

3.4 Identifizierung von genetisch kartierten Proteinspots durch Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der kartierten Proteinspots mit MALDI Massenspektrometrie wurden Proteinvarianten aus vier silbergefärbten 2D-Gelen (Shevchenko et al. 1996b) ausgestochen und vereinigt. Von 70 zur Identifizierung gegebenen Spots (Dr. Christine Gauss, Max-Planck Institut MPIMG, Berlin-Dahlem) konnten 18 identifiziert werden. Die Ergebnisse sind veröffentlicht (Gauss et al. 1999). Weitere Spots wurden aus Coomassie-gefärbten "dicken" Gelen (Kap.2.2.3) ausgestochen. Die Isoelektrische Focussierung des ca. dreifachen Probenvolumens (50ul Probe) wurde hier in Gelen von 1,5 mm Durchmesser durchgeführt und die Gele wie unter Kap.2.2.3 beschrieben gefärbt. Von 23 zur Analyse gegebene Spots konnten von der Arbeitsgruppe Dr. E. Krause (FMP, Berlin) 16 identifiziert werden, drei davon unsicher.

Einige weitere Spots wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Jungblut am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin, identifiziert. Da viele der polymorphen Proteinspots in sehr geringen Mengen vorlagen, d.h. sie waren auf silbergefärbten Gelen gerade sichtbar und ihre Menge liegt damit im Nanogramm-Bereich, waren viele der Identifizierungsversuche erfolglos. Ein weiterer Grund für fehlgeschlagene Identifizierungen könnte sein, dass diese Proteine noch nicht in Protein- und translatierten DNA-Datenbanken vorhanden sind und aus diesem Grund nicht identifiziert werden konnten.

Tab.3.4.a) Identifizierung von polymorphen Spotpärchen der Elternstämme *Mus musculus* (B6) und *Mus spretus* (SPR)

Variante/ Spot des 2-DE Standardmusters von B6 oder SPR Mr, pI	Identifizierung (MALDI-Analyse) Mr, pI
aV232 D5_068 B6: 17,77 KD, pI 6,34	Nukleosiddiphosphat Kinase A (Mouse) 17,2 KD, pI 6,84
aV232 SPR	Nukleosiddiphosphat Kinase A (Mouse) 17,2 KD, pI 6,84
mV148 B5_440 B6: 44,45 KD, pI 6,71	40 KD Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (Human) CYP4_HUMAN, CYP40 40,7 KD, pI 6,7
mV148 SPR	40 KD Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (Human) CYP4_HUMAN, CYP40 40,7 KD, pI 6,7
mV363 C5_038 B6: 34,61KD, pI 6,18	3-Merkaptopyruvat Schwefeltransferase (Ratte) 32,9 KD, pI 5,87
mV363 SPR	3-Merkaptopyruvat Schwefeltransferase (Ratte) 32,9 KD, pI 5,87
mV146 B5_505 B6: 41,33 KD, pI 6,37	Alkohol Dehydrogenase 2 (Maus) 39,6 KD, pI unbekannt
mV146 SPR	Alkohol Dehydrogenase 2 (Maus) 39,6 KD, pI unbekannt

mV269 B6_088 B6: 56,32 KD, pI 6,73	Glutathion Reduktase (Maus) 50,0 KD, pI 8,12
mV269 SPR	Glutathion Reduktase (Maus) 50,0 KD, pI 8,12
mV147 B5_463 B6: (43,20 KD, pI 6,54)	Acetyl-CoA Acetyltransferase Precursor, mitochondrial (Ratte) 44,7 KD, pI 8,92
mV147 SPR	Acetyl-CoA Acetyltransferase Precursor, mitochondrial (Ratte) 44,7 KD, pI 8,92

Die Identifizierung kartierter Proteinspots zeigte, dass im Rahmen meiner Untersuchung 14 Proteine neu kartiert wurden. Abb.3.4 beleuchtet den Fall der 3-Merkaptopyruvat-Schwefeltransferase: die Kartierung des homologen menschlichen Proteins bestätigt unsere Kartierungsposition eines 2. Genorts in der Maus (Thiosulfat-Sulfurtransferase und Merkaptopyruvat Schwefeltransferase). 20 Proteine waren bereits kartiert und wurden durch meine Analyse in ihrer Kartierungsposition bestätigt. Eine interessante Beobachtung war, dass einige Proteine nicht auf den bekannten Strukturgenlocus kartierten. In Tab.3.4.b), Tab.3.4.c) und Tab.3.4.d) sind die kartierten und gleichzeitig mit Massenspektrometrie identifizierten Proteine aufgelistet. Tab.3.4.b) fasst die Daten zur Neukartierung zusammen. Tab.3.4.a) zeigt Identifizierungsergebnisse für von polymorphen Proteinspots der Mausstämme B6 und SPR. In allen Fällen stammten die polymorphen Spots vom jeweils selben Protein.

Tab.3.4.b) Genetisch kartierte Varianten, die sich nach der Identifizierung mit Massenspektrometrie als neukartierte Proteine erwiesen haben (Molekulargewicht und Isoelektrischer Punkt des 2D-Gel Spots des 2D-Gels siehe Tabelle 1 im Anhang)

Variante/ Spot des 2-DE Standardmusters von B6 / (SPR), Mr, pI	Identifizierung (MALDI-Analyse) Mr, pI	Neuartierung
mV301 A5_294	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, mitochondrialer Precursor (Human) PPCM_HUMAN 70,6 KD, pI 7,56 Q16822 (SwissProt) ¹	Chr14
mV229 C6_023	MMU68535_1 product aldo ketolase (Mouse) 35 KD, pI 7,32 U68535 ²	Chr13
mV148 B5_440	40 KD Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (Human) CYP4_HUMAN, CYP40 40,7 KD, pI 6,7 Q08752 (SwissProt) ¹	Chr3
mV363 C5_038	3-Merkaptopyruvat sulfurtransferase (Rat) 32,9 KD, pI 5,87 P97532 (SwissProt) ¹	Chr 15

mV131 E6_070	Acyl-CoA binding protein (Mouse) 10 KD, pI 8,78 P31786 (SwissProt) ¹	Chr1
mV146 B5_505	Alkohol Dehydrogenase 2 (Mouse) 39,6 KD, pI unbekannt P28474 (SwissProt) ¹	Chr3
mV262 B6_420	QOR_MOUSE Quinone oxidoreductase 35 KD, pI 8,10 ?? ²	Chr3
mV139 C6_217 mV215 C6_224	GTM1_MOUSE Glutathione S-transferase GT8.7 26 KD, pI 8.12 P10649 ²	Chr3
mV93 A2_207	Hsp110	Chr11
mV81 B3_158	AINX_MOUSE Neurofilament protein NF-66 Internexin alpha 56 KD, pI5.0 P46660 (Swissprot) ²	Chr19
mV8 D3_092	RNGMF_1 Glia maturation factor, beta 16,6 KD, pI 5,22 Z11558 ²	Chr14
paV410 B5_523	Cytosolische Acyl-CoA Thioester Hydrolase (Rat) THCC_RAT 37,6 KD, pI unbekannt Q64559 (SwissProt) ¹	Chr 17
mV82 B4_078	ER60_MOUSE prob. protein disulfide isomerase er- 60 precursor 57 KD, pI 6,30 P27773 (Swissprot) ²	Chr17

¹MALDI-Identifizierung Dr.E. Krause

²MALDI-Identifizierung Dr. C. Gauss

³MALDI-Identifizierung Dr. P. Jungblut

Tab.3.4.c) Genetisch kartierte Varianten, die sich nach der Identifizierung mit Massenspektrometrie als bereits kartierte Proteine erwiesen haben. Ihre Kartierungsposition wurde durch diese Arbeit bestätigt. (Molekulargewicht und Isoelektrischer Punkt des 2D-Gel Spots des 2D-Gels siehe Tabelle 1 im Anhang)

Variante /Spot des 2-DE Standardmuster s von B6 Mr, pI	Identifizierung (MALDI-Analyse) Mr, pI	bestätigte Kartierungen
mV269 B6_088	Glutathion Reduktase (Maus) 50,0 KD, pI 8,12 P47791 (SwissProt) ¹	Chr8
mV138 C5_151	Carbonic Anhydrase II gene 29 KD, pI 7,01 M81022 ²	Chr3
mV153 C6_389	DHCA_MOUSE Carbonyl reductase 31 KD, pI 7,74 P48758 ²	Chr16

mV137 C5_167	DHPR_RAT Dihydropteridene reductase 26 KD, pI 7,83 P11348 ²	Chr5
mV154 C5_379	DHCA_MOUSE Carbonyl reductase 31 KD, pI 7,74 P48758 ²	Chr16
mV191 C6_274	PRC5_MOUSE Proteasome component 26 KD, pI 7,38 O09061 ²	Chr17
mV268 B6_084	DHAC_MOUSE Aldehyde dehydrogenase 54 KD, pI 7,55 P24549 ²	Chr19
mV145 B5_611	G3P_MOUSE Glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase P16858 ²	Chr6
mV143 B5_660	G3P_MOUSE Glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase 37 KD, pI 7,14 ?? ³	Chr6
mV27 C2_049	ANX5_MOUSE Annexin 36 KD, pI 4,66 P48036 ²	Chr3
paV110 B3_640	MVMANNEX3_1 gene: "Anx3" 36 KD, pI 5,27 AJ00163 ²	Chr5
mV343 B4_233 B4_340	OAT_MOUSE Ornithine aminotransferase 48 KD, pI 6,61 P29758 ²	Chr7
mV104 A2_097	ENPL_MOUSE Endoplasmin precursor 92 4.57 P08113 ²	Chr10
paV171 B3_248	ANX7_MOUSE Annexin VII, Synexin 50 KD, pI 6,02 Q07076 ²	Chr14
mV83 A4_199	Alb1	Chr5
mV73 B3_359	ENOG_MOUSE gamma Enolase 47 KD, pI 4.84 P17183 ²	Chr6
mV1 E1_026	LDHH_MOUSE L-Lactate dehydrogenase H chain 36 KD, pI 5.95 ??	Chr6
aV274 C6_362	alpha B2 Crystallin 24.1 KD, pI 6.88 M73741 ²	Chr9
mV142 C6_072	Cbr carbonyl reductase 31 KD, pI 7.74 P48758 ²	Chr16
mV135 C5_227	HPRT_MOUSE hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 24 KD, pI 6.67 P00493 ²	Chr X

Tab.3.4.d) Genetisch kartierte Varianten auf, die sich nach der Identifizierung mit Massenspektrometrie als bereits kartierte Proteine erwiesen haben. Ihre Kartierungsposition weicht jedoch von der in dieser Arbeit gefundenen ab. (Molekulargewicht und Isoelektrischer Punkt des 2D-Gel Spots des 2D-Gels siehe Tabelle 1 im Anhang)

Variante /Spot des 2-DE Standardmusters von B6 Mr, pI	Identifizierung (MALDI-Analyse) Mr, pI	abweichende Kartierung	
		diese Arbeit	CCR ⁴
mV147 B5_463	Acetyl-CoA Acetyltransferase Precursor, mitochondrial (Ratte) 44,7 KD, pI 8,92 P17764 (SwissProt) ¹	Chr 9 ⁵	Chr9 ⁶
paV419 B5_464	ALFC_RAT Fructose bisphosphate aldolase C 39 KD, pI 7,10 P09117 ^{2,3}	Chr7	Chr11
aV19 D3_152	TPIS_MOUSE Triosephosphate isomerase 27 KD, pI 7,29 P17751 ^{2,3}	Chr18	Chr6
mV134 C5_271	CAH2_MOUSE Carbonic anhydrase 29 KD, pI 7,05 P00920 ^{2,3}	Chr3, Chr8 ⁷	Chr3
mV248 B6_220	ACON_HUMAN Aconitate hydratase 85 KD, pI 7,46 Q99798 ²	Chr15	Chr10

¹MALDI-Identifizierung Dr.E. Krause

²MALDI-Identifizierung Dr. C. Gauss

³MALDI-Identifizierung Dr. P. Jungblut

⁴CCR 1999 = Chromosome Committee Report, Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics Webseite, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web (URL: <http://www.informatics.jax.org/>). (Blake et al. 2000)

⁵mV147 kartiert proximal von D9Nds8 und Crya2

⁶Acetyl-CoA Acetyltransferase wurde basierend auf einer Rekombination mit Crya2 von Xia (Xia et al. 1996) distal von Crya kartiert

⁷mV134 zeigt schwache Kopplung an telomernahe Marker des Chromosoms 3 und 8

Tab.3.4.e) Zusammenfassung der Kartierungs- und Identifizierungsergebnisse

Neukartierungen	<p>2 Proteine sind weder in Maus, Mensch und Ratte kartiert: mV301, mV229</p> <p>10 Kartierungen wurden bestätigt durch den Vergleich mit der Kartierungsposition des menschlichen Homologs: mV148, mV363, mV131, mV146, mV262, mV139, mV215, mV93, mV81, mV8</p> <p>2 Kartierungen waren abweichend von der Kartierungsposition des menschlichen Homologs: paV410, mV82</p>
Kartierungsergebnisse im Vergleich mit der Maus Konsenskarte (CCR)	<p>20 Kartierungspositionen stehen in Übereinstimmung mit bereits bekannten Kartierungspositionen (CCR): mV269, mV138, mV153, mV137, mV154, mV191, mV268, mV145, mV143, mV27, paV110, mV343, mV104, paV171, mV83, mV73, mV1, aV274, mV142, mV135</p> <p>5 abweichende Kartierungspositionen (CCR): mV147, paV419, aV19, mV134, mV248</p>

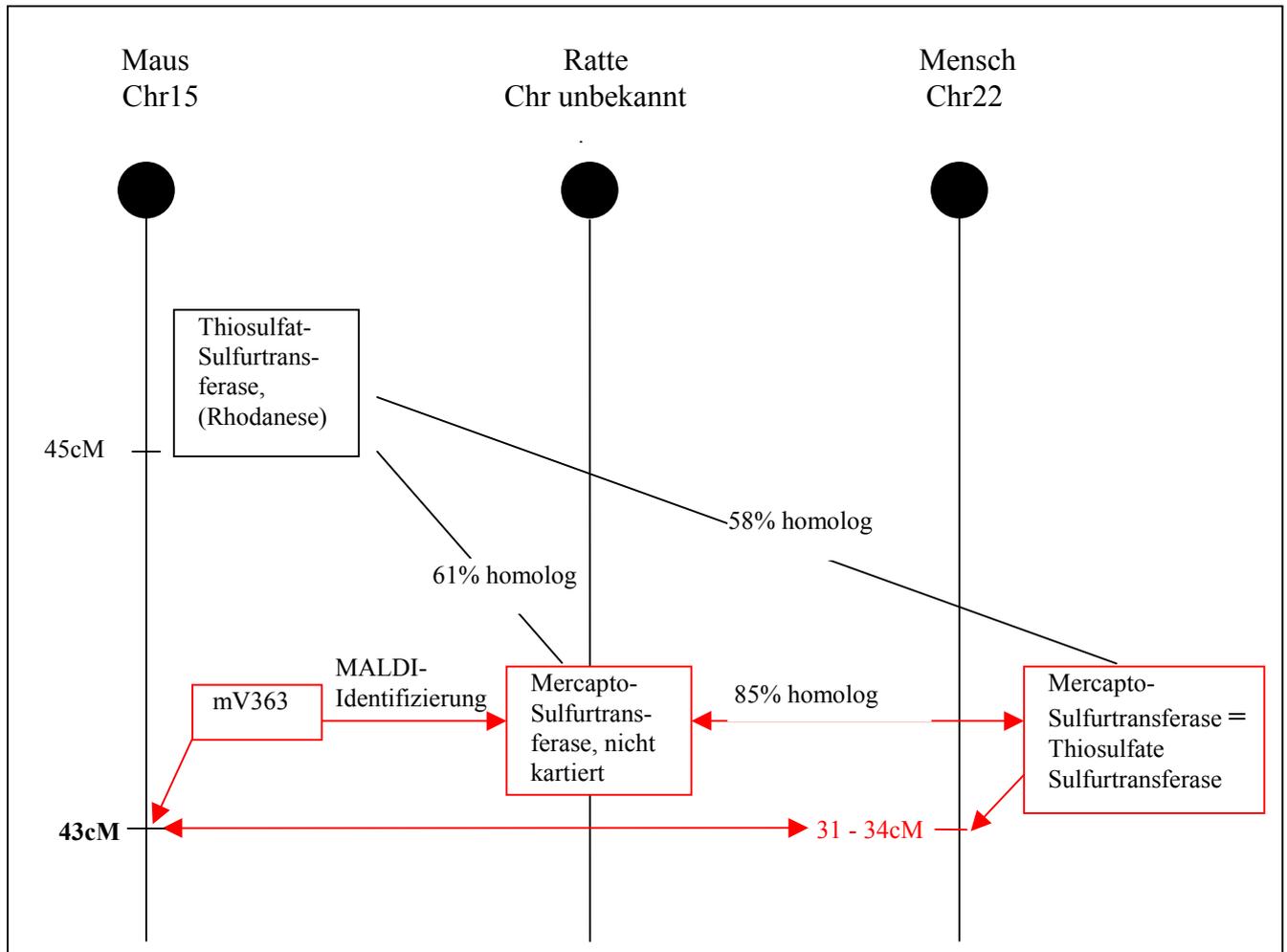


Abb.3.4.: Neukartierung der 3-Merkaptopyruvat-Schwefeltransferase (mV363) in der Maus. Thiosulfat-Sulfurtransferasen (Rhodanesen) und die Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase bestehen aus ca. 296/297 Aminosäuren. Die Proteine des Menschen sind fast identisch und kartieren im menschlichen Genom in dasselbe Markerintervall: Chr 22q13.1 (D22S272 – D22S283) haben jedoch leicht unterschiedliche Substratspezifität. Der kartierte 2D-Spot mv363 entspricht höchstwahrscheinlich der bisher unbekanntenen Maus-Mercaptosulfurtransferase, da die Massenspektrometrie sonst die Maus-Thiosulfat-Sulfurtransferase identifiziert hätte.