

Einleitung

Das Human-Genom-Projekt ist weitgehend abgeschlossen, das Genom verschiedenster Organismen ist sequenziert. Die Grundlagen sind geschaffen. Nun stellt sich die eigentlich viel komplexere Frage nach den Genprodukten, nach der Umsetzung der genetischen Information in Proteine. Denn für das Verständnis zellulärer Prozesse nutzt die DNS-Sequenz alleine nichts. Sie bildet die Grundlage, auf der die Proteom-Forschung aufbaut. Was letztendlich interessiert, ist eben das Proteom, das heißt, welche Proteine werden zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen in der Zelle exprimiert, und was ist ihre Funktion? [Przybylski 2001] [Lottspeich 2001] [BIAjournal 2000] Erst damit erhält man Informationen über den Stoffwechselzustand einer Zelle oder eines Gewebes. Das Proteom ändert sich in seiner Zusammensetzung ständig, da Anzahl und Art der Proteine in einer Zelle von zahlreichen, verschiedenen Faktoren abhängig sind. Diese Komplexität macht die Proteom-Analytik ungleich komplizierter als die Genom-Analytik. 2D-Elektrophorese, MALDI, Mikroarray-Techniken sind momentan die Methoden der Wahl. Bis aber Proteom-Forschung wirklich im „High Throughput“ vergleichbar mit der Genom-Forschung möglich wird, muss noch eine Menge Arbeit geleistet werden [Görg 2001].

Mit Hilfe der in den letzten Jahren etablierten DNS-Chip-Technologien ist es bereits heute möglich, das Expressionsmuster von Tausenden von mRNAs aus Geweben oder Zellen routinemäßig auf einem einzigen DNS-Chip qualitativ und quantitativ zu analysieren [Phimister 1999]. DNS-Sequenzen und mRNA-Expressionsdaten alleine sind jedoch nicht ausreichend, um die komplexen, dynamischen Prozesse in Zellen zu erklären. Das gesamte zelluläre Verhalten, das heißt alle intrazellulären Prozesse und interzellulären Wechselwirkungen werden nicht primär über Gene und deren exprimierte mRNA vermittelt, sondern über deren Translationsprodukte, die Proteine und deren vielfältige Interaktionen untereinander gesteuert. Deshalb ist es das erklärte Ziel der Proteom-Forschung, das komplette Proteom einer Zelle oder eines Gewebes, das heißt das Vorkommen, die Menge und die posttranslationalen Modifikationen aller Proteine der Zelle oder des Gewebes zu bestimmten Zeitpunkten zu erfassen [Lopez 2000]. Dadurch sollen die dynamischen Prozesse in Zellen und Geweben auf Proteinebene darstellbar und in ihren molekularen Wechselwirkungen verstehbar werden [Joos 2001]. Dazu gehören komplexe, vernetzte Reaktionskaskaden und regulative Rückkopplungen, ausgehend von den Genen, auf allen Ebenen der Transkription, Translation, Proteinmodifikation, Transport und Interaktionen.

Allerdings reichen die bisher zur Verfügung stehenden Techniken bei weitem nicht aus, um alle Proteine einer Zelle in einem Experiment qualitativ und quantitativ zu

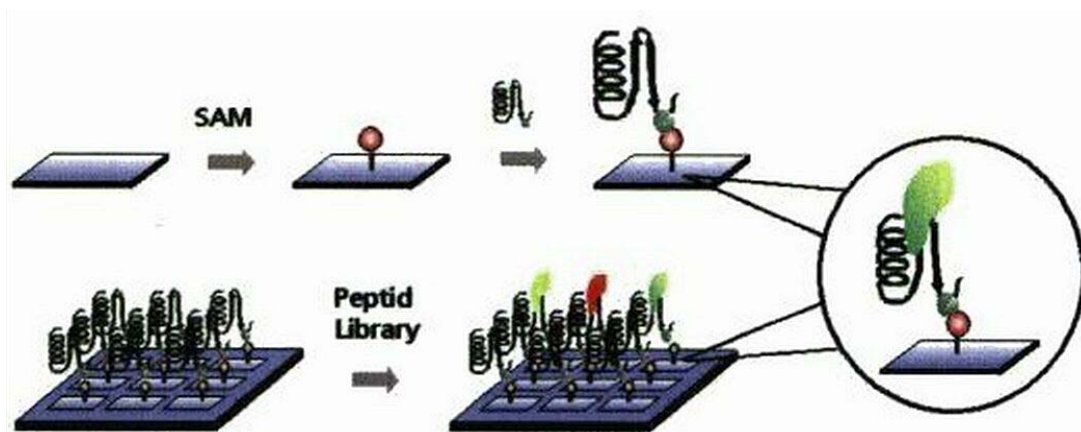
erfassen. Alternativ zu den 2D-Elektrophorese/Massenspektrometrie-basierenden Techniken [Tovar 2001] werden zur Zeit große Anstrengungen unternommen, um die etablierten Methoden der DNS-Chip-Technologie auf Proteine zu übertragen [Abbot 1999].

Alle Proteine des Gesamt-Proteoms werden an bestimmten funktionellen Gruppen (Amino-, Carbonsäure-, Hydroxyl-Gruppen) spezifisch markiert (radioaktiv, Fluorophore, Biotin) und auf einem Mikroarray mit den „Fängermolekülen“ (Sonden) inkubiert. Die an die passenden Fängermoleküle gebundenen, markierten Proteine können nach dem Auswaschen unspezifisch gebundener Proteine orts aufgelöst mit entsprechenden Detektionssystemen nachgewiesen werden [Haab 2001]. Neben diesen Nachweisverfahren werden auch markierungsfreie Detektionsverfahren für die orts aufgelöste, multiple und parallele Detektion von an Fängermoleküle gebundenen Proteinen entwickelt (Oberflächen-Plasmon-Resonanz, SPR). Protein-Mikroarrays werden ihre Anwendung in der Proteom-Analyse und Diagnostik dort finden, wo eine qualitative und quantitative, parallele Bestimmung einer Vielzahl von definierten Proteinen schnell und kostengünstig durchgeführt werden muss.



Das Bild zeigt ein Yeast Pan®-Oligonukleotid-Microarray nach der Hybridisierung mit einem Cy5-markierten Zufallsoligonukleotidmix. Insgesamt enthält der Mikroarray 6348 Sondenpunkte. 6250 Sondenpunkte detektieren jeweils ein unterschiedliches Hefegen. Als Negativkontrolle dienen 7 Arabidopsis thaliana spezifische Sonden, und 91 Hefesonden wurden über das gesamte Mikroarray als Replikate verteilt. Das Vorhandensein von Oligonukleotiden zeigt sich durch ein deutliches Signal nach der Hybridisierung. Die unterschiedliche Intensität der Signale korreliert nicht mit der Menge des gebundenen Oligos. Dies liegt an der unterschiedlichen Kopplungseffizienz während der Oligonukleotidsynthese, welche zu keiner homogenen Sequenzverteilung innerhalb des Zufallsoligonukleotidmix führt [Donner 2001].

Im universitären Bereich werden Peptid-Chips zum Epitop-Screening, Alanin-Scanning und Ligand-Screening genutzt, während Protein-Chips zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen und zum Substrat-Ligand-Screening genutzt werden. Auch ist es möglich, mit Peptid- und Protein-Chips die Proteom-Aktivität zu untersuchen und industrielle Prozesse wie das Metabolismus-Profil von fermentierenden Bakterien zu verfolgen. Eine einfache Anwendung von Protein-Chips besteht beispielsweise in der Ankopplung des Proteins p24 aus dem Kapsid von HIV auf einen Chip. Damit lassen sich anti-HIV-Antikörper in humanen Seren identifizieren. Die gebundenen Antikörper werden über Fluoreszenzmarkierung detektiert [Larbolette 2001]. Die BASF-Tochter Knoll nutzte Protein-Chips bei der Suche nach Inhibitoren für das Target Endothelinkonversionsenzym (ECE), das z.B. beim akuten Nierenversagen eine zentrale Rolle spielt. Das Detektionsprinzip beruhte auf der Fluoreszenzpolarisation [Jäckel 2000].



Proteinchips für die Ligandensuche mit MALDI-MS Analytik: Der Self-Assembled Monolayer (SAM) führt einen Proteinanker ein, an dem ein Proteinrezeptor immobilisiert wird [Tovar 2001].

Wichtige Firmen, die auf dem Gebiet der Protein-Chip-Entwicklung eine Vorreiterrolle spielen und riesige finanzielle Investitionen tätigen, sind z.B. Affymetrix [Brauckmann 1999], Phylos und Zyomyx in den USA, CIPHERgen Biosystems [Eggeling 2000] [George 2001] in Großbritannien, Biacore [BIAjournal 2000] in Schweden, MWG Biotech [Donner 2001] und Graffinity in Deutschland.

Ein fundamentales Postulat der statistischen Mechanik, die Ergodik-Hypothesen, ist, dass der zeitliche Durchschnitt einer physikalischen Größe eines einzelnen Moleküls äquivalent zum Durchschnitt dieser Größe bei der Messung des Ensembles der Moleküle mit gegebener Zeit ist. Man sollte also durch Untersuchung des Ensembles alle Informationen gewinnen können. Damit dieses Postulat jedoch annähernd richtig ist, muss das Ensemble homogen sein, das heißt, aus einheitlichen Bestandteilen

bestehen. Bei inhomogenen Systemen variiert der Durchschnitt der Messungen der Bestandteile mitunter stark und ist nicht mehr äquivalent zum Durchschnitt des Ensembles. Auf der anderen Seite wiederum sind individuelle Phänomene durch unterschiedliche molekulare Nanoumgebungen wie Verteilung von spektralen Positionen und Formen, Photon(anti)bunching, spektrale und Rotationssprünge sowie Photozerstörung einzelner Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle im Ensemble „versteckt“ [Macklin 1996] [Weston 1998 a] [Veerman 1999].

Sehr ausführliche Übersichtsartikel zu Stand, Anwendung und Zukunft der Einzelmolekül-Detektion und Fluoreszenzspektroskopie gibt es von Weiss [Weiss 1999], Barnes et al. [Barnes 1995], Ambrose et al. [Ambrose 1999] sowie Xie und Trautman [Xie 1998].

S. Weiss schreibt in seinem Übersichtsartikel “Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules” über die Geschichte, Markierungsmethoden und physikalische Observablen, Anregungs- und Detektionsmethoden, Reaktionsbedingungen, künftige Verbesserungen und einen Ausblick [Weiss 1999].

M.D. Barnes, W.B. Whitten und J.M. Ramsey beleuchten in ihrem Artikel “Detecting Single Molecules in Liquids” Anwendungsmöglichkeiten, Techniken, die Empfindlichkeitslimitierungen, Detektionskriterien sowie die molekulare Detektionseffizienz [Barnes 1995].

W.P. Ambrose und Kollegen verschaffen in „Single Molecule Fluorescence Spectroscopy at Ambient Temperature“ einen umfangreichen Überblick über die Einzelmolekül-Spektroskopie in fließenden Lösungen mit Methoden und Techniken, Photozerstörung, Daten-Analyse und -Simulation sowie Anwendung, in den nächsten Abschnitten über schwebende Tropfen und konfokale Anregung und Detektion einschließlich Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie in Flüssigkeiten. In weiteren Abschnitten schreiben sie über Detektion in Mikrokapillaren und Mikrostrukturen, über Zwei-Photonen-Anregung und am Ende zu Einzelmolekül-Abbildung mit Kameras unter Umgebungsbedingungen [Ambrose 1999].

X.S. Xie und J.K. Trautman fassen in Ihrem Artikel “Optical Studies of Single Molecules at Room Temperature” aktuelle Entwicklungen in optischen Studien an Einzelmolekülen bei Raumtemperatur zusammen. Sie gehen auf zugrundeliegende Prinzipien, das Potential, Beispiele aus Photochemie und Photophysik mit Einzelmolekül-Messungen, spektralen Schwankungen, Raman-Spektroskopie, Diffusionsbewegung, Konformationsdynamik, FRET, Exciton-Dynamik und Enzymreaktionen ein [Xie 1998].

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, die spektroskopischen Eigenschaften farbstoffmarkierter Proteine bzw. Modellpeptide auf Glasträgern zu kennen.

Aufgabe dieser Arbeit ist es zu zeigen, dass man sowohl unterschiedlich markierte Peptide, als auch gleich markierte Peptide, die sich durch das Vorhandensein von Tryptophan unterscheiden, anhand ihrer spektroskopischen Eigenschaften und in ihrer spezifischen Umgebung auf Einzelmolekülebene identifizieren und unterscheiden kann.