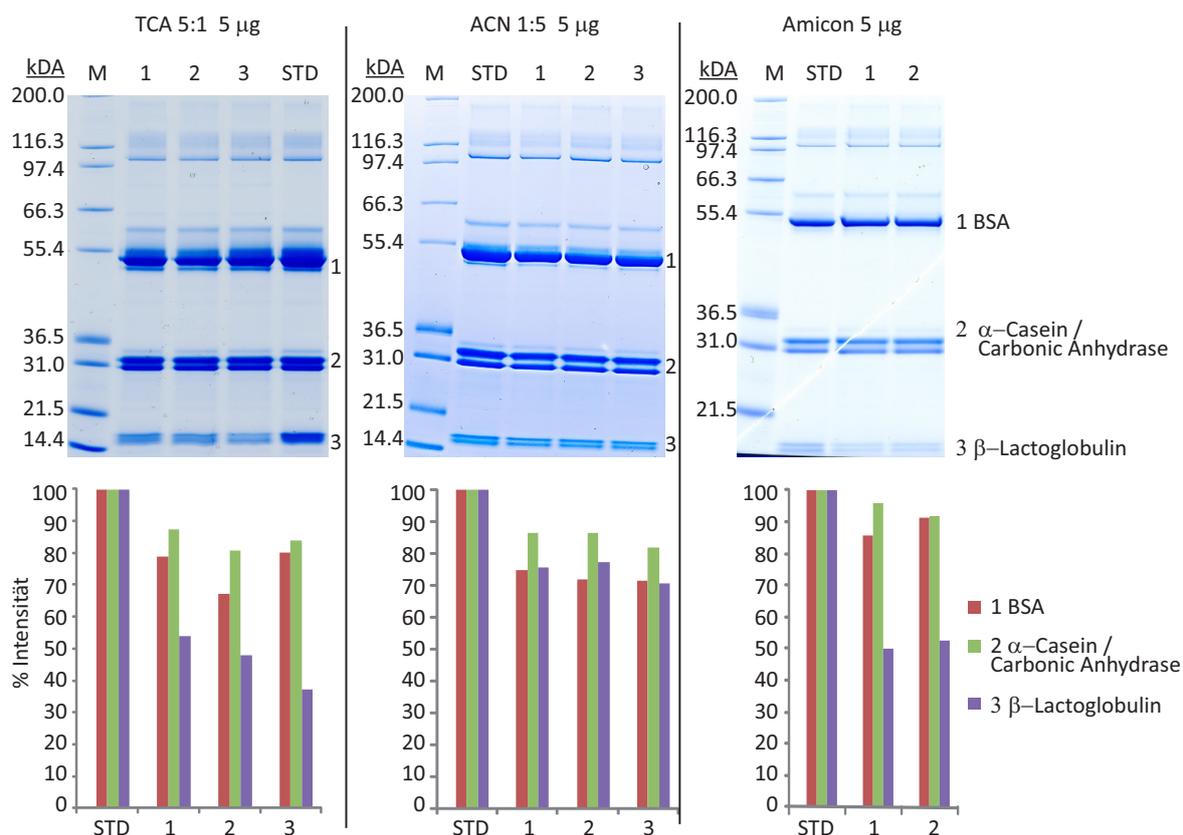


Abb. 4.15: 1D-PAGE-Analyse der Fällungsoptimierung an Standardproteinen: Die Proben wurden stets in der Reihenfolge: Kontrolle und anschließend zwei bis drei Replikate der präzipitierten oder filtrierten Proteine aufgetragen. Für die Färbung wurde kolloidales Coomassie genutzt, da es eine Endpunktfärbung darstellt, die eine Quantifizierung der Proteinbanden mit der Software ImageJ erlaubt. Die Diagramme zeigen die Bandenintensitäten der Replikate im Vergleich zur Kontrolle, auf die normalisiert wurde [ImageJ-Rohdaten siehe Abb.7.3,7.4,7.5 in Kap. 7].

und aufzuzeichnen. Um dies zu realisieren, wurde ein Proteinmix aus fünf bovinen Standardproteinen (BSA, Glutamate Dehydrogenase, Carbonic Anhydrase, β-Casein, β-Lactoglobulin) verwendet.

Tab. 4.1: Zusammensetzung des Standardproteinmix für die Verdauoptimierung.

| Protein | MW [gmol ⁻¹] | Menge _{Proteinmix} [µg] |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| BSA [P02769] | 69,293 | 100 |
| Glutamate Dehydrogenase [P00366] | 61,512 | 100 |
| Carbonic Anhydrase [Q1LZA1] | 28,822 | 100 |
| β-Casein [P02666] | 25,107 | 100 |
| β-Lactoglobulin [P02754] | 19,883 | 100 |

Um die Kompatibilität des Probenpuffers aus der Aufreinigung der rekombinanten Proteine für den tryptischen Verdau zu testen, wurde der Standardproteinmix zunächst mit dem Saccharosepuffer (20%) verdünnt und entsprechend für den Verdau vorbereitet (Carbamidomethylierung). Nach Zugabe von 0,025 µg Trypsin zu 0,5 µg des Proteinmix und einer Inkubation bei 37°C über Nacht konnte allerdings keine enzymatische Aktivität der Protease festgestellt werden.

Derselbe Puffer wurde ohne den Zusatz von Saccharose hergestellt und der Proteinmix ein weiteres Mal tryptisch verdaut. Dazu wurden unterschiedliche Mengen an Trypsin eingesetzt. Die Fraktionen des tryptischen In-Lösung-Verdaus wurden durch eine 1D-PAGE-Auftrennung und anschließender Silberfärbung nach Blum, sowie mittels LC-MS/MS-Analyse untersucht. Am effizientesten und reproduzierbarsten (hinsichtlich LC-MS/MS-Analyse) war der Verdau bei Verwendung eines Trypsin-Protein-Mengenverhältnisses von 1:20 [siehe Abb. 4.16]. Der Zusatz von Acetonitril während des Verdaus konnte zwar einige Peptidintensitäten erhöhen, resultierte aber während der LC-MS/MS-Analyse [siehe Tab.7.3] in einer geringeren Sequenzabdeckung der enthaltenen Proteine im Vergleich zum 1:20-Verdau. Der in wissenschaftlichen Publikationen häufig genannte zweistufige Verdau zeigte keine reproduzierbaren Ergebnisse und ist deshalb ebenfalls nicht für eine anschließende quantitative Analyse geeignet. Das Trypsin:Protein-Verhältnis von 1:50 konnte zwar hinsichtlich Reproduzierbarkeit überzeugen, die Analyse ergab jedoch eine verhältnismäßig hohe Zahl semi-tryptischer und überlesener Schnittstellen im Vergleich zum 1:20-Verdau, der ähnliche Peptid-Scores und Proteinsequenzabdeckungen zeigte.

Des Weiteren wurde ein Trypsinreaktor getestet, bei dem Trypsin kovalent an eine Säulenmatrix gekoppelt vorlag. Es erfolgte ein Verdau bei Raumtemperatur sowie beim Temperaturoptimum der Protease von 37°C. Bei beiden Bedingungen konnte im Anschluss noch unverdautes Protein bei der 1D-PAGE-Kontrolle identifiziert werden. Die LC-MS/MS-Analyse beider Fraktionen erbrachte zudem vergleichsweise wenig Peptididentifikationen [siehe Tab.7.3], so dass auch dieser Ansatz verworfen wurde.

Nach Optimierung mittels des Standardproteinmix wurde der rekombinante Wildtypkomplex analog verdaut (inkl. Carbamidomethylierung) und einer LC-MS/MS-Analyse mit Hilfe der LTQ Orbitrap XL unterzogen. Die Daten wurden mit dem MASCOTTM-Suchalgorithmus gegen die SwissProt-Datenbank verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass viele Peptide semi-tryptische Schnittstellen aufwiesen.

Um eine Abschätzung über den Gehalt dieser Schnittstellen im Vergleich zur korrekten Peptidsequenz zu erhalten, wurden die m/z semi-tryptischer Peptide mit dem Qualbrowser (Thermo Fisher) ausgewertet und mit den tryptischen Peptiden verglichen [siehe Tab. 4.3]. Das Peptid SMN1 zeigte dabei einen sehr intensiven Bruch an der sterisch gehinderten Aminosäure Prolin. Da die Retentionszeit des semi-tryptischen Peptids mit der des tryptischen Peptids exakt übereinstimmt, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser Bruch durch Gasphasenfragmentierung beim Eintritt der Peptide in die Quelle entsteht und nicht bereits in der Probe enthalten war [siehe Abb. 4.17]. Eine Vorhersage mittels des TheorChromo-Algorithmus [170] ergibt für beide Peptide zwar ähnliche, aber doch eindeutig unterschiedliche Retentionszeiten. Auch andere prolinhaltige Peptide zeigten intensive Bruchstücke an der starren Aminosäure Prolin mit identischen Retentionszeiten zur tryptischen Peptidsequenz. Die ungewünschte Gasphasenfragmentierung (engl. *in-source decay*) kann zustande kommen, wenn die Einstellung des Gasdrucks an der Quelle des sogenannten *Curtain*-Gases zu hoch ist bzw. die Peptide sehr labile Bindungen aufweisen (z.B. post-translationale Modifikationen).

Alle ausgewählten Peptide des SMN-Komplexes wurden bzgl. semi-tryptischer Schnittstellen und post-translationaler Modifikationen mit dem MASCOTTM-Suchalgorithmus untersucht (Car-

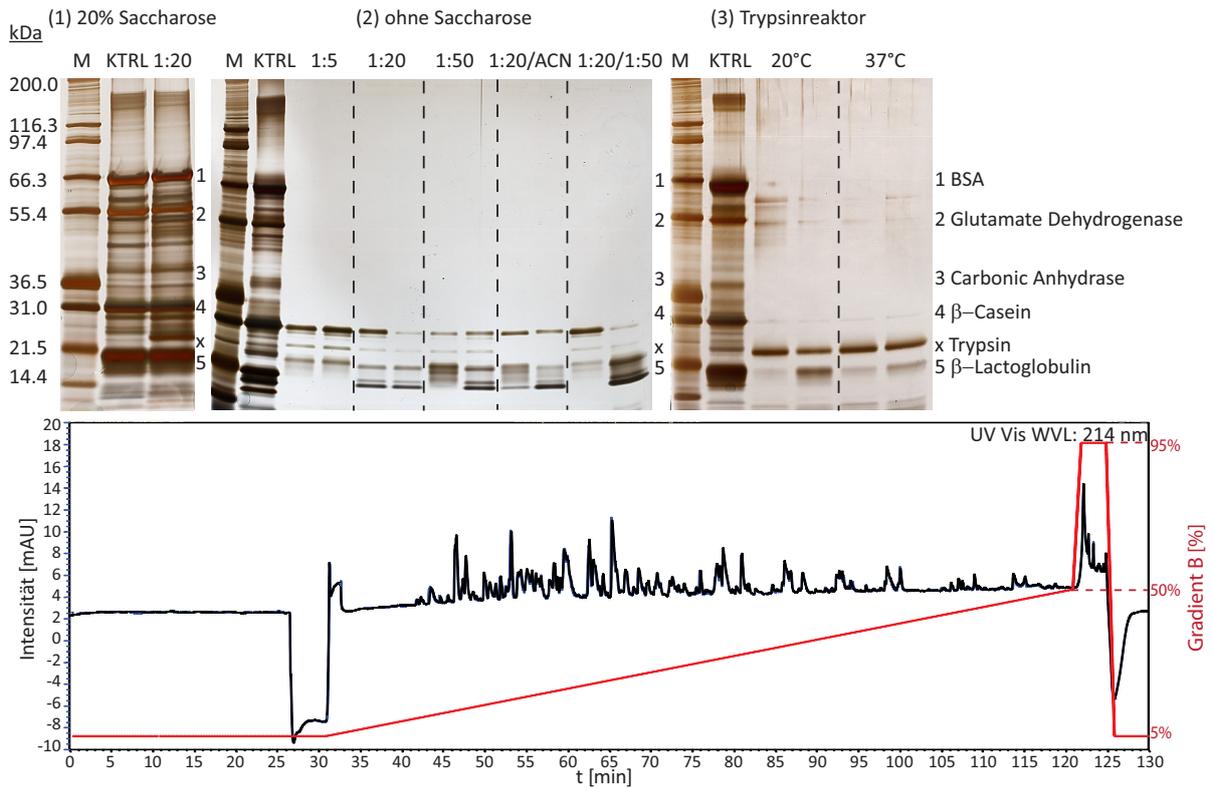


Abb. 4.16: Optimierung des tryptischen Verdaus. Bei Anwesenheit von Saccharose wird das Enzym Trypsin inhibiert und die Proteine bleiben unverdaut (1). Dieselbe Probe ohne Saccharose wurde in unterschiedlichen Trypsin:Protein-Verhältnissen verdaut (2). Das Mengenverhältnis Trypsin:Protein von 1:20 zeigt die höchste Reproduzierbarkeit bei der LC-MS/MS-Analyse (in der 1D-PAGE-Darstellung sind Unterschiede im niedrigmolekularen Bereich zu erkennen). Die Darstellung der HPLC-Auftrennung zeigt zwei aufeinanderfolgende Läufe des 1:20 Verdaus als *Overlay* in Blau und Schwarz. Die rote Linie zeigt den Verlauf des binären Lösungsmittelgradienten mit Bezug auf Lösungsmittel B (0,1% FA, 84% ACN). Die 1D-PAGE-Analyse (3) zeigt die Anwendung eines Trypsinreaktors (Trypsin-gekoppelte Säulenmatrix) bei unterschiedlichen Temperaturen. KTRL: dieselbe Menge einer unverdauten Probe Proteinmix.

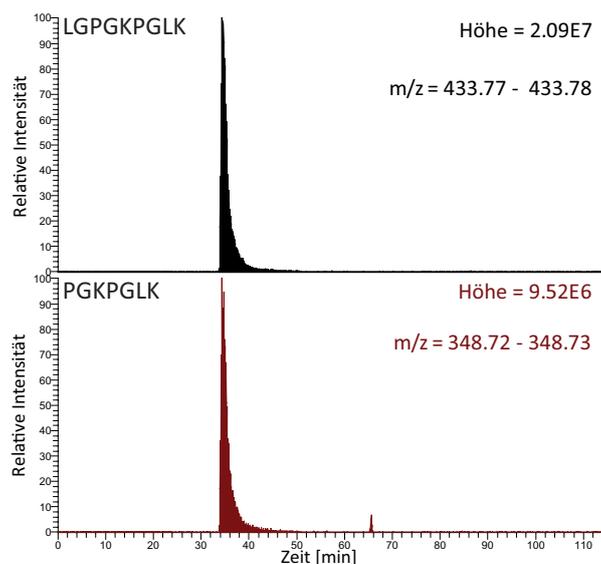


Abb. 4.17: Semi-tryptisches Peptid von SMN1: die analogen Retentionszeiten sprechen für eine Gasphasenfragmentierung während der Ionisierung in der Quelle.

bamidomethylierung als fixe Modifikation) und mit dem Qualbrowser hinsichtlich Signalintensitäten analysiert [siehe Tab. 4.2]. Es wurde auch solche Sequenzen in die Analyse einbezogen, deren *Score* unter dem Signifikanzschwellenwert lagen. Außerdem ist zu beachten, dass eine solche Analyse nur eine qualitative Einschätzung darstellt, da Signalintensitäten verschiedener Peptidsequenzen nicht direkt miteinander verglichen werden können, um korrekte Aussagen hinsichtlich Konzentration der Peptide in der Probe zu erhalten.

Tab. 4.2: Mittels LTQ *Orbitrap* XL identifizierte semi-tryptische oder überlesene Schnittstellen der zur Quantifizierung verwendeten Peptide. Alle enthaltenen Cysteine sind entsprechend der Probenvorbereitung carbamidomethyliert. Es wurde auf die korrekten Sequenzen normiert (fett gedruckt = 100%). Dies kann aber allenfalls als Näherung betrachtet werden, da einige Sequenzen unterhalb des Signifikanzthresholds identifiziert wurden und ein direkter Vergleich unterschiedlicher Peptidsequenzen hinsichtlich Signalintensität nicht möglich ist (unterschiedlicher Ionisierungsgrad / Fragmentierungseigenschaften etc.). Es wurden nur Signalthöhen (keine Peakflächen) betrachtet, da MS/MS-Experiment.

| Peptid | Sequenz | m/z | RT | Signalintensität | % |
|--------------------------------|---|---------|----------|------------------|-------|
| SMN1 | LGPGKPLK | 433,78 | 22,76 | 5,40E+07 | 100% |
| | PGKPLK | 348,72 | 22,74 | 1,30E+07 | 24% |
| | LGPGKPLKF | 507,31 | 32,99 | 3,38E+05 | 1% |
| | LGPGKPLK (Acetylierung / Trimethylierung) | 454,78 | 29,92 | 4,97E+05 | 1% |
| SMN2 | ETCvvvYtgyGNr | 759,36 | 31,38 | 5,18E+05 | 100% |
| | VYtgyGNr | 465,23 | 20,27 | 5,45E+05 | 105% |
| | TgyGNREEQNLS | 684,31 | 20,94 | 1,60E+06 | 309% |
| | TgyGNREEQNLSd | 741,82 | 21,13 | 7,37E+05 | 142% |
| | VYtgyGNREEQNl | 771,86 | 27,79 | 4,72E+04 | 9% |
| | GNREEQNLSdLLSP | 786,39 | 37,60 | 1,49E+05 | 29% |
| | GNREEQNLSdLLSPIC | 922,95 | 41,03 | 9,95E+04 | 19% |
| | TgyGNREEQNLSdLLSP | 946,95 | 38,58 | 1,36E+05 | 26% |
| | GyGNREEQNLSdLLSPi | 952,97 | 42,76 | 8,22E+04 | 16% |
| | TgyGNREEQNLSdLLSPi | 1003,50 | 42,67 | 2,53E+07 | 4884% |
| | GNREEQNLSdLLSPICEV | 1037,00 | 43,59 | 1,03E+06 | 199% |
| | GNREEQNLSdLLSPICEVA | 1072,51 | 43,82 | 1,00E+05 | 19% |
| | YtgyGNREEQNLSdLLSPi | 1085,02 | 43,33 | 4,96E+04 | 10% |
| | GNREEQNLSdLLSPICEVAN | 1129,53 | 44,72 | 2,72E+05 | 53% |
| | VYtgyGNREEQNLSdLLSPi | 1134,56 | 43,87 | 1,57E+05 | 30% |
| | TgyGNREEQNLSdLLSPICEV | 1197,56 | 43,93 | 1,13E+06 | 218% |
| | TgyGNREEQNLSdLLSPICEVA | 822,39 | 44,11 | 1,43E+05 | 28% |
| | TgyGNREEQNLSdLLSPICEVAN | 1290,10 | 42,99 | 1,77E+05 | 34% |
| | VYtgyGNREEQNLSdLLSPICEV | 886,08 | 44,78 | 4,04E+04 | 8% |
| | GNREEQNLSdLLSPICEVANNIEQ | 914,77 | 45,67 | 6,35E+04 | 12% |
| ETCvvvYtgyGNREEQNLSdLLSPi | 952,79 | 45,32 | 1,53E+05 | 30% | |
| GNREEQNLSdLLSPICEVANNIEQNAQ | 1019,15 | 46,66 | 4,47E+04 | 9% | |
| TgyGNREEQNLSdLLSPICEVANNIEQNA | 1083,51 | 47,81 | 2,10E+04 | 4% | |
| TgyGNREEQNLSdLLSPICEVANNIEQNAQ | 1126,19 | 47,01 | 5,40E+04 | 10% | |
| Gemin2_1 | DFTPELGR | 467,73 | 31,72 | 5,22E+07 | 100% |
| | TPELGR | 336,69 | 31,72 | 5,25E+05 | 1% |
| | FTPELGR | 410,22 | 29,23 | 6,56E+05 | 1% |
| | ERDFTPELGR | 610,31 | 28,56 | 1,72E+06 | 3% |
| | GERDFTPELGR | 638,82 | 28,86 | 2,18E+06 | 4% |
| Gemin2_2 | TPQEYLR | 453,74 | 25,51 | 5,21E+07 | 100% |
| | PQEYLR | 403,21 | 25,53 | 2,34E+06 | 4% |

Tab. 4.2: Fortsetzung

| Peptid | Sequenz | m/z | RT | Signalintensität | % |
|----------|-------------------------------|---------|-------|------------------|------|
| Gemin6_1 | VQDLIEGHLTASQ | 705,87 | 32,97 | 1,45E+07 | 100% |
| | VQDLIEGH | 455,73 | 27,41 | 4,86E+07 | 335% |
| | IEGHLTASQ | 478,24 | 27,75 | 1,68E+06 | 12% |
| | VQDLIEGHL | 512,28 | 35,44 | 1,88E+06 | 13% |
| Gemin6_2 | GPLEWQDYIYK | 706,35 | 41,72 | 9,83E+06 | 100% |
| | KGPLEWQDY | 568,28 | 35,31 | 2,62E+07 | 267% |
| | GPLEWQDYIY | 642,3 | 44,62 | 6,80E+05 | 7% |
| | KGPLEWQDYIYK | 770,4 | 37,50 | 2,59E+06 | 26% |
| Gemin7_1 | GPDGFSR | 368,18 | 19,38 | 1,27E+07 | 100% |
| | GPDGFSRG | 396,69 | 19,48 | 4,59E+05 | 4% |
| Gemin8_1 | QYFAETER | 522,24 | 24,99 | 5,18E+06 | 100% |
| Gemin8_2 | LYGDSAAC | 412,71 | 17,91 | 4,65E+06 | 100% |
| | RLYGDSAAC | 490,76 | 16,26 | 2,08E+06 | 45% |
| Gemin3_1 | LFILDEADK | 532,29 | 37,75 | 5,35E+06 | 100% |
| | LFILDEADKL | 588,83 | 44,17 | 1,20E+06 | 22% |
| | LFILDEADKLLLEGSFQ | 984 | 49,09 | 3,78E+04 | 1% |
| | ILDEADKLLLEGSFQ | 853,92 | 38,74 | 8,53E+04 | 2% |
| | ILDEADKLLLEGSFQEQINWIY | 885,44 | 47,18 | 9,06E+04 | 2% |
| | ILDEADKLLLEGSFQEQINWIYSSLPASK | 1108,56 | 48,24 | 8,80E+04 | 2% |
| Gemin3_2 | VLISTDLTSR | 552,82 | 32,87 | 1,33E+07 | 100% |
| Gemin4_1 | TNPSVSSLLQR | 601,32 | 33,13 | 6,71E+06 | 100% |
| | TNPSVSSL | 402,71 | 28,76 | 5,28E+05 | 8% |
| Gemin5_1 | TSVFLVR | 411,25 | 34,51 | 8,77E+05 | 100% |
| Gemin5_2 | ELNEDVSADVEER | 752,84 | 26,40 | 1,97E+06 | 100% |
| Unrip2 | EFLVAGGEDFK | 606,3 | 35,30 | 1,42E+06 | 100% |
| | EFLVAGGEDFKLY | 744,37 | 43,14 | 5,33E+04 | 4% |

4.5.4 Verringerung von Adsorptionseffekten niedrig abundanter Peptide an Oberflächen

Die Analyse von niedrig konzentrierten Peptidlösungen liefert häufig nicht zufriedenstellende Ergebnisse aufgrund von Adsorptionseffekten an den Oberflächen der Reaktionsgefäße und der HPLC, z.B. an den Edelstahlstatoren, die verwendet wurden, da bionterte Titaniumstatoren nicht für die Verwendung bei 60°C, die Temperatur bei der die Auftrennung statt findet, ausgelegt sind. Grund sind die in Titanstatoren verwendeten Tefzel[®] Rotoren, deren thermische Stabilität nur bis 50°C zertifiziert ist. Beim Einsatz von Edelstahlrotoren werden stattdessen PEEK-Rotoren verwendet, die eine höhere thermische Stabilität aufweisen. Der beschriebene Peptidverlust ist abhängig von der Hydrophobizität der entsprechenden Peptidsequenzen. So wiesen einige Peptide keine Adsorption auf, die Signalintensitäten anderer Peptide unterlagen jedoch starken Schwankungen. Solche Effekte können zwar durch den Einsatz von sogenannten *LoBind*-Reaktionsgefäßen (spezielle Polypropylensorte, die eine Anhaftung, Denaturierung von Proteinen/Peptiden unterbindet) reduziert werden, verhindern aber nicht die Anhaftung

der Peptide an Oberflächen (Edelstahlstatoren, PEEK-Kapillare, *Fused Silica*-Kapillare etc.) innerhalb der HPLC.

Um den Verlust durch Adsorption von Peptiden zu verringern, wurde die Zugabe verschiedener hydrophober, natürlich vorkommender Peptide zu den zu analysierenden Proben getestet. Glucagon ist ein Peptidhormon, das für die Regulation des Blutzuckerspiegels eine wichtige Rolle spielt. Die Verwendung von Glucagon in der zu analysierenden Probe, führte zu Verbesserungen hinsichtlich Signalintensität und mit der erhöhten Wiederfindung von Peptiden einhergehend zu verbesserten Signal-Rausch-Verhältnissen. Um den Einfluß von Oberflächen innerhalb der HPLC, mit denen das Peptidgemisch bei der Auftrennung in Kontakt kommt (Kapillare, Statoren, Rotoren etc.), zu untersuchen, wurden Proben verglichen, bei denen lediglich die Probengefäße mit Glucagon gespült wurden und solche, bei denen das hydrophobe Peptid direkt in die Probe gegeben wurde und zusammen mit den Peptiden der Probe aufgetrennt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil der Peptide erst durch die Auftrennung innerhalb der HPLC verloren geht [siehe Abb. 4.19].

Im Laufe weiterer Analysen wurde jedoch deutlich, dass Glucagon trotz seiner hohen Hydrophobizität [RT = 42,7 Vorhersage mittels des Algorithmus TheorChromo] [170] mit Signalen von Peptiden interferiert, die im späteren Verlauf des Gradienten eluieren. Obwohl bei der MS-Analyse die Peptid-spezifische MRM-Methode angewandt wurde, konnte das Glucagonssignal aufgrund ähnlicher m/z-Werte im Vergleich der zu analysierenden Peptide nicht vollständig ausgeblendet werden.

Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde in allen nachfolgenden Analysen Melittin eingesetzt. Dieses aus Bienengift gewonnene Peptid ist noch hydrophober [RT = 47,1 min Vorhersage mittels des Algorithmus TheorChromo] [170] als Glucagon und zeigte keine Interferenzen mit anderen Peptidsignalen. Der anti-adhäsive Effekt von Melittin und Glucagon ist, abhängig von Konzentration und Art der zu analysierenden Peptide, unterschiedlich stark ausgeprägt [siehe Abb. 4.18].

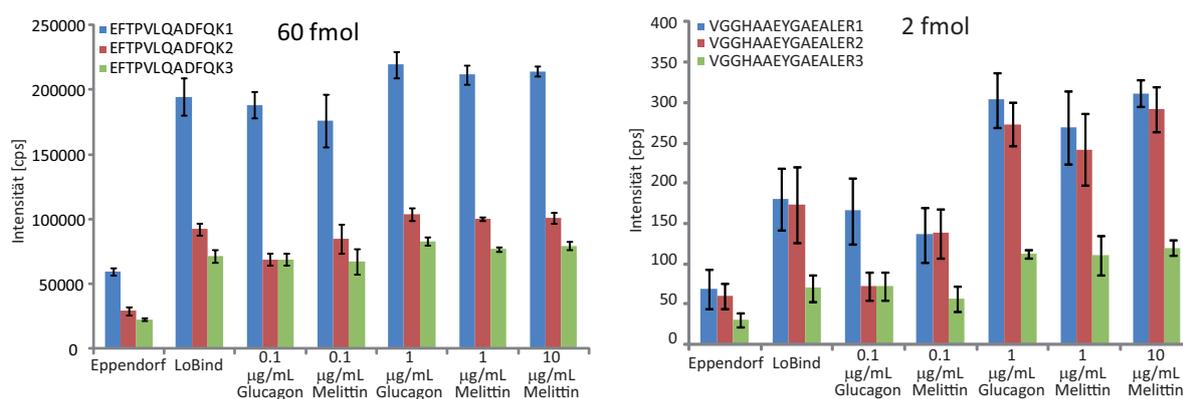


Abb. 4.18: Einfluß von hydrophoben Additiven auf die Signalintensität von Peptiden: Bei höher konzentrierten Peptiden bzw. komplexen Proben ist der Gebrauch von LoBind Reaktionsgefäßen ausreichend. Niedrig abundante Peptide zeigen einen Anstieg der Intensitäten beim Einsatz von Glucagon oder Melittin. Der Zusatz von 1 µg/mL Melittin ist optimal. Die Zahlen 1 bis 3 entsprechen unterschiedlichen MRM-Übergängen desselben Peptids (Vorläuferion/Fragmention-Paar).

In dieser Hinsicht konnten beim Vergleich der AQUA-Peptide ohne und mit Einsatz von Me-

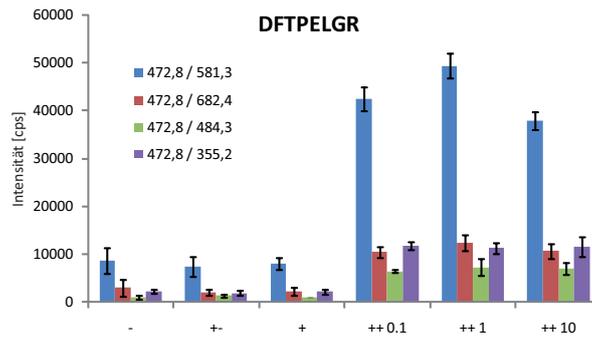


Abb. 4.19: MRM-Analyse des AQUA-Peptids DFTPELGR (1 fmol) ohne und mit Zusatz von Glucagon. - Probe ohne Glucagon +- Spülen des Probengefäßes mit Glucagon, zusätzlicher Waschschrift + Spülen des Probengefäßes mit Glucagon ohne zusätzliches Waschen + 0,1/ 1/ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Glucagon direkt in der Probe.

littin starke Unterschiede festgestellt werden. Zwar korreliert auch ohne Zusatz von Melittin die Signalintensität mit der eingesetzten Konzentration, allerdings ist der Anstieg der Regressionsgeraden wesentlich kleiner als nach Zuspitzen von Melittin. Im Gegensatz dazu wurde für andere Peptidsequenzen keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Proben (mit und ohne Melittin) identifiziert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass bestimmte Peptidsequenzen eine stärkere Adsorption an Oberflächen zeigen, als andere. Der größte Effekt auf die Wiederfindungsrate konnte bei hydrophilen Peptiden festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung ist die Absättigung von Oberflächen nach Wasch- und Äquilibrierungszyklus der Säule durch diese früh eluierenden Peptide. Für die quantitativen Analysen der rekombinanten und endogenen SMN-Komplexe wurde daher stets Melittin mit einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zugegeben.

4.6 Quantifizierung des endogenen SMN-Komplexes

Zur Quantifizierung der nativen SMN-Komplexe mussten diese zuvor von der Affinitätsmatrix eluiert, gefällt und verdaut werden. Im Rahmen der Probenvorbereitung wurden die genannten optimierten Arbeitsschritte verwendet. Dementsprechend wurde der Komplex zuerst mit einem 1% SDS-Elutionspuffer von der Matrix eluiert, anschließend wurde dieser durch Zugabe des fünffachen Volumens von Acetonitril gefällt. Das Proteinpellet wurde dann in einem 200 mM Guanidiniumpuffer resuspendiert, carbamidomethyliert und anschließend tryptisch über Nacht verdaut. Wie in Abb. 4.21 dargestellt, konnte der Komplex reproduzierbar aufgearbeitet und schließlich vollständig verdaut werden.

Die Strategie zur Quantifizierung des SMN-Komplexes beruht auf der bereits erwähnten AQUA-Methode. Dazu werden synthetisch erzeugte stabilisotopenmarkierte Peptide, die in ihrer Sequenz ausgewählten Peptiden der nativen Proteine gleichen, zu der Probe gegeben. Diese wurden dann im Anschluss durch die MRM-Methode analysiert und quantifiziert. Außerdem wurden verschiedene markierungsfreie Methoden getestet. Für die AQUA-Methode mussten nun zunächst geeignete proteotypische Peptide ausgewählt werden. Die Peptide sollten dabei möglichst vielen Kriterien entsprechen [genaue Auflistung von Spezifikationen für die Auswahl geeigneter Peptide siehe Tab. 5.1 in Kap. 5], z.B. keine leicht modifizierbaren Aminosäuren (M, W),

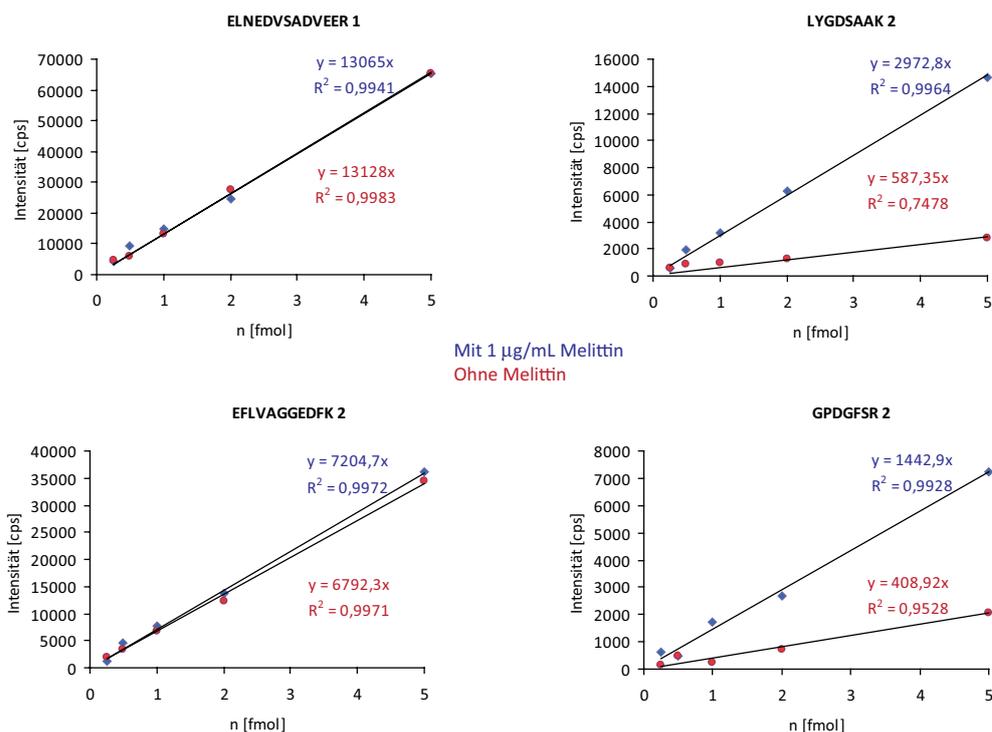


Abb. 4.20: Konzentrationsreihen ausgewählter AQUA-Peptide (jeweils Darstellung eines spezifischen MRM-Übergangs; die angegebene Menge der Peptide entspricht fmol auf der Säule) mit 1 µg/mL und ohne Melittin. Die Peptide GPDFSR und LYGDSAAC zeigen eine starke Absorption an Oberflächen. Durch Zugabe von Melittin konnte dieser Effekt reduziert werden.

instabile Aminosäuren (Q) oder überlesene Schnittstellen enthalten. Einige Komponenten des SMN-Komplexes weisen jedoch nur wenige brauchbare Peptide auf, so dass nicht in allen Fällen den genannten Bedingungen vollständig entsprochen werden konnte [siehe Abb. 7.6]. Um Fehler bei der Quantifizierung zu verringern und statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, wurden stets mindestens zwei Peptide pro Protein gewählt.

Tab. 4.3: Ausgewählte AQUA-Peptide für die Komponenten des SMN-Komplexes. Die mit einem * versehenen Aminosäuren wurden während der Synthese durch entsprechende stabilisotopenmarkierte Äquivalente substituiert. Die in den Peptiden ETCVVVYTG YGNR und CSDIISYTFKP enthaltenen Cysteine liegen in den synthetisch generierten Peptiden bereits carbamidomethyliert vor.

| Name | Sequenz |
|----------|-----------------|
| SMN1 | LGPGKPGLK* |
| SMN2 | ETCVVVYTG YGNR* |
| Gemin2_1 | DFTPELGR* |
| Gemin2_2 | TPQEYLR* |
| Gemin3_1 | LFILDEADK* |
| Gemin3_2 | VLISTDLTSR* |
| Gemin4_1 | LDVEEVDLSLR* |
| Gemin4_2 | TNPSVSSLLQR* |
| Gemin5_1 | TSVFLVR* |
| Gemin5_2 | ELNEDVSADVEER* |

Tab. 4.3: Fortsetzung

| Name | Sequenz |
|----------|----------------|
| Gemin6_1 | VQDLIEGHL*TASQ |
| Gemin6_2 | GPLEWQDYIYK* |
| Gemin7_1 | GPDGF SR* |
| Gemin7_2 | LPRGPDGF SR* |
| Gemin7_3 | CSDIISYTFK*P |
| Gemin8_1 | QYFAETER* |
| Gemin8_2 | LYGDSA AK* |
| Unrip1 | AATAAADFTAK* |
| Unrip2 | EFLVAGGEDFK* |

Die gewählten stabilisotopenmarkierten Peptide wurden nach Auftrags synthese hergestellt und mittels Aminosäureanalyse quantifiziert. Nach Herstellerangaben lag jeweils eine Konzentration von 5 pmol/ μ L vor. Diese Angaben mussten zunächst verifiziert werden. Dazu wurde eine separate Aminosäureanalytik im Arbeitskreis von Prof.Dr.Helmut Meyer (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Jeweils zwei Aliquots jedes Peptids (mit ca. 0,1 μ g) wurden lyophilisiert und in 6N Salzsäure bei 110°C 24 Stunden hydrolysiert, um die Peptidbindungen aufzubrechen und so einzelne Aminosäuren freizusetzen. Das Aminosäuregemisch wurde dann im Anschluß nach Derivatisierung mit einem Fluorophor (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbat) mittels UPLC-Auftrennung und Fluoreszenzmessung analysiert. Die anschließende Quantifizierung erfolgte über die im Chromatogramm erhaltenen Signalintensitäten der einzelnen Aminosäuren. Diese wurden mit einem internen Aminosäurestandard (Norvalin) normalisiert und im Anschluß mit einem Standardaminosäuregemisch verglichen. Die Berechnung erfolgte in Form einer Mittelung der in der jeweiligen Sequenz enthaltenen Aminosäuren. Wie in Tab. 4.4 dargestellt, liegen die meisten Konzentrationen bis zu ca. 20% über den Angaben der Firma Thermo Fisher Scientific. Diese ermittelten Werte wurden für die anschließenden Quantifizierungen genutzt. Innerhalb der Sequenz des Peptids CSDIISYTFKP wurde zudem Alanin als zusätzliche Aminosäure festgestellt. Es ist davon auszugehen, dass während der Synthese des Peptids eine Verunreinigung mit Alanin statt fand, dies konnte jedoch massenspektrometrisch nicht verifiziert werden. Demzufolge wurde das Peptid nicht für die Quantifizierung verwendet.

Tab. 4.4: Aminosäureanalyse der kommerziell erworbenen AQUA-Peptide. Zu entnehmen sind jeweils die tatsächliche Konzentration sowie die proz. Abweichung von den Herstellerangaben (5 pmol/ μ L). Die Werte wurden über eine Doppelbestimmung erhalten.

| Name | Konzentration [pmol/ μ L] | %Abweichung |
|----------|-------------------------------|-------------|
| SMN1 | 4,17 | 16,6 |
| SMN2 | 5,07 | 1,4 |
| Gemin2_1 | 6,95 | 39,0 |
| Gemin2_2 | 6,24 | 24,8 |
| Gemin3_1 | 6,41 | 28,2 |
| Gemin3_2 | 5,50 | 10 |
| Gemin4_1 | 4,68 | 6,4 |

Tab. 4.4: Fortsetzung

| Name | Konzentration [pmol/ μ L] | %Abweichung |
|----------|-------------------------------|-------------|
| Gemin4_2 | 6,02 | 20,4 |
| Gemin5_1 | 6,18 | 23,6 |
| Gemin5_2 | 5,39 | 7,8 |
| Gemin6_1 | 5,37 | 7,4 |
| Gemin6_2 | 5,05 | 1 |
| Gemin7_1 | 5,89 | 17,8 |
| Gemin7_2 | 5,61 | 12,2 |
| Gemin7_3 | 5,88 | 17,6 |
| Gemin8_1 | 5,72 | 14,4 |
| Gemin8_2 | 6,11 | 22,2 |
| Unrip1 | 5,86 | 17,2 |
| Unrip2 | 5,43 | 8,6 |

Zur Erhöhung der Löslichkeit der AQUA-Peptide wurde jeweils ein Aliquot (1 nmol), in Anlehnung an Schmidt *et al.* [139], zunächst lyophilisiert, anschließend in 100% ACN resolubilisiert und intensiv gevortext sowie einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die gemessenen Signalintensitäten der auf diese Art und Weise behandelten Peptide waren jedoch im Widerspruch zu der Publikation [139] geringer als die der ohne gesonderte Behandlung analysierten Peptide aus den Originalaliquots [siehe Abb. 4.22].

Zu Beginn der eigentlichen Quantifizierung der einzelnen SMN-Komplexe wurde zunächst der lineare dynamische Bereich jedes einzelnen Peptids ermittelt. Dazu wurden Verdünnungsreihen angefertigt, die entweder auf dem 4000 Q TRAP oder auf dem TSQ Vantage analysiert wurden. Für die LC-MS-Analyse wurde stets mit der niedrigsten Konzentration begonnen. Zwischen allen Proben wurden *Blank*-Läufe aufgetrennt, um eine Verschleppung von Peptiden in den nächsten Lauf zu verhindern.

Die meisten Peptide wiesen einen linearen dynamischen Bereich von bis zu vier Größenordnungen auf. Als idealen Meßbereich stellten sich Konzentrationen von 1 bis 200 fmol/15 μ L heraus. Unter 1 fmol/15 μ L wurden für viele der AQUA-Peptide große Standardabweichungen der Signalintensität ermittelt. Über einer Konzentration von 200 fmol/15 μ L zeigte sich bei einigen Peptiden während der LC-MS-Analyse eine Absättigung des RP-Materials bzw. Signalsättigung des Detektors im Massenanalysator. Wie in Abb. 4.23 zu erkennen, zeigte das Peptid DFTPELGR sogar über einen dynamischen Bereich von fünf Größenordnungen eine lineare Abhängigkeit. Als Detektionslimit (LOD, engl. *Limit of Detection*) konnte beim Q TRAP eine Konzentration von 100 amol/15 μ L bestimmt werden, während das TSQ-Vantage sogar Peptidkonzentrationen von 10 amol/15 μ L detektieren konnte.

Im weiteren Versuchsverlauf zeigte sich, dass die Praxis, weggefrorene AQUA-Peptid-Verdünnungen nach dem Auftauen mit Ultraschall zu behandeln, dazu führte, dass zwei (LGPGK-PGLK und LPRGPDGFSR) der insgesamt 19 Peptide, während der HPLC-Auftrennung nicht mehr reproduzierbar auf dem RP-Material retardiert wurden, sondern eine Elution über den gesamten Gradienten zeigten [siehe Abb. 4.24]. Dieses Verhalten konnte direkt mit dem Ultra-

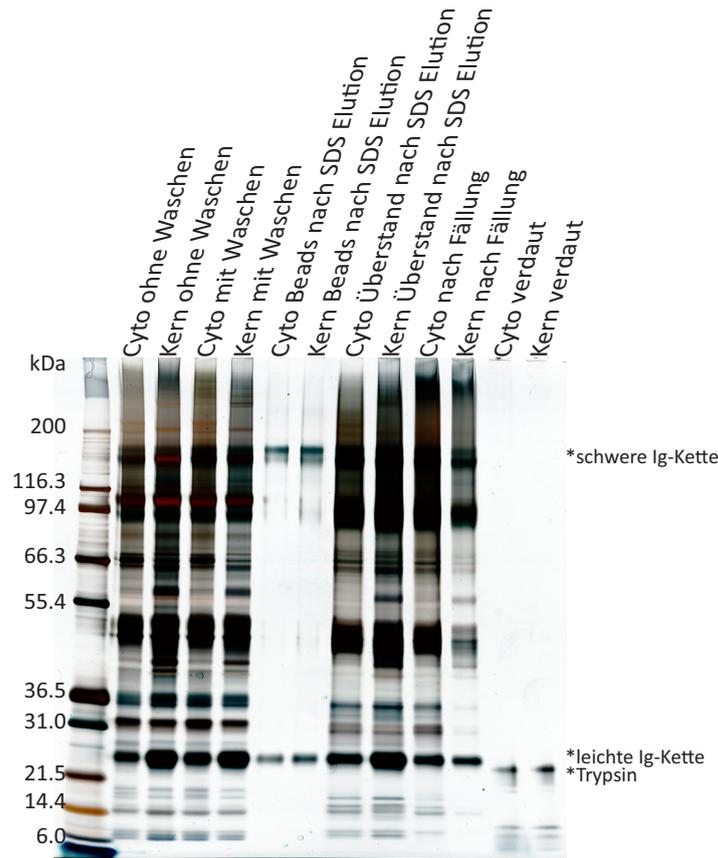


Abb. 4.21: 1D-PAGE Analyse der einzelnen Probenvorbereitungsschritte zur Aufarbeitung des nativen SMN-Komplexes. Das Auftragen der Probe der Kernfraktion nach der Fällung verursachte Probleme, die zu einem Proteinverlust bei der 1D-PAGE-Analyse führten.

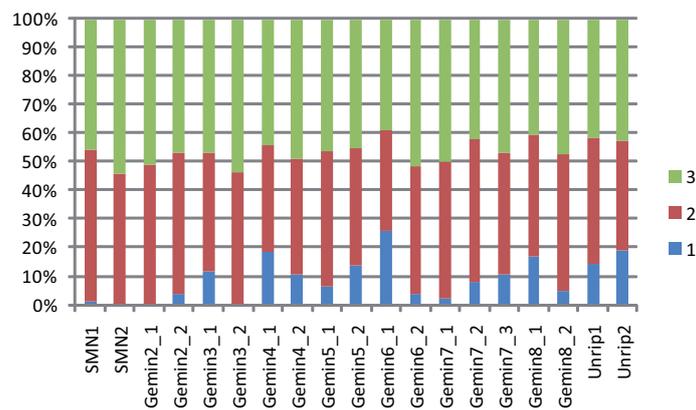


Abb. 4.22: Vergleich der AQUA-Peptide nach Gefriertrocknung, Resolubilisierung in ACN und Ultraschallbehandlung: 1 Lyophilisierte, resolubilierter, ultraschallbehandelter AQUA-Peptide [139]; 2 AQUA-Peptide der Originalaliquots ohne weitere Behandlung; 3 Original-Aliquots nach Ultraschallbehandlung. Das vorgegebene Protokoll von Schmidt *et al.* [139] wirkt sich im Vergleich zu unbehandelten/Ultraschall-behandelten Peptidproben stark negativ auf die Wiederfindungsraten der einzelnen Peptide aus.

schall in Verbindung gebracht werden. Daher wurde im weiteren Verlauf auf die Behandlung mit Ultraschall verzichtet.

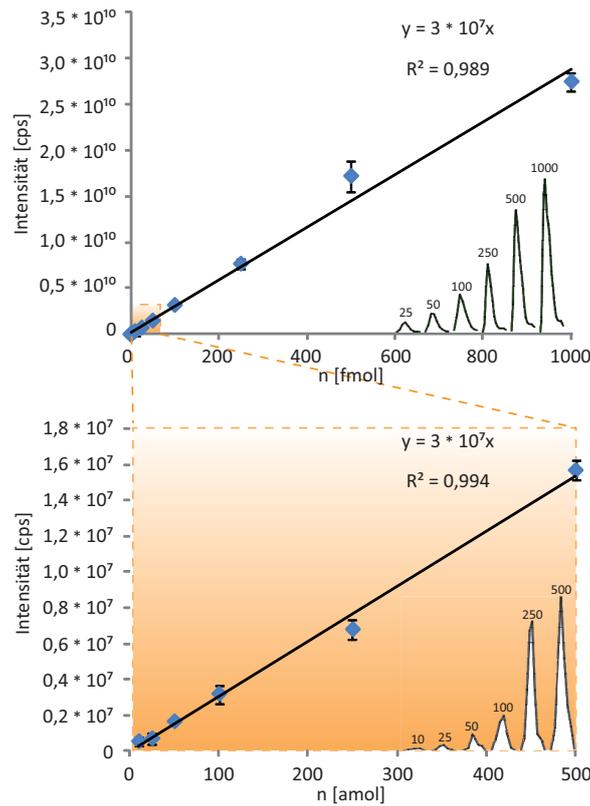


Abb. 4.23: Verdünnungsreihe des AQUA-Peptids DFTPELGR, aufgenommen mit dem TSQ Vantage. Es besteht lineare Abhängigkeit in einem dynamischen Bereich von fünf Größenordnungen (10 amol/15µL bis 1 pmol/15µL). Analoge Verdünnungsreihen wurden für alle anderen AQUA-Peptide aufgenommen, die ein ähnliches Verhalten bei ansteigender Konzentration zeigten.

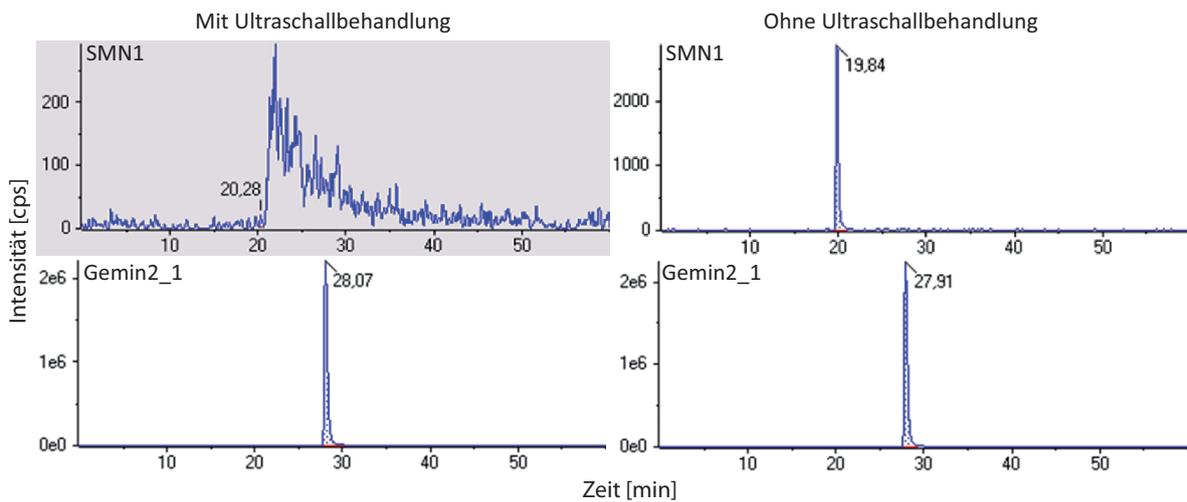


Abb. 4.24: Einfluß von Ultraschall auf AQUA-Peptide. Aufgrund von Ultraschall werden die Peptide LGPGK-PGLK und LPRGPDGFSR so modifiziert, dass sie an Stelle eines distinkten Peaks über den gesamten Gradienten eluieren. Für alle anderen Peptide wurde kein negativer Effekt von Ultraschall hinsichtlich Signalintensität und Retentionszeit festgestellt.

4.6.1 S/MRM-Analyse mit dem 4000 Q TRAP

Anhand der synthetisierten stabilisotopenmarkierten Peptide konnten die erforderlichen MRM-Übergänge optimiert werden, was insbesondere die Anpassung der MS-Parameter hinsichtlich *Declustering Potential*, Kollisionsenergie und Fragmentionen betraf. Die Peptide wurden in 0,1% FA und 50% ACN gelöst und nach Direktinfusion am 4000 Q TRAP analysiert. Für die Bestimmung geeigneter Fragmentionen wurden MS/MS-Spektren der Peptide aufgenommen und möglichst intensive Fragmente ausgewählt. Dabei war zu beachten, dass die Fragmentionen möglichst hohe m/z aufwiesen, um eine spezifische Analyse zu gewährleisten. Werden Fragmentionen aus dem unteren m/z -Bereich gewählt, so sind diese häufig auf einzelne Aminosäuren bzw. auf Dipeptide zurückzuführen. Die Wahrscheinlichkeit, ähnliche m/z in anderen Peptiden wiederzufinden, ist sehr hoch und führt zu einer unspezifischen Analyse: Da die Identifizierung von Peptiden durch MRM lediglich auf spezifischen Peptid-/Fragmentionen-Paaren, sowie reproduzierbaren Retentionszeiten während der LC-Auftrennung beruht, ist es von großer Bedeutung, spezifische Übergänge zu definieren, die keine Interferenzen mit anderen Peptiden hervorrufen und so eventuell zu einer falschen Aussage bzgl. der Signalintensität führen.

Aufgrund der Verhaltensanalogie zwischen synthetischem und nativem Peptid, konnten die optimierten Parameter auch für die endogenen Peptide angewandt werden [siehe Tab. 7.4]. Es mussten lediglich die Massen der Vorläufer- und Fragmentionen entsprechend angepasst werden (stabilisotopenmarkierte Aminosäuren weisen höhere Massen auf als endogene). Um diese Massen zu erhalten wurde das im Internet verfügbare Programm *MS-Product* der Webseite *Proteinprospector* (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) genutzt.

Nach Optimierung der Parameter wurden verschiedene MRM-Analysen mit dem nativen SMN-Komplex durchgeführt. Aufgrund unzureichender Auflösung und Sensitivität erwies sich die 4000 Q TRAP als nicht geeignet, um die zum Teil sehr niedrig abundanten Komplexkomponenten zu quantifizieren. Deshalb wurden alle folgenden Untersuchungen der nativen Komplexe mit dem TSQ Vantage vorgenommen.

4.6.2 S/MRM-Analyse mit dem TSQ Vantage

Die MRM-Parameter der TSQ Vantage wurden semiautomatisch mittels der XCalibur Software optimiert. Die Peptide wurden dazu mittels einer Spritzenpumpe direkt in das Gerät injiziert. Nach Eingabe des m/z sowie der Ladung des entsprechenden Peptidions wählt das TSQ automatisch geeignete MRM-Übergänge, die dann anschließend nochmals hinsichtlich der Kollisionsenergie angepasst werden.

Für die Analyse der cytoplasmatischen und nukleären Fraktion wurden jeweils drei biologische Replikate gewählt, des Weiteren wurden jeweils vier technische Replikate jeder Probe mit zunehmendem Gehalt an zugesetzten AQUA-Peptiden gemessen. Die Abweichungen bzgl. der Quantifizierung der technischen Replikate lagen jeweils bei unter 20%.

Die Signalintensitäten einiger AQUA-Peptide zeigten hohe Schwankungen hinsichtlich der verschiedenen technischen und biologischen Replikate. Daher wurde in den meisten Fällen die Quantifizierung nur auf ein Peptid pro Protein bezogen, diese sind in Tabelle 4.5 hellgrün markiert. Zur Auswertung der Daten wurde die Software *Pinpoint* (Thermo Fisher) benutzt, die

es erlaubt, die Peptidsignale mathematisch zu integrieren. Zur generellen Vergleichbarkeit aller Proben wurden diese auf das SMN1-Peptid normalisiert (100%).

Aus den ermittelten Werten konnten nun die Verhältnisse der verschiedenen Komplexkomponenten zueinander bestimmt werden. Wie in Tabelle 4.6 zu erkennen, sind für einige niedrig abundante Peptide keine korrelierenden Werte zwischen den verschiedenen biologischen Replikaten ersichtlich. Dies kann durch eine erschwerte Integration der entsprechenden Kurvenflächen begründet werden. Da jedoch die Replikate Cyto1 sowie Kern2 und Kern3 während der LC-MS-Analysen eine angemessene Intensität aufwiesen und so eine Quantifizierung ermöglichten, wurden für die Berechnung der theoretischen Stöchiometrien hauptsächlich auf diese Werte zurückgegriffen.

Tab. 4.5: Ergebnisse der MRM-Analyse der nativen SMN-Komplexe. Die grün markierten Peptide wurden für die spätere Berechnung der Verhältnisse herangezogen. Abweichungen sind auf niedrig abundante Peptide, die eine akkurate Integration der Flächen erschweren, zurückzuführen.

| Peptid | %Cyto1 | %Cyto2 | %Cyto3 | %Kern1 | %Kern2 | %Kern3 |
|----------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| SMN1 | 100,00 ± 18,08 | 100,00 ± 9,52 | 100,00 ± 30,60 | 100,00 ± 9,85 | 100,00 ± 20,65 | 100,00 ± 15,85 |
| SMN2 | 4,66 ± 6,22 | 2,45 ± 12,75 | 5,40 ± 13,36 | 2,95 ± 7,50 | 3,70 ± 14,40 | 4,56 ± 22,49 |
| Gemin2_1 | 32,12 ± 4,92 | 7,75 ± 7,94 | 7,50 ± 13,04 | 2,54 ± 11,39 | 15,12 ± 20,75 | 5,37 ± 9,59 |
| Gemin2_2 | 55,08 ± 6,43 | 46,73 ± 8,95 | 56,03 ± 0,91 | 32,13 ± 5,83 | 42,26 ± 10,05 | 26,42 ± 11,65 |
| Gemin3_1 | 13,13 ± 8,36 | 0,59 ± 9,02 | 1,45 ± 2,00 | 0,78 ± 7,04 | 4,55 ± 18,33 | 4,66 ± 19,84 |
| Gemin3_2 | 22,74 ± 9,23 | 3,89 ± 12,79 | 5,81 ± 4,13 | 7,91 ± 10,95 | 11,19 ± 13,00 | 10,63 ± 18,23 |
| Gemin4_1 | 3,05 ± 22,82 | 1,60 ± 13,04 | 0,30 ± 59,18 | 2,57 ± 32,32 | 2,63 ± 12,31 | 1,29 ± 40,03 |
| Gemin4_2 | 4,73 ± 6,88 | 4,61 ± 13,39 | 2,97 ± 0,44 | 5,82 ± 9,62 | 5,41 ± 18,18 | 4,07 ± 14,74 |
| Gemin5_1 | 0,84 ± 1,38 | 0,20 ± 9,56 | 0,17 ± 13,44 | 0,90 ± 10,30 | 1,38 ± 11,68 | 0,90 ± 13,40 |
| Gemin5_2 | 6,21 ± 4,41 | 1,26 ± 4,34 | 1,77 ± 10,38 | 7,72 ± 12,14 | 8,49 ± 9,63 | 6,34 ± 19,54 |
| Gemin6_1 | 1,55 ± 13,29 | 6,67 ± 12,11 | 6,10 ± 1,09 | 10,95 ± 13,50 | 2,00 ± 11,19 | 2,18 ± 12,98 |
| Gemin6_2 | 1,66 ± 11,08 | 0,71 ± 12,95 | 1,40 ± 24,96 | 1,59 ± 26,11 | 1,56 ± 15,33 | 1,31 ± 7,77 |
| Gemin7_1 | 6,84 ± 13,50 | 7,77 ± 12,06 | 6,90 ± 11,55 | 11,55 ± 15,22 | 8,49 ± 12,43 | 6,31 ± 14,11 |
| Gemin7_3 | 0,29 ± 7,54 | 0,79 ± 12,36 | 0,30 ± 5,20 | 1,05 ± 24,77 | 0,31 ± 5,25 | 0,28 ± 35,74 |
| Gemin8_1 | 2,31 ± 8,25 | 2,45 ± 17,70 | 3,05 ± 14,86 | 5,66 ± 9,82 | 2,32 ± 9,15 | 2,02 ± 13,76 |
| Gemin8_2 | 5,65 ± 4,52 | 5,50 ± 8,81 | 4,82 ± 5,20 | 7,50 ± 9,00 | 4,39 ± 19,89 | 4,74 ± 16,93 |
| Unrip1 | 7,31 ± 10,83 | 1,56 ± 23,40 | 2,44 ± 22,16 | 3,64 ± 19,98 | 6,73 ± 12,41 | 5,29 ± 15,74 |
| Unrip2 | 3,10 ± 4,12 | 0,37 ± 10,53 | 0,32 ± 8,39 | 0,40 ± 16,83 | 1,30 ± 9,14 | 1,24 ± 17,25 |

Tab. 4.6: Stöchiometrien der nativen SMN-Komplexe; Ergebnisse aus den TSQ-Messungen. Die grün markierten Felder wurden zur Berechnung der Mittelwerte (MW) herangezogen. Die Abweichungen der übrigen Replikate sind auf Probleme bei der Integration sehr niedrig abundanter Peptide zurückzuführen. Nach Mittelwertbildung wurden unter Einbeziehung aller Einzelwerte, Verhältnisse festgelegt, um ein theoretischen Modell der Stöchiometrie des SMN-Komplexes zu definieren.

| | Cyto1 | Cyto2 | Cyto3 | MW Cyto | Modell ¹ Cyto | Kern1 | Kern2 | Kern3 | MW Kern | Modell Kern |
|-------------------|-------|--------|--------|---------|--------------------------|--------|-------|-------|---------|-------------|
| SMN1:Gemin2_2 | 1,82 | 2,14 | 1,78 | 1,91 | 2,00 | 3,11 | 2,37 | 3,79 | 3,09 | 3,00 |
| SMN1:Gemin6_2 | 60,33 | 141,33 | 71,20 | 65,77 | 60,00 | 63,02 | 64,13 | 76,36 | 67,84 | 60,00 |
| SMN1:Gemin7_1 | 14,61 | 12,88 | 14,50 | 14,00 | 15,00 | 8,66 | 11,78 | 15,84 | 12,09 | 12,00 |
| SMN1:Gemin8_2 | 17,70 | 18,19 | 20,73 | 18,87 | 17,14 | 13,34 | 22,79 | 21,11 | 19,08 | 20,00 |
| Gemin2_2:Gemin6_2 | 33,23 | 66,05 | 39,89 | 36,56 | 30,00 | 20,25 | 27,10 | 20,17 | 22,51 | 20,00 |
| Gemin2_2:Gemin7_1 | 8,05 | 6,02 | 8,12 | 7,40 | 7,50 | 2,78 | 4,98 | 4,18 | 4,58 | 4,00 |
| Gemin2_2:Gemin8_2 | 9,75 | 8,50 | 11,61 | 9,95 | 8,57 | 4,29 | 9,63 | 5,58 | 6,50 | 6,67 |
| Gemin7_1:Gemin6_2 | 4,13 | 10,98 | 4,91 | 4,52 | 4,00 | 7,28 | 5,44 | 4,82 | 5,13 | 5,00 |
| Gemin8_2:Gemin6_2 | 3,41 | 7,77 | 3,44 | 3,42 | 3,50 | 4,72 | 2,81 | 3,62 | 3,22 | 3,00 |
| Gemin7_1:Gemin8_2 | 1,21 | 1,41 | 1,43 | 1,35 | 1,14 | 1,54 | 1,93 | 1,33 | 1,60 | 1,67 |
| SMN1:Gemin3_2 | 4,40 | 25,72 | 17,22 | 4,40 | 5,00 | 12,65 | 8,94 | 9,41 | 10,33 | 10,00 |
| SMN1:Gemin4_2 | 21,16 | 21,68 | 33,72 | 25,52 | 20,00 | 17,17 | 18,49 | 24,55 | 20,07 | 20,00 |
| SMN1:Gemin5_2 | 16,12 | 79,08 | 56,52 | 16,12 | 15,00 | 12,96 | 11,78 | 15,78 | 13,50 | 15,00 |
| SMN1:Unrip2 | 32,27 | 270,59 | 315,02 | 32,27 | 30,00 | 251,80 | 77,02 | 80,75 | 78,88 | 60,00 |
| Gemin2_2:Gemin5_2 | 8,88 | 36,96 | 31,67 | 8,88 | 7,50 | 4,16 | 4,98 | 4,17 | 4,44 | 5,00 |
| Gemin3_2:Gemin4_2 | 4,81 | 0,84 | 1,96 | 4,81 | 4,00 | 1,36 | 2,07 | 2,61 | 2,34 | 2,00 |
| Gemin8_2:Gemin4_2 | 1,20 | 1,19 | 1,63 | 1,34 | 1,17 | 1,29 | 0,81 | 1,16 | 1,09 | 1,00 |
| Gemin8_2:Unrip2 | 1,82 | 14,87 | 15,20 | 1,82 | 1,75 | 18,88 | 3,38 | 3,82 | 3,60 | 3,00 |
| Gemin7_1:Unrip2 | 2,21 | 21,02 | 21,73 | 2,21 | 2,00 | 29,08 | 6,54 | 5,10 | 5,82 | 5,00 |
| Gemin6_2:Unrip2 | 0,53 | 1,91 | 4,42 | 0,53 | 0,50 | 4,00 | 1,20 | 1,06 | 1,13 | 1,00 |
| Gemin2_2:Gemin3_2 | 2,42 | 12,02 | 9,65 | 2,42 | 2,50 | 4,06 | 3,78 | 2,49 | 3,44 | 3,33 |

¹ Unter Berücksichtigung aller erhaltenen Werte wurden möglichst plausible Verhältnisse festgelegt.

Anhand der erhaltenen Werte konnten für den nukleären bzw. den cytoplasmatischen SMN-Komplex die in Tabelle 4.7 zusammengefassten Stöchiometrien ermittelt werden. Beide Komplexe unterscheiden sich folglich nur wenig in ihrer Zusammensetzung. Am größten sind die Unterschiede für die Proteine Gemin3 und Unrip. Aus der Literatur ist bekannt, dass beide Komponenten hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert sind.

Tab. 4.7: Stöchiometrien der nativen SMN-Komplexe; normierte Ergebnisse aus Messungen mit dem TSQ Vantage.

| Protein | Cyto | Kern |
|---------|------|------|
| SMN | 60 | 60 |
| Gemin2 | 30 | 20 |
| Gemin3 | 12 | 6 |
| Gemin4 | 3 | 3 |
| Gemin5 | 4 | 4 |
| Gemin6 | 1 | 1 |
| Gemin7 | 4 | 5 |
| Gemin8 | 3,5 | 3 |
| Unrip | 2 | 1 |

4.6.3 Markierungsfreie quantitative Analyse mit dem LTQ *Orbitrap* Velos

Anstelle stabilisotopenmarkierter Peptide kann man sich auch im Rahmen einer markierungsfreien Messung hochauflösende Massenanalytoren, wie die LTQ *Orbitrap* Velos, zu Nutze machen. Dazu werden die Proben im MS1-Modus analysiert, das heißt, das Gerät detektiert die Peptidionen, ohne diese anschließend zu fragmentieren. Somit erhält man ein Elutionsprofil für jedes in der Probe enthaltene Peptid. Mit dem Qual Browser der XCalibur Software [Thermo Fisher] können die Spektren manuell ausgewertet werden. Zur Zuordnung der Peptide wurde zuvor eine LC-MS/MS-Analyse durchgeführt und die entsprechenden Peptide identifiziert. Unter der Voraussetzung einer stabilen, reproduzierbaren HPLC-Auftrennung erfolgt der Abgleich anhand der Retentionszeiten. Der Vorteil dieser Messmethode liegt in der globalen Quantifizierung von Peptiden einer Proben, entgegen der zielgerichteten Quantifizierung bei Verwendung der S/MRM-Technik. Allerdings wurde auch hier eine Auswahl von Peptiden getroffen, da bestimmte Sequenzen keine reproduzierbaren Signalintensitäten wiedergaben. Im Gegensatz zur AQUA-Methode wurden die Peptide hier nicht absolut quantifiziert, sondern durch Vergleich der Intensitäten von Kern- und Cytoplasmaproben, relativ quantifiziert. Wie in Tabelle 4.8 dargestellt, korrelieren die meisten Werte (Ausnahme: Gemin5) sehr gut mit den zuvor über

MRM-Analyse ermittelten Stöchiometrien für Kern- und Cytoplasmakomplex.

Tab. 4.8: Verhältnis des cytoplasmatischen zum nukleären SMN-Komplex. Ergebnisse der markierungsfreien LC-MS-Messungen mit der LTQ *Orbitrap* Velos. Aufgrund starker Abweichungen einiger Peptidsequenzen innerhalb der drei Replikate wurden nur die in der Tabelle erwähnten Peptide ausgewählt, sowie nur das Replikat Cytol und die beiden Kernreplikate 1 und 2 genutzt. Die fett markierten Peptide entsprechen den Peptidsequenzen, die auch für die AQUA-Methode verwendet wurden. In Anlehnung an die zuvor ermittelten Verhältnisse wurden auch hier alle Einzelwerte zur besseren Veranschaulichung normiert.

| Protein | Peptid | Cyto:Kern | MW ¹ _{Cyto:Kern} | Modell ² _{Cyto:Kern} |
|---------|--------------------|-----------|--------------------------------------|--|
| SMN | AVASFK | 1,00 | 1,07 | 1,00 |
| | LGPGKPLK | 1,22 | | |
| | NGDICETSGKPK | 1,00 | | |
| Gemin2 | TPQEYLR | 1,51 | 1,73 | 1,50 |
| | DFTPELGR | 1,87 | | |
| | KFCLGEK | 1,81 | | |
| Gemin3 | TLQIQK | 1,50 | 1,96 | 2,00 |
| | DPTFVR | 2,80 | | |
| | NNSVSGLSVK | 2,52 | | |
| | LFILDEADK | 1,76 | | |
| | SYLEGSSDNQLK | 1,58 | | |
| | AAGFERPSPVQLK | 1,62 | | |
| Gemin4 | GLTQIQSR | 0,87 | 1,26 | 1,00 |
| | TNPSVSSLLQR | 0,75 | | |
| | SSQGTSYDSYR | 1,52 | | |
| | SIAEGIGPEERR | 1,32 | | |
| | LLETVIDVSTADR | 1,54 | | |
| | LDVEEVDSLRL | 1,57 | | |
| Gemin5 | GVLQTAAER | 0,67 | 0,69 | 1,00 |
| | LRPEDPVLK | 0,79 | | |
| | SLPLSTSLDHR | 0,60 | | |
| Gemin6 | VTASEKNEYK | 1,37 | 1,22 | 1,00 |
| | AYSPEDLEER | 1,08 | | |
| | NHIPITEQGDAPR | 1,20 | | |
| Gemin7 | GPDGFSR | 1,16 | 0,96 | 0,80 |
| | MQTPVNIPVPVLR | 0,75 | | |
| Gemin8 | LYGDSAAK | 1,71 | 1,24 | 1,17 |
| | RLYGDSAAK | 1,00 | | |
| | QYFAETER | 1,08 | | |
| | SVEAPTERPGER | 1,41 | | |
| | ATRPWYSHPVYAR | 1,00 | | |
| Unrip | LWDHATMTEVK | 2,60 | 1,84 | 2,00 |
| | IYDLNKPEAEPK | 1,39 | | |
| | EFLVAGGEDFK | 1,52 | | |

¹ Mittelwert

² Unter Berücksichtigung aller erhaltenen Werte wurden möglichst plausible Verhältnisse festgelegt.

4.7 Quantifizierung der rekombinanten SMN-Komplexe

Für die Analyse der rekombinanten Komplexe mußten weniger Probenaufarbeitungsschritte durchgeführt werden als für die nativen Proteinkomplexe: Die Komplexe wurden, wie bereits beschrieben, durch Zugabe der TEV-Protease nativ von der Glutathion-Matrix eluiert, daher entfiel eine Entfernung LC-MS und HPLC-inkompatibler Detergentien. Anfänglich wurden die Komplexe nochmals über einen Saccharosegradienten aufgereinigt. Es zeigte sich jedoch, dass die enthaltene Saccharose inhibierend auf den späteren tryptischen Verdau wirkte. Des Weiteren war die Konzentration der so erhaltenen SMN-Komplexe unzureichend für eine weitere quantitative Analyse [siehe Abb. 4.25]. Deshalb wurden die SMN-Komplexe direkt nach der Elution von der Glutathion-Matrix, carbamidomethyliert, verdaut und quantifiziert. Wie in Abb. 4.25 zu erkennen, konnte der Komplex vollständig verdaut werden.

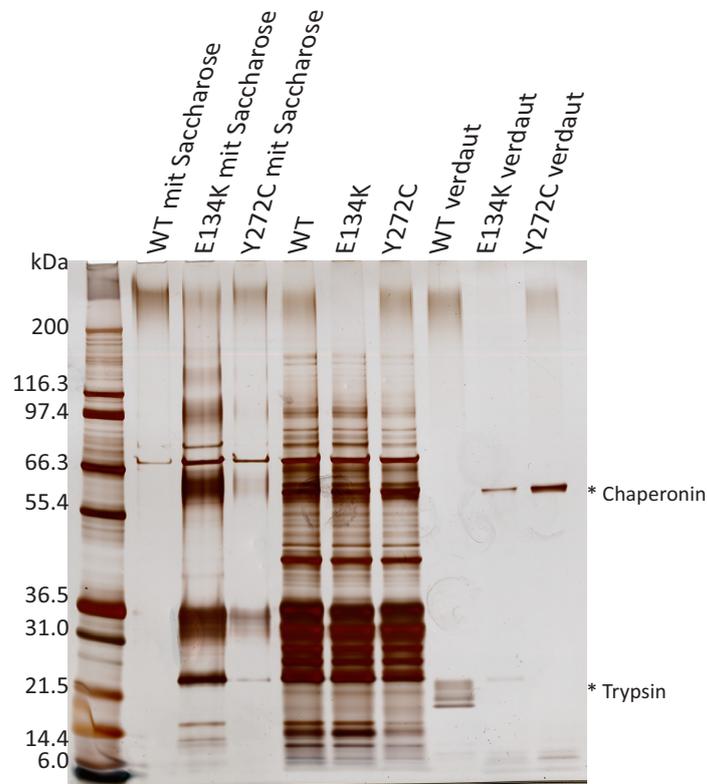


Abb. 4.25: 1D-PAGE Analyse der einzelnen Probenvorbereitungsschritte zur Aufarbeitung der rekombinanten SMN-Komplexe.

4.7.1 S/MRM-Analyse mit dem 4000 Q TRAP

Für die MRM-Analyse der rekombinanten Komplexe mit dem 4000 Q TRAP wurden die bereits in Tabelle 7.4 erwähnten Parameter für die nativen Komplexe hinsichtlich Peptid-Fragmentationen-Übergängen, Kollisionsenergie und *Declustering* Potential verwendet. Da in den rekombinanten Komplexen nur der *Core*-Komplex enthalten ist, wurden lediglich die entsprechenden Peptide für SMN, Gemin2, Gemin6, Gemin7 und Gemin8 eingesetzt. Wie im Falle der nativen Komplexe wurden jeweils vier technische Replikate mit steigender Konzentration an zu-

gesetzten AQUA-Peptiden analysiert. Anschließend wurde auf das SMN1-Peptid normalisiert und die Werte prozentual angeglichen [siehe Tab. 4.9].

Tab. 4.9: Ergebnisse der MRM-Analyse der rekombinanten SMN-Komplexe mit dem 4000 Q TRAP. Die grün markierten Felder wurden zur Berechnung der Verhältnisse herangezogen.

| Peptid | %WT | %E134K | %Y272C |
|----------|----------------|----------------|----------------|
| SMN1 | 100,00 ± 17,51 | 100,00 ± 14,36 | 100,00 ± 15,71 |
| SMN2 | 2,12 ± 10,92 | 3,71 ± 6,74 | 3,38 ± 8,96 |
| Gemin2_1 | 37,46 ± 8,92 | 36,37 ± 8,34 | 30,14 ± 12,15 |
| Gemin2_2 | 44,41 ± 10,88 | 58,26 ± 13,01 | 55,43 ± 8,81 |
| Gemin6_1 | 22,68 ± 4,58 | 27,98 ± 9,23 | 12,83 ± 5,34 |
| Gemin6_2 | 5,12 ± 13,41 | 5,86 ± 12,90 | 3,11 ± 20,34 |
| Gemin7_1 | 17,05 ± 13,56 | 21,87 ± 11,54 | 8,03 ± 12,19 |
| Gemin7_3 | 1,82 ± 1,21 | 3,75 ± 3,10 | 2,05 ± 5,24 |
| Gemin8_1 | 9,48 ± 1,70 | 10,84 ± 3,86 | 3,23 ± 3,49 |
| Gemin8_2 | 9,84 ± 7,94 | 8,24 ± 7,16 | 2,50 ± 11,19 |

Aus diesen Werten konnten nun die Verhältnisse der einzelnen Proteinkomponenten berechnet werden. Wie der nachfolgenden Tabelle 4.10 zu entnehmen ist, unterscheiden sich WT- und E134K-Komplex nur geringfügig, während der Y272C-Komplex eine Abreicherung des Gemin6-Gemin7-Gemin8-Trimers im Vergleich zum WT und der E134K-Mutante aufzeigt.

Tab. 4.10: Verhältnisse einzelner Komplexkomponenten der rekombinanten SMN-Komplexe aus Messungen mit dem 4000 Q TRAP. Zur Vereinheitlichung wurden auch hier unter Einbeziehung aller Einzelwerte normierte Verhältnisse gebildet.

| | WT | E134K | Y272C | Modell _{WT} | Modell _{E134K} | Modell _{Y272C} |
|-------------------|-------|-------|-------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| SMN1:Gemin2_2 | 2,25 | 1,72 | 1,80 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| SMN1:Gemin6_2 | 19,52 | 17,08 | 32,16 | 15,00 | 15,00 | 30,00 |
| SMN1:Gemin7_1 | 5,86 | 4,57 | 12,45 | 5,00 | 5,00 | 10,00 |
| SMN1:Gemin8_2 | 10,55 | 9,23 | 30,99 | 10,00 | 10,00 | 30,00 |
| Gemin2_2:Gemin7_1 | 2,60 | 2,66 | 6,90 | 2,50 | 2,50 | 5,00 |
| Gemin2_2:Gemin6_2 | 8,67 | 9,95 | 17,83 | 7,50 | 7,50 | 15,00 |
| Gemin2_2:Gemin8_2 | 4,68 | 5,37 | 17,18 | 5,00 | 5,00 | 15,00 |
| Gemin7_1:Gemin6_2 | 3,33 | 3,73 | 2,58 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| Gemin8_2:Gemin6_2 | 1,85 | 1,85 | 1,04 | 1,50 | 1,50 | 1,00 |
| Gemin7_1:Gemin8_2 | 1,80 | 2,02 | 2,49 | 2,00 | 2,00 | 3,00 |

Anhand dieser Verhältnisse können die in Tabelle 4.11 dargestellten modellierten Stöchiometrien für den pentameren Komplex von WT, E134K und Y272C berechnet werden.

Tab. 4.11: Durch Normierung der experimentellen Werte ermittelte Stöchiometrien der rekombinanten SMN-Komplexe; Ergebnisse aus den Messungen mit dem 4000 Q TRAP.

| Protein | WT | E134K | Y272C |
|---------|-------|-------|-------|
| SMN | 60,00 | 60,00 | 60,00 |
| Gemin2 | 30,00 | 30,00 | 30,00 |
| Gemin6 | 4,00 | 4,00 | 2,00 |
| Gemin7 | 12,00 | 12,00 | 6,00 |
| Gemin8 | 6,00 | 6,00 | 2,00 |

4.7.2 S/MRM-Analyse mit dem TSQ Vantage

Die selben rekombinanten SMN-Komplexe [siehe 4.7.1] wurden nochmals mit dem TSQ Vantage analysiert. Auch hier wurde in Anlehnung an die Q TRAP-Messungen analog vorgegangen. Es wurden jeweils vier technische Replikate mit steigender AQUA-Peptidkonzentration gemessen. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und alle Komplexe auf das SMN1-Peptid normalisiert [siehe Tabelle 4.12].

Tab. 4.12: Ergebnisse der MRM-Analyse der rekombinanten SMN-Komplexe; Messungen mit dem TSQ Vantage. Die grün markierten Felder wurden zur Berechnung der Verhältnisse herangezogen.

| Peptid | %WT | %E134K | %Y272C |
|----------|---------------|---------------|---------------|
| SMN1 | 100,00 ± 4,53 | 100,00 ± 2,36 | 100,00 ± 3,47 |
| SMN2 | 0,28 ± 63,40 | 1,18 ± 34,48 | 0,29 ± 38,09 |
| Gemin2_1 | 30,86 ± 5,05 | 18,13 ± 0,67 | 7,52 ± 0,88 |
| Gemin2_2 | 22,31 ± 1,17 | 38,96 ± 1,04 | 31,51 ± 0,91 |
| Gemin6_1 | 2,41 ± 4,44 | 16,52 ± 2,35 | 7,88 ± 2,97 |
| Gemin6_2 | 0,98 ± 30,84 | 1,78 ± 10,31 | 0,64 ± 11,96 |
| Gemin7_1 | 9,32 ± 7,31 | 13,90 ± 4,78 | 4,60 ± 7,82 |
| Gemin7_3 | 0,06 ± 28,15 | 1,65 ± 13,76 | 0,51 ± 16,12 |
| Gemin8_1 | 1,59 ± 13,42 | 1,94 ± 8,10 | 0,55 ± 9,23 |
| Gemin8_2 | 3,99 ± 8,98 | 4,12 ± 4,54 | 1,17 ± 4,57 |

Auf Basis dieser Werte konnten im Anschluß die Stöchiometrien der einzelnen Proteinkomponenten berechnet werden. Wie bereits aus der Q TRAP-Analyse ersichtlich, unterscheiden sich der WT- und E134K-Komplex nur geringfügig, was vermutlich nur auf Messungenauigkeiten zurückzuführen ist. Die Y272C-Mutante weist hingegen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Gemin6-, Gemin7- und Gemin8-Konzentrationen auf. SMN- und Gemin2-Konzentration der Mutanten sind im Vergleich zum WT unverändert [siehe Tab. 4.13].

Tab. 4.13: Verhältnisse der einzelnen Komplexkomponenten der rekombinanten SMN-Komplexe; Ergebnis der Messungen mit dem TSQ Vantage. Die erhaltenen Werte wurden wie zuvor zur besseren Veranschaulichung normiert.

| | WT | E134K | Y272C | Modell _{WT} | Modell _{E134K} | Modell _{Y272C} |
|-------------------|-------|-------|--------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| SMN1:Gemin2_2 | 3,24 | 2,57 | 3,17 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| SMN1:Gemin6_2 | 41,53 | 56,24 | 157,37 | 40,00 | 40,00 | 120,00 |
| SMN1:Gemin7_1 | 10,73 | 7,19 | 21,72 | 10,00 | 10,00 | 20,00 |
| SMN1:Gemin8_2 | 62,91 | 51,62 | 180,33 | 60,00 | 60,00 | 120,00 |
| Gemin2_2:Gemin7_1 | 3,31 | 2,80 | 6,84 | 3,33 | 3,33 | 6,67 |
| Gemin2_2:Gemin6_2 | 12,82 | 21,91 | 49,58 | 13,33 | 13,33 | 40,00 |
| Gemin2_2:Gemin8_2 | 19,41 | 20,11 | 56,82 | 20,00 | 20,00 | 40,00 |
| Gemin7_1:Gemin6_2 | 3,87 | 7,82 | 7,24 | 4,00 | 4,00 | 6,00 |
| Gemin8_2:Gemin6_2 | 0,66 | 1,09 | 0,87 | 0,67 | 0,67 | 1,00 |
| Gemin7_1:Gemin8_2 | 5,86 | 7,18 | 8,30 | 6,00 | 6,00 | 6,00 |

Aus diesen Verhältnissen wurden nun die theoretischen Stöchiometrien sowohl für den WT- und E134K-Mutations-Komplex, als auch für die Y272C-Mutante ermittelt. Tabelle 4.14 stellt diese in der Übersicht dar.

Tab. 4.14: Normierte Stöchiometrien der experimentellen Daten der rekombinanten SMN-Komplexe; Ergebnis der Messungen mit dem TSQ Vantage.

| Protein | WT | E134K | Y272C |
|---------|--------|--------|--------|
| SMN | 120,00 | 120,00 | 120,00 |
| Gemin2 | 40,00 | 40,00 | 40,00 |
| Gemin6 | 3,00 | 3,00 | 1,00 |
| Gemin7 | 12,00 | 12,00 | 6,00 |
| Gemin8 | 2,00 | 2,00 | 1,00 |

4.7.3 Markierungsfreie quantitative Analyse mit dem LTQ Orbitrap Velos

Wie bereits im Fall der endogenen SMN-Komplexe gezeigt [siehe Kapitel 4.6.3], können quantitative Daten auch markierungsfrei mittels hochauflösender Massenspektrometer ermittelt werden. Dazu wurden alle drei Proteinkomplexe (WT, E134K, Y272C) im MS1-Modus aufgenommen, d.h. es wurden nur die Ionenspuren der Peptidionen aufgezeichnet ohne diese zusätzlich zu fragmentieren. Die LC-MS-Analysen wurden mit dem Qual Browser der Xcalibur Suite [Thermo Fisher] ausgewertet, in dem die entsprechenden Kurven der Peptidsignale integriert wurden. Anschließend wurde auf das Peptid AVASFK normalisiert und die Verhältnisse zwischen den einzelnen Komplexkomponenten ermittelt [siehe Tab. 4.15]. Auch hier zeigte sich, dass der WT- und E134K-Komplex wenig Differenzen aufweisen, wohingegen die Y272C-Mutante deutlich erniedrigte Konzentrationen des Gemin6-Gemin7-Gemin8-Trimers zeigt.

Tab. 4.15: Stöchiometrisches Verhältnis der Komponenten des WT-Komplexes im Vergleich zu dem der E134K-Mutante (1) und Y272C-Mutante (2), sowie das Verhältnis der Komplexkomponenten der E134K-Mutante im Vergleich zu denen des Y272C-Komplex (3).

| Protein | Peptid | Velos | | | Q TRAP | | | TSQ | | |
|---------|-------------------|-------|------|------|--------|---|---|------|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| | AVAFK | 1,00 | 1,00 | 1,00 | | | | | | |
| | LGPGKPLK | 1,00 | 1,08 | 1,08 | | | | | | |
| SMN | NGDICTSGKPK | 1,03 | 1,39 | 1,35 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | GTGQSDSDIWDITALIK | 1,31 | 1,23 | 0,94 | | | | | | |
| | SAPWNSFLPPPPMPGPR | 1,52 | 1,18 | 0,78 | | | | | | |
| | TPQEYLR | 0,94 | 1,09 | 1,15 | | | | | | |
| | AELAGLK | 0,97 | 0,97 | 0,99 | | | | | | |
| | YFDQR | 0,87 | 0,97 | 1,12 | | | | | | |
| Gemin2 | FCLGEK | 1,18 | 1,16 | 0,98 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | KFCLGEK | 0,99 | 1,08 | 1,09 | | | | | | |
| | SEDEEGWKK | 0,86 | 1,09 | 1,26 | | | | | | |
| | SQQLDSNVTMPK | 1,21 | 1,24 | 1,02 | | | | | | |
| | AYSPELEER | 1,28 | 2,90 | 2,26 | | | | | | |
| Gemin6 | GPLEWQDIYK | 0,82 | 1,50 | 1,82 | 1 | 2 | 2 | 1 | 3 | 3 |
| | NHIPTEQGDAPR | 1,10 | 3,13 | 2,85 | | | | | | |
| Gemin7 | GPDGFSR | 0,87 | 2,34 | 2,68 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| | QTPVNIPVPVLR | 0,59 | 2,18 | 3,69 | | | | | | |
| | RLYGDSA AK | 0,67 | 2,18 | 3,27 | | | | | | |
| Gemin8 | QYFAETER | 0,92 | 2,86 | 3,09 | 1 | 3 | 3 | 1,19 | 2 | 2 |
| | SVEAPTERPGER | 1,14 | 4,96 | 4,34 | | | | | | |
| | ATRPWYSHPVYAR | 0,93 | 5,15 | 5,52 | | | | | | |

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den humanen SMN-Komplex hinsichtlich Stöchiometrie mittels massenspektrometrischer Methoden zu charakterisieren. Dazu wurde der genannte Komplex aus einer humanen Zelllinie (HeLa-Zellen) angereichert und untersucht. Es konnten Unterschiede zwischen den im Zellkern und im Cytoplasma angereicherten SMN-Komplex quantifiziert werden. Methode der Wahl war die absolute Quantifizierung durch stabilisotopenmarkierte Peptidanaloga, die in definierten Verhältnissen zu den Proben gegeben wurden.

Des Weiteren wurden drei verschiedene rekombinante pentamere SMN-Komplexe (darunter das Wildtyp-SMN-Protein, sowie zwei SMN-Analoga mit bekannten SMA-Patienten-Mutationen) zur Verfügung gestellt. Dadurch sollte der Einfluss zweier Punktmutationen, die im Zusammenhang mit spinaler Muskelatrophie stehen, im Vergleich zum Wildtyp-SMN festgestellt werden.

5.1 Zellkern-Cytoplasma-Fraktionierung mittels eines modifizierten Roeder-Protokolls

Die korrekte Anreicherung des SMN-Komplexes stellt eine wichtige Voraussetzung für eine spätere Charakterisierung hinsichtlich Komposition und Stöchiometrie dar. Dazu war es zunächst notwendig, eine reproduzierbare und effiziente Zellkern-Cytoplasmafraktionierung zu erreichen. Der SMN-Komplex ist laut verschiedene Publikationen im Cytoplasma und im Kern lokalisiert. Die Lokalisation im Kern konnte durch Immunofluoreszenzstudien, sowohl für das Nukleoplasma, als auch für diskrete Kompartimente des Zellkerns, die sogenannten Gems (Granulate, die mehr als 200 Proteine für das prä-mRNA-Spleißen beinhalten), bestimmt werden [56, 57]. Ein Protein des SMN-Komplexes, Gemin4, ist außerdem im Nukleolus angesiedelt [51]. Bisher gibt es noch keine Veröffentlichungen hinsichtlich der exakten Stöchiometrie und Komposition der im Nukleoplasma und den Gems angereicherten SMN-Komplexe. Es ist vorstellbar, dass sich beide Komplexe grundlegend unterscheiden und aufgrund dessen weitere Aufreinigungsschritte wie z.B. Gradientenzentrifugation angewendet werden müssen, um sie voneinander zu trennen. In vielen Veröffentlichungen wurde bisher die Fraktionierungsmethode von Dignam *et al.* angewendet [1, 56, 167]. In dieser Arbeit konnte jedoch festgestellt werden, dass durch eine mechanische Behandlung der HeLa-Zellen bereits ein großer Anteil an Zellkernen lysiert wird. Dies führt zu einer Vermischung der nukleoplasmatischen und cytoplasmatischen Fraktionen und damit einhergehend zu einer Vermengung vermutlich biochemisch unterschiedlicher SMN-Komplexe. Um dies zu vermeiden wurde das Protokoll mit dem Ziel einer sanften Lyse der Zellen optimiert. Dazu wurden verschiedene Detergentien für die chemisch-physikalische Lyse der Zellwände evaluiert. Am besten hat sich hier die Verwendung von 0,3% NP40 bewährt, welches im Anschluss

an die Vorversuche in allen Fraktionierungen benutzt wurde. Nach Abtrennung des Cytoplasmas durch Zentrifugation, wurde das Pellet in einem HEPES-Puffer (Roeder Puffer A) resuspendiert. Da mit dem Mikroskop noch intakte Zellen erkennbar waren, wurden diese zunächst durch mechanische Lyse mit dem Douncer lysiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt zur Abtrennung einer gemischten Fraktion aus lysierten Kernen und Cytoplasma wurden die Kerne pelletiert und konnten durch Resuspension in einem hochkonzentrierten Salzpuffer und mechanischer Behandlung lysiert werden. Mit der verwendeten Fraktionierungsstrategie wurden alle löslichen ungebundenen Komponenten des Zellkerns entfernt. Die durch den hypertonen Puffer induzierte Osmose führt zu einem Ausstrom des Nukleoplasmas aus den Zellkernen. Membrangebundene Proteine werden dabei nicht angereichert, da sie durch Ultrazentrifugation mit den Zelltrümmern entfernt werden. Inwiefern der SMN-Komplex aus den im Kern enthaltenen Gems befreit werden konnte, kann leider nicht bestimmt werden. Die Gems selbst sind im Nukleoplasma ungebunden enthalten und sollten dahergehend nicht abgetrennt werden. Es ist jedoch möglich, dass aufgrund zu starker Zentrifugationskräfte diese Granulate sedimentiert werden.

Western Blot-Analysen gegen nukleäre (PRP31) und cytoplasmatische Marker (pICln) konnten eine erfolgreiche Zellkern-Cytoplasma-Trennung bestätigen. Auch die Identifikation von unspezifischen Kontaminationen oder noch nicht bekannten Interaktionspartnern durch LC-MS/MS-Analyse konnte diese Aussage unterstützen. So ließen sich in der cytoplasmatischen Fraktion hauptsächlich cytoplasmatische Proteine finden, während ein Großteil der Zellkernfraktion nukleären Proteinen zugeordnet werden konnte. Eine Fraktion von 7 von insgesamt 97 in der Zellkernfraktion identifizierten Proteinen entstammen laut Uniprot-Zuordnung dem Cytoplasma. Dieses Ergebnis kann zustande kommen, wenn Proteine entweder in der Uniprot-Datenbank nicht richtig klassifiziert sind oder durch Stress-bedingtes *Shutteln* während der Aufarbeitung in den Zellkern translokalisieren [171]. In der cytoplasmatischen Fraktion wurden 4 von insgesamt 99 identifizierten Proteinen laut Uniprot dem Nukleus zugeordnet. Auch hier kann die Kategorisierung in der Uniprot fehlerbehaftet sein. Ein Beispiel für eine falsche Klassifikation zeigte sich für alle Sm-Proteine. Laut der Uniprot-Einträge sind alle Sm-Proteine nukleär lokalisiert, es ist jedoch bekannt, dass diese durch den SMN-Komplex im Cytoplasma mit der snRNA assembliert werden, also dementsprechend auch in der cytoplasmatischen Fraktion vorzufinden sind.

Für die Anreicherung von Proteinkomplexen muss bedacht werden, dass Salz- und Detergenzkonzentration möglichst niedrig gehalten werden müssen, um eine Dissoziation der Interaktionspartner zu verhindern. Es ist bekannt, dass der SMN-Komplex bis zu Salzkonzentrationen von 500 mM stabil vorliegt. Höhere Salzkonzentrationen führen zum Verlust von Gemin5, während die anderen Komponenten bis 1,5 M weiter stabil assoziiert sind [siehe Abb. 5.1] [2]. In dem verwendeten modifizierten Roeder-Protokoll wurde mit Salzkonzentrationen bis max. 420 mM KCl gearbeitet. Der Einsatz von Detergentien wurde auf 0,3% NP40 beschränkt, da auch höhere Detergenzkonzentrationen Interaktionen zwischen Proteinen beeinflussen können. Wie in der Literatur beschrieben liegt der SMN-Komplex auch bei Verwendung von 1% NP40 noch unverändert vor [56].

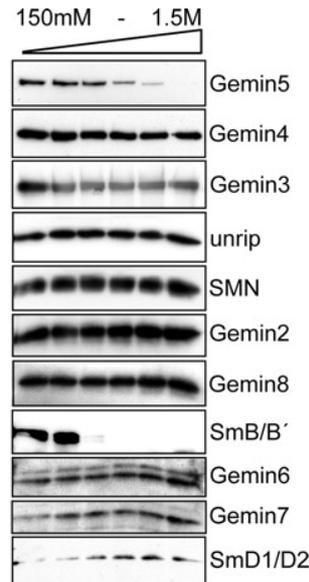


Abb. 5.1: Western Blot Analyse des SMN-Komplexes hinsichtlich Stabilität bei steigenden Salzkonzentration (modifiziert nach [2]): Alle Komponenten des SMN-Komplexes bis auf Gemin5 liegen bis 1.5 M NaCl-Konzentration stabil vor.

5.2 Anreicherung des SMN-Komplexes durch Co-Immunopräzipitation

Nach der Zellkern-Cytoplasma-Trennung musste der SMN-Komplex selbst durch Co-Immuno-präzipitation angereichert werden. Dies wurde über den SMN-Protein-spezifischen Antikörper 7B10 erreicht. Auch dieser Schritt musste hinsichtlich Reinheit der Komplexe und Spezifität der Komplexbestandteile optimiert werden. Allerdings sind verschiedene Literaturstellen bekannt, die durch unterschiedliche Methoden molekularbiologisch unterscheidbare SMN-Komplexe identifizieren konnten.

Meister *et al.* [1] konnten nach der Zellkern-/Cytoplasmafraktionierung nach Dignam *et al.* [167] verschiedene nukleäre Komplexe identifizieren. Dazu wendeten sie zunächst Saccharosegradientenzentrifugation an und konnten dabei den Hauptanteil von SMN in einem 20S-Komplex identifizieren. Nur wenig SMN (<5%) sedimentierte am Boden des Gradienten oder im obersten Teil als vermutlich ungebundene SMN-Proteine. Der angereicherte 20S-Komplex wurde anschließend auf einen schwachen Kationenaustauscher geladen und durch ansteigende Salzkonzentrationen eluiert. Nur 20% des im 20S-Komplex enthaltenen SMN konnte auf der Matrix retardiert werden. Der Großteil des SMN wurde als Durchfluß nicht an die Säule gebunden. Dies beweist, dass innerhalb des Saccharosegradienten bei 20S zwei biochemisch unterscheidbare SMN-Komplexe sedimentieren. Die Komposition des bei 300 mM NaCl eluierten SMN-Komplex wurde durch SDS-PAGE und Western Blots untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Proteine Gemin3, Gemin4, Gemin2 und ein Teil der Sm-Proteine mit dem SMN-Protein interagieren. Außerdem konnten weitere Proteine bestimmt, jedoch nicht zugeordnet werden, da sie zu diesem Zeitpunkt noch nicht mittels MS/MS-Analyse als Komplexbestandteile identifiziert waren. Der zweite biochemisch charakterisierte Komplex wurde nicht weiter untersucht, so dass dessen

Komposition unbekannt ist.

Des Weiteren konnten Fischer *et al.* [172] mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie (SEC) auch für die im Cytoplasma lokalisierten SMN-Komplexe zwei unterscheidbare Komplexe (bei ca. 300 kDa und > 670 kDa) biochemisch anreichern. Auch in diesem Fall wurde nur die Komposition (Gemin2/3/4/5/6, Unrip, Sm-Proteine) des bei ca. 300 kDa eluierten Komplexes durch Zuordnung von Molekulargewichten (ohne massenspektrometrische Identifikation) analysiert. Die Autoren merken an, dass sich aus ihrer per Molekulargewicht geschätzten Zusammensetzung des Komplexes ein wesentlich größeres Gesamt-molekulargewicht ergeben müsste, aber die dichte Assoziation des Komplexes die Elution bei geringeren Molekulargewicht ermöglicht. Ein ähnliches Ergebnis hinsichtlich des Molekulargewichts des cytosolischen SMN-Komplexes wurde ebenfalls in anderen Publikationen gezeigt, wobei hier die Größe auf > 800 kDa bestimmt wurde. Dies ist wahrscheinlich auf eine längere SEC-Säule zurückzuführen, die eine bessere Trennung ermöglicht [51]. Eine andere Publikation zeigt durch Gradientenzentrifugation ermittelte Sedimentationskonstanten für den SMN-Komplex zwischen 40S und 80S, die ebenfalls auf makromolekulare Komplexe im Megadaltonbereich hinweisen [56].

All dies zeigt die Schwierigkeit, definierte SMN-Komplexe aus Zellkernen oder Cytoplasma anzureichern. In dieser Arbeit wurden weder SEC noch Saccharosegradienten angewendet, so dass eine Trennung unterschiedlicher cytoplasmatischer oder nukleärer Komplexe nicht gewährleistet werden kann. Die Schwierigkeit bei der Verwendung von Saccharosegradientenzentrifugation in Verbindung mit LC-MS ist die Inkompatibilität der Saccharose mit dem tryptischen Verdau sowie der Separierung mittels HPLC. Hier konnte festgestellt werden, dass Saccharose den enzymatischen Verdau komplett inhibiert. Auch die Retardierung dieses Reagenz auf der RP-Matrix verhindert eine reproduzierbare hochauflösende HPLC-Auftrennung. Da weitere Reinigungsschritte häufig in großen, nicht kalkulierbaren Verlusten von Proteinen resultieren, wurde auf einen Saccharosegradienten verzichtet.

Die Anreicherung von Proteinkomplexen stellt häufig eine große Schwierigkeit dar, da viele Proteine an mehreren funktionellen Einheiten in der Zelle involviert sind oder auch die Anreicherung von Intermediaten des vollständigen Komplex nicht auszuschließen sind. Auch für den SMN-Komplex werden stets neue Aufgaben, als lediglich die U snRNP-Assemblierung diskutiert. Es gibt u.a. Veröffentlichungen, die SMN als Initiator für das Motorneuronenwachstum sehen und damit einen direkten Zugang zu dem gewebsspezifischen Phänotypen von SMA knüpfen. Die Aussagen sind allerdings kritisch zu betrachten, da bisher keine eindeutigen experimentellen Beweise für diese These erbracht werden konnten. Im Gegenteil, es wurden viele Patientenmutationen (Y272C, E134K) festgestellt, die einen direkten Einfluss auf Interaktionspartner des SMN-Komplexes haben und damit die Verknüpfung zur U snRNP-Assemblierung belegen [173, 174].

Des Weiteren gibt es einige Veröffentlichungen, die mittels Gradientenzentrifugation verschiedene Subkomplexe nachweisen konnten. So wurde z.B. festgestellt, dass es einen Gemin6-Gemin7-Unrip-Subkomplex gibt, der nicht direkt an SMN assoziiert ist. Außerdem wurde ein Intermediat identifiziert, welches aus den Proteinen Gemin3, Gemin4 und Gemin5 besteht ohne direkte Interaktion an den SMN-Komplex. Auch die beiden Hauptkomponenten des SMN-Komplexes,

SMN selbst und Gemin2, bilden einen intermediären Subkomplex [51, 175]. Aufgrund dieser Tatsachen ist es sehr schwer, selbst durch die Verwendung von Gradientenzentrifugation, alle Unterkomplexe sauber voneinander zu trennen. Häufig unterscheiden sich diese Komplexe nicht ausreichend stark, dass sie distinkte Svedbergwerte aufweisen. Man sieht eher ein Schmierer der unterschiedlichen Komplexe über mehrere Bereiche hinweg. Für die saubere Trennung aller Komplexe voneinander müssten Protokolle etabliert werden, die verschiedene monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche Komponenten des SMN-Komplexes verwenden. Eine quantitative Aufarbeitung kann damit jedoch nicht gewährleistet werden, da zuviele Probenaufarbeitungsschritte häufig zum Verlust von Proteininteraktoren führen. Durch die Bestimmung der absoluten Gesamtmenge jedes einzelnen Proteins könnten evtl. die Subkomplexe per Western Blot-Analyse relativ quantifiziert und damit stöchiometrisch charakterisiert werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführte Co-Immunopräzipitation wurde ein monoklonaler Antikörper (7B10) verwendet, der spezifisch SMN anreichert, in dem er die ersten 30 Aminosäuren am N-Terminus des SMN-Proteins als Epitop erkennt [1]. Aufgrund der nativen Bedingungen, wurden alle Interaktionspartner indirekt mit aufgereinigt. Andere Arbeitsgruppen verwenden einen anderen Antikörper: 2B1 [37]. Die in verschiedenen Publikationen erwähnten Unterschiede beider Antikörper zeigen sich sowohl hinsichtlich der Stöchiometrie einiger Komponenten (Gemin5, Unrip), als auch in funktionellen Studien z.B. bzgl. der Inhibition der Initiation des Spleißosoms [1, 176]. Es wird vermutet, dass beide Antikörper unterschiedliche Epitope im SMN ansprechen und dadurch voneinander verschiedene strukturelle Veränderungen des Antigens verursachen. Damit einhergehend kann die Bindung zu anderen Interaktionspartnern modifiziert werden und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Um einen Überschuss an Antikörper im Eluat zu vermeiden, wurde eine kovalente Kopplung des Antikörpers an die Protein-G-Sepharose-Matrix verwendet. Dadurch verbleibt dieser während der Elution mit SDS auf der Matrix. Andernfalls ist die Konzentration des Antikörpers im Eluat häufig enorm und interferiert sehr stark mit den LC-MS-Analysen. Im Anschluß an die Immunopräzipitation der SMN-Komplexe wurde ein SDS-Gel angefertigt, die Komponenten mit Silberfärbung visualisiert, um die Proteine durch tryptischen Verdau und anschließende LC-MS/MS-Analyse zu identifizieren. Es konnten alle bisher bekannten Komponenten (SMN, Gemin2-8, Unrip, SmB/B', SmD1-D3, SmE, SmF, SmG) des Komplexes identifiziert werden. Bereits nach der 1D-PAGE-Analyse war ein sehr hoher Hintergrund unspezifischer Interaktionen erkennbar, auch durch die LC-MS/MS-Analyse wurden viele unspezifische Kontaminationen oder noch unbekannte Interaktionspartner identifiziert. Der hohe Hintergrund erschwerte eine akkurate Quantifizierung der eigentlichen Komponenten, da die Intensitäten der verwendeten Proteinmengen im Vergleich zu anderen Proteinen zu gering waren. Es konnte jedoch auch nicht mehr Ausgangsmaterial für die LC-MS-Analysen eingesetzt werden, da dies zu einer Überladung des RP-Material geführt und damit die Reproduzierbarkeit der Analysen beeinträchtigt hätte. Bei der Verwendung von Sepharose- oder Agarose-basierten Matrices sieht man häufig eine Anreicherung von unspezifischen Proteinen, wie Tubulinen oder anderen hoch abundanten Proteinen der Zelle, die direkt auf der Matrix präzipitiert werden. Andere unspezifische Interaktionen kommen zustande, wenn Proteine unterschiedlicher Subkompartimente mit verschiedenen

Funktionen trotzdem eine unspezifische Affinität zueinander besitzen. Wenn nach der Lyse diese Subkompartimente vermischt werden, interagieren diese Proteine mit den eigentlichem Antigen und dessen Co-Interaktoren und simulieren eine spezifische Interaktion [177].

Um diese unspezifischen Interaktionen zu verringern, kann man höhere Salzkonzentrationen im Waschpuffer verwenden, die die Bindung an die Matrix oder den Antikörper hemmen. Es muss jedoch bedacht werden, dass höhere Salzkonzentration auch zum Verlust spezifischer, aber schwach gebundener Interaktoren führen könnten, weshalb hier nur mit 280 mM NaCl gearbeitet wurde. Der Hintergrund konnte damit verringert und mehr Ausgangsmaterial eingesetzt werden, um die SMN-Komplexproteine zu quantifizieren.

5.3 Expression und Reinigung des *in vitro* gebildeten rekombinanten SMN-Komplexes

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit umfasste die Bestimmung des Einflusses bekannter SMA-Patientenpunktmutationen im *SMN1*-Gen auf die Stöchiometrie des zentralen SMN-Komplexes (bestehend aus SMN, Gemin2, Gemin6, Gemin7 und Gemin8). Die rekombinanten Proteinkomponenten des SMN-Komplexes wurden in Zusammenarbeit mit der AG Fischer (Biochemie, Universität Würzburg) zunächst in *E.coli* exprimiert. Für die spätere Aufreinigung der Proteine aus den Zellysaten, wurden entsprechende Affinitäts-*Tags* eingeführt. Im SMN-Protein wurde ein GST-*Tag* integriert, der eine Bindung an eine Glutathion-Sepharose erlaubt. Das Protein Gemin6 besitzt einen Hexa-His-*Tag*, der die Reinigung mit einer Nickel-Nitrillessigsäurematrix ermöglicht. Es muss in Betracht gezogen werden, dass solche strukturellen Veränderungen der Proteine, eine korrekte Faltung verhindern bzw. bestimmte Interaktionsflächen für andere Proteine maskieren können. Auch die Herstellung von humanen Proteinen in Bakterienzellen stellt eine gewisse Hürde dar, da für die Interaktion bedeutsame post-translationale Modifikationen in *E.coli* nicht eingeführt werden, ebenso kann eine korrekte strukturelle Faltung der Proteine in solchen Spezies-fremden Zellen beeinträchtigt sein. All dies kann in der späteren Quantifizierung des SMN-Komplexes zu Fehlaussagen führen, die nicht der natürlichen Stöchiometrie entsprechen.

Um diese Hindernisse zu umgehen und die Aussagekraft solcher Analysen zu bestärken, ist es sinnvoll, stets N- sowie C-terminale getaggte Proteine zu produzieren. Diese können dann getrennt aufgearbeitet und analysiert werden. Die individuell erhaltenen Ergebnisse werden dann gegenüber gestellt, auf Vergleichbarkeit geprüft und diskutiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Komplexe setzten sich aus dem SMN-*Core*-Komplex bestehend aus den Proteinen SMN, Gemin2, Gemin6, Gemin7 und Gemin8 zusammen. Die *E.coli*-Expression der weiteren Interaktoren wie Gemin3, Gemin4 und Gemin5 konnte nicht erreicht werden, da sie aufgrund ihres hohen Molekulargewichts nicht im solubilisierten Zustand aufgereinigt werden konnten. Auch in diesem Fall ist es vorstellbar, dass bestimmte PTMs oder unterstützende Faltungsproteine (Chaperone) notwendig sind, um diese Proteine in Lösung zu bringen.

Der bereits erwähnte Sub-Komplex aus Gemin6, Gemin7 und Unrip, kann ebenfalls eine Ver-

schiebung der Stöchiometrie verursachen. Zwar war das Protein Unrip in den gewählten Komplexen nicht anwesend, trotzdem ist es möglich dass auch die Proteine Gemin6 und Gemin7 allein ein Intermediat ausbilden, welches nicht an SMN gebunden ist. In der Literatur wird ein Heterodimer bestehend aus Gemin6 und Gemin7 beschrieben, welches strukturell den Sm-Proteinen ähnelt. Die Reinigung des Komplexes durch GST-*Pulldown* über das Protein SMN, sollte solche Interferenzen jedoch ausschließen.

Zwei der rekombinanten SMN-Komplexe besitzen Aminosäuresubstitutionen, die aus SMA-Patienten bekannt sind. Eine dieser Mutation ist die Y272C-Mutante, bei der das Tyrosin an Position 272 durch ein Cystein ersetzt wurde. Die Mutation ist verbunden mit der schwersten Form von SMA (SMA Typ I) und ist die häufigste Punktmutation von *SMN1* (20%) [178] in Verbindung mit dieser Erkrankung. Verschiedene Veröffentlichungen diskutieren, dass Y272C die Selbstoligomerisierung von SMN zerstört, damit einhergehend die Komplexformation verhindert und eine U snRNP-Assemblierung unterdrückt [28, 176, 179]. Zudem ist bekannt, dass der Bereich zur Bindung des Proteins Gemin8 zwischen den Aminosäuren 242 und 298 liegt, d.h. genau in der Region in der sich auch die Mutation befindet [2].

Im zweiten rekombinanten Patientenmutationskomplex ist ebenfalls eine Aminosäuresubstitution enthalten. Diese betrifft die Glutaminsäure 134, die durch ein Lysin ersetzt wurde. Problematisch ist dabei die Einführung einer zweiten tryptischen Aminosäure, die direkt an das zur absoluten Quantifizierung verwendete Peptid ETCVVVYTGYNR anschließt. Direkt aufeinander folgende tryptische Schnittstellen resultieren häufig in überlesenen Schnittstellen oder nicht quantitativ geschnittenen Peptiden. Eine Genauigkeit der Quantifizierung der E134K-Mutante mittels dieses AQUA-Peptids konnte also nicht gewährleistet werden.

5.4 Optimierung der Probenvorbereitung für die quantitative Analyse

5.4.1 Elution von der Präzipitationsmatrix

Die endogenen Proteinkomplexe mussten für die anschließende Analyse zunächst quantitativ von der Affinitätsmatrix eluiert werden. Dazu wurden verschiedene Methoden validiert, die eine reproduzierbare und effiziente Elution der Proteine von der Matrix bewirken sollten. Der Versuch die leichte Kette des Antikörpers durch Carbamidomethylierung von der schweren Kette zu trennen, um damit die Bindung zum Epitop des SMN-Proteins zu unterdrücken, hat nicht funktioniert. Die 1D-PAGE-Analyse zeigte zwar die Elution der schweren und leichten Kette, aber keine weiteren Proteine des Komplexes. Durch die Abspaltung der leichten Antikörperkette wurde die Antigen-*Binding site* des Antikörpers offenbar nicht ausreichend verändert, um dessen Bindung an SMN zu schwächen. Die Ursache für dieses Verhalten, könnte darin begründet sein, dass nur die freien Antikörper durch DTT und IAA umgesetzt wurden, während die mit SMN interagierenden Antikörper nicht frei zugänglich für diese chemische Reaktion waren und deshalb auch nicht carbamidomethyliert worden sind.

Ein ähnliches Verhalten konnte beim direkten tryptischen Verdau (nach Carbamidomethylierung) von der Matrix beobachtet werden. Die 1D-PAGE-Analyse zeigte zum Großteil unvollstän-

dig verdauter Proteine. Die enge Assoziation der Proteine im SMN-Komplex könnte dazu führen, dass diese für den enzymatischen Verdau mit Trypsin nicht zugänglich sind, welches selbst ein Molekulargewicht von 21 kDa und damit eine gewisse räumliche Ausdehnung hat. Die Erhöhung des Trypsin-zu-Protein-Verhältnisses oder eine Zugabe von Detergentien zur strukturellen Entfaltung des Proteinkomplexes hätten möglicherweise die Ausbeute des Verdau deutlich verbessern können. Allerdings werden durch hohe Konzentrationen an Trypsin oft unspezifische Schnittstellen verursacht, die eine akkurate Quantifizierung stark beeinträchtigt hätten. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass durch hohe Mengen an Trypsin- und Antikörperpeptiden der Hintergrund während der massenspektrometrischen Analyse zu hoch gewesen wäre, um eine sensitive Quantifizierung von niedrig abundanten Komplexpeptiden zu gewährleisten.

1D-PAGE-Analyse der ACN/TFA-Elution erbrachte ebenfalls kein zufriedenstellendes Ergebnis hinsichtlich Effizienz der Elution, da auch hier keine Proteine eluiert wurden. Es ist anzunehmen, dass diese aufgrund der organischen Eigenschaften des Lösungsmittels und des niedrigen pHs auf der Matrix irreversibel präzipitiert sind und deshalb nicht im Elutionspuffer solubilisiert waren.

Unter weniger stringenten Bedingungen wie bei der pH-Elution mit einem Glycin-Puffer, konnte ein besseres Ergebnis erzielt werden. Die 1D-PAGE-Analyse zeigte eine Elution des SMN-Komplexes von der Matrix, während als Kontrolle die Matrix selbst mit persistierenden Proteinen diente. Dabei konnte ein großer Anteil nicht eluierter Proteine auf der Matrix nachgewiesen werden. Da für die quantitative Analyse jedoch möglichst eine vollständige Elution erreicht werden muss, wurde diese Methode verworfen.

Die herkömmlichste Methode stellt die Elution mit SDS dar [180]. Dafür wurde die Matrix bei 95°C aufgekocht und der Überstand abgenommen. Wie man in Abb. 4.12 erkennen kann, konnte so eine effiziente Elution erreicht werden. Das Ergebnis konnte durch eine längere Inkubationszeit, sowie einem anschließenden Waschschrift mit 1xPBS-Puffer verbessert werden [siehe Abb. 4.21]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Elution mit SDS quantitativ war. Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass Protein unterhalb der Detektionsgrenze der Silberfärbung auf der Matrix retardiert wurde.

5.4.2 Entfernen von LC-MS-inkompatiblen Detergentien in der Probe

Aufgrund der Verwendung eines SDS-haltigen Puffers mussten weitere Probenvorbereitungsschritte unternommen werden, um das ionische Detergenz möglichst quantitativ vor der LC-MS/MS-Analyse aus den Proben zu entfernen. Zum einen inhibiert SDS den tryptischen Verdau, da es Trypsins denaturiert und damit dessen Tertiär- und Quartärstruktur zerstört [181]. Zum anderen wechselwirkt es stark mit der HPLC-Auftrennung, da es aufgrund seiner stark sauren Gruppe an die RP-Matrix bindet und so mit der Wirkung eines Ionenaustauschers, die Retardierung der Peptide unterdrückt. Im Laufe mehrerer HPLC-Läufe mit SDS-haltigen Proben kommt es folglich zu starken Retentionszeitverschiebungen. Dieses Verhalten verhindert eine akkurate Quantifizierung von Peptiden, welche auf einer hochauflösenden und reproduzierbaren LC-Auftrennung beruht [182].

Da SDS in Lösung Mizellen ausbildet, kann es nicht durch Dialyse entfernt werden. Aus diesem

Grund wurden verschiedene Fällungsprotokolle ausgetestet, die eine Präzipitation der Proteine bei gleichzeitiger SDS-Deletion bewirken. Nach Pelletierung der Proteine kann der Überstand inklusive des Detergenz entfernt werden. Das Proteinpellet muss wieder gelöst und die solubilierten Proteine im Anschluss mit Trypsin verdaut werden.

Eine Methode um Proteine zu fällen, ist die Verwendung von Trichloressigsäure [183]. Durch die Verwendung von Säuren werden die Ladungsverhältnisse innerhalb des Proteins verändert. Durch Protonierung der Proteine können große Anionen angelagert werden (Trichloracetat), die die Löslichkeit der Proteine herabsetzen. Damit wird das Protein irreversibel denaturiert [184] und ausgefällt. Die TCA-Präzipitation wurde anhand eines Standardproteinmix getestet und resultierte in einem Verlust von Proteinen geringeren Molekulargewichts (β -Lactoglobulin mit ca. 19 kDa, Verlust ca. 50 %). Dieser Effekt wird am deutlichsten bei der Fällung von sehr kleinen Proteinmengen ($< 5 \mu\text{g}$). Das Defizit kann daher rühren, dass kürzere Proteine aufgrund fehlender komplexer struktureller Merkmale eine höhere Löslichkeit besitzen als größere, strukturell anspruchsvollere Proteine und dadurch nicht effektiv präzipitiert werden. Andererseits ist es auch möglich, dass aufgrund der Irreversibilität der Fällung (Zerstörung der Tertiär- und Quartärstruktur) Proteine nicht mehr vollständig gelöst werden können.

Eine Alternative der irreversiblen Präzipitation von Proteinen ist die reversible Fällung mittels organischen Lösungsmitteln. Dadurch wird primär der Hydratationszustand des Proteins verändert und damit einhergehend nicht-kovalente Wasserstoffbrückenbindungen zerstört. Dies wird durch die Apolarität der organischen Lösungsmittel hervorgerufen [185]. In Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Verwendung von Acetonitril eine effektive Methode darstellt, um Proteine zu präzipitieren. Zwar ist auch hier ein Verlust von Proteinen erkennbar (Verlust bei allen Proteinen des Standardproteinmix ca. 20 %), dieser ist jedoch relativ unabhängig vom Molekulargewicht und findet für alle Proteine im ähnlichen Verhältnis statt [siehe Abb.4.15 in Kap.4].

Neben der irreversiblen und reversiblen Fällung von Proteinen wurden außerdem Membranfiltereinheiten getestet, bei denen die Entfernung von SDS auf einem Pufferaustausch beruht. Die verwendeten Filter verhindern ein Austrocknen der Probe, es bleiben stets 10 bis 30 μL auf der Membran zurück. Durch mehrmaliges Verdünnen des Rückstandes mit Detergenz-freiem Puffer wird der Gehalt an SDS allmählich verringert. Auch diese Methode ist für die meisten Proteine sehr effektiv. Der beobachtete Verlust war in diesem Fall im Vergleich mit den Fällungstechniken am geringsten ($< 10\%$ für Proteine $> 20 \text{ kDa}$). Allerdings konnte auch hier eine enorme Beeinträchtigung kleiner Proteine festgestellt werden. Obwohl die verwendeten Filter einen sogenannten Massen-Grenzwert von 10 kDa besitzen, wurden auch Verluste größerer Proteine (β -Lactoglobulin mit ca. 19 kDa, Verluste bis 50 %) beobachtet. Grundlegend basiert die Separierung auf dem Molekulargewicht, aber natürlich spielt die dreidimensionale Struktur der Proteine eine große Rolle. Besonders dicht gepackte Proteine können aufgrund ihrer geringen räumlichen Ausdehnung trotz höherem Molekulargewichts durch die Poren verloren gehen. Auch die Verwendung von Detergentien beeinflusst die Permeabilität der Membran. Durch das enthaltene SDS können auch größere Proteine durch die Poren diffundieren.

Wisniewski *et al.* [186] entwickelten auf Basis dieser Methode eine universelle Probenvorberei-

tungsanwendung, bei der Carbamidomethylierung und tryptischer Verdau direkt in den Reaktionsgefäßen auf der Membran statt finden. Sie benutzten dazu ebenfalls 10 kDa Ausschlußmassenfilter. Für den in dieser Arbeit verwendeten Standardproteinmix konnte die Effektivität und Reproduzierbarkeit der Methode nicht nachgewiesen werden. Es ist natürlich möglich, dass durch die Anwesenheit von komplexeren Proben eine höhere Effizienz durch einen Matrixeffekt erreicht werden kann.

Für die folgenden Quantifizierungen wurde die reversible Präzipitation der Proteine mit ACN gewählt. Nach Zentrifugation und Waschen mit Aceton wurde das Proteinpellet mit einem 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer und 200 mM Guanidiniumhydrochlorid wieder solubilisiert. Dazu wurden die Proben 30 min bei 37°C inkubiert. Wie in Abb. 4.21 zu erkennen, konnten die Proteine quantitativ eluiert, gefällt und resolubilisiert werden.

5.4.3 Minimierung von Adsorptionseffekten niedrig abundanter Peptide an Oberflächen

Für die folgenden LC-MS/MS-Analysen zur Quantifizierung der SMN-Komplexe wurden jeweils nur sehr geringe Probenmengen eingesetzt. Die geringe Komplexität der Proben und die niedrigen Protein- bzw. nach tryptischen Verdau Peptidkonzentrationen resultieren oft in einem Verlust durch Adhäsion an Oberflächen. Dies beeinträchtigt nicht nur die Detektions- bzw. Bestimmungsgrenze, sondern schränkt auch den linearen Bereich von Standardkonzentrationsreihen stark ein, da diese erst mit höheren Konzentrationen eine lineare Abhängigkeit (Signal - Peptidmenge) aufweisen. Bei zu geringen Konzentrationen ist der Verlauf durch Adhäsion zunächst flacher.

Komplexe Realproben weisen häufig eine hohe Gesamtpeptidkonzentration auf, so dass hier der Einfluss zu vernachlässigen ist. Man kann davon ausgehen, dass alle in einer komplexen Probe enthaltenen Peptidsequenzen eine Affinität zu Oberflächen aufweisen und somit der Verlust pro Peptidsequenz unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Sind nur wenige sehr gering konzentrierte Peptide in einer Probe enthalten, so wird der Verlust für jede Sequenz detektierbar. Allerdings ist die Affinität abhängig von den physikochemischen Eigenschaften der Peptide. Besonders hydrophobe Peptide zeigen einen Verlust an Oberflächen. Der Vorteil stabilisotopenmarkierter Peptide liegt in der Möglichkeit, sie direkt zur Realprobe zu geben, so dass der Einfluss durch die Matrix vernachlässigt werden kann, da sich synthetisches und endogenes Peptid analog verhalten sollten. Werden quantitative Daten durch aufeinander folgende und damit getrennten Messungen von Realprobe und synthetischen Peptiden erfasst, ist der Fehler durch die unterschiedlichen Matrices möglicherweise sehr hoch.

Um den Verlust von Peptiden an reaktiven Oberflächen zu verringern, kann man sogenannte *LoBind*-Gefäße verwenden. Diese sind aus wenig adhäsivem Kunststoff (laut Hersteller eine spezielle Polypropylensorte) hergestellt, der nur eine geringe Affinität zu Peptiden aufweist. Der Vorteil von *LoBind*-Reaktionsgefäßen im Vergleich zu normalen Reaktionsgefäßen konnte gezeigt werden [siehe Abb.4.18 in Kap.4]. Die Verwendung dieser speziellen Reaktionsgefäße kann jedoch nicht verhindern, dass Peptide während der HPLC-Auftrennung verloren gehen. Zwar werden heutzutage immer häufiger bioinerte Anlagen aus Titanium oder anderen speziellen

Legierungen verwendet, nichtsdestotrotz können Peptide z.B. in den PEEK- oder *Fused Silica*-Kapillaren adhären. Der Verlust niedrig abundanter Peptide kann durch einen Hintergrund höher abundanter Peptide verringert werden. Es ist möglich einen BSA-Verdau innerhalb der wenig komplexen Proben zu verwenden, um die Oberflächen innerhalb der Reaktionsgefäße und HPLC mittels des hoch abundanten BSAs abzusättigen. Häufig interferieren Proteinverdau jedoch mit der LC-MS/MS-Analyse der Probe, da sie eine Vielzahl an Peptiden beinhalten, die möglicherweise eine höhere Konzentration als die zu analysierenden Peptide haben und dementsprechend bevorzugt für die Fragmentierung ausgewählt werden. Auch in zielgerichteten Methoden wie MRM steigt die Wahrscheinlichkeit Peptidionen und Fragmentionen gleicher m/z in der Probe zu generieren, die dann mit dem MS-Signal wechselwirken und die quantitative Aussage verfälschen.

Um diesen Effekt zu minimieren, wurde in dieser Arbeit ein einzelnes stark hydrophobes Peptid (Glucagon), mit dem Ziel Oberflächen in Reaktionsgefäßen und HPLC zu belegen, eingesetzt. Im Laufe der weiteren Analysen zeigte sich jedoch, dass das MS-Signal von Glucagon mit einigen spät eluierenden AQUA-Peptiden interferiert und damit die quantitative Analyse beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde nach weiteren kommerziell erhältlichen Peptiden oder kleineren Proteinen gesucht, die eine hohe Hydrophobizität besitzen. Melittin ist ein natürlich vorkommendes Peptid, welches aus Bienengift gewonnen werden kann. Laut des TheorChromo-Algorithmus [170] zur Vorhersage der Retentionszeit innerhalb des verwendeten RPLC-Gradienten wird Melittin später von der RP-Säule eluiert als Glucagon. Die MS-Analyse konnte dies bestätigen. Melittin wurde zudem nicht während der MRM-Analysen detektiert und konnte den linearen Bereich der Verdünnungsreihen erweitern und die Bestimmungsgrenze einzelner Peptide herabsetzen [siehe Abb.4.18 in Kap.4]. Im Laufe der weiteren LC-MS/MS-Analysen wurde stets 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Melittin eingesetzt.

Da Melittin durch den tryptischen Verdau ein ebenfalls stark hydrophobes tryptisches Peptid freisetzt, kann es auch bereits sehr früh in der Probenvorbereitung von niedrig abundanten Proteinen eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde dieser Einfluss ebenfalls untersucht, es konnte jedoch kein Unterschied zu Melittin-freien Referenzproben ermittelt werden. Die endogenen aus Zelllinien angereicherten SMN-Komplexe weisen einen hohen unspezifischen Proteinhintergrund auf, der Proteinverluste verringert und die rekombinanten SMN-Komplexe besitzen selbst eine genügend hohe Proteinkonzentration, so dass in beiden Fällen der Einsatz von Melittin die Wiederfindungsrate der Peptide nicht merklich erhöht.

5.4.4 Vorbereitung der synthetisch erzeugten AQUA-Peptide

5.4.4.1 Konzentration der AQUA-Peptide

Die ausgewählten Peptidsequenzen wurden als Auftragssynthese durch die Firma Thermo Fisher Scientific als stabilisotopenmarkierte Peptide hergestellt. Die Peptide wurden in jeweils 10 Aliquots à 1 nmol mit je 200 μL geliefert. Die angegebene Konzentration wurde durch eine zusätzliche Aminosäureanalyse verifiziert. Im Durchschnitt lagen die Abweichungen bei $\pm 15,6\%$, wobei bis auf wenige Ausnahme immer höhere Konzentrationen als die angegebenen Werte ermittelt wurden. Für das Peptid SMN2 lag der Wert um das 1,4fache höher als die berichteten

5 pmol/ μ L. Dies kann einerseits auf Fehler während der Aminosäureanalytik zurückzuführen sein oder basiert auf Löslichkeitseffekte des entsprechenden Peptids.

Um diese Problematik zu umgehen, entwickelten Holzmann *et al.* [164] eine entsprechende Methode, die es ermöglicht, äquimolare Mischungen der synthetischen Peptide herzustellen. Dazu wurden diese mit einem *Equalizer*-Peptid versehen, welches durch den tryptischen Verdau freigesetzt wird. Durch Abgleich dieses stabilisotopenmarkierten *Equalizer*peptids mit einem analogen leichtem Peptid können alle Peptidaliquots entsprechend synchronisiert werden. Damit wird gewährleistet, dass bei der anschließenden Verdünnung der synthetischen schweren Peptide mit dem Probenverdau äquimolare Mengen der eingesetzten Peptide verwendet werden.

5.4.4.2 Löslichkeit der AQUA-Peptide

Um die Löslichkeit der einzelnen Peptide zu optimieren, wurden zu Beginn der Quantifizierung die einzelnen Aliquots, sowie die kombinierten Peptidgemische intensiv gevortext und mit Ultraschall behandelt. Im Laufe dieser Arbeit konnte jedoch festgestellt werden, dass einige Peptide keine distinkten Peaks bei der RP-Auftrennung zeigten [siehe Abb.4.24 in Kap.4]. Durch nähere Untersuchung konnte als Ursache die Ultraschallbehandlung identifiziert werden, weshalb in folgenden Experimenten auf diese verzichtet wurde.

Um die Löslichkeit der Peptide heraufzusetzen, wurde in Anlehnung an Schmidt *et al.* [139] jeweils ein Aliquot pro Peptid durch Gefriertrocknung lyophilisiert und anschließend in 100% Acetonitril resuspendiert. Ein Vergleich zu den „normal“ behandelten Peptidlösungen zeigte jedoch wesentlich geringere Intensitäten der lyophilisierten und resuspendierten Peptidmixturen [siehe Abb.4.22 in Kap.4]. Dieses Ergebnis steht zwar im Widerspruch zu der zitierten Veröffentlichung [139], kann jedoch durch Verluste während der Lyophilisation und/oder durch Präzipitationseffekte in der organischen Matrix begründet werden.

Im weiteren Vorgehen wurden die Peptide stets nur vorsichtig gevortext, ohne sie jedoch einer Ultraschallbehandlung zu unterziehen, um ungewollte Peptidrückgratbrüche zu unterdrücken bzw. die Ausbildung von strukturellen Intermediaten zu verhindern, die eine akkurate Quantifizierung beeinträchtigen.

5.4.5 Sprayinstabilitäten der 4000 Q Trap

Voraussetzung für eine akkurate Quantifizierung ist, neben einer reproduzierbaren Probenvorbereitung, ein stabiles und reproduzierbares LC-MS/MS-System. Für die Gewährleistung einer reproduzierbaren HPLC wurden bei jedem Wechsel der Säule zunächst LC-MS-Läufe durchgeführt, um die Säulen entsprechend abzusättigen (mit 1 μ g/mL Melittin). Außerdem wurden die synthetischen AQUA-Peptide in Testläufen vermessen und die Reproduzierbarkeit der jeweiligen Retentionszeiten geprüft.

Einen signifikanten Einfluss auf eine akkurate Quantifizierung hat, neben der reproduzierbaren HPLC, auch die Stabilität des nano-ESI-Sprays. Bei Messungen mit der 4000 Q Trap konnten jedoch starke Schwankungen in der Spraystabilität (gemessen am MS-Hintergrundrauschen) während eines LC-MS-Laufs verzeichnet werden. Außerdem konnte ein rapider Einbruch und

eine verzögerte Wiederherstellung eines stabilen Grundrauschens nach Durchbruch der 0,1%-TFA (Schalten der Vorsäule in den Hauptsäulenfluss) festgestellt werden. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurde über ein T-Stück mit einem Fluss von 100 nl/min Lösungsmittel B (0,2% FA, 84% ACN) zum Hauptsäulenfluss *post column* durch eine zweite HPLC-Pumpe und einem eigens konstruierten *Flow splitter* zugeführt. Durch diese Modifikation konnte ein stabiles Spray (Hintergrundrauschen) während des gesamten LC-MS-Laufs gewährleistet werden. Natürlich wurden aber durch die Vergrößerung des Totvolumens nach der Säule durch das verwendete T-Stück die Peakhalbwertsbreiten leicht erhöht, sowie die Sensitivität durch Erhöhung der Gesamtflussrate herabgesetzt.

5.5 Quantifizierung des endogenen SMN-Komplexes

Für die Synthese der stabilisotopenmarkierten Peptidanaloga mussten zunächst für die absolute Quantifizierung geeignete Peptidsequenzen ausgewählt werden. Dazu wurden die SMN-Komplex-Proben (nativ und rekombinant) mit einem 4000 Q TRAP Massenspektrometer über LC-MS/MS-Experimente analysiert. Die erhaltenen MS/MS-Spektren wurden mittels des MASCOT™-Algorithmus gegen eine humane SwissProt-Datenbank (Nov. 2009) gesucht. Die identifizierten Peptide wurden hinsichtlich Spektrenqualität (z.B. alle prominenten Signale annotiert), überlesener Schnittstellen, post-translationaler Modifikationen und Retentionszeit manuell evaluiert. Dazu sollten möglichst viele der in Tabelle 5.1 erwähnten Kriterien zutreffen.

Tab. 5.1: Kriterien zur Auswahl geeigneter tryptischer Peptide für die Quantifizierung.

| Nr. | Kriterium | betroffene AS |
|-----|---|----------------------------|
| 1 | Peptide sollten zwischen 6 und 20 Aminosäuren lang sein (besser: 8-15 AS) | alle |
| 2 | Die Molekulargewichte der Peptide sollten idealerweise zwischen 700 und 2000 Da liegen. | alle |
| 3 | Die ausgewählten Peptide sollten möglichst keine chemisch reaktiven Seitenketten enthalten. | C,M,W |
| 4 | Außerdem sollten die zur Quantifizierung verwendeten Peptide keine chemisch instabilen Seitenketten besitzen. | NG,DG,QG,N-term N,N-term Q |
| 5 | Es sollten keine „LC-inkompatiblen“ Peptide (früh oder spät im Gradienten eluierende Peptide) verwendet werden. | alle |
| 6 | Keine Peptide, die ein R angrenzend an ein P besitzen, da dies potentielle überlesene Schnittstellen darstellen. | RP |
| 7 | R-terminierende sind K-terminierenden Peptiden bevorzugt auszuwählen, da Guanidierung von K zu Homoarginin führen kann. | K |

Tab. 5.1: Fortsetzung

| Nr. | Kriterium | betroffene AS |
|-----|--|---------------|
| 8 | Die Peptide sollten keine bekannten post-translationalen Modifikationen besitzen und auf potentielle PTMs massenspektrometrisch untersucht werden. | alle |
| 9 | Die ausgewählten Peptide sollten definierte tryptische Schnittstellen besitzen und keine benachbarten Ks und/oder Rs aufweisen. | K,R |
| 10 | Die Gruppe der gewählten Peptide sollte abschließend geBLASTet werden, um ihre Einzigartigkeit in der verwendeten Spezies/Probe nachzuweisen. | alle |

Die Identifizierung von überlesenen Schnittstellen ist abhängig vom m/z der erzeugten Peptide. Dies hängt mit dem eingeschränkten Massenbereich der Massenanalytoren zusammen. Außerdem zeigen sehr große Peptide häufig eine starke Retardierung und sehr späte Elution in der HPLC-Auftrennung, während sehr kleine Peptide bereits sehr früh im Gradienten eluieren bzw. bereits durch das Waschen der Vorsäule verloren gehen oder während der MS/MS-Auswertung nicht eindeutig identifiziert werden können (bei kürzeren Sequenzen sinkt die Wahrscheinlichkeit ihrer Einzigartigkeit - falsch positive Identifikationen sind gehäuft). Diese Faktoren verhindern die Analyse sehr großer ($MW > 3$ kDa) und sehr kleiner Peptide ($MW < 500$ kDa). Es ist daher nicht eindeutig auszuschließen, dass die gewählten Peptide unvollständig durch das Verdauenzym Trypsin prozessiert werden.

Ferner ist es schwierig post-translationale Modifikationen zu identifizieren. Viele der bekannten Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen kommen in den betroffenen Proteinen nur substöchiometrisch vor, d.h. die entsprechende Aminosäure ist nur in einem sehr geringen Teil der Proteinspezies modifiziert. Um post-translationale Modifikationen zu identifizieren ist es daher in den meisten Fällen unabdingbar eine Anreicherung der modifizierten Spezies vorzunehmen. Da neben der Phosphorylierung jedoch noch bis zu 200 verschiedene weitere Modifikationen existieren [187] und eine einzige Peptidsequenz bereits unzählige Variationen unterschiedlicher Modifikationszustände aufweisen kann, ist es heutzutage noch nicht möglich, alle Varianten der Modifizierung zu identifizieren und zu quantifizieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Peptide nur nach den gängigsten PTMs (Phosphorylierung, Oxidation, Acetylierung, Deamidierung) untersucht. Zu Beginn dieser Experimente wurden die SMN-Komplex-Proben hauptsächlich über Quadrupol- und lineare Ionenfallen analysiert. Im letzten Jahr dieser Promotion standen sensitivere und hochauflösendere Geräte wie das LTQ *Orbitrap* XL oder die LTQ *Orbitrap* Velos zur Verfügung, um einen noch besseren Einblick in das Peptidom der erzeugten Proteinverdaue zu erhalten.

Mit beiden Geräte wurden die synthetischen AQUA-Peptide sowie tryptischen Verdaue der Proteinkomplexe näher untersucht. Es wurde für eine Vielzahl von Peptiden mehrere Sequenzen identifiziert, die einen Teil oder die komplette Peptidsequenz aufgrund semitryptischer oder

überlesener Schnittstellen sowie PTMs beinhalteten [siehe Tab.4.2 in Kap.4]. Die beiden Cystein-haltigen Peptide ETCVVVYTYGNGR und CSDIISYTFKP konnten so zum Beispiel nicht reproduzierbar quantifiziert werden, da sie in allen Proben nur sehr niedrig konzentriert vorlagen. Dies kann u.a. auf eine unvollständige Carbamidomethylierung zurückgeführt werden, so dass noch freie Thiolgruppen in der Peptidsequenz vorliegen. Auch eine Alkylierung anderer Aminosäuren der Sequenz ist denkbar. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Carbamidomethylierung unter Umständen auch am N-Terminus, sowie an K- und R-Seitenketten erfolgen kann [188]. Ferner wurde für das Peptid ETCVVVYTYGNGR verschiedene Peptidspezies gefunden, die aufgrund unvollständiger Prozessierung durch das Enzym Trypsin zustande kamen. Des Weiteren beobachtet man zudem häufig O-Alkylierungen nach der Zugabe von IAA [188]. Für die Q-haltigen Peptide (VQDLIEGHLTASQ, QYFAETER) konnten ebenfalls während der Analysen starke Abweichungen verzeichnet werden, die u.a. auf Deamidierungen oder N-terminale Umlagerung von Q in Pyroglutamat (unter Abspaltung von NH_3) zurückzuführen sind.

Für fast jedes Peptid konnten nach dem tryptischen Verdau Varianten gefunden werden, die durch semi-tryptische Schnittstellen zustande kamen. Ein Grund für dieses Verhalten während des proteolytischen Verdau, ist eine chymotryptische Restaktivität des Trypsins. Dieses kann durch Verunreinigungen mit Chymotrypsin verursacht werden, denn beide Enzyme werden aus dem Pankreas von Tieren (z.B. des Pferdes) gewonnen. Die Reinigung des Trypsins erfolgt durch mehrmaliges Umkristallisieren, wodurch evtl. noch ein Restgehalt an Chymotrypsin durch die strukturellen Ähnlichkeiten enthalten sein kann [189]. Ein weiterer Grund ist das autoproteolytische Verhalten von Trypsin. Die Autoproteolyse kann die Entstehung eines Pseudotrypsins vorantreiben, welches ebenfalls chymotryptische Aktivitäten aufweist [190]. Trypsin selbst schneidet sehr spezifisch [191] nach Arginin oder Lysin, es sei denn, es wird durch ein C-terminales Prolin oder durch modifizierte saure Reste (Phospho-S, Phospho-T), die in der näheren Umgebung der Schnittstelle auftreten, sterisch gehindert. Jedoch auch modifiziertes Cystein wird durch Trypsin prozessiert. Chymotrypsin hingegen scheidet besonders bevorzugt hinter aromatischen Aminosäuren (F, W, Y) oder M.

Andere semi-tryptische Schnittstellen wurden durch Gasphasenfragmentierung in der Quelle erzeugt. Ist der Druck des verwendeten Schutzgases (Stickstoff) zu hoch, können bereits außerhalb der Kollisionszelle Peptidrückgratbrüche zwischen besonders labilen Bindungen induziert werden. Solch eine sterisch gehinderte Aminosäure ist Prolin, weshalb aufgrund der Spannung des pentameren Rings die N-terminale Bindung zur nächsten Aminosäure besonders gefährdet ist. Auch in ordinären MS/MS-Spektren ist dieser Prolinbruch eines der intensivsten Signale im Spektrum. In dieser Arbeit wurden zwei Peptidspezies (z.B. PGKPGLK, PQEYLR) mit einem N-terminalen Prolin nachgewiesen, die diesen markanten Bruch zeigten [siehe Abb. 4.17].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entstehung einer Vielzahl an Nebenprodukten der gewählten Peptidspezies das größte Manko der AQUA-Methode darstellt. Es kann nie ausgeschlossen werden, dass die Proteine in der Zelle, während der Probenvorbereitung oder durch den Verdau unterschiedlich und unspezifisch prozessiert werden. Dies erschwert eine akkurate Quantifizierung enorm und erklärt sicherlich die auch in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede

zwischen biologischen oder technischen Replikaten. Auch Schmidt *et al.* wiesen bereits auf diese Problematik des unspezifischen Verdaus hin [139]. Um dieses Problem zu umgehen, müssten alle einzelnen Spezies eines einzigen Peptids quantitativ erfasst werden. Dies ist gleichbedeutend mit einer Synthese aller identifizierten Peptidsequenzen, die Teil dieses Peptids sind. Aufgrund des hohen Kosten- und Zeitfaktors der Peptidsynthese, -aufreinigung und -quantifizierung ist dies jedoch praktisch nicht umsetzbar. Generell sollte die Probenvorbereitung stets in nur wenigen Schritten und reproduzierbar erfolgen, um Fehler durch unnötige Arbeitsabläufe und Modifikationen zu vermeiden.

Viele Proteine (z.B. in dieser Arbeit Gemin6 und Gemin7) weisen zudem, aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts, nur sehr wenige proteotypische Peptide auf, die für eine Quantifizierung zur Verfügung stehen, so dass häufig auch nicht die Möglichkeit besteht, mehrere Peptide pro Protein zu wählen, um statistisch signifikante Aussagen zu erhalten. Die große Zahl an Akzeptanzkriterien für die Auswahl geeigneter Peptide erschwert die Suche nach tauglichen Sequenzen bei Proteinen mit geringem Molekulargewicht enorm [siehe Tabelle 5.1].

Eine Lösung dieser Problematiken könnte durch Expression rekombinanter Proteine in mit stabilisotopenmarkierten Aminosäuren substituiertem Medium erfolgen. Der Proteingehalt müsste nach der Reinigung der einzelnen Proteine ebenfalls durch entsprechende Methoden wie z.B. Aminosäureanalyse sehr genau bestimmt werden. Auch diese Methode ist für komplexere Fragestellungen nicht anwendbar, sondern ist ähnlich wie AQUA durch einen hohen Kosten- und Zeitfaktor auf kleine Zahlen von Proteinen beschränkt. Die Expression von Proteinen stellt einen großen Zeitaufwand dar, da die Proteine zunächst durch Klonierung und Transformation in entsprechende Zellstämme eingebracht werden müssen. Für viele Proteine ist so eine Methodik aufgrund eines zu hohem Molekulargewichts nicht anwendbar. Des Weiteren kann die Methode in bestimmten Zellen nicht durchgeführt werden, da diese einzelne Aminosäuren umsetzen und damit dieselbe Proteinsequenz mit verschiedenen markierten Aminosäuren exprimieren. Stattdessen müssen solche Zellen verwendet werden, die keine Aminosäuren prozessieren und eine Auxotrophie für die stabilisotopenmarkierten Aminosäuren aufweisen, die in die Proteinsequenzen integriert werden sollen, d.h. Organismen, die nicht in der Lage sind (durch Mutation oder Plasmidtransformation) die substituierten Aminosäuren selbst herzustellen.

5.5.1 Evaluierung der Ergebnisse aus Messungen mit 4000 Q TRAP, TSQ Vantage sowie markierungsfrei mit der LTQ Orbitrap Velos

5.5.1.1 Stöchiometrie des SMN-Komplexes

Der Vergleich zwischen den einzelnen Ansätzen zur Erfassung der Stöchiometrie des SMN-Komplexes zeigt sowohl sehr ähnliche Verhältnisse, als auch Abweichungen zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Massenanalysatoren. Das Verhältnis zwischen SMN und Gemin2 ist bei allen Vorgehensweisen nahezu identisch. Es ist bekannt, dass innerhalb des SMN-Komplexes eine SMN-Gemin2-Substruktur besteht, die erst evolutionsbedingt durch weitere Faktoren ergänzt wurde [47]. Dieser Grundkomplex ist laut Ogawa *et al.* [48] durch Oligomerisierung der beiden Komponenten aufgebaut. Das SMN-Protein zeigt eine Selbstoligomerisierung über das C- und N-terminale Ende, während in Gemin2 hauptsächlich der C-terminale Schwanz für die

Selbstoligomerisierung verantwortlich ist. In der genannten Veröffentlichung von Ogawa *et al.* wird außerdem erwähnt, dass die Menge an SMN und Gemin2 im SMN-Komplex alle anderen Komponenten stark übertrifft und wahrscheinlich ein einfacher Grundcore besteht. Diese Vermutung kann durch die hier dargestellten Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden. Zwar ist das Verhältnis beider Komponenten nicht exakt 1:1, liegt aber nahe bei 2:1 (Cytoplasma) bzw. 3:1 (Kern) SMN:Gemin2 [siehe Tab.5.2]. Auch das Verhältnis von SMN zu den anderen Komponenten zeigt einen hohen Überschuss des Proteins in dem Komplex. Die Ergebnisse des rekombinanten Wildtypkomplex decken sich ebenfalls mit diesem Resultat.

Das Verhältnis zwischen SMN-Gemin2-Grundkomplex und den Proteinen Gemin6, Gemin7 und Gemin8 stimmt für die rekombinanten und nativen Komplexe nicht überein [siehe Tab.5.2]. Wie bereits erwähnt kann diese Abweichung durch den reduzierten und artifiziellen rekombinanten SMN-Komplex erklärt werden. Der GST-Tag im SMN-Protein sowie fehlende posttranslationale Modifikationen und Proteinkomponenten verändern möglicherweise die Struktur und Stöchiometrie des SMN-Komplexes. Im Gegensatz dazu ist das Verhältnis zwischen Gemin6 und Gemin7 in allen vier Ansätzen nahezu gleich, d.h. nur die Bindung an den SMN-Gemin2-Grundkomplex ist in den rekombinanten Komplexen gestört, nicht jedoch die Ausbildung des Gemin6-Gemin7-Subcores. Ma *et al.* [60] deuten eine heterodimere Struktur von Gemin6 und Gemin7 an, welche durch Kopf-Schwanz-Interaktion zustande kommt und in ihrer Kristallstruktur mit dem Sm-Core korrespondieren. Das 1:1-Verhältnis kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Gemin7 ist in einem ca. vierfachen Überschuss im Vergleich zu Gemin6 vorhanden [siehe Tab.5.2]. Dieser Unterschied resultiert womöglich aus Problemen bei der Probenvorbereitung oder einem evt. partiellen Verlust von Gemin6 durch zu stringente Bedingungen bei der Co-IP (Salz, NP40). Es ist bekannt, dass die Assoziation von Gemin6 an den SMN-Komplex über Gemin7 erfolgt [2]. Da bei der Co-IP über das Protein SMN alle Komponenten angereichert wurden, ist der Verlust von peripheren Faktoren durch schwächere Interaktion an SMN wahrscheinlicher als direkt assoziierende Proteinkomponenten. Gemin7 interagiert mit SMN sowohl direkt, als auch durch indirekte Interaktion über Gemin8.

Tab. 5.2: Ergebnisse der Quantifizierung nativen SMN-Komplexe aus Cytoplasma (Cyto) und Zellkern mit dem TSQ Vantage im Vergleich zu den Ergebnissen des rekombinanten (rek.) Wildtyp(WT)-SMN-Komplexes mit dem TSQ Vantage und der 4000 Q TRAP. Die angegebenen Zahlen stellen Verhältnisse von Proteinen dar.

| | TSQ(Cyto) _{nativ} | Q TRAP(WT) _{rek.} | TSQ(WT) _{rek.} | TSQ(Kern) _{nativ} |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| SMN1:Gemin2_2 | 2,00 | 2,00 | 3,00 | 3,00 |
| SMN1:Gemin6_2 | 60,00 | 15,00 | 40,00 | 60,00 |
| SMN1:Gemin7_1 | 14,00 | 5,00 | 10,00 | 15,00 |
| SMN1:Gemin8_2 | 18,87 | 10,00 | 60,00 | 17,14 |
| Gemin2_2:Gemin6_2 | 30,00 | 7,50 | 13,33 | 20,00 |
| Gemin2_2:Gemin7_1 | 7,50 | 2,50 | 3,33 | 4,00 |
| Gemin2_2:Gemin8_2 | 8,57 | 5,00 | 20,00 | 6,67 |
| Gemin7_1:Gemin6_2 | 4,00 | 3,00 | 4,00 | 5,00 |
| Gemin8_2:Gemin6_2 | 3,50 | 1,50 | 0,67 | 3,00 |
| Gemin7_1:Gemin8_2 | 1,14 | 2,00 | 6,00 | 1,67 |
| SMN1:Gemin3_2 | 5,00 | - | - | 10,00 |
| SMN1:Gemin4_2 | 20,00 | - | - | 20,00 |

Tab. 5.2: Fortsetzung

| | TSQ(Cyto) _{nativ} | Q TRAP(WT) _{rek.} | TSQ(WT) _{rek.} | TSQ(Kern) _{nativ} |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| SMN1:Gemin5_2 | 15,00 | - | - | 15,00 |
| SMN1:Unrip2 | 30,00 | - | - | 60,00 |
| Gemin2_2:Gemin5_2 | 7,50 | - | - | 5,00 |
| Gemin3_2:Gemin4_2 | 4,00 | - | - | 2,00 |
| Gemin8_2:Gemin4_2 | 1,17 | - | - | 1,00 |
| Gemin8_2:Unrip2 | 1,75 | - | - | 3,00 |
| Gemin7_1:Unrip2 | 2,00 | - | - | 5,00 |
| Gemin6_2:Unrip2 | 0,50 | - | - | 1,00 |
| Gemin2_2:Gemin3_2 | 2,50 | - | - | 3,33 |

5.5.1.2 Verteilung der Proteinkomponenten zwischen Kern und Cytoplasma

Vergleicht man die Stöchiometrie des cytoplasmatischen SMN-Komplexes mit der des nukleären SMN-Komplex sind nur marginale Unterschiede in den Verteilungen zu erkennen. Beide Vorgehensweisen mit AQUA und S/MRM, sowie markierungsfrei mit der LTQ Oribtrap Velos [siehe Tab.4.8 in Kap.4] liefern diesbezüglich identische Ergebnisse. Am deutlichsten ist der Unterschied für das Protein Unrip, von dem bekannt ist, dass es hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert. Diese Aussage kann durch die erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Im cytoplasmatischen Komplex ist der Anteil Unrip ungefähr doppelt so hoch, als der im Zellkernkomplex [36, 63].

Unterschiede zwischen Kern und Cytoplasma für distinkte Proteine des SMN-Komplexes (z.B. Gemin5 und Gemin4) sind entgegen den Postulierungen aus verschiedenen Veröffentlichungen nicht ersichtlich [52, 56, 57]. Immunofluoreszenzstudien basieren auf der Antigen-Epitop-Bindung eines Antikörpers mit dem Zielprotein. Dieser Antikörper ist entweder direkt mit einem Fluorophor gekoppelt oder wird durch einen sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper detektiert. Diese Methode basiert demzufolge auf dem Eindringen von Makromolekülen in die einzelnen Subkompartimente, welches aufgrund von sterischen Behinderungen nicht immer gewährleistet werden kann. Außerdem sollte der verwendete Antikörper eine hohe Spezifität aufweisen, um ungewollte Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen zu verhindern. Schließlich kann die Bindung des Antikörpers entweder Strukturveränderungen im Zielprotein induzieren oder für die Lokalisation wichtige Sequenzabschnitte verdecken. Die Ergebnisse aus Immunfluoreszenzstudie spiegeln also nicht immer unbedingt die Realität wieder und sind häufig fehlerbehaftet. Für das Protein Gemin5 sind zum Beispiel zwei Veröffentlichungen bekannt, die sich bezüglich der Lokalisation von Gemin5 widersprechen. Während Gubitz *et al.* Gemin5 durch Immunofluoreszenz eindeutig in Gems identifizieren und damit die Co-Lokalisation zu SMN nachweisen [57], können Hao *et al.* Gemin5 nicht in *Cajal Bodies* bzw. Gems in Interaktion mit SMN im Kern nachweisen.

Für Gemin4 ist bekannt, dass ein großer Anteil im Kern in den Nukleoli lokalisiert ist [52]. Die angewendete Aufarbeitungsmethode inklusive Kompartionierung und Co-Immunopräzipitation kann diesen Anteil nicht abdecken, so dass dieser verloren geht. Das Verhältnis von SMN und

Gemin4 ist damit im Cytoplasma und in den nukleären Gems nahezu identisch. Das in den Nukleoli angereicherte Gemin4 nimmt wahrscheinlich eine vom SMN-Komplex unabhängige Rolle ein und ist damit nicht entscheidend für die Stöchiometrie des Zellkernkomplex.

5.6 Quantifizierung der rekombinanten SMN-Komplexe

Neben der Quantifizierung nativer SMN-Komplexe, die durch Anreicherung aus dem Cytoplasma und Kerne von HeLa-Zellen gewonnen wurden, erfolgte die absolute Quantifizierung zusätzlich an rekombinant erzeugten SMN-Komplexen aus *E.coli*. Dies stellten jedoch nur einen Ausschnitt des SMN-Komplexes dar, da es nicht möglich war, alle Komplexbestandteile in *E.coli* zu exprimieren und löslich aufzuarbeiten. Proteine wie Gemin3, Gemin4 und Gemin5, konnten aufgrund ihres hohen Molekulargewichts nicht hergestellt werden. Die rekombinanten Komplexe bestanden aus diesem Grund nur aus den Proteinen: SMN, Gemin2, Gemin 6, Gemin7 und Gemin8. Das Protein SMN wurde in drei Varianten erzeugt: eine „gesunde“ Form des Proteins ohne Mutationen und zwei Varianten, die jeweils eine bekannte SMA-Mutation (E134K, Y272C) enthielten. Die drei verschiedenen SMN-Subkomplexe wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Stöchiometrie untersucht. Der geringe Hintergrund als Folge der Expression und Aufarbeitung (GST-Affinitätschromatographie) sowie die im Vergleich zu den nativen Komplexen hohe Konzentration, erleichterten die Quantifizierung erheblich. Im Folgenden werden die Unterschiede zwischen den drei betrachteten Komplexen herausgestellt und der spezifische Einfluss der integrierten Mutationen auf die Stöchiometrie diskutiert.

5.6.1 Evaluierung der verschiedenen Ansätze durch Messung mit dem 4000 Q TRAP, TSQ Vantage und markierungsfrei mit der LTQ Orbitrap Velos

5.6.1.1 Stöchiometrien der rekombinanten Komplexe

Die Quantifizierung durch alle drei Ansätze zeigt eine direkte Vergleichbarkeit des Wildtypkomplexes mit dem rekombinanten Komplex E134K. Beide SMN-Komplexe zeigen keine Unterschiede in den Verhältnissen für der Proteinkomponenten SMN, Gemin2, Gemin6, Gemin7 und Gemin8. Es ist bekannt, dass die Mutation im SMN-Protein E134K hauptsächlich die Bindung zu den Sm-Proteinen schwächt und dadurch SMA ausgelöst wird [192]. Diese Aussage wird durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt, allerdings konnte in dieser Arbeit der Einfluss der E134K-Mutation auf die Sm-Bindung nicht untersucht werden, da die Sm-Proteine nicht Bestandteil der rekombinanten Komplexe waren. In anderen Publikationen ist der Einfluss der Mutation auf die Oligomerisierung des SMN-Proteins benannt [179]. Eine Veränderung in der SMN-Komplex Grundstruktur ist jedoch aufgrund der Ergebnisse nicht ersichtlich.

Im Gegensatz dazu ist der Einfluss der Y272C-Mutation auf den vorliegenden rekombinanten SMN-Komplex enorm. Schon durch 1D-PAGE und Coomassiefärbung konnte eine Reduktion der Anteile von Gemin6, Gemin7 und Gemin8 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch die massenspektrometrische Analyse weiter bestätigt, so sind die genannten Proteinkomponenten um ca. 1/3 im Y272C-SMN-Komplex reduziert [siehe Tab.4.11 in Kap.4]. Da alle drei

Komponenten, wie bereits erwähnt, durch Assoziation direkt miteinander interagieren und die Bindung an das SMN-Protein hauptsächlich über Gemin8 gebildet wird, ist die äquivalente Abnahme zu erklären, die Interaktion mit Gemin2 ist dagegen stabil. Auch Otter *et al.* wiesen bereits auf den Einfluss der Y272C-Mutation auf die Selbstoligomerisierung des SMN-Proteins hin [2], wodurch bis auf die Bindung zu Gemin2, die gesamte Struktur des SMN-Komplex zerstört wird und andere Komponenten nur mäßig erfolgreich co-immunopräzipitiert werden können. Diese Aussage kann auch durch die vorliegende Arbeit ebenfalls bestätigt werden.

Die Analysen mittels 4000 Q TRAP und TSQ lieferten in dieser Hinsicht analoge, d.h. vergleichbare Ergebnisse.

5.7 Schlußfolgerung und Ausblick

Makromolekulare Proteinkomplexe spielen bei vielen zellulären Prozessen eine zentrale Rolle. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte SMN-Komplex ist involviert in der Assemblierung der U snRNPs, sowie dem anschließenden Transport vom Cytoplasma in den Zellkern.

Durch verschiedene molekularbiologische Reinigungsmethoden wie Co-Immunopräzipitation, Gradientenzentrifugation oder Größenausschlusschromatographie oder Kombinationen davon, ist es möglich, solche makromolekularen Einheiten aus Zellen anzureichern und zu reinigen. Sensitive LC-MS/MS-Systeme mit hoher Massengenauigkeit erlauben heutzutage eine zuverlässige Identifikation der beteiligten Proteinkomponenten. Quantitative Betrachtungen zur Ermittlung der Stöchiometrie solcher Proteinkomplexe durch massenspektrometrische Methoden sind jedoch noch sehr begrenzt.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich absolute Quantifizierung von SMN-Komplex-spezifischen Peptidsequenzen durch stabilisotopenmarkierte Peptidanaloga in Kombination mit S/MRM angewendet. Kritische Punkte für eine reproduzierbare und akkurate Quantifizierung von Proteinkomplexen betreffen dabei die folgenden Aspekte.

Zunächst muss das Vorliegen eines homogenen Proteinkomplexes durch die verwendeten Anreicherungs- und Reinigungsschritte gewährleistet werden. Dies wird erschwert durch die Tatsache, dass Zellen nicht als starre Systeme betrachtet werden können, sondern lebendige und aktive Einheiten darstellen. Proteine können dabei gleichzeitig an verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt sein, Proteinkomplexe verändern während der Durchführung ihrer Aufgaben stetig ihre Komposition, Struktur und Stöchiometrie und durch Zusammenarbeit unterschiedlicher Zellorganellen und Subkompartimente findet ein ständiger aktiver Transport von zellulären Molekülen statt. Durch Anwendung und Kombination verschiedener Methoden zur Proteinaufarbeitung, sowie durch kontinuierliche Kontrolle der Effektivität der Anreicherung und Spezifität der Reinigung können diese Variablen eingeschränkt werden.

In dieser Hinsicht wurden die in dieser Arbeit verwendeten endogenen SMN-Komplexe aus HeLa-Zellen durch eine effektive und saubere Zellkern-Cytoplasma-Trennung und anschließende Co-Immunopräzipitation angereichert. Eine weitere Optimierung dieser Aufarbeitung könnte mittels Verwendung weiterer SMN-spezifischer Antikörper (neben dem hier benutzten 7B10-Antikörper) gegen andere Epitope des SMN-Proteins oder sogar anderer Komponenten des

SMN-Komplexes erreicht werden. Antikörper können durch ihre Antigen-Bindung Epitope für spezifische Interaktionspartner maskieren und dadurch die gesamte Struktur und Stöchiometrie des Komplexes verändern.

Die untersuchten rekombinanten pentameren SMN-Komplexe wurden durch Expression von GST-markierten SMN-Protein und vier weiteren Komponenten in *E.coli* und anschließende Anreicherung auf einer Glutathion-Sepharose-Matrix erhalten. Auch in Bezug auf diese Experimente könnten durch Verwendung weiterer artifiziell eingeführter Epitop-*Tags* (z.B. His₆, Flag), die sowohl C-terminal, als auch N-terminal integriert werden, die erhaltenen Ergebnisse manifestiert und verifiziert werden.

Ein weiterer kritischer Aspekt bei der massenspektrometrischen Quantifizierung auf Peptidebene betrifft einen reproduzierbaren, vollständigen proteolytischen Verdau (in dieser Arbeit durch Verwendung der Protease Trypsin). Dazu muss jede Proteinprobe individuell bezüglich geeigneter Bedingungen betrachtet und durch Tandem-MS-Experimente untersucht werden. Trotz der Verfügbarkeit von sensitiven LC-MS/MS-Systemen mit hohen Massengenauigkeiten ist eine vollständige Betrachtung eines Proteinverdaus nicht möglich. Häufig werden zu kleine oder zu große Peptidfragmente erzeugt, die entweder nicht durch die chromatographische Methode oder den Massenbereich des MS-Systems abgedeckt sind. Des Weiteren entstehen oft unspezifische (z.B. durch chymotryptische Kreuzaktivitäten, überlesene Schnittstellen) Fragmente, die durch die verwendeten Algorithmen zur Datenauswertung nicht identifiziert werden. Eine Möglichkeit, um die chymotryptische Aktivität des Trypsins zu unterdrücken ohne dabei dessen proteolytische Aktivität herabzusetzen, ist die Behandlung mit L-1-Tosylamido-2-phenylethylchloromethylketon (TPCK). In dieser Arbeit wurde jedoch aus Kostengründen mit unbehandeltem Trypsin gearbeitet, welches eine chymotryptische Restaktivität aufwies.

Als weiterer kritischer Aspekt wurde die Auswahl geeigneter Peptidsequenzen identifiziert. Dazu müssen die erzeugten tryptischen Peptide mit möglichst sensitiven MS-Geräten hinsichtlich definierter Akzeptanzkriterien untersucht werden. Obwohl auch bei dem untersuchten SMN-Komplex ein Vielzahl an Peptiden durch Tandem-MS-Experimente identifiziert wurden, entsprachen letztlich nur sehr wenige Peptide den geforderten Spezifikationen [siehe Tab.5.1]. Sehr kurze Proteinsequenzen einiger Komplexkomponenten (z.B. Gemin6 und Gemin7) mit wenigen tryptischen Schnittstellen und vielen labilen, leicht modifizierbaren Aminosäuren schränkten die Auswahl stark ein. Für eine zuverlässige Quantifizierung sollten jedoch eigentlich mindestens zwei, besser mehr Standardpeptide definierter Konzentration zur Verfügung stehen, um signifikante Aussagen zu erhalten. In dieser Arbeit wurde aus den angegebenen sowie aus Kostengründen nur auf Basis von zwei Peptiden pro Interaktionspartner quantifiziert. Eine Möglichkeit der Optimierung der beiden letzten genannten Aspekte betrifft die Verwendung von stabilisotopenmarkierten Proteinen der jeweiligen Sequenzen, um somit Abweichungen durch den tryptischen Verdau oder Modifikationen labiler Aminosäuren während der Probenvorbereitung zu umgehen.

Andere Einschränkungen der angewendeten Methode betrafen die definierten Konzentrationen der kommerziell erhaltenen stabilisotopenmarkierten Peptide und die Reproduzierbarkeit der verwendeten LC-MS-Systeme. In dieser Hinsicht könnte eine Optimierung durch Verwendung kommerzieller nano-RPLC-Säulen sowie neuartiger UPLC-Systeme mit verbesserter Auflösung

und Effizienz erreicht werden.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass bei der Quantifizierung von Proteinkomplexen viele kritische Details betrachtet und optimiert werden müssen, um zuverlässige Aussagen hinsichtlich der Stöchiometrie zu erhalten. Je mehr Interaktionspartner in einem Komplex vorhanden sind, desto aufwendiger und kostenintensiver wird die Beantwortung solcher Fragestellungen. Moderne LC-MS/MS-Systeme und verbesserte Methoden zur absoluten Quantifizierung von Proteinen können diese Aufgaben zwar erleichtern, jedoch darf die Bedeutung einer korrekten Komplexanreicherung und Probenvorbereitung nicht vernachlässigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] G. Meister, D. Buhler, B. Laggerbauer, M. Zobawa, F. Lottspeich, and U. Fischer. Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum. Mol. Genet.*, 9(13):1977–86, 2000.
- [2] S. Otter, M. Grimmler, N. Neuenkirchen, A. Chari, A. Sickmann, and U. Fischer. A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex. *J Biol Chem*, 282(8):5825–33, 2007.
- [3] A.L. Burlingame and S.A. Carr. Mass Spectrometry in the Biological Sciences. *Humana Press*, 1996.
- [4] M. R. Lunn and C. H. Wang. Spinal muscular atrophy. *Lancet*, 371(9630):2120–33, 2008.
- [5] C. Eggert, A. Chari, B. Laggerbauer, and U. Fischer. Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol Med.*, 12(3):113–21, 2006.
- [6] C. Winkler, C. Eggert, D. Gradl, G. Meister, M. Giegerich, D. Wedlich, B. Laggerbauer, and U. Fischer. Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev*, 19(19):2320–30, 2005.
- [7] G Werdnig. Zwei fruehinfantile hereditaere Faelle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 22(2):437–480, 1891.
- [8] G Werdnig. Die fruehinfantile progressive spinale Amyotrophie. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 26(3):706–744, 1894.
- [9] K. Fried and A. E. H Emery. Spinal muscular atrophy type II. *Clinical Genetics*, 2(4):203–9, 1971.
- [10] B. S. Russman. Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *J Child Neurol.*, 22(8):946–51, 2007.
- [11] C. Brahe, O. Clermont, S. Zappata, F. Tiziano, J. Melki, and G. Neri. Frameshift mutation in the survival motor neuron gene in a severe case of SMA type I. *Hum. Mol. Genet.*, 5(12):1971–6, 1996.
- [12] S. Y. Chng, Y. Q. Wong, J. H. Hui, H. K. Wong, H. T. Ong, and D. Y. Goh. Pulmonary function and scoliosis in children with spinal muscular atrophy types II and III. *J Paediatr Child Health.*, 39(9):673–6, 2003.

- [13] M. M. Muqit, J. Moss, C. Sewry, and R. J. Lane. Phenotypic variability in siblings with type iii spinal muscular atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 75(12):1762–4, 2004.
- [14] C. C. Wehl, A. M. Connolly, and A. Pestronk. Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscle atrophy. *Neurology*, 67(3):500–1, 2006.
- [15] J. Hoffmann. Weitere Beiträge zur Lehre von der progressiven neurotischen Muskeldystrophie. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde*, 1:95–120, 1891.
- [16] M. Feldkotter, V. Schwarzer, R. Wirth, T. F. Wienker, and B. Wirth. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, 70(2):358–68, 2002.
- [17] J. Melki, S. Abdelhak, P. Sheth, M. F. Bachelot, P. Burlet, A. Marcadet, J. Aicardi, A. Barois, J. P. Carriere, M. Fardeau, and et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*, 344(6268):767–8, 1990.
- [18] S. Lefebvre, L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani, and et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80(1):155–65, 1995.
- [19] B. Schrank, R. Gotz, J. M. Gunnensen, J. M. Ure, K. V. Toyka, A. G. Smith, and M. Sendtner. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(18):9920–5, 1997.
- [20] S. Paushkin, B. Charroux, L. Abel, R. A. Parkinson, L. Pellizzoni, and G. Dreyfuss. The survival motor neuron protein of schizosacharomyces pombe. conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms. *J Biol Chem*, 275(31):23841–6, 2000.
- [21] C. F. Rochette, N. Gilbert, and L. R. Simard. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum Genet.*, 108(3):255–66, 2001.
- [22] C. L. Lorson and E. J. Androphy. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum. Mol. Genet.*, 9(2):259–65, 2000.
- [23] C. L. Lorson, E. Hahnen, E. J. Androphy, and B. Wirth. A single nucleotide in the smn gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(11):6307–11, 1999.
- [24] L. Cartegni and A. R. Krainer. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.*, 30(4):377–84, 2002.

- [25] T. Kashima and J. L. Manley. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.*, 34(4):460–3, 2003.
- [26] H. C. Chang, W. C. Hung, Y. J. Chuang, and Y. J. Jong. Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem. Int.*, 45(7):1107–12, 2004.
- [27] D. K. Gavrilov, X. Shi, K. Das, T. C. Gilliam, and C. H. Wang. Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat. Genet.*, 20(3):230–1, 1998.
- [28] S. Lefebvre, P. Burlet, Q. Liu, S. Bertrand, O. Clermont, A. Munnich, G. Dreyfuss, and J. Melki. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.*, 16(3):265–9, 1997.
- [29] J. L. Fernandez-Torre, J. L. Teja, A. Castellanos, J. Figols, T. Obeso, and R. Arteaga. Spinal muscular atrophy type I mimicking critical illness neuropathy in a paediatric intensive care neonate: electrophysiological features. *Brain Dev.*, 30(9):599–602, 2008.
- [30] T. W. Prior. Spinal muscular atrophy diagnostics. *J Child Neurol.*, 22(8):952–6, 2007.
- [31] C. J. Sumner, T. N. Huynh, J. A. Markowitz, J. S. Perhac, B. Hill, D. D. Coovert, K. Schussler, X. Chen, J. Jarecki, A. H. Burghes, J. P. Taylor, and K. H. Fischbeck. Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol.*, 54(5):647–54, 2003.
- [32] Y. Hofmann, C. L. Lorson, S. Stamm, E. J. Androphy, and B. Wirth. Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(17):9618–23, 2000.
- [33] W. C. Liang, C. Y. Yuo, J. G. Chang, Y. C. Chen, Y. F. Chang, H. Y. Wang, Y. H. Ju, S. S. Chiou, and Y. J. Jong. The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patients. *J Neurol Sci.*, 268(1-2):87–94, 2008.
- [34] M. Azzouz, T. Le, G. S. Ralph, L. Walmsley, U. R. Monani, D. C. Lee, F. Wilkes, K. A. Mitrophanous, S. M. Kingsman, A. H. Burghes, and N. D. Mazarakis. Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.*, 114(12):1726–31, 2004.
- [35] A. K. Gubit, W. Feng, and G. Dreyfuss. The SMN complex. *Exp. Cell Res.*, 296(1):51–6, 2004.
- [36] M. Grimmler, S. Otter, C. Peter, F. Muller, A. Chari, and U. Fischer. Unrip, a factor implicated in cap-independent translation, associates with the cytosolic SMN complex and influences its intracellular localization. *Hum. Mol. Genet.*, 14(20):3099–111, 2005.
- [37] Q. Liu and G. Dreyfuss. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J*, 15(14):3555–65, 1996.

- [38] V. La Bella, S. Kallenbach, and B. Pettmann. Expression and subcellular localization of two isoforms of the survival motor neuron protein in different cell types. *J. Neurosci. Res.*, 62(3):346–56, 2000.
- [39] R. Morse, D. J. Shaw, A. G. Todd, and P. J. Young. Targeting of SMN to Cajal bodies is mediated by self-association. *Hum. Mol. Genet.*, 16(19):2349–58, 2007.
- [40] Y. Hua and J. Zhou. Modulation of SMN nuclear foci and cytoplasmic localization by its C-terminus. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(19-20):2658–63, 2004.
- [41] M. Grimmler, L. Bauer, M. Nousiainen, R. Korner, G. Meister, and U. Fischer. Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO Rep.*, 6(1):70–6, 2005.
- [42] S. Petri, M. Grimmler, S. Over, U. Fischer, and O. J. Gruss. Dephosphorylation of survival motor neurons (SMN) by PPM1G/PP2Cgamma governs Cajal body localization and stability of the SMN complex. *J. Cell Biol.*, 179(3):451–65, 2007.
- [43] C. Ogawa, K. Usui, F. Ito, M. Itoh, Y. Hayashizaki, and H. Suzuki. Role of survival motor neuron complex components in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J Biol Chem*, 284(21):14609–17, 2009.
- [44] S. Paushkin, A. K. Gubitz, S. Massenet, and G. Dreyfuss. The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14(3):305–12, 2002.
- [45] P. Selenko, R. Sprangers, G. Stier, D. Buhler, U. Fischer, and M. Sattler. SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol.*, 8(1):27–31, 2001.
- [46] U. Fischer, Q. Liu, and G. Dreyfuss. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*, 90(6):1023–9, 1997.
- [47] M. Kroiss, J. Schultz, J. Wiesner, A. Chari, A. Sickmann, and U. Fischer. Evolution of an RNP assembly system: a minimal SMN complex facilitates formation of UsnRNPs in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(29):10045–50, 2008.
- [48] C. Ogawa, K. Usui, M. Aoki, F. Ito, M. Itoh, C. Kai, M. Kanamori-Katayama, Y. Hayashizaki, and H. Suzuki. Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem*, 282(15):11122–34, 2007.
- [49] L. Campbell, K. M. Hunter, P. Mohaghegh, J. M. Tinsley, M. A. Brasch, and K. E. Davies. Direct interaction of SMN with dp103, a putative RNA helicase: a role for Snn in transcription regulation? *Hum. Mol. Genet.*, 9(7):1093–100, 2000.
- [50] K. B. Shpargel, K. Praveen, T. K. Rajendra, and A. G. Matera. Gemin3 is an essential gene required for larval motor function and pupation in *drosophila*. *Mol. Biol. Cell*, 20(1):90–101, 2009.

- [51] B. Charroux, L. Pellizzoni, R. A. Perkinson, A. Shevchenko, M. Mann, and G. Dreyfuss. Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J. Cell Biol.*, 147(6):1181–94, 1999.
- [52] M. A. Lorson, A. M. Dickson, D. J. Shaw, A. G. Todd, E. C. Young, R. Morse, C. Wolstencroft, C. L. Lorson, and P. J. Young. Identification and characterisation of a nuclear localisation signal in the SMN associated protein, Gemin4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 375(1):33–7, 2008.
- [53] B. Charroux, L. Pellizzoni, R. A. Perkinson, J. Yong, A. Shevchenko, M. Mann, and G. Dreyfuss. Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J. Cell Biol.*, 148(6):1177–86, 2000.
- [54] D. J. Battle, M. Kasim, J. Yong, F. Lotti, C. K. Lau, J. Mouaikel, Z. Zhang, K. Han, L. Wan, and G. Dreyfuss. The SMN complex: an assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 71:313–20, 2006.
- [55] C. K. Lau, J. L. Bachorik, and G. Dreyfuss. Gemin5–snRNA interaction reveals an RNA binding function for WD repeat domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16(5):486–91, 2009.
- [56] T. Hao le, H. R. Fuller, T. Lam le, T. T. Le, A. H. Burghes, and G. E. Morris. Absence of gemin5 from SMN complexes in nuclear Cajal bodies. *BMC cell biology*, 8:28, 2007.
- [57] A. K. Gubitza, Z. Mourelatos, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem*, 277(7):5631–6, 2002.
- [58] L. Pellizzoni, J. Baccon, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J Biol Chem*, 277(9):7540–5, 2002.
- [59] J. Baccon, L. Pellizzoni, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem*, 277(35):31957–62, 2002.
- [60] Y. Ma, J. Dostie, G. Dreyfuss, and G. D. Van Duyne. The Gemin6–Gemin7 heterodimer from the survival of motor neurons complex has an Sm protein-like structure. *Structure*, 13(6):883–92, 2005.
- [61] C. Carissimi, L. Saieva, J. Baccon, P. Chiarella, A. Maiolica, A. Sawyer, J. Rappsilber, and L. Pellizzoni. Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J Biol Chem*, 281(12):8126–34, 2006.
- [62] C. Carissimi, L. Saieva, F. Gabanella, and L. Pellizzoni. Gemin8 is required for the architecture and function of the survival motor neuron complex. *J Biol Chem*, 281(48):37009–16, 2006.

- [63] C. Carissimi, J. Baccon, M. Straccia, P. Chiarella, A. Maiolica, A. Sawyer, J. Rappsilber, and L. Pellizzoni. Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett.*, 579(11):2348–54, 2005.
- [64] W. J. Friesen, S. Massenet, S. Paushkin, A. Wyce, and G. Dreyfuss. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell*, 7(5):1111–7, 2001.
- [65] G. Meister, C. Eggert, and U. Fischer. SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.*, 12(10):472–8, 2002.
- [66] G. Meister, C. Eggert, D. Buhler, H. Brahm, C. Kambach, and U. Fischer. Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr. Biol.*, 11(24):1990–4, 2001.
- [67] W. T. Pu, G. B. Krapivinsky, L. Krapivinsky, and D. E. Clapham. pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 19(6):4113–20, 1999.
- [68] G. S. Pesiridis, E. Diamond, and G. D. Van Duyne. Role of pICln in methylation of Sm proteins by PRMT5. *J Biol Chem*, 284(32):21347–59, 2009.
- [69] W. J. Friesen, A. Wyce, S. Paushkin, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem*, 277(10):8243–7, 2002.
- [70] G. Guderian, C. Peter, J. Wiesner, A. Sickmann, K. Schulze-Osthoff, U. Fischer, and M. Grimmler. Mutually Exclusive Binding of pICln and the novel PRMT5 methyltransferase complex component RioK1 modulates PRMT5 Complex Composition and Methyltransferase Substrate Specificity. *J Biol Chem*, in submission, 2010.
- [71] D. Schumperli and R. S. Pillai. The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(19-20):2560–70, 2004.
- [72] B. L. Talken, K. R. Schafermeyer, C. W. Bailey, D. R. Lee, and R. W. Hoffman. T cell epitope mapping of the Smith antigen reveals that highly conserved Smith antigen motifs are the dominant target of T cell immunity in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 167(1):562–8, 2001.
- [73] A. Chari, M. M. Golas, M. Klingenhager, N. Neuenkirchen, B. Sander, C. Englbrecht, A. Sickmann, H. Stark, and U. Fischer. An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs. *Cell*, 135(3):497–509, 2008.
- [74] P. Khusial, R. Plaag, and G. W. Zieve. LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs. *Trends Biochem. Sci.*, 30(9):522–8, 2005.
- [75] J. Rino and M. Carmo-Fonseca. The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus? *Trends Cell Biol.*, 19(8):375–84, 2009.

- [76] G. Meister and U. Fischer. Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *EMBO J*, 21(21):5853–63, 2002.
- [77] S. J. Kolb, D. J. Battle, and G. Dreyfuss. Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol.*, 22(8):990–4, 2007.
- [78] J. Wiesner, T. Premisler, and A. Sickmann. Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics*, 8(21):4466–83, 2008.
- [79] X. Han, A. Aslanian, and 3rd Yates, J. R. Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12(5):483–90, 2008.
- [80] B. Domon and R. Aebersold. Mass spectrometry and protein analysis, 2006.
- [81] Y. Ge, B. G. Lawhorn, M. ElNaggar, E. Strauss, J. H. Park, T. P. Begley, and F. W. McLafferty. Top down characterization of larger proteins (45 kDa) by electron capture dissociation mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(4):672–8, 2002.
- [82] J. S. Cottrell. Protein identification by peptide mass fingerprinting. *J Pept Res.*, 7(3):115–24, 1994.
- [83] K. Biemann. Peptides and proteins: overview and strategy. *Methods Enzymol.*, 193:351–60, 1990.
- [84] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926):64–71, 1989.
- [85] M. Dole, Mack L.L., R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, and M.B. Alice. Molecular beams of macroions, 1968.
- [86] M. Yamashita and J.B. Fenn. Electrospray ion source. Another variation on the free jet theme. *J. Phys. Chem.*, 88(20):4451–9, 1984.
- [87] A. K. Shukla and J. H. Futrell. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *J. Mass Spectrom.*, 35(9):1069–90, 2000.
- [88] 3rd Yates, J. R., J. K. Eng, A. L. McCormack, and D. Schieltz. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal. Chem.*, 67(8):1426–36, 1995.
- [89] D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18):3551–67, 1999.
- [90] G. Mitulovic, M. Smoluch, J. P. Chervet, I. Steinmacher, A. Kungl, and K. Mechtler. An improved method for tracking and reducing the void volume in nano HPLC-MS with micro trapping columns. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376(7):946–51, 2003.

- [91] U. Nirenberg. Reversed-phase hplc. analytical procedure, 1994.
- [92] A. Sickmann, M. Mreyen, and H.E. Meyer. Identification of modified proteins by mass spectrometry. *IUBMB Life.*, 54(2):51–7, 2002.
- [93] G. Mitulovic and K. Mechtler. HPLC techniques for proteomics analysis—a short overview of latest developments. *Brief Funct Genomic Proteomic.*, 5(4):249–60, 2006.
- [94] M. C. Garcia. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, 825(2):111–23, 2005.
- [95] T.W. Jaskolla, W.D. Lehmann, and M. Karas. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, 2008.
- [96] M. Karas and F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, 1988.
- [97] M. Karas, M. Gluckmann, and J. Schafer. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom.*, 35(1):1–12, 2000.
- [98] J.V. Iribarne and B.A. Thomson. On the evaporation of small ions from charged droplets, 1976.
- [99] G.T. Gibson, S.M. Mugo, and R.D. Oleschuk. Nanoelectrospray emitters: trends and perspective. *Mass Spectrom Rev.*, 28(6):918–36, 2009.
- [100] W.E. Stephens. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Phys Rev.*, 69(2):691–692, 1946.
- [101] W.C. Wiley and I.H. McLaren. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments.*, 26:1150, 1955.
- [102] B.A. Mamyrin, V.I. Karataev, D.V. Shmikk, and V.A. Zagulin. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov Phys JETP*, 37:45, 1973.
- [103] R. J. Cotter. Time-of-flight mass spectrometry: an increasing role in the life sciences. *Biomed Environ Mass Spectrom.*, 18(8):513–32, 1989.
- [104] E. Mathieu. Memoire sur Le Mouvement Vibratoire d une Membrane de forme Elliptique. *Journal des Mathematiques Pures et Appliquees*, (1):137–203, 1868.
- [105] Z. Ouyang, L. Gao, M. Fico, W. J. Chappell, R. J. Noll, and R. G. Cooks. Quadrupole ion traps and trap arrays: geometry, material, scale, performance. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 13(1):13–8, 2007.

- [106] F. L. Brancia. Recent developments in ion-trap mass spectrometry and related technologies. *Expert Rev Proteomics.*, 3(1):143–51, 2006.
- [107] A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, and G. S. Jackson. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev.*, 17(1):1–35, 1998.
- [108] R.H. Perry, R.G. Cooks, and R.J. Noll. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Cancer Res.*, 27(6):661–99, 2008.
- [109] 59th Conf. Amer. Soc. Mass Spectrom. *Enhanced FT for Orbitrap Mass Spectrometry*, volume MP093, June 2011. Poster.
- [110] M. Scigelova and A. Makarov. Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics. *Proteomics.*, 6(Suppl 2):16–21, 2006.
- [111] A. Makarov. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.*, 72(6):1156–62, 2000.
- [112] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, and R. Graham Cooks. The orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.*, 40(4):430–43, 2005.
- [113] J.V. Olsen, J.C. Schwartz, J. Griep-Raming, M.L. Nielsen, E. Damoc, E. Denisov, O. Lange, P. Remes, D. Taylor, M. Splendore, E.R. Wouters, M. Senko, A. Makarov, M. Mann, and S. Horning. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol Cell Proteomics*, 8(12):2759–69, 2009.
- [114] J. R. Yates, D. Cociorva, L. Liao, and V. Zabrouskov. Performance of a linear ion trap-orbitrap hybrid for peptide analysis. *Anal. Chem.*, 78(2):493–500, 2006.
- [115] K. S. Lilley and D. B. Friedman. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics.*, 1(4):401–9, 2004.
- [116] M. Vaudel, A. Sickmann, and L. Martens. Peptide and protein quantification: a map of the minefield. *Proteomics*, 10(4):650–70, 2010.
- [117] S. P. Mirza and M. Olivier. Methods and approaches for the comprehensive characterization and quantification of cellular proteomes using mass spectrometry. *Physiol Genomics.*, 33(1):3–11, 2008.
- [118] S. Pan, R. Aebersold, R. Chen, J. Rush, D. R. Goodlett, M. W. McIntosh, J. Zhang, and T. A. Brentnall. Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J. Proteome Res.*, 8(2):787–97, 2009.
- [119] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, and B. Kuster. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389(4):1017–31, 2007.
- [120] W. Yang, H. Steen, and M. R. Freeman. Proteomic approaches to the analysis of multi-protein signaling complexes. *Proteomics*, 8(4):832–51, 2008.

- [121] M. Sturm, A. Bertsch, C. Gropl, A. Hildebrandt, R. Hussong, E. Lange, N. Pfeifer, O. Schulz-Trieglaff, A. Zerck, K. Reinert, and O. Kohlbacher. OpenMS - an open-source software framework for mass spectrometry. *BMC bioinformatics*, 9:163, 2008.
- [122] O. Kohlbacher, K. Reinert, C. Gropl, E. Lange, N. Pfeifer, O. Schulz-Trieglaff, and M. Sturm. TOPP—the OpenMS proteomics pipeline. *Bioinformatics*, 23(2):191–7, 2007.
- [123] S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 1(5):376–86, 2002.
- [124] M. Krüger, M. Moser, S. Ussar, I. Thievensen, C.A. Lubber, F. Forner, S. Schmidt, S. Zanivan, R. Fässler, and M. Mann. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell*, 134(2):353–64, 2008.
- [125] M.D. Sury, J.X. Chen, and M. Selbach. The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo. *Mol Cell Proteomics*, 9(10):2173–83, 2010.
- [126] D.R. Georgianna, A.M. Hawkrige, D.C. Muddiman, and G.A. Payne. Temperature-dependent regulation of proteins in *Aspergillus flavus*: whole organism stable isotope labeling by amino acids. *J Proteome Res.*, 7(7):2973–9, 2008.
- [127] T. Geiger, J. Cox, P. Ostasiewicz, J.R. Wisniewski, and M. Mann. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat Methods*, 7(5):383–5, 2010.
- [128] S. E. Ong and M. Mann. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc.*, 1(6):2650–60, 2006.
- [129] D. B. McClatchy, L. Liao, S. K. Park, J. D. Venable, and J. R. Yates. Quantification of the synaptosomal proteome of the rat cerebellum during post-natal development. *Genome Res.*, 17(9):1378–88, 2007.
- [130] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.*, 17(10):994–9, 1999.
- [131] P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlett-Jones, F. He, A. Jacobson, and D. J. Pappin. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics*, 3(12):1154–69, 2004.
- [132] A. Thompson, J. Schafer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, R. Johnstone, A. K. Mohammed, and C. Hamon. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.*, 75(8):1895–904, 2003.

- [133] M. Miyagi and K. C. Rao. Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrom Rev.*, 26(1):121–36, 2007.
- [134] G. Hevesy and R. Hobbie. Lead content of rocks. *Nature.*, 128(3242):1038–39, 1931.
- [135] S. A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M. W. Kirschner, and S. P. Gygi. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(12):6940–5, 2003.
- [136] D. J. Jenden and A. K. Cho. Selected ion monitoring in pharmacology. *Biochem. Pharmacol.*, 28(6):705–13, 1979.
- [137] V. Lange, P. Picotti, B. Domon, and R. Aebersold. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.*, 4:222, 2008.
- [138] M. Brönstrup. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics*, 1(4), 2004.
- [139] C. Schmidt, C. Lenz, M. Grote, R. Luhrmann, and H. Urlaub. Determination of protein stoichiometry within protein complexes using absolute quantification and multiple reaction monitoring. *Anal. Chem.*, 2010.
- [140] G. B. Fields and R. L. Noble. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.*, 35(3):161–214, 1990.
- [141] C. Shaw. Peptide purification by reverse-phase HPLC. *Methods Mol Biol.*, 32:275–87, 1994.
- [142] L. Bosch, A. Alegria, and R. Farre. Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *J. Chromatogr., A*, 831(1-2):176–83, 2006.
- [143] W. Zhu, J. W. Smith, and C. M. Huang. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *JBB*, 2010:840518, 2009.
- [144] J. M. Asara, H. R. Christofk, L. M. Freemark, and L. C. Cantley. A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen. *Proteomics*, 8(5):994–9, 2008.
- [145] H. Liu, R. G. Sadygov, and 3rd Yates, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.*, 76(14):4193–201, 2004.
- [146] Y. Ishihama, Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber, and M. Mann. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics*, 4(9):1265–72, 2005.
- [147] L. A. Huber, K. Pfaller, and I. Vietor. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ. Res.*, 92(9):962–8, 2003.

- [148] M. Dreger. Subcellular proteomics. *Mass Spectrom Rev.*, 22(1):27–56, 2003.
- [149] P. Yaciuk. Co-immunoprecipitation of protein complexes. *Methods Mol Med.*, 131:103–11, 2007.
- [150] S. Munro and H. R. Pelham. Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of drosophila hsp 70. *EMBO J*, 3(13):3087–93, 1984.
- [151] A. Einhauer and A. Jungbauer. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49(1-3):455–65, 2001.
- [152] J. L. Casey, P. A. Keep, K. A. Chester, L. Robson, R. E. Hawkins, and R. H. Begent. Purification of bacterially expressed single chain Fv antibodies for clinical applications using metal chelate chromatography. *J. Immunol. Methods*, 179(1):105–16, 1995.
- [153] A. Skerra and T. G. Schmidt. Applications of a peptide ligand for streptavidin: the strep-tag. *Biomol. Eng.*, 16(1-4):79–86, 1999.
- [154] M. Kroiss, K. M. Brunger, J. Wiesner, M. Grimmner, A. Sickmann, and U. Fischer. Native purification of protein and RNA-protein complexes using a novel affinity procedure. *Fly*, 3(3):221–8, 2009.
- [155] A. Brymora, V. A. Valova, and P. J. Robinson. Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. *Curr Protoc Cell Biol.*, Chapter 17:175, 2004.
- [156] H. Schagger and G. von Jagow. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, 199(2):223–31, 1991.
- [157] H. Schagger, W. A. Cramer, and G. von Jagow. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 217(2):220–30, 1994.
- [158] N. T. Hartman, F. Sicilia, K. S. Lilley, and P. Dupree. Proteomic complex detection using sedimentation. *Anal. Chem.*, 79(5):2078–83, 2007.
- [159] J. Mogridge. Using light scattering to determine the stoichiometry of protein complexes. *Methods Mol Biol.*, 261:113–8, 2004.
- [160] A. J. Link, J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, and 3rd Yates, J. R. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, 17(7):676–82, 1999.
- [161] A. Mallick, M. Schirle, S.S. Chen, M.R. Flory, H. Lee, D. Martin, J. Ranish, B. Raught, R. Schmitt, T. Werner, B. Kuster, and R. Aebersold. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.*, 25(1):125–31, 2007.

- [162] E. O. Hochleitner, P. Sondermann, and F. Lottspeich. Determination of the stoichiometry of protein complexes using liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection of fluorescently labeled proteolytic peptides. *Proteomics*, 4(3):669–76, 2004.
- [163] E. O. Hochleitner, B. Kastner, T. Frohlich, A. Schmidt, R. Luhrmann, G. Arnold, and F. Lottspeich. Protein stoichiometry of a multiprotein complex, the human spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein: absolute quantification using isotope-coded tags and mass spectrometry. *J Biol Chem*, 280(4):2536–42, 2005.
- [164] J. Holzmann, P. Pichler, M. Madalinski, R. Kurzbauer, and K. Mechtler. Stoichiometry determination of the MP1-p14 complex using a novel and cost-efficient method to produce an equimolar mixture of standard peptides. *Anal. Chem.*, 81(24):10254–61, 2009.
- [165] *Der Reaktionsmechanismus zellulärer U snRNP Zusammenlagerung*. PhD thesis, Universität Würzburg, 2009.
- [166] C. Cooper, N. Packer, and K. Williams. Amino Acid Analysis Protocols. *Humana Press.*, 159(1):89–89, 2001.
- [167] J.D. Dignam, R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei., 1983.
- [168] T. Samuel, K. Okada, M. Hyer, K. Welsh, J.M. Zapata, and J.C. Reed. cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. *Cancer Res.*, 65(1):210–8, 2005.
- [169] C. Winkler, K. Denker, S. Wortelkamp, and A. Sickmann. Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis*, 28(12):2095–99, 2007.
- [170] A.V. Gorshkov, I.A. Tarasova, V.V. Evreinov, M.M. Savitski, M.L. Nielsen, R.A. Zubarev, and M.V. Gorshkov. Liquid chromatography at critical conditions: comprehensive approach to sequence-dependent retention time prediction. *Anal Chemi.*, 78(22):7770–7, 2006.
- [171] K. Suzuki, P. Bose, R.Y. Leong-Quong, D.J. Fujita, and K. Riabowol. REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes.*, 3(294):1–6, 2010.
- [172] *Untersuchungen zur Funktion von SMN während der U snRNP Biogenese*. PhD thesis, Freie Universität Berlin, 2001.
- [173] M. L. McWhorter, U. R. Monani, A. H. Burghes, and C. E. Beattie. Knockdown of the survival motor neuron (smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *The Journal of cell biology*, 162(5):919–31–, 2003.
- [174] M. L. McWhorter, K. L. Boon, E. S. Horan, A. H. Burghes, and C. E. Beattie. The smn binding protein gemin2 is not involved in motor axon outgrowth. *Developmental neurobiology*, 68(2):182–94–, 2008.

- [175] D. J. Battle, M. Kasim, J. Wang, and G. Dreyfuss. SMN-independent subunits of the SMN complex. Identification of a small nuclear ribonucleoprotein assembly intermediate. *The Journal of biological chemistry*, 282(38):27953–9, 2007.
- [176] L. Pellizzoni, B. Charroux, and G. Dreyfuss. Smn mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snrnp proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(20):11167–72–, 1999.
- [177] K. Markham, Y. Bai, and G. Schmitt-Ulms. Co-immunoprecipitations revisited: an update on experimental concepts and their implementation for sensitive interactome investigations of endogenous proteins. *Anal Bioanal Chem.*, 389(1):461–73, 2007.
- [178] E. Zapletalova, P. Hedvicakova, L. Kozak, P. Vondracek, R. Gaillyova, T. Marikova, Z. Kalina, V. Juttnerova, J. Fajkus, and L. Fajkusova. Analysis of point mutations in the SMN1 gene in SMA patients bearing a single SMN1 copy. *Neuromuscul Disord*, 17(6):476–81, 2007.
- [179] C. L. Lorson, J. Strasswimmer, J. M. Yao, J. D. Baleja, E. Hahnen, B. Wirth, T. Le, A. H. Burghes, and E. J. Androphy. Smn oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.*, 19(1):63–6–, 1998.
- [180] J.S. Bonifacino, E.C. Dell’Angelica, and T.A. Springer. Immunoprecipitation. *Curr Protoc Immunol.*, 8(3), 2001.
- [181] N. Zhang and L. Li. Effects of common surfactants on protein digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of the digested peptides using two-layer sample preparation., journal = *Neuromuscul Disord*. 18(8):889–96, 2004.
- [182] H. Kawasaki and K. Suzuki. Separation of peptides dissolved in a sodium dodecyl sulfate solution by reversed-phase liquid chromatography: removal of sodium dodecyl sulfate from peptides using an ion-exchange precolumn. *Anal. Biochem.*, 186(2):264–8, 1990.
- [183] L. Jiang, L. He, and M. Fountoulakis. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A.*, 1023(2):317–20, 2004.
- [184] B.J. Manadas, K. Vougas, M. Fountoulakis, and C.B. Duarte. Sample sonication after trichloroacetic acid precipitation increases protein recovery from cultured hippocampal neurons, and improves resolution and reproducibility in two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 27(9):1825–31, 2006.
- [185] R. Kay, C. Barton, L. Ratcliffe, B. Matharoo-Ball, P. Brown, J. Roberts, P. Teale, and C. Creaser. Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 22(20):3255–60, 2008.
- [186] J.R. Wisniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, and M. Mann. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, 6(5):359–62, 2009.

-
- [187] M. Hamdan, M. Galvani, and P.G. Righetti. Monitoring 2-D gel-induced modifications of proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.*, 20(3):121–41, 2001.
- [188] E.S. Boja and H.M. Fales. Overalkylation of a protein digest with iodoacetamide. *Anal Chem.*, 73:3576–82, 2001.
- [189] W. Grassmann, K. Hannig, and M. Schleyer. Versuche zur elektrophoretischen Reinigung von Trypsin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie.*, 316(1):71–7, 1959.
- [190] V. Keil-Dlouha, N. Zylber, J. Imhoff, N. Tong, and B. Keil. Proteolytic activity of pseudotrypsin. *FEBS Lett.*, 16(4):291–5, 1971.
- [191] J.V. Olsen, S. Ong, and M. Mann. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Mol Cell Proteomics*, 3(6):608–14, 2004.
- [192] B.G. Burnett, E. Munoz, A. Tandon, D.Y. Kwon, C.J. Sumner, and K.H. Fischbeck. Regulation of SMN Protein Stability. *Mol Cell Biol.*, 29(5), 2009.

7 Anhang

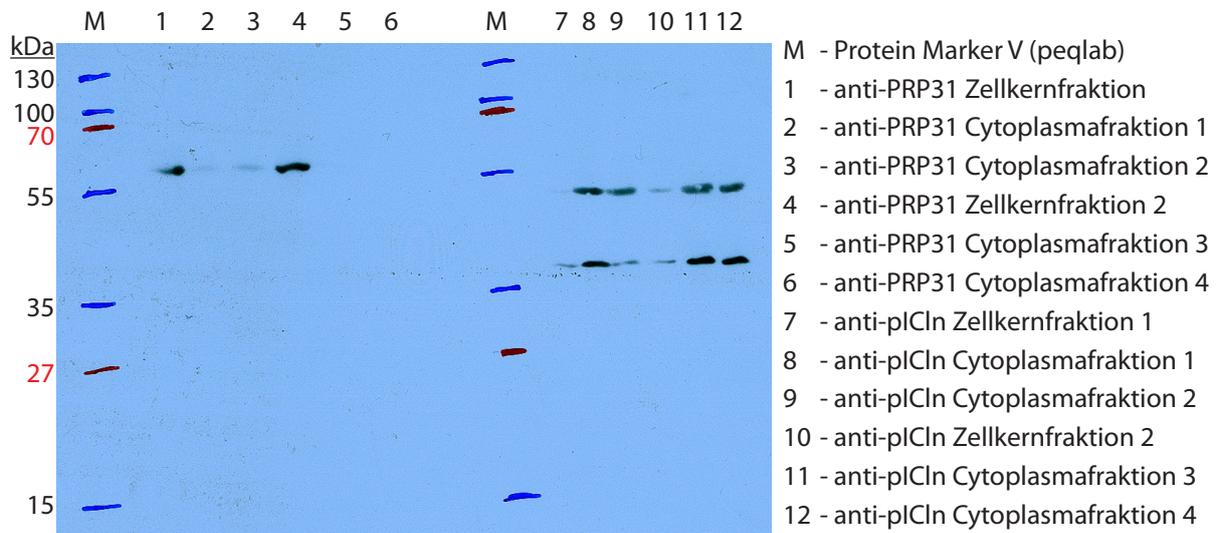


Abb. 7.1: Western-Blot-Analyse der Zellkern- und Cytoplasmafraktionen mittels Antikörper gegen einen cytoplasmatischen (pICln) und einen Kernmarker (PRP31) - Original.

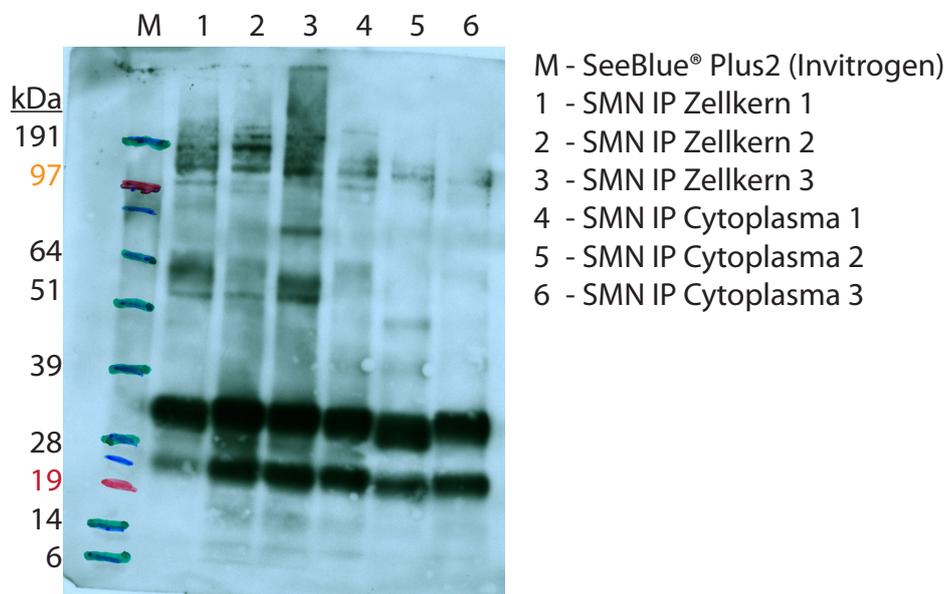


Abb. 7.2: Western-Blot-Analyse (anti-SMN Antikörper 7B10) der durch Co-Immunopräzipitationen angereicherten SMN-Komplexe aus den Zellkern- und Cytoplasmafraktionen - Original.

Tab. 7.1: Identifizierte Proteine der nativen Kern(K)- und Cytoplasma(C)-Fraktionen. Die Lokalisation wurde der Uniprot-Datenbank entnommen. Bestandteile des SMN-Komplexes sind fett gedruckt.

| Bande | Accession | Proteinname | Lokalisation | K | C |
|-------|-----------|---|-----------------------------|---|---|
| 1 | Q93074 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 | Zellkern | x | |
| | Q93008 | Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X | Cytoplasma | | x |
| | Q93074 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 | Zellkern | x | |
| 2 | P27708 | CAD protein | Cytoplasma | | x |
| | Q9UHV7 | Thyroid hormone receptor-associated protein complex 240 kDa component | Zellkern | x | |
| 3 | Q8TEQ6 | Gem-associated protein 5/ Gemin5 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 4 | Q8TEQ6 | Gem-associated protein 5/ Gemin5 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 5 | Q8TEQ6 | Gem-associated protein 5/ Gemin5 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | O60244 | CRSP complex subunit 2 | Zellkern | x | |
| 6 | Q16513 | Serine/threonine-protein kinase N2 | Cytoplasma | x | x |
| | Q16531 | DNA damage-binding protein 1 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P57678 | Component of gems 4/ Gemin4 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P20585 | DNA mismatch repair protein Msh3 | Zellkern | x | |
| | P57678 | Component of gems 4/ Gemin4 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 7 | P43246 | DNA mismatch repair protein Msh2 | Zellkern | x | |
| | Q9UHI6 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20/ Gemin3 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 8 | O75448 | Thyroid hormone receptor-associated protein complex 100 kDa component | Zellkern | x | |
| | Q9UHI6 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20/ Gemin3 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 10 | P27540 | Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator | Zellkern | x | x |
| | Q09161 | Nuclear cap-binding protein subunit 1 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 11 | P40939 | Trifunctional enzyme subunit alpha | Mitochondrien | x | |
| | P27540 | Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator | Zellkern | x | x |
| | P08237 | 6-phosphofructokinase | Cytoplasma | | x |
| 12 | P11021 | 78 kDa glucose-regulated protein precursor | Endoplasmatisches Retikulum | x | x |
| | P02545 | Lamin-A/C | Zellkern | x | |
| 12 | P38646 | Stress-70 protein | Mitochondrien | x | x |
| | P40939 | Trifunctional enzyme subunit alpha | Mitochondrien | x | x |
| | Q9NVC6 | CRSP complex subunit 6 | Zellkern | x | |

Tab. 7.1: Fortsetzung

| Bande | Accession | Proteinname | Lokalisation | K | C |
|-------|-----------|---|-----------------------------|---|---|
| | P52272 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M | Zellkern | x | |
| | P11142 | Heat shock cognate 71 kDa protein | Cytoplasma | x | x |
| | P38646 | Stress-70 protein Mitochondrien | x | | x |
| 13 | O14744 | Protein arginine N-methyltransferase 5 / PRMT5 | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | P11021 | 78 kDa glucose-regulated protein precursor | Endoplasmatisches Retikulum | | x |
| | P17066 | Heat shock 70 kDa protein 6 | Cytoplasma | | x |
| | P08107 | Heat shock 70 kDa protein 1 | Cytoplasma | x | x |
| | P38646 | Stress-70 protein | Mitochondrien | x | x |
| 14 | P11142 | Heat shock cognate 71 kDa protein | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P17066 | Heat shock 70 kDa protein 6 | Cytoplasma | x | x |
| | O14744 | Protein arginine N-methyltransferase 5 / PRMT5 | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | O95365 | Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A | Zellkern | | x |
| | Q8IX15 | Homeobox and leucine zipper protein Homez | Zellkern | | x |
| | O95831 | Programmed cell death protein 8 | Zellkern/Mitochondrien | | x |
| | O95365 | Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A | Zellkern | | x |
| 15 | P38646 | Stress-70 protein | Mitochondrien | | x |
| | O00567 | Nucleolar protein Nop56 | Zellkern | | x |
| | P08621 | U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | O14744 | Protein arginine N-methyltransferase 5 / PRMT5 | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | P08107 | Heat shock 70 kDa protein 1 | Cytoplasma | | x |
| 16 | P08651 | Nuclear factor 1 C-type | Zellkern | | x |
| | P08621 | U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P08651 | Nuclear factor 1 C-type | Zellkern | | x |
| 17 | P10809 | 60 kDa heat shock protein | Mitochondrien | | x |
| | P08621 | U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 18 | P08621 | U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 19 | P08621 | U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P49336 | Cell division protein kinase 8 | Zellkern | | x |
| | P08651 | Nuclear factor 1 C-type | Zellkern | | x |
| | P07437 | Tubulin beta-2 chain | Cytoskelett | | x |

Tab. 7.1: Fortsetzung

| Bande | Accession | Proteinname | Lokalisation | K | C |
|-------|-----------|--|---------------------|---|---|
| | P68371 | Tubulin beta-2C chain | Cytoskelett | x | x |
| | P19474 | 52 kDa Ro protein | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P08670 | Vimentin | Cytoskelett | x | |
| | Q13509 | Tubulin beta-3 chain | Cytoskelett | | x |
| | Q9Y265 | RuvB-like 1 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P68363 | Tubulin alpha-ubiquitous chain | Cytoskelett | | x |
| | Q71U36 | Tubulin alpha-3 chain | Cytoskelett | | x |
| | P68366 | Tubulin alpha-1 chain | Cytoskelett | | x |
| | Q9Y230 | RuvB-like 2 | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | P08651 | Nuclear factor 1 C-type | Zellkern | | x |
| | P07437 | Tubulin beta-2 chain | Cytoskelett | | x |
| | P19474 | 52 kDa Ro protein | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P68371 | Tubulin beta-2C chain | Cytoskelett | x | x |
| | Q13509 | Tubulin beta-3 chain | Cytoskelett | x | x |
| | P68363 | Tubulin alpha-ubiquitous chain | Cytoskelett | x | x |
| | P31943 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 21 | Q9H814 | RNA U small nuclear RNA export adapter protein | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | Q9BQE3 | Tubulin alpha-6 chain | Cytoskelett | | x |
| | Q71U36 | Tubulin alpha-3 chain | Cytoskelett | | x |
| | P68366 | Tubulin alpha-1 chain | Cytoskelett | | x |
| | Q9Y230 | RuvB-like 2 | Zellkern/Cytoplasma | x | |
| | Q9BUF5 | Tubulin beta-6 chain | Cytoskelett | | x |
| | Q9H4B7 | Tubulin beta-1 chain | Cytoskelett | | x |
| | P51648 | Fatty aldehyde dehydrogenase | Cytoplasma | | x |
| | P08651 | Nuclear factor 1 C-type | Zellkern | | x |
| | P07437 | Tubulin beta-2 chain | Cytoskelett | | x |
| | P68371 | Tubulin beta-2C chain | Cytoskelett | x | x |
| 22 | P19474 | 52 kDa Ro protein | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P68104 | Elongation factor 1-alpha 1 | Cytoplasma | x | x |
| | P55084 | Trifunctional enzyme subunit beta | Mitochondrien | | x |

Tab. 7.1: Fortsetzung

| Bande | Accession | Proteinname | Lokalisation | K | C |
|-------|-----------|---|-----------------------------|---|---|
| | P68363 | Tubulin alpha-ubiquitous chain | Cytoskelett | x | x |
| | O14874 | 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase | Mitochondrien | x | |
| 23 | P60709 | Actin | Cytoplasma | x | x |
| | P83369 | U7 snRNA-associated Sm-like protein LSm11 | Zellkern | x | x |
| | Q9Y3F4 | Serine-threonine kinase receptor-associated protein/ Unrip | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 24 | P83369 | U7 snRNA-associated Sm-like protein LSm11 | Zellkern | x | x |
| | O14874 | 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase | Mitochondrien | x | |
| | Q16637 | Survival motor neuron protein/ SMN | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | Q9Y3F4 | Serine-threonine kinase receptor-associated protein/ Unrip | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 25 | P05388 | 60S acidic ribosomal protein P0 | Cytoplasma | | x |
| | P55735 | SEC13-related protein | - | | x |
| | Q16637 | Survival motor neuron protein/ SMN | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 26 | P09012 | U1 small nuclear ribonucleoprotein A | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | O14893 | Survival of motor neuron protein-interacting protein 1/ Gemin2 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | Q9NWZ8 | Protein FAM51A1/ Gemin3 | Zellkern/Cytoplasma | x | |
| 27 | P62424 | 60S ribosomal protein L7a | Cytoplasma | | x |
| | Q9HBM6 | Transcription initiation factor TFIID subunit 9B | Zellkern | | x |
| | P61247 | 40S ribosomal protein S3a | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | O75586 | RNA polymerase transcriptional regulation mediator | Zellkern | | x |
| | O14893 | Survival of motor neuron protein-interacting protein 1/ Gemin2 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | Q9Y5M8 | Signal recognition particle receptor subunit beta | Endoplasmatisches Retikulum | x | |
| | P18124 | 60S ribosomal protein L7 | Cytoplasma | | x |
| | Q16637 | Survival motor neuron protein/ SMN | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 28 | P62701 | 40S ribosomal protein S4 | Cytoplasma | | x |
| | P24863 | Cyclin-C | Zellkern | | x |
| | P09661 | U2 small nuclear ribonucleoprotein A' | Zellkern | | x |
| | P62917 | 60S ribosomal protein L8 | Cytoplasma | | x |
| | Q16637 | Survival motor neuron protein/ SMN | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | O14893 | Survival of motor neuron protein-interacting protein 1/ Gemin2 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 29 | P04792 | Heat-shock protein beta-1 | Zellkern/Cytoplasma | | x |

Tab. 7.1: Fortsetzung

| Bande | Accession | Proteinname | Lokalisation | K | C |
|-------|-----------|---|---------------------|---|---|
| | P14678 | Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B' | Zellkern/Cytoplasma | x | |
| | P08579 | U2 small nuclear ribonucleoprotein B'' | Zellkern/Cytoplasma | x | |
| 30 | Q16637 | Survival of motor neuron protein/ SMN | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | O14893 | Survival of motor neuron protein-interacting protein 1/ Gemin2 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | Q8WXD5 | Gem-associated protein 6/ Gemin6 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P62269 | 40S ribosomal protein S18 | Cytoplasma | | x |
| 31 | P62277 | 40S ribosomal protein S13 | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | P30050 | 60S ribosomal protein L12 | Cytoplasma | | x |
| | Q8WXD5 | Gem-associated protein 6/ Gemin6 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P62899 | 60S ribosomal protein L31 | Cytoplasma | | x |
| | P62316 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | Q04837 | Single-stranded DNA-binding protein | Mitochondrien | | x |
| 33 | P62318 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | P62314 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 | Zellkern/Cytoplasma | | x |
| | P10599 | Thioredoxin | Cytoplasma | | x |
| 34 | P62316 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P62306 | Small nuclear ribonucleoprotein F/ SmF | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P62304 | Small nuclear ribonucleoprotein E/ SmE | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 35 | P62316 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| | P26447 | Protein S100-A4 | Zellkern/Cytoplasma | x | x |
| 36 | P62306 | Small nuclear ribonucleoprotein F/ SmF | Zellkern/Cytoplasma | x | x |

Tab. 7.2: Proteinidentifikation (4000 Q TRAP-MS/MS-Analyse) des Coomassie-gefärbten Gels 4.8. Bestandteile des SMN-Komplexes sind fett gedruckt.

| Bande | Accession | Proteinname | Taxonomie |
|-------|-----------|---|--------------------|
| 1 | P0A6Y8 | Chaperone protein dnaK | Escherichia coli |
| | B5YQ07 | Threonyl-tRNA synthetase | Escherichia coli |
| | Q0T324 | Methionyl-tRNA synthetase | Escherichia coli |
| | B1IXT2 | Bifunctional polymyxin resistance protein arnA | Escherichia coli |
| 2 | P0A6F5 | 60 kDa chaperonin | Escherichia coli |
| | Q0TEA3 | Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-component | Escherichia coli |
| 3 | P0AG30 | Transcription termination factor rho | Escherichia coli |
| | Q0TEW9 | Cytoskeleton protein rodZ | Escherichia coli |
| 4 | P0A6N1 | Elongation factor Tu | Escherichia coli |
| | P0ABC7 | Protein hflK | Escherichia coli |
| | P0AE06 | Acriflavine resistance protein A | Escherichia coli |
| | P0ADA3 | Lipoprotein nlpD | Escherichia coli |
| | A1AE61 | Peptidase B | Escherichia coli |
| 5 | Q16637 | Survival motor neuron protein | Homo Sapiens |
| 6 | O14893 | Survival of motor neuron protein-interacting protein 1 | Homo Sapiens |
| | Q16637 | Survival motor neuron protein | Homo Sapiens |
| 7 | O14893 | Survival of motor neuron protein-interacting protein 1 | Homo Sapiens |
| | Q16637 | Survival motor neuron protein | Homo Sapiens |
| | Q9NWZ8 | Gem-associated protein 8 | Homo Sapiens |
| 8 | P04517 | Genome polyprotein | Tobacco etch virus |
| 9 | Q8CXZ9 | Transcriptional regulatory protein phoP | Escherichia coli |
| 10 | Q8WXD5 | Gem-associated protein 6 | Homo Sapiens |
| 11 | Q8WXD5 | Gem-associated protein 6 | Homo Sapiens |
| 12 | Q16637 | Survival motor neuron protein | Homo Sapiens |
| 13 | Q9H840 | Gem-associated protein 7 | Homo Sapiens |
| 14 | P0A7J7 | 50S ribosomal protein L11 | Escherichia coli |

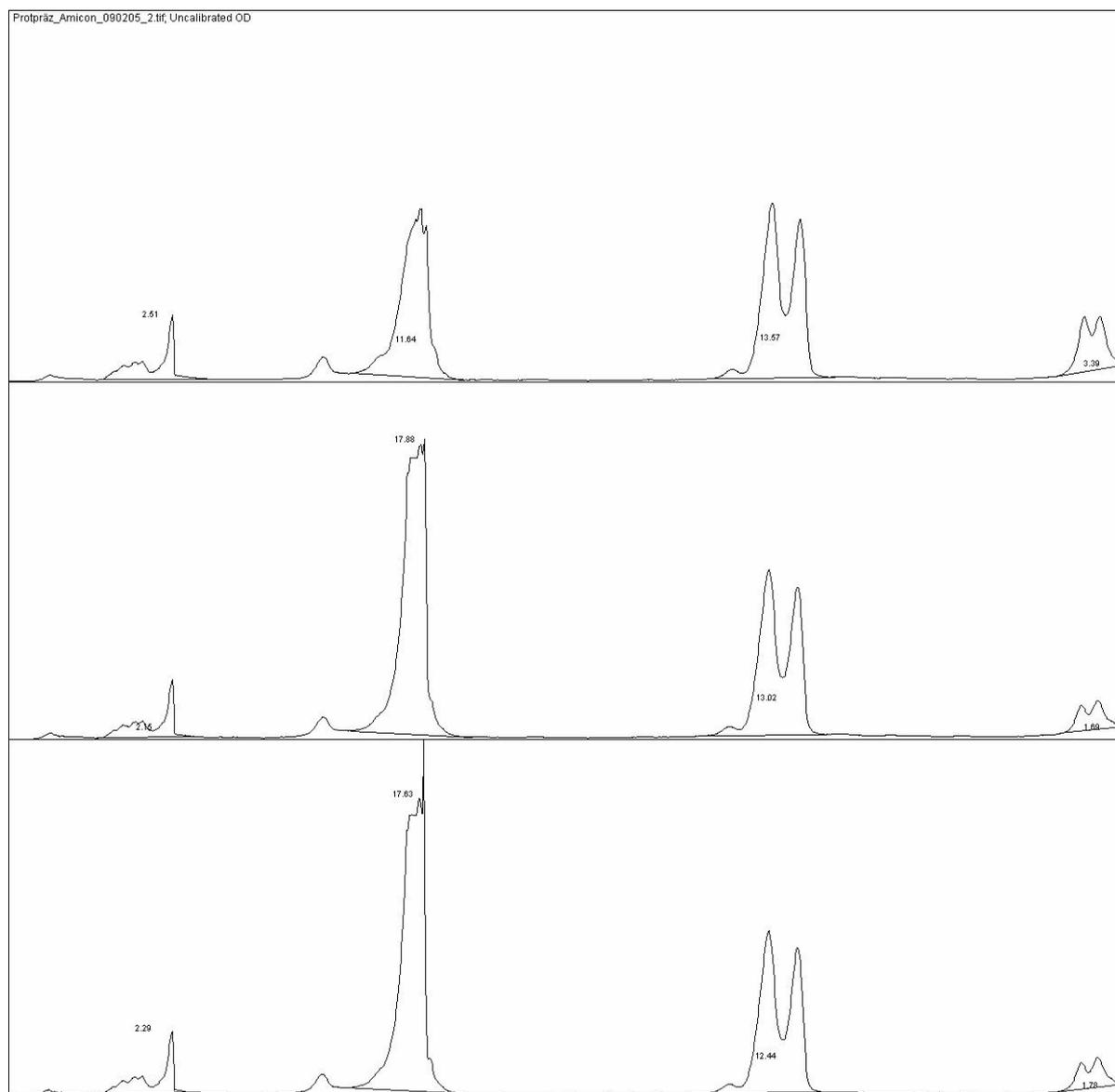


Abb. 7.3: ImageJ Auswertung Proteinpräzipitation Amicon.

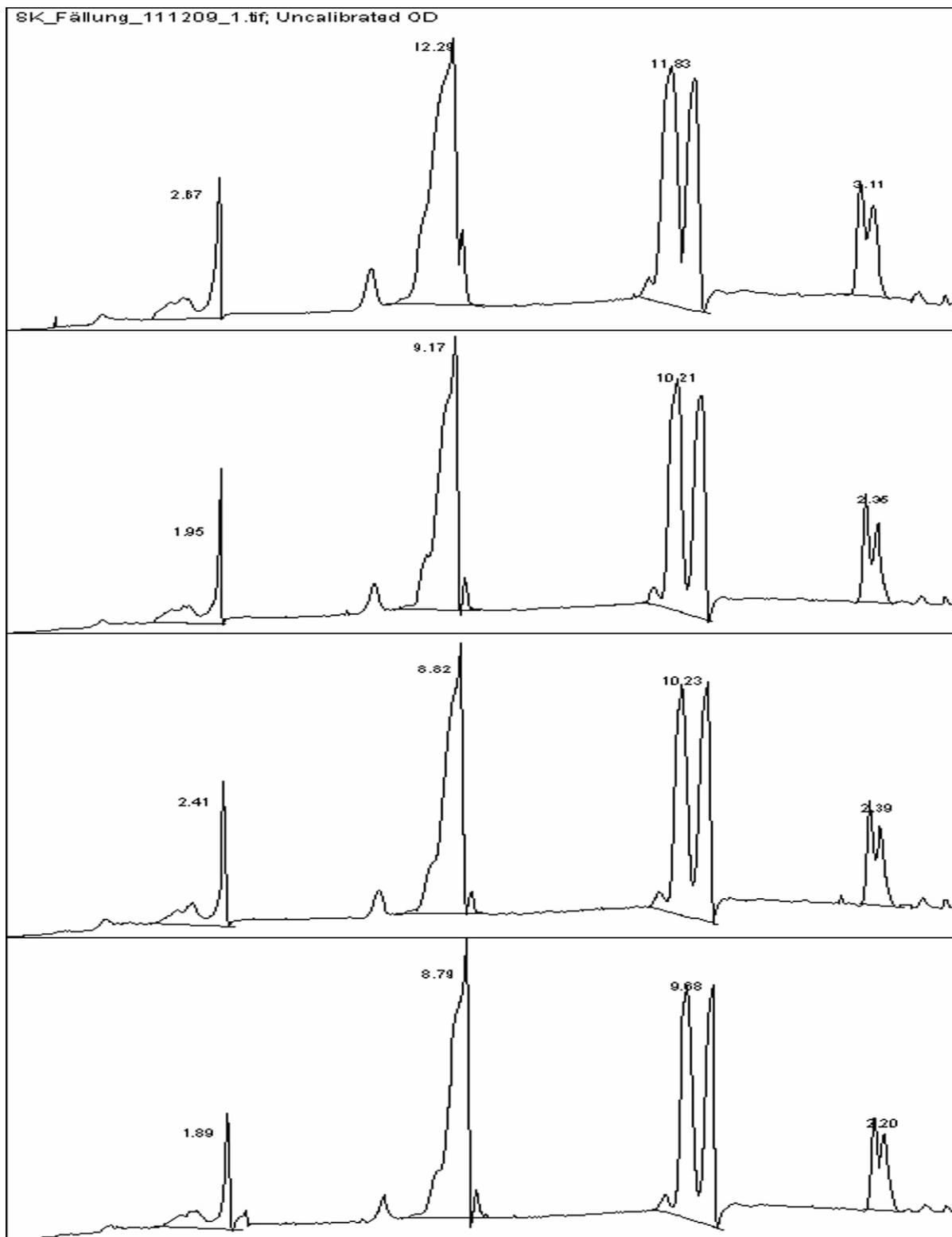


Abb. 7.4: ImageJ Auswertung Proteinpräzipitation Acetonitril.

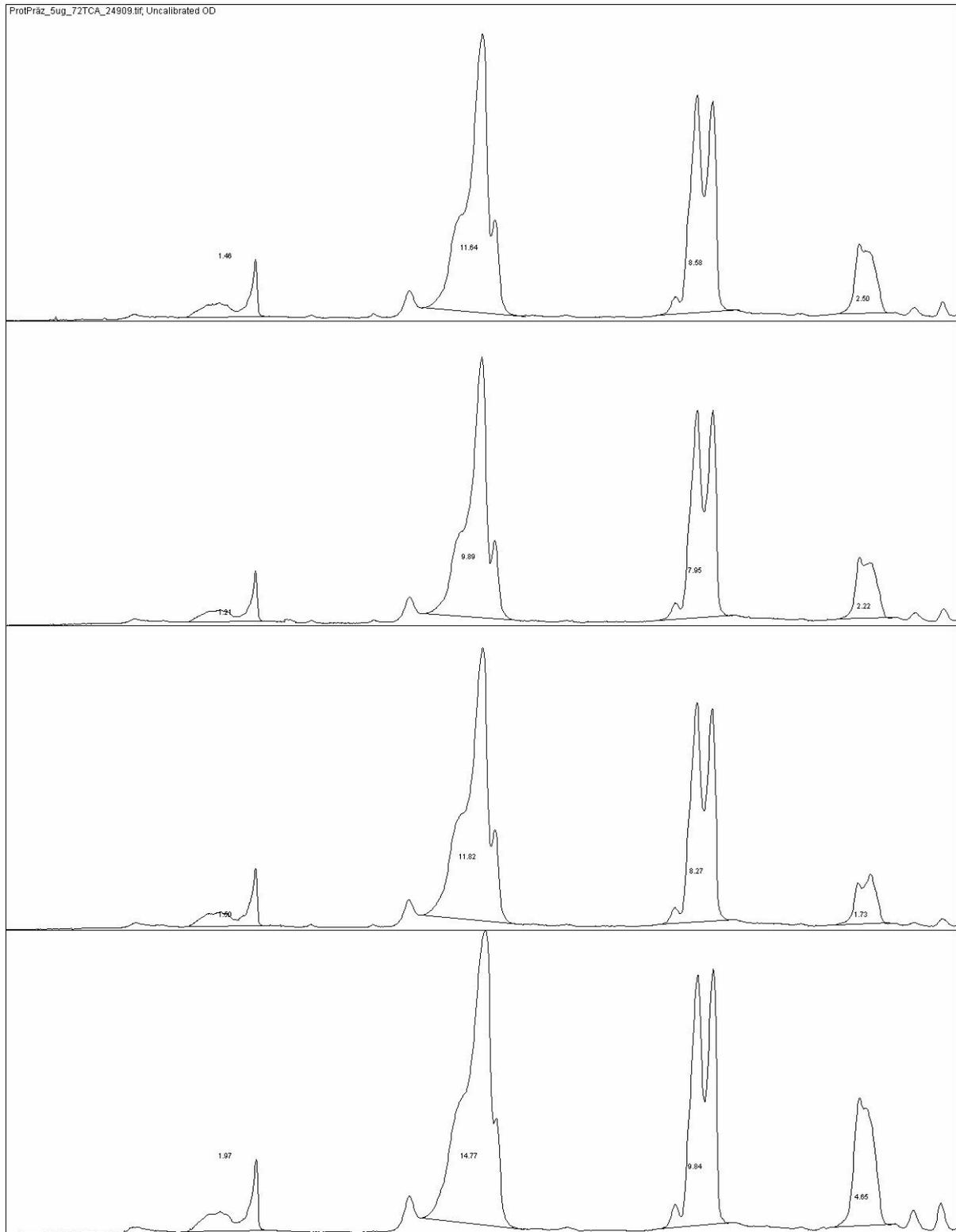


Abb. 7.5: ImageJ Auswertung Proteinpräzipitation Trichloressigsäure.

Abb. 7.6: Proteinsequenzen des SMN-Komplexes: Alle unterstrichenden Sequenzen konnten mittels LC-MS/MS-Analyse mit dem LTQ Orbitrap Velos identifiziert werden. Die letztlich gewählten Peptidsequenzen für die Synthese der stabilisotopenmarkierten Peptide sind fett gedruckt. Rot-markierte Aminosäuren entsprechen entweder instabilen, modifizierten oder überlesenen tryptischen Aminosäuren. Unterstrichene Aminosäuren der fett gedruckten Sequenzen sprechen für problematische Aminosäuren in den gewählten Peptiden.

Survival motor neuron protein - SMN

MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIWDDDTALIKAYDKAVAS
FKHALKNGDICTSGKPKTTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASIQQWKVGDCK
AIWSEDGCYPATIASIDFKRETCVVVYTYGNREEQNLDSLSPICEVANNI
EQNAQENEFESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKPKSAPWNSFLPPPPMP
GPRLGPGKPLGFNGGPPPPPPPHLLSCWLPPPFGSPPIIPPPPCPDS
LDDADALGSMLISWYMSGYHTGYMGRFRQNQKEGRCSHSLN

Survival of motor neuron protein-interacting protein 1 - Gemin2

MRRAELAGLKTMAWVPAESAVEELMPRLLPVEPCDLTEGFDPSPVPPPTPQ
EYLRRQIEAAQCPDVVVAQIDPKKRRQSVNISLSGCQPAEPGYPTLQ
WQQQQVAQFSTVRQNVNKHRSHWKSQQLDSNVTMPKSEDEEGWKK
CLGEKLCADGAVGPATNESPGIDYVQIGFPPLLSIVSRMNOATVTSVLEVLS
NWFGERDFTPELGRWYLLACLEKPLLEAHSLRILARRCSEVRLVDS
DDERVPALNLLCLVSRYDQRDLAEPS

Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20 - Gemin3

MAAFEASGALAAVATMPAEHVAQVPAPEPTPGPVRILRTAQDLSSPR
TRTGDVLLAEADFESLLRPVLEGLRAAGFRPSPVQLKAIPLGRCGDLI
VQAKSGTGKTCVFSTIALDSLVENLSTQILIAPTREIAVQIHSVITAIGIKME
GLECHVIGGTPLSQDKTRLKCHIAVGSPGRIQLIEDLYNPGSIRLFIDE
ADKLEEGSFQEQINWYSSLPASKQMLAVSATPEFLANALTKYMRDPTF
VRLNSSDPSLIGLKQYKVVNSPLAHKVFEEKTQHLQELFSRIPNQALVFS
NLHSRAQHLADILSSKGFPAECISGNMNONQRLDAMAKLKHFHCRVLIST
DLTSRGIDAEKVNLVNLDVPLWETYMHRIGRAGREGTLGLTVTYCCRGE
EENMMMRIAQKCNINLLPDPIPSGLMEECVDWDVEVKAAVHTYGIAS
VPNQLKQIKIERTLQQKAHGDHMASSRNNSVSGLSVKSKNNTKQL
PVKSHSECGIEKATSPKELGCDROSEQMKNSVQTPVENSTNSQHQVKEA
LPVSLQIPCLSSFIHQPYTLTFAELVEDEYHIKEGLEKPVEIRHTGPGDQ
TVNPQNGFVRNKVIEQRVPLASSSQSGDSESDSSSRTSSQSKGNKSY
LEGSSDNQLKDSESTPVDDRJSLEQPPNGSDTPNPEKYQESPGIQMKTRLK
EGASORAKSRRNLPRRSSFRLQTEAQEDDWYDCHREIRLSFSDTYQDYE
YWRAYRAWQEYAASHYWNAQRHPSWMAAHMNTIYLQEMMH
SNQ

Component of gems 4 - Gemin4

MDLGPLNICEEMTILHGGFLAEQLFHPKAELTKSDWERVGRPIVEALRE
ISSAAHSQPFAWKKALIIWAKVLQPHPVTPSDTETRWQEDLFFSVGN
MIPTINHILFELLKSEASGLIQLLMALPTTICHAELRFLEHVTDSAED
VAFFLDIWVEVMKHGHPQDPLLSQFSAMAHKYLPALDEFFHPPKRLRS
DPDACPTMPLLAMLLRGLTQSRILGPRKCCALANLADMLTVFALTED
POEVSATVLDKLATVISVWNSDTQNPYHQQALEAKVKEAERDVSLTSLAK
LPSETFVGCEFLHLLREWGEELQAVLRSSQGTSYDSYRICDSLTSFSQNAT
LYLNRTSLSKEDRQVVSELAECVRDFRKTSTVLKNRAEDITASIAMAVIQ
KMDRHMEVCIFASEKWAESDEWVACLGSNRALREPDVLRLETVIDV
STADRAIPSQIRQVIHLILECYADLSLPGKNKVLAGIRSWGRKLSEKLLAY
VEGFQEDLNTTFNQLTQSASEQGLAKAVASVARLVIVHPEVTVKMCSLAV
VNLGTHKFLAQLTAFPALRFVEVQGPNSATFMVSCLKETVWMKFSTPKE
EKOFLELLNCLMSPVKPQGIPVAALLEPDEVLKEFVLPLRLDVEEVDLSLR
FIQTLEANACREEYWLQTCSPFLLFSLCQLLDRFSYWPLPKEKRCLSDRK
DLAIHILLCEIVSANAETFSPDVWKSLWHRKLEQLDWTVGLRLKSFFE
GHFKCEVPATLEICKLSEDEWTSQAHPGYGAGTLLAWMECCSVSGISE
RMLSLLVDVGNEPEVRLFSKGFLVQVMPWCSPQEWQRLHLTRLL
EKQLLHVPSLEYIQFVPLNLKPFAQELQSVLRTFQLCSHCRNWPL
EGWNHVVKLCGSLRLDSVRAIQAAGPWWGPEQDITQEALFVYTQV
CHALHIMAMLHPEVCPLVLALETLTCYTLSKTNPSVSSLQRAHEQRL
KSIAEGIGPEERQTLLQKMSSF

Gem-associated protein 5 - Gemin5

MGQEPRTLPPSNWYCARCSDAVPGGLFGFAARTSVFLVRGPGAGESP
GTPPFERVIGELVGHTERVSGFTFSHPGQYNLCATSSDDGTVKIWDVETKT
VTEHALHQHTISTLHWSPRVKDLIVSGDEKGVVFCYWFNRNDSQHLFIEP
RTIFCLTCSPHEDLVAIGYKDGIVIIDISKGEVIHRLGHDDEIHSIAWCPL
PGEDCLSINQEETSEAEITNGNAVAQAPVTKGCLATGSKD

Gem-associated protein 7 - Gemin7
MQTPVNIPIVPLRLLPRGPDGFSGRGFAPDGRRAPLRPEVPEIQECPIAQESL
ESQEQRARAALRERYLRSLLAMVGHQVSFTLHEGVRVAAHGATDLDVAN
FYVSQLQTPIGVQAEALLR CSDISYTFKP

Gem-associated protein 8
 MAAVKASTSKATRPWYSHPVYARYWQHYHQAMAWMQSHHNAYRKAV
 ESCFNLPWYLPSALLPQSSYDNEAAYPQSFYDHHVAVQDYPCSSHFRRS
 GQHPRYSSRIQASTKEDQALSKEEEMETESDAEVECDLSNMEITELRQYF
AETERHREFRRQQLDAERLDSYVNADHDLYCNTRRSVEAPTERPGERR
 QAEMKRLGDSAAKIQAMEAAVQLSFDKHDRKQPKYWVPIPLKF

Serine-threonine kinase receptor-associated protein - Unrip
 MAMRQTPLTCSGHTRPVVDLAFSGITPYGYFLISACKDGKPMLRQGDTGD
WIGTFLGHKGAVWGATLNKDATKAATAAADFTAKWDAVSGDELMTLA
 HKHIVKTVDFTQDSNYLLTGGQDKLLRIYDLNKPEAEPKEISGHTSGIKKAL
WCSEDKQILSADDKTVRLDHATMTEVKSLNFMNSVSSMEYIPEGEILVIT
 YGRSIAFHSAVSLDPIKSFEAPATINSASLHPEKEFLVAGGEDFKLYKYDNSG
 EELESYKGFHFGPIHCVRFSPDGELYASGSEDGTLRLWQTVVGKTYGLWKCV
 LPEEDSGELAKPKIGFPETTEEELEEIASENSDCIFPSAPDVKA

Tab. 7.4: Parameter der Peptide für die 4000 Q Trap MRM-Analysen.

| Sequenz | m/zPeptid | m/zFragment | RT [min] | DP [V] | CE [V] |
|---------------------|-----------|-------------|----------|--------|--------|
| LPGPKPGLK schwer | 437,78 | 761,47 | 23,69 | 87,15 | 25,00 |
| | 437,78 | 607,40 | 23,69 | 87,15 | 29,38 |
| | 437,78 | 422,29 | 23,69 | 87,15 | 35,17 |
| | 437,78 | 352,73 | 23,69 | 87,15 | 25,98 |
| | 764,37 | 840,39 | 30,33 | 73,89 | 40,00 |
| ETCVVVYTYGNR schwer | 764,37 | 939,46 | 30,33 | 73,89 | 31,39 |
| | 764,37 | 677,32 | 30,33 | 73,89 | 30,74 |
| | 764,37 | 373,12 | 30,33 | 73,89 | 40,00 |
| | 472,75 | 581,3281 | 30,81 | 65,05 | 23,88 |
| DFTPELGR schwer | 472,75 | 682,38 | 30,81 | 65,05 | 16,41 |
| | 472,75 | 484,28 | 30,81 | 65,05 | 30,71 |
| | 472,75 | 355,23 | 30,81 | 65,05 | 34,64 |
| | 458,76 | 718,3758 | 24,77 | 64,25 | 30,00 |
| TPQEYLR schwer | 458,76 | 590,32 | 24,77 | 64,25 | 30,70 |
| | 458,76 | 461,27 | 24,77 | 64,25 | 29,58 |
| | 458,76 | 408,22 | 24,77 | 64,25 | 25,58 |
| | 536,33 | 811,43 | 37,58 | 61,20 | 24,70 |
| LFILDEADK schwer | 536,33 | 698,34 | 37,58 | 61,20 | 25,83 |
| | 536,33 | 585,26 | 37,58 | 61,20 | 25,36 |
| | 536,33 | 958,50 | 37,58 | 61,20 | 21,07 |
| | 536,33 | 470,23 | 37,58 | 61,20 | 35,83 |
| | 557,80 | 789,40 | 33,07 | 65,05 | 26,31 |
| VLISTDLTSR schwer | 557,80 | 902,48 | 33,07 | 65,05 | 28,55 |
| | 557,80 | 702,37 | 33,07 | 65,05 | 26,43 |
| | 557,80 | 486,29 | 33,07 | 65,05 | 44,17 |
| | 557,80 | 601,32 | 33,07 | 65,05 | 29,64 |
| | 649,37 | 970,51 | 37,73 | 68,90 | 27,36 |
| LDVEEVDLSLR schwer | 649,37 | 613,35 | 37,73 | 68,90 | 29,04 |
| | 649,37 | 712,42 | 37,73 | 68,90 | 33,13 |
| | 649,37 | 841,47 | 37,73 | 68,90 | 31,07 |
| | 649,37 | 498,33 | 37,73 | 68,90 | 45,00 |
| | 649,37 | 385,24 | 37,73 | 68,9 | 29,5 |

Tab. 7.4: Fortsetzung

| Sequenz | m/z _{Peptid} | m/z _{Fragment} | RT [min] | DP [V] | CE [V] |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|----------|--------|--------|
| TNPSVSSLLQR schwer | 606,34 | 996,57 | 33,41 | 66,36 | 26,41 |
| | 606,34 | 713,42 | 33,41 | 66,36 | 38,80 |
| | 606,34 | 899,52 | 33,41 | 66,36 | 39,17 |
| | 606,34 | 499,25 | 33,41 | 66,36 | 28,23 |
| | 606,34 | 812,49 | 33,41 | 66,36 | 35,19 |
| TSVFLVR schwer | 416,24 | 544,35 | 34,29 | 64,12 | 20,33 |
| | 416,24 | 643,42 | 34,29 | 64,12 | 18,97 |
| | 416,24 | 730,45 | 34,29 | 64,12 | 28,65 |
| | 416,24 | 397,28 | 34,29 | 64,12 | 20,83 |
| ELNEDVSADVEER schwer | 757,86 | 815,38 | 27,20 | 86,02 | 36,79 |
| | 757,86 | 914,45 | 27,20 | 86,02 | 33,33 |
| | 757,86 | 728,34 | 27,20 | 86,02 | 39,50 |
| | 757,86 | 542,28 | 27,20 | 86,02 | 50,50 |
| | 757,86 | 657,31 | 27,20 | 86,02 | 30,28 |
| | 757,86 | 583,24 | 27,20 | 86,02 | 32,12 |
| VQDLIEGHLTASQ schwer | 709,39 | 343,16 | 31,99 | 67,78 | 44,72 |
| | 709,39 | 962,50 | 31,99 | 67,78 | 34,17 |
| | 709,39 | 849,42 | 31,99 | 67,78 | 32,50 |
| | 709,39 | 720,37 | 31,99 | 67,78 | 35,00 |
| | 709,39 | 456,25 | 31,99 | 67,78 | 34,58 |
| GPLEWQDYIYK schwer | 710,36 | 709,36 | 39,41 | 83,05 | 31,07 |
| | 710,36 | 837,42 | 39,41 | 83,05 | 30,00 |
| | 710,36 | 594,34 | 39,41 | 83,05 | 29,72 |
| | 710,36 | 318,19 | 39,41 | 83,05 | 44,64 |
| | 710,36 | 397,21 | 39,41 | 83,05 | 34,17 |
| | 710,36 | 407,16 | 39,41 | 83,05 | 52,5 |
| GPDGFSR schwer | 373,35 | 591,28 | 18,37 | 51,90 | 22,21 |
| | 373,35 | 476,25 | 18,37 | 51,90 | 25,21 |
| | 373,35 | 344,67 | 18,37 | 51,90 | 20,83 |
| | 373,35 | 419,23 | 18,37 | 51,90 | 24,17 |
| | 373,35 | 573,27 | 18,37 | 51,90 | 24,17 |
| LPRGPDGFSR schwer | 556,30 | 476,25 | 25,66 | 64,80 | 37,50 |
| | 556,30 | 636,35 | 25,66 | 64,80 | 34,77 |
| | 556,30 | 745,35 | 25,66 | 64,80 | 45,00 |
| | 556,30 | 490,75 | 25,66 | 64,8 | 39,17 |
| CSDIISYTFKP schwer | 669,86 | 363,10 | 37,15 | 62,94 | 34,50 |
| | 669,86 | 750,39 | 37,15 | 62,94 | 25,83 |
| | 669,86 | 476,18 | 37,15 | 62,94 | 35,28 |
| | 669,86 | 863,48 | 37,15 | 62,94 | 35,83 |
| | 669,86 | 345,09 | 37,15 | 62,94 | 35,71 |
| QYFAETER schwer | 527,26 | 762,37 | 24,27 | 54,10 | 30,00 |
| | 527,26 | 615,30 | 24,27 | 54,10 | 34,67 |
| | 527,26 | 544,26 | 24,27 | 54,10 | 25,00 |
| | 527,26 | 415,22 | 24,27 | 54,10 | 24,77 |
| | 527,26 | 247,11 | 24,27 | 54,10 | 40,89 |
| LYGDSAAK schwer | 416,74 | 556,28 | 16,84 | 48,11 | 22,66 |
| | 416,74 | 719,35 | 16,84 | 48,11 | 20,58 |

Tab. 7.4: Fortsetzung

| Sequenz | m/z _{Peptid} | m/z _{Fragment} | RT [min] | DP [V] | CE [V] |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|----------|--------|--------|
| | 416,74 | 384,23 | 16,84 | 48,11 | 20,83 |
| | 416,74 | 402,16 | 16,84 | 48,11 | 25,83 |
| | 416,74 | 249,16 | 16,84 | 48,11 | 23,08 |
| | 523,29 | 731,38 | 25,07 | 66,15 | 29,23 |
| AATAAADFTAK schwer | 523,29 | 660,34 | 25,07 | 66,15 | 25,00 |
| | 523,29 | 802,42 | 25,07 | 66,15 | 25,00 |
| | 523,29 | 903,47 | 25,07 | 66,15 | 23,33 |
| | 523,29 | 589,31 | 25,07 | 66,15 | 23,86 |
| | 610,28 | 731,35 | 35,48 | 66,80 | 26,94 |
| EFLVAGGEDFK schwer | 610,28 | 830,41 | 35,48 | 66,80 | 29,17 |
| | 610,28 | 943,50 | 35,48 | 66,80 | 26,94 |
| | 610,28 | 660,31 | 35,48 | 66,80 | 27,50 |
| | 433,77 | 753,46 | 23,69 | 87,15 | 25,00 |
| LGP GK PGLK leicht | 433,77 | 599,39 | 23,69 | 87,15 | 29,38 |
| | 433,77 | 414,27 | 23,69 | 87,15 | 35,17 |
| | 433,77 | 348,73 | 23,69 | 87,15 | 25,98 |
| | 759,35 | 830,38 | 30,33 | 73,89 | 40,00 |
| ETCVV VYTGYGNR leicht | 759,35 | 929,45 | 30,33 | 73,89 | 31,39 |
| | 759,35 | 667,32 | 30,33 | 73,89 | 30,74 |
| | 759,35 | 373,12 | 30,33 | 73,89 | 40,00 |
| | 467,76 | 571,32 | 30,81 | 65,05 | 23,88 |
| DFTPELGR leicht | 467,76 | 672,37 | 30,81 | 65,05 | 16,41 |
| | 467,76 | 474,27 | 30,81 | 65,05 | 30,71 |
| | 467,76 | 345,23 | 30,81 | 65,05 | 34,64 |
| | 453,76 | 708,37 | 24,77 | 64,25 | 30,00 |
| TPQEYLR leicht | 453,76 | 580,31 | 24,77 | 64,25 | 30,70 |
| | 453,76 | 451,27 | 24,77 | 64,25 | 29,58 |
| | 453,76 | 403,22 | 24,77 | 64,25 | 25,58 |
| | 532,31 | 803,41 | 37,58 | 61,20 | 24,70 |
| LFILDEADK leicht | 532,31 | 690,33 | 37,58 | 61,20 | 25,83 |
| | 532,31 | 577,25 | 37,58 | 61,20 | 25,36 |
| | 532,31 | 950,49 | 37,58 | 61,20 | 21,07 |
| | 532,31 | 462,22 | 37,58 | 61,20 | 35,83 |
| | 552,82 | 779,39 | 33,07 | 65,05 | 26,31 |
| VLISTDLTSR leicht | 552,82 | 892,47 | 33,07 | 65,05 | 28,55 |
| | 552,82 | 692,36 | 33,07 | 65,05 | 26,43 |
| | 552,82 | 476,29 | 33,07 | 65,05 | 44,17 |
| | 552,82 | 591,31 | 33,07 | 65,05 | 29,64 |
| | 644,33 | 960,50 | 37,73 | 68,90 | 27,36 |
| LDVEEV DLSLR leicht | 644,33 | 603,35 | 37,73 | 68,90 | 29,04 |
| | 644,33 | 702,41 | 37,73 | 68,90 | 33,13 |
| | 644,33 | 831,46 | 37,73 | 68,90 | 31,07 |
| | 644,33 | 488,32 | 37,73 | 68,90 | 45,00 |
| | 644,33 | 375,24 | 37,73 | 68,90 | 29,50 |
| | 601,34 | 986,56 | 33,41 | 66,36 | 26,41 |
| TNPSV SLLQR leicht | 601,34 | 703,41 | 33,41 | 66,36 | 38,80 |
| | 601,34 | 889,51 | 33,41 | 66,36 | 39,17 |

Tab. 7.4: Fortsetzung

| Sequenz | m/z _{Peptid} | m/z _{Fragment} | RT [min] | DP [V] | CE [V] |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|----------|--------|--------|
| | 601,34 | 499,25 | 33,41 | 66,36 | 28,23 |
| | 601,34 | 802,48 | 33,41 | 66,36 | 35,19 |
| TSVFLVR leicht | 411,30 | 534,34 | 34,29 | 64,12 | 20,33 |
| | 411,30 | 633,41 | 34,29 | 64,12 | 18,97 |
| | 411,30 | 720,44 | 34,29 | 64,12 | 28,65 |
| | 411,30 | 387,27 | 34,29 | 64,12 | 20,83 |
| | | 752,85 | 805,37 | 27,20 | 86,02 |
| ELNEDVSADVEER leicht | 752,85 | 904,44 | 27,20 | 86,02 | 33,33 |
| | 752,85 | 718,34 | 27,20 | 86,02 | 39,50 |
| | 752,85 | 532,28 | 27,20 | 86,02 | 50,5 |
| | 752,85 | 647,30 | 27,20 | 86,02 | 30,28 |
| | 752,85 | 583,24 | 27,20 | 86,02 | 32,12 |
| VQDLIEGHLTASQ leicht | 705,85 | 343,16 | 31,99 | 67,78 | 44,72 |
| | 705,85 | 955,48 | 31,99 | 67,78 | 34,17 |
| | 705,85 | 842,40 | 31,99 | 67,78 | 32,50 |
| | 705,85 | 713,35 | 31,99 | 67,78 | 35,00 |
| | 705,85 | 456,25 | 31,99 | 67,78 | 34,58 |
| GPLEWQDYIYK leicht | 706,31 | 701,35 | 39,41 | 83,05 | 31,07 |
| | 706,31 | 829,41 | 39,41 | 83,05 | 30,00 |
| | 706,31 | 586,33 | 39,41 | 83,05 | 29,72 |
| | 706,31 | 310,18 | 39,41 | 83,05 | 44,64 |
| | 706,31 | 397,21 | 39,41 | 83,05 | 34,17 |
| | 706,31 | 407,16 | 39,41 | 83,05 | 52,5 |
| GPDGFSR leicht | 368,17 | 581,27 | 18,37 | 51,90 | 22,21 |
| | 368,17 | 466,24 | 18,37 | 51,90 | 25,21 |
| | 368,17 | 339,67 | 18,37 | 51,90 | 20,83 |
| | 368,17 | 409,23 | 18,37 | 51,90 | 24,17 |
| | 368,17 | 563,26 | 18,37 | 51,90 | 24,17 |
| LPRGPDGFSR leicht | 367,86 | 466,24 | 25,66 | 64,80 | 37,50 |
| | 367,86 | 636,35 | 25,66 | 64,80 | 34,77 |
| | 367,86 | 735,35 | 25,66 | 64,80 | 45,00 |
| | 367,86 | 485,75 | 25,66 | 64,80 | 39,17 |
| CSDIISYTFKP leicht | 665,84 | 363,10 | 37,15 | 62,94 | 34,50 |
| | 665,84 | 742,38 | 37,15 | 62,94 | 25,83 |
| | 665,84 | 476,18 | 37,15 | 62,94 | 35,28 |
| | 665,84 | 855,47 | 37,15 | 62,94 | 35,83 |
| | 665,84 | 345,09 | 37,15 | 62,94 | 35,71 |
| QYFAETER leicht | 522,23 | 752,36 | 24,27 | 54,10 | 30,00 |
| | 522,23 | 605,29 | 24,27 | 54,10 | 34,67 |
| | 522,23 | 534,25 | 24,27 | 54,10 | 25,00 |
| | 522,23 | 405,21 | 24,27 | 54,10 | 24,77 |
| | 522,23 | 247,11 | 24,27 | 54,10 | 40,89 |
| LYGDSAAK leicht | 412,78 | 548,27 | 16,84 | 48,11 | 22,66 |
| | 412,78 | 711,33 | 16,84 | 48,11 | 20,58 |
| | 412,78 | 376,22 | 16,84 | 48,11 | 20,83 |
| | 412,78 | 402,16 | 16,84 | 48,11 | 25,83 |
| | 412,78 | 249,16 | 16,84 | 48,11 | 23,08 |

Tab. 7.4: Fortsetzung

| Sequenz | m/z _{Peptid} | m/z _{Fragment} | RT [min] | DP [V] | CE [V] |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|----------|--------|--------|
| AATAAADFTAK leicht | 519,31 | 723,37 | 25,07 | 66,15 | 29,23 |
| | 519,31 | 652,33 | 25,07 | 66,15 | 25,00 |
| | 519,31 | 794,40 | 25,07 | 66,15 | 25,00 |
| | 519,31 | 895,46 | 25,07 | 66,15 | 23,33 |
| | 519,31 | 581,30 | 25,07 | 66,15 | 23,86 |
| EFLVAGGEDFK leicht | 606,31 | 723,33 | 35,48 | 66,80 | 26,94 |
| | 606,31 | 822,40 | 35,48 | 66,80 | 29,17 |
| | 606,31 | 935,48 | 35,48 | 66,80 | 26,94 |
| | 606,31 | 652,30 | 35,48 | 66,8 | 27,5 |

Tab. 7.5: Parameter der Peptide für die TSQ Vantage MRM-Analysen.

| Sequenz | m/z _{Peptid} | m/z _{Fragment} | CE [V] |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|--------|
| LGPGKPGLK leicht | 433,78 | 348,72 | 16 |
| | 433,78 | 377,23 | 17 |
| | 433,78 | 414,27 | 23 |
| | 433,78 | 696,44 | 16 |
| LGPGKPGLK schwer | 437,84 | 352,67 | 16 |
| | 437,84 | 381,20 | 17 |
| | 437,84 | 422,22 | 23 |
| | 437,84 | 704,56 | 16 |
| ETCVVVYTYGYGNR leicht | 759,36 | 750,84 | 13 |
| | 759,36 | 830,38 | 21 |
| | 759,36 | 929,45 | 21 |
| ETCVVVYTYGYGNR schwer | 764,36 | 755,08 | 13 |
| | 764,36 | 840,55 | 21 |
| | 764,36 | 939,84 | 21 |
| DFTPELGR leicht | 467,74 | 234,90 | 25 |
| | 467,74 | 458,73 | 11 |
| | 467,74 | 571,32 | 15 |
| | 467,74 | 672,37 | 14 |
| DFTPELGR schwer | 472,70 | 234,90 | 25 |
| | 472,70 | 463,59 | 11 |
| | 472,70 | 581,23 | 15 |
| | 472,70 | 682,34 | 14 |
| TPQEYLR leicht | 453,74 | 345,68 | 17 |
| | 453,74 | 403,21 | 16 |
| | 453,74 | 580,31 | 19 |
| | 453,74 | 708,37 | 19 |
| TPQEYLR schwer | 458,80 | 350,62 | 17 |
| | 458,80 | 408,17 | 16 |
| | 458,80 | 590,38 | 19 |
| | 458,80 | 718,50 | 19 |
| LFILDEADK leicht | 532,31 | 233,07 | 19 |
| | 532,31 | 261,07 | 17 |

Tab. 7.5: Fortsetzung

| Sequenz | m/z _{Peptid} | m/z _{Fragment} | CE [V] |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|--------|
| | 532,31 | 690,33 | 17 |
| | 532,31 | 803,41 | 16 |
| | 536,33 | 233,07 | 19 |
| LFILDEADK schwer | 536,33 | 261,07 | 17 |
| | 536,33 | 698,49 | 17 |
| | 536,33 | 811,68 | 16 |
| | 552,82 | 185,06 | 22 |
| VLISTDLTSR leicht | 552,82 | 213,05 | 19 |
| | 552,82 | 779,39 | 19 |
| | 552,82 | 892,47 | 19 |
| | 557,86 | 185,06 | 22 |
| VLISTDLTSR schwer | 557,86 | 213,05 | 19 |
| | 557,86 | 789,58 | 19 |
| | 557,86 | 902,80 | 19 |
| | 644,33 | 228,97 | 27 |
| LDVEEVDSLRL leicht | 644,33 | 603,35 | 23 |
| | 644,33 | 702,41 | 25 |
| | 644,33 | 831,46 | 22 |
| | 644,33 | 960,50 | 24 |
| | 649,37 | 228,97 | 27 |
| LDVEEVDSLRL schwer | 649,37 | 613,35 | 23 |
| | 649,37 | 712,49 | 25 |
| | 649,37 | 841,63 | 22 |
| | 649,37 | 970,84 | 24 |
| | 601,34 | 493,79 | 19 |
| TNPSVSSLLQR leicht | 601,34 | 592,33 | 14 |
| | 601,34 | 703,41 | 24 |
| | 601,34 | 986,56 | 20 |
| | 606,34 | 498,71 | 19 |
| TNPSVSSLLQR schwer | 606,34 | 597,59 | 14 |
| | 606,34 | 713,31 | 24 |
| | 606,34 | 996,87 | 20 |
| TSVFLVR leicht | 411,30 | 534,34 | 16 |
| | 411,30 | 633,41 | 15 |
| TSVFLVR schwer | 416,24 | 544,27 | 16 |
| | 416,24 | 643,37 | 15 |
| | 752,85 | 583,10 | 21 |
| ELNEDVSADVEER leicht | 752,85 | 647,30 | 21 |
| | 752,85 | 718,34 | 26 |
| | 752,85 | 744,33 | 11 |
| | 752,85 | 805,37 | 26 |
| | 752,85 | 904,44 | 29 |
| | 752,85 | 1019,46 | 27 |
| | 757,86 | 583,10 | 21 |
| ELNEDVSADVEER schwer | 757,86 | 657,15 | 21 |
| | 757,86 | 728,42 | 26 |
| | 757,86 | 749,00 | 11 |

Tab. 7.5: Fortsetzung

| Sequenz | m/z _{Peptid} | m/z _{Fragment} | CE [V] |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|--------|
| | 757,86 | 815,53 | 26 |
| | 757,86 | 914,74 | 29 |
| | 757,86 | 1029,92 | 27 |
| VQDLIEGHLTASQ leicht | 705,86 | 147,01 | 28 |
| | 705,86 | 233,93 | 22 |
| | 705,86 | 342,87 | 30 |
| | 705,86 | 697,35 | 14 |
| VQDLIEGHLTASQ schwer | 709,38 | 147,01 | 28 |
| | 709,38 | 233,93 | 22 |
| | 709,38 | 342,87 | 30 |
| | 709,38 | 700,72 | 14 |
| GPLEWQDYIYK leicht | 706,35 | 154,84 | 32 |
| | 706,35 | 397,21 | 22 |
| | 706,35 | 697,84 | 6 |
| | 706,35 | 1015,49 | 14 |
| GPLEWQDYIYK schwer | 710,41 | 154,84 | 32 |
| | 710,41 | 397,14 | 22 |
| | 710,41 | 701,92 | 6 |
| | 710,41 | 1024,10 | 14 |
| GPDGF SR leicht | 368,17 | 154,96 | 16 |
| | 368,17 | 339,66 | 15 |
| | 368,17 | 359,17 | 12 |
| | 368,17 | 466,24 | 17 |
| | 368,17 | 581,27 | 15 |
| GPDGF SR schwer | 373,18 | 154,96 | 16 |
| | 373,18 | 344,56 | 15 |
| | 373,18 | 364,15 | 12 |
| | 373,18 | 476,20 | 17 |
| | 373,18 | 591,27 | 15 |
| LPRGPDGF SR leicht | 551,29 | 466,24 | 24 |
| | 551,29 | 542,29 | 19 |
| | 551,29 | 636,47 | 22 |
| LPRGPDGF SR schwer | 556,35 | 476,23 | 24 |
| | 556,35 | 547,47 | 19 |
| | 556,35 | 636,47 | 22 |
| CSDIISYTFKP leicht | 665,84 | 362,99 | 28 |
| | 665,84 | 612,42 | 11 |
| | 665,84 | 742,38 | 17 |
| | 665,84 | 855,47 | 19 |
| CSDIISYTFKP schwer | 669,90 | 362,99 | 28 |
| | 669,90 | 612,42 | 11 |
| | 669,90 | 750,66 | 17 |
| | 669,90 | 863,80 | 19 |
| QYFAETER leicht | 522,23 | 513,24 | 13 |
| | 522,23 | 534,25 | 15 |
| | 522,23 | 605,29 | 19 |
| | 522,23 | 752,36 | 19 |

Tab. 7.5: Fortsetzung

| Sequenz | m/z _{Peptid} | m/z _{Fragment} | CE [V] |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|--------|
| QYFAETER schwer | 527,29 | 518,28 | 13 |
| | 527,29 | 544,34 | 15 |
| | 527,29 | 615,25 | 19 |
| | 527,29 | 762,62 | 19 |
| LYGDSAAK leicht | 412,78 | 249,05 | 15 |
| | 412,78 | 277,00 | 12 |
| | 412,78 | 376,22 | 19 |
| | 412,78 | 548,27 | 14 |
| | 412,78 | 711,33 | 16 |
| LYGDSAAK schwer | 416,74 | 249,01 | 15 |
| | 416,74 | 277,00 | 12 |
| | 416,74 | 384,11 | 19 |
| | 416,74 | 556,27 | 14 |
| | 416,74 | 719,40 | 16 |
| AATAAADFTAK leicht | 519,31 | 439,22 | 16 |
| | 519,31 | 448,23 | 12 |
| | 519,31 | 510,26 | 12 |
| | 519,31 | 723,37 | 16 |
| AATAAADFTAK schwer | 523,33 | 443,22 | 16 |
| | 523,33 | 452,22 | 12 |
| | 523,33 | 514,29 | 12 |
| | 523,33 | 731,55 | 16 |
| EFLVAGGEDFK leicht | 606,31 | 276,92 | 25 |
| | 606,31 | 470,94 | 13 |
| | 606,31 | 652,30 | 19 |
| | 606,31 | 723,33 | 17 |
| | 610,33 | 276,92 | 25 |
| EFLVAGGEDFK schwer | 610,33 | 470,94 | 13 |
| | 610,33 | 660,36 | 19 |
| | 610,33 | 731,53 | 17 |

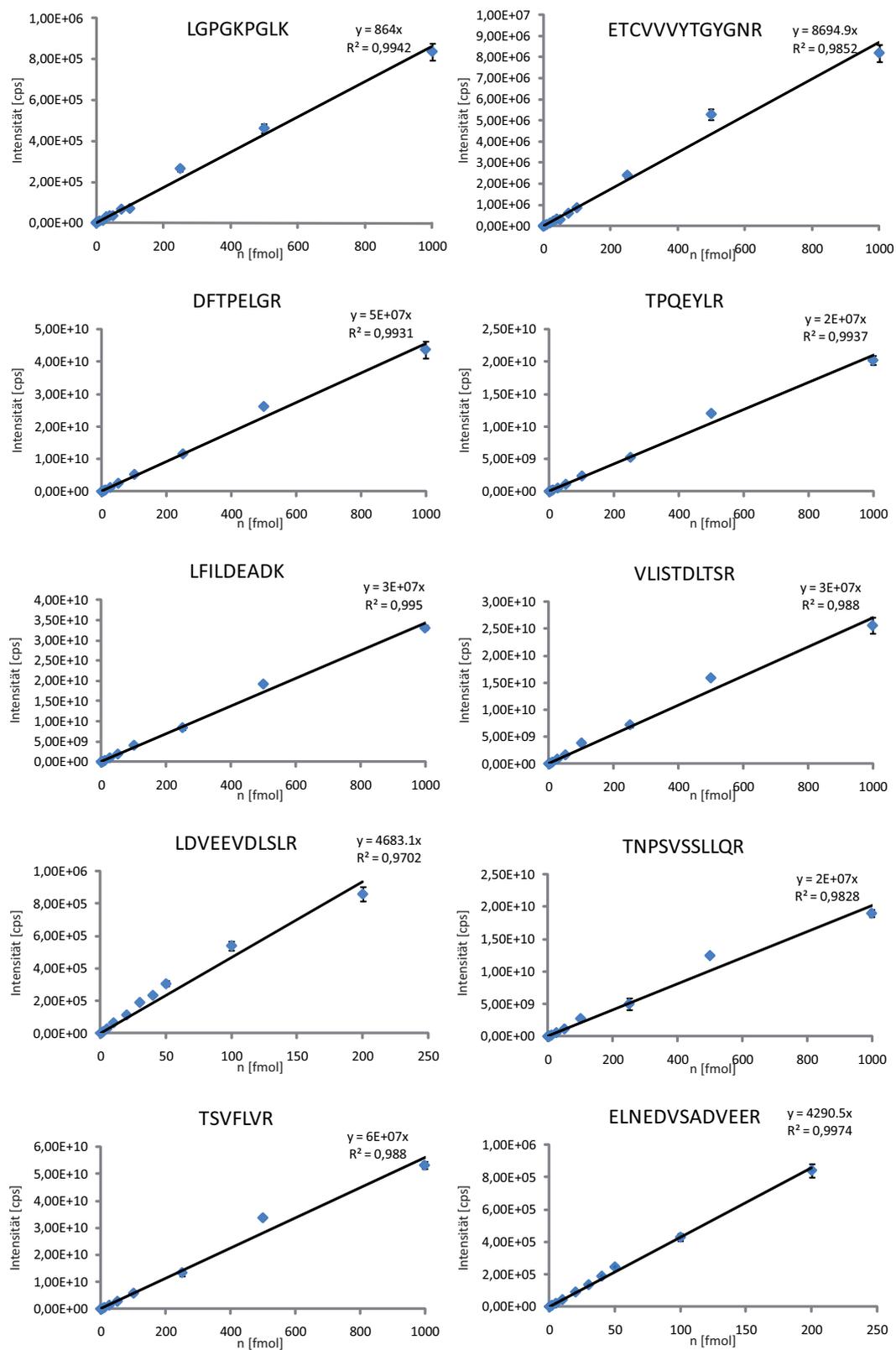
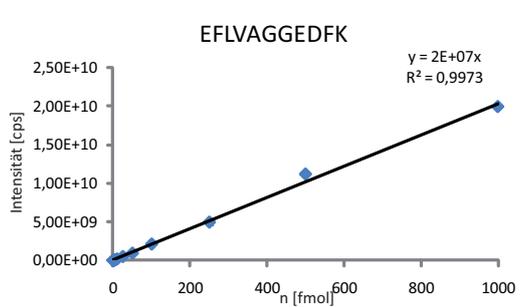
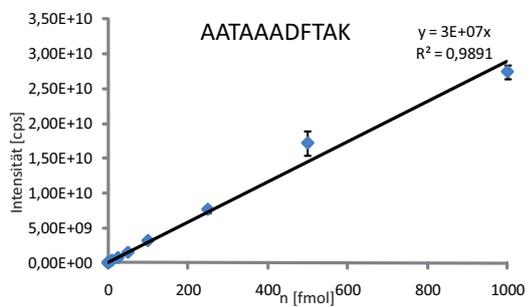
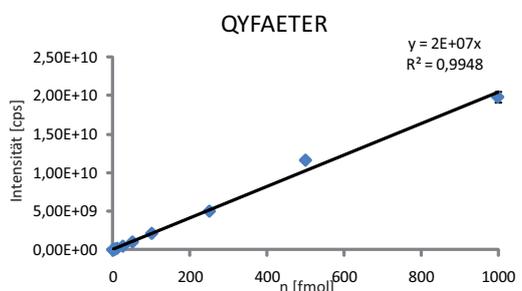
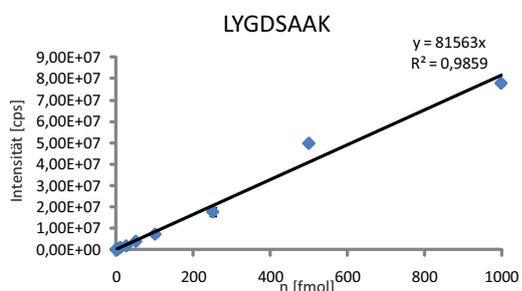
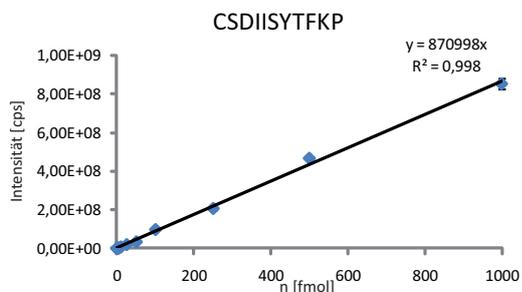
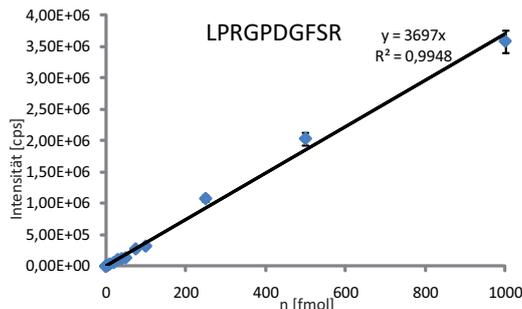
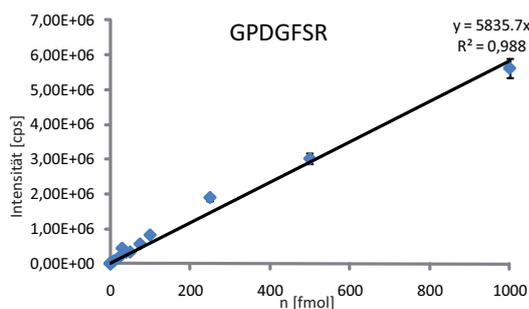
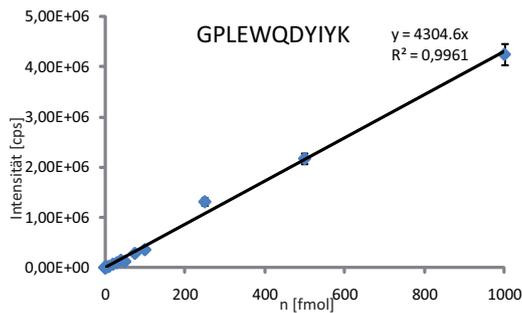
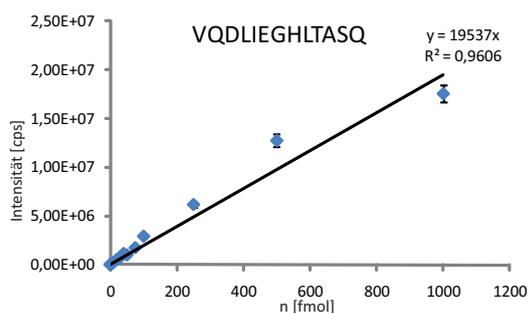


Abb. 7.7: Verdünnungsreihen der AQUA-Peptide.



Tab. 7.6: LTQ Orbitrap Velos Messung der nativen SMN-Komplexe. Die Intensitäten wurden auf das Peptid AVASFK normalisiert.

| Protein | Peptid | Cyto1 | Cyto2 | Cyto3 | MW Cyto | Kern1 | Kern2 | Kern | MW Kern |
|---------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| SMN | AVASFK | 125054951 | 125054951 | 125054951 | 125054951 | 125516719 | 125516719 | 125516719 | 125516719 |
| | LGPGKPLK | 240379627 | 186541212 | 153979134 | 193633324 | 174562220 | 238841021 | 156352668 | 189918636 |
| | ETCVVYTGYNR | 4737108 | 3291059 | 7403702 | 5143956 | 2030240 | 8510790 | 12684589 | 7741873 |
| | NGDICTSGKPK | 38312500 | 33306939 | 24005862 | 31875100 | 18817862 | 41855118 | 34472970 | 31715316 |
| | GTGQSDSDIWDITALIK | 109608601 | 91723996 | 24983395 | 75438664 | 101479130 | 116013439 | 202655716 | 140049428 |
| | SAPWNSFLPPPPMPGPR | 113376850 | 204417348 | 204761056 | 174185085 | 326382693 | 303866977 | 481892121 | 370713930 |
| | TPQEYLR | 344768405 | 243703754 | 255628394 | 281366851 | 150827451 | 271674486 | 186307079 | 202936339 |
| | DFTPELGR | 126783760 | 27608585 | 31806428 | 62066258 | 6606784 | 67631968 | 34719134 | 36319295 |
| | YFDQR | 44673607 | 17359012 | 15037221 | 25689947 | 12931458 | 15459561 | 10704003 | 13031674 |
| | FCLGEK | 332007085 | 106244506 | 151107612 | 196453068 | 81781170 | 193489714 | 121258493 | 132176459 |
| Gemin2 | KFCLGEK | 26221358 | 9781297 | 11980659 | 15994438 | 6593945 | 18553884 | 10417582 | 11855137 |
| | SEDEEGWKK | 32285560 | 13118672 | 16415575 | 20606603 | 9487489 | 19725391 | 10587125 | 13266668 |
| | SQQLDSNVTMPK | 982571513 | 415860758 | 413526643 | 603986304 | 309957223 | 635952254 | 400969077 | 448959518 |
| | TLQIQK | 194609662 | 55981958 | 78543214 | 109711612 | 106239919 | 149193705 | 110980961 | 122138195 |
| | DPTFVR | 51807986 | 1594229 | 3323710 | 18908642 | 3052905 | 19643049 | 17306222 | 13334059 |
| | TAQDLSSPR | 299816479 | 90546881 | 124224859 | 171529406 | 209137573 | 215410625 | 213153454 | 2125567217 |
| | NNSVSGLSVK | 16421092 | 26085737 | 10397873 | 17634900 | 32295991 | 6878956 | 6139918 | 15104955 |
| | LFILDEADK | 105389129 | 12568167 | 11925922 | 43294406 | 19019769 | 43618285 | 75965099 | 46201051 |
| | VLSTDLTSR | 187740803 | 31575445 | 42580781 | 87299010 | 50428400 | 130292686 | 164367979 | 115029689 |
| | VVNSYPLAHK | 5251223 | 5910148 | 4702624 | 5287998 | 63746589 | 9501587 | 3026617 | 25424931 |
| Gemin3 | AQHLADILSSK | 13251578 | 19520115 | 17722262 | 16831318 | 21769176 | 17616107 | 20815836 | 20067040 |
| | TQHLQELFSR | 10244388 | 7114396 | 8639189 | 8665991 | 5982502 | 11857883 | 8088406 | 8642930 |
| | SYLEGSSDNQLK | 45783009 | 4668456 | 4441205 | 18297557 | 2164679 | 23293135 | 34698463 | 20052092 |
| | AAGFERPSPVQLK | 155021854 | 33888317 | 34788231 | 74399467 | 56123101 | 122766070 | 68735472 | 82541548 |
| | QLIELDYLNPGSIR | 44249825 | 5660324 | 4295764 | 18068638 | 7817796 | 34083529 | 45314477 | 29071934 |
| | VLAGILR | 79745930 | 7586255 | 5038634 | 30790273 | 11610811 | 42552641 | 45582270 | 33248574 |
| | GLTQISR | 51742412 | 38626051 | 44269399 | 44879287 | 50356155 | 63180371 | 55329310 | 56288612 |
| | SIAEGIGPEER | 492356255 | 57817023 | 43713271 | 197962183 | 120810174 | 338529171 | 246757913 | 235365753 |
| | TNPSVSSLLQR | 69518563 | 36760482 | 19767612 | 42015552 | 44263775 | 92714199 | 91691702 | 76223225 |
| | LVIVHPEVTVK | 34883774 | 1927168 | 220420 | 12343787 | 3058328 | 20742426 | 18899655 | 14233469 |

Tab. 7.7: Markierungsfreie Quantifizierung mittels der LTQ *Orbitrap* Velos der rekombinanten SMN-Komplexe. Die Intensitäten (Peakflächen der MS-Signale) wurden auf das Peptid AVASFK normalisiert.

| Protein | Peptid | WT | E134K | Y272C |
|---------|-------------------|-----------|-----------|-------------|
| SMN | AVASFK | 461548784 | 461548784 | 461548784 |
| | LGPGKPKGLK | 324240565 | 324548325 | 300418899 |
| | ETCVVYTYGYGNR | 1637956 | 8396490 | 2232979 |
| | NGDICETSGKPK | 185684863 | 180504626 | 133578471 |
| | GTGQSDSDIWDITALIK | 993922030 | 758141049 | 807237385 |
| | SAPWNSFLPPPPMPGPR | 854767397 | 561137119 | 723560794 |
| Gemin2 | TPQEYLR | 474364288 | 502977280 | 435703605 |
| | DFTPELGR | 454258652 | 187748579 | 122067857 |
| | AELAGLK | 198541586 | 204207161 | 205596383 |
| | YFDQR | 54510908 | 62639959 | 56116807 |
| | FCLGEK | 377730722 | 320390439 | 325823130 |
| | KFCLGEK | 20063044 | 20282206 | 18642560 |
| | SEDEEGWKK | 57156128 | 66251129 | 52564874 |
| | SQQLDSNVTMPK | 914202118 | 753157389 | 739422960 |
| Gemin6 | VTASEKNEYK | 19612375 | 12567663 | 2660571.855 |
| | AYSPEDLEER | 392079351 | 305317268 | 135188596 |
| | VQDLIEGHLTASQ | 68947941 | 272958483 | 174465312 |
| | GPLEWQDYIYK | 11367336 | 13791242 | 7594809 |
| | NHIPITEQGDAPR | 64901622 | 59094713 | 20767509 |
| Gemin7 | GPDGFSR | 39599115 | 45314286 | 16911266.13 |
| | QTPVNIPVPVLR | 767170 | 1297323 | 352019 |
| | MQTPVNIPVPVLR | 119896590 | 185941220 | 86623165 |
| Gemin8 | LYGDSAAK | 7925996 | 4479472 | 931824.239 |
| | RLYGDSAAK | 25295812 | 37963428 | 11614535 |
| | QYFAETER | 24797963 | 26836775 | 8676458 |
| | YWPVIPLKF | 2073157 | 2142740 | 3975486 |
| | SVEAPTERPGER | 28192711 | 24681940 | 5686259 |
| | ATRPWYSHPVYAR | 19287361 | 20698724 | 3748289 |

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Albert Sickmann für die interessante Themenstellung, die stetige Diskussionsbereitschaft und Förderung dieser Arbeit, sowie für die persönliche Unterstützung zur Realisierung meines Tagungsbesuch in Australien.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Spiteller danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenfalls gilt Prof. Dr. Utz Fischer großer Dank für die Bereitstellung seiner Labore und stete Kooperationsbereitschaft auf dem Gebiet des SMN-Komplexes. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Clemens Englbrecht lobenswert erwähnen, der sowohl die rekombinanten SMN-Komplexe zur Verfügung gestellt hat, als auch mit Rat und Tat zu Seite stand bei der Reinigung der endogenen SMN-Komplexe.

Allen Sickmännern und -frauen sowohl aus Würzburg, als auch aus Dortmund möchte ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima danken, das weit über das Labor hinausging. Besonderen Dank möchte ich Dr. Urs Lewandrowski und Dr. René P. Zahedi aussprechen, die meine Arbeit im Labor durch ihre Betreuung und ihre ständige Bereitschaft mir alle erdenklichen Fragen zu beantworten, sehr erleichterten. Für das schnelle und kritische Korrekturlesen des Manuskripts und die zahlreichen Anregungen bedanke ich mich sehr herzlich bei Julia M. Burkhart, Dr. René P. Zahedi und Thomas Premser. Meinen Dank möchte ich auch den Damen und Herren von der Technik, Claudia Schütz, Christiane Winkler und Susanne Kroiss aussprechen.

Dem Rudolf-Virchow-Zentrum und der Leibniz-Gemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die durch ihre liebevolle und finanzielle Unterstützung nicht zuletzt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem danke ich herzlichst meinen lieben Freunden Jule, Tine, Sebastian, Carsten und Sven, die mir neben der Arbeit viele schöne Abwechslungen verschafften, mich auf allen meinen Umzügen hilfreich begleiteten und durch ständige Motivation, das Schreiben dieser Arbeit unterstützten.

Zuletzt danke ich Johannes für unsere bisher zwar kurze, aber sehr intensive und abwechslungsreiche Zeit, sowie für die vielen gemeinsamen Momente und Herausforderungen, die uns noch bevor stehen. Du hast mir das Schreiben dieser Arbeit in den letzten Wochen durch Erdulden meiner Launen sehr erleichtert.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Quantitative Analyse des *Survival of Motor Neuron*(SMN)-Komplexes unter Verwendung von Absoluter Quantifizierung SMN-Komplex-spezifischer Peptide durch synthetische stabilisotopenmarkierte Peptidanaloga“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Unterschrift