

1. Grundlegendes & geschichtlicher Hintergrund

Die **2-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese**, kurz 2D-PAGE oder 2DE, wurde 1975 gleichzeitig, aber unabhängig voneinander, von Klose und O'Farrel entwickelt [1, 2]. Sie dient zur Auftrennung komplexer Proteingemische in die enthaltenen Einzelproteine. Nach der Trennung können dann die einzelnen Proteine identifiziert werden.

Die Identifizierung von Proteinmischungen spielt eine wichtige Rolle in der Proteomforschung, in der Biochemie und in der Molekularbiologie.

In der Pharmazie wird die 2D-Page zur Entwicklung von Arzneistoff-Carriern zum spezifischen Drug Targeting eingesetzt. Drug Targeting bedeutet einen Wirkstoff zu einem bestimmten Wirkort oder -organ zu transportieren. Dadurch wird die therapeutische Effizienz eines Medikamentes erhöht, da der Arzneistoff nur dorthin transportiert wird, wo er auch tatsächlich wirken soll und zusätzlich werden unerwünschte Nebenwirkungen minimiert. Drug Targeting ist somit das große Ziel in der Pharmazie.

Ein Grund, warum dieses Ziel so schwer realisierbar ist, ist die Tatsache, dass intravenös injizierte Partikel innerhalb kurzer Zeit als körperfremd erkannt werden und von Zellen des mononukleären phagozytären Systems (MPS), vor allem von der Leber (Kupfersche Sternzellen) und der Milz aufgenommen werden. Ursache für die Phagozytose ist die Adsorption von im Blut enthaltenen Blutplasmaproteinen, die sofort nach Injektion auf den Partikeln adsorbieren.

Welche Plasmaproteine und wieviel davon auf der Partikeloberfläche adsorbieren hängt von den physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel ab. Somit kann man die Adsorption von Blutplasmaproteinen steuern, indem man die physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel gezielt verändert.

Prinzipiell unterscheidet man:

1. Plasmaproteine, die die Phagozytose verstärken (Opsonine, z.B. Immunglobulin G (IgG) und die Komponenten des Komplementsystems)
2. Plasmaproteine, die eine Phagozytose verhindern (Dysopsonine, z.B. Albumin und Immunglobulin A (IgA))
3. Plasmaproteine, die den wirkstoffspezifischen Transport vermitteln

Ziel der Forschung ist es daher Plasmaproteine, die den wirkstoffspezifischen Transport vermitteln zu identifizieren. Die 2D-PAGE ist, wie oben erwähnt, in der Lage komplexe Proteingemische aufzutrennen und stellt damit eine ideale Technik dar, um Proteinadsorptionsmuster aufzuklären. Sie ermöglicht die Identifizierung von Plasmaproteinen, die den Wirkstofftransport vermitteln, indem Partikel untersucht werden, von denen man weiß, dass sie in der Lage sind einen Wirkstoff zu einem speziellen Wirkort zu transportieren. Die optimalen physiko-chemischen Eigenschaften von Partikeln kann man wiederum ermitteln, indem man die Proteinadsorptionsmuster verschiedener Partikel charakterisiert und die Partikel identifiziert, die eine optimale Adsorption der Targeting vermittelnden Blutplasmaproteine aufweisen. Hierzu werden die Partikel mit

Blutplasma inkubiert. Das jeweils resultierende Proteinabsorptionsmuster wird mittels 2D-PAGE identifiziert.

2. Prinzip der 2D-PAGE

Das Prinzip einer Gelelektrophorese ist immer die Trennung von Molekülen, die sich entweder in ihrer Ladung oder ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Die zu trennenden Moleküle werden auf ein Gel aufgebracht und durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Moleküle durch das Gel. Die zurückgelegte Wegstrecke ist jeweils abhängig von der Ladung bzw. dem Molekulargewicht. Das bedeutet positiv geladene Moleküle wandern zur negativen Kathode und negativ geladene Moleküle wandern zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit und demzufolge die zurückgelegte Wegstrecke pro Zeit ist auch abhängig vom Molekulargewicht. Daher wandern kleine, stark geladene Moleküle am schnellsten und schwachgeladene, große Moleküle am langsamsten.

Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese unterscheidet sich vom klassischen Ablauf der Elektrophorese, da die Trennung der Moleküle in zwei separaten Elektrophorese-Schritten (zwei Dimensionen) durchgeführt wird. Im ersten Schritt, der sogenannten ersten Dimension, werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt im zweiten Schritt (2. Dimension) werden sie dann nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Dazu wird das elektrische Feld senkrecht zur Laufrichtung der 1. Dimension angelegt. Zuletzt werden die Proteine durch Färbung sichtbar gemacht. Abb. 1 verdeutlicht den Ablauf.

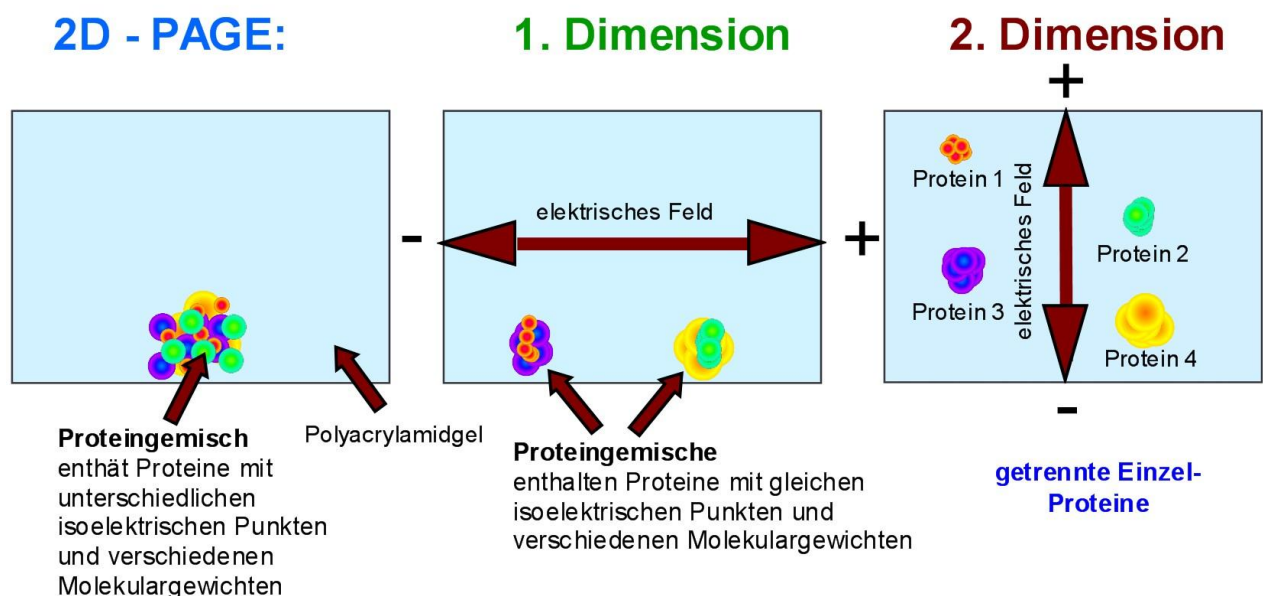


Abb. 1: Prinzip der 2D-PAGE - nach Auftragen des Proteingemisches (links) erfolgt elektrophoretische Trennung nach dem isoelektrischen Punkt (1. Dimension, Mitte), in der 2. Dimension (rechts) erfolgt elektrophoretische Trennung nach Molekülmasse senkrecht zur Laufbahn der 1. Dimension.

3. Erste Dimension: Auftrennung nach isoelektrischem Punkt

Hierzu wird ein Polyacrylamidgel mit einem pH-Gradient von sauer bis basisch hergestellt worauf das zu untersuchende Proteingemisch aufgetragen wird. Danach wird ein elektrisches Feld angelegt und die Proteine beginnen aufgrund ihrer Ladung zu wandern. Da Proteine Zwitterionen sind besitzen sie einen isoelektrischen Punkt. Das bedeutet, dass bei einem bestimmten pH-Wert

das Proteinmolekül nach außen eine neutrale Ladung besitzt, da sich die Ladungen im Molekül gegenseitig aufheben. Erreicht also ein Protein auf dem Gel den Bereich mit dem pH-Wert seines pI wird es nach außen neutral und verbleibt somit an dieser Stelle des Gels. Diesen Vorgang bezeichnet man als „isoelektrische Fokussierung“ (IEF). Abbildung 2 zeigt den Ablauf der 1. Dimension und Abbildung 3 zeigt die dazu benötigten Geräte.

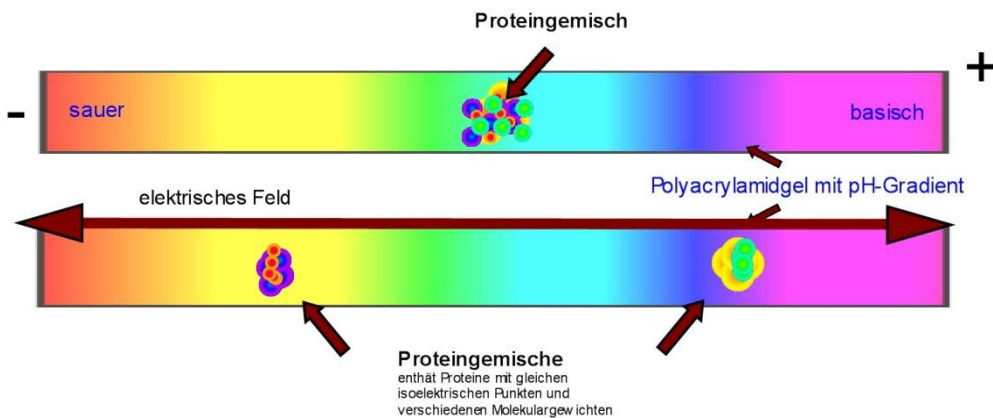


Abb. 2: Ablauf der 1. Dimension - die Proteine werden auf das Gel aufgetragen (oben); durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine bis sie den pH-Wert ihres isoelektrischen Punktes erreichen (unten).

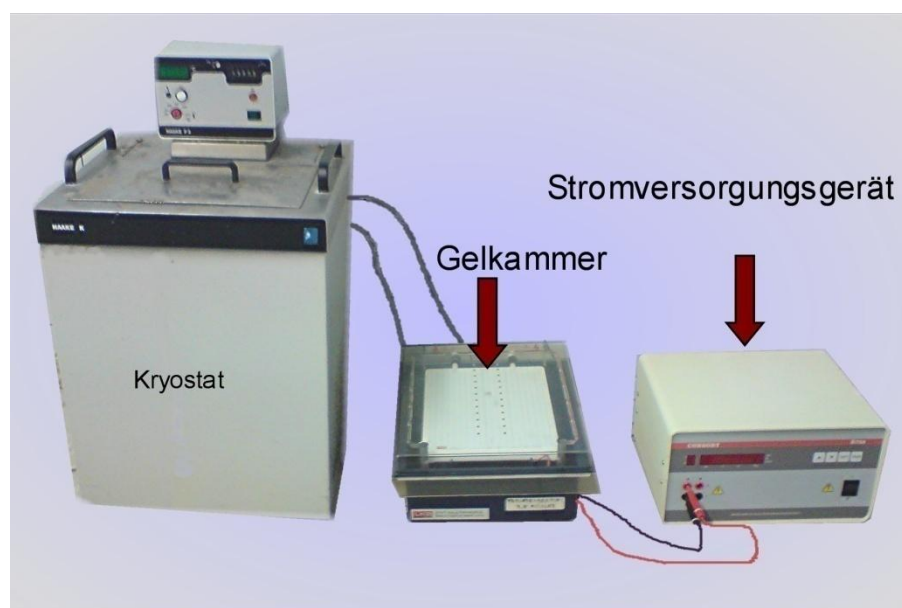


Abb. 3: Geräte für die IEF – Kryostat (links), Gelkammer (Mitte), Stromversorgungsgerät (rechts).

4. Zweite Dimension: Auftrennung nach Molekulargewicht

Nach abgeschlossener Fokussierung müssen die IPG-Streifen auf die bevorstehende zweite Dimension vorbereitet werden. Dieser Vorgang nennt sich Äquilibration. Zunächst wird den Proteinen Natriumlaurylsulfat (engl. sodium lauryl sulfate, SDS) zugesetzt. Dieses maskiert die Eigenladung der Proteine und verursacht so eine hohe negative Nettoladung des Proteins. Zudem verändert dieses Detergens die native Konformation des Proteins, so dass alle Proteine eine mehr oder weniger ähnliche Konformation im Gel aufweisen.

So behandelt lassen sich die IPG-Streifen auf SDS-Gele transferieren. Diese sind im Allgemeinen Gele aus dem vernetzten Polymer Polyacrylamid, weshalb die zweite Dimension auch SDS-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, genannt wird. Dieses Polymer wirkt wie ein Sieb: es verlangsamt Proteine, die in einem elektrischen Feld wandern in etwa proportional zu ihrer molekularen Masse. Gestoppt wird die Elektrophorese, wenn die kleinen, schnell im Gel wandernden Proteine das Ende des Gels erreicht haben. Sichtbar gemacht wird dies durch Zusatz eines Farbstoffes, wie zum Beispiel Bromphenolblau. Damit die Proteine nun an exakt dieser Stelle über die Zeit konstant verbleiben, müssen sie fixiert werden. Dazu werden üblicherweise Methanol oder Ethanol und Essigsäure eingesetzt, welche die getrennten Proteine denaturieren und in der Gelmatrix fixieren. Eingeführt wurde die SDS-PAGE 1967 von Shapiro, Vinuela et al. Abbildung 4 zeigt die Geräte der 2. Dimension.

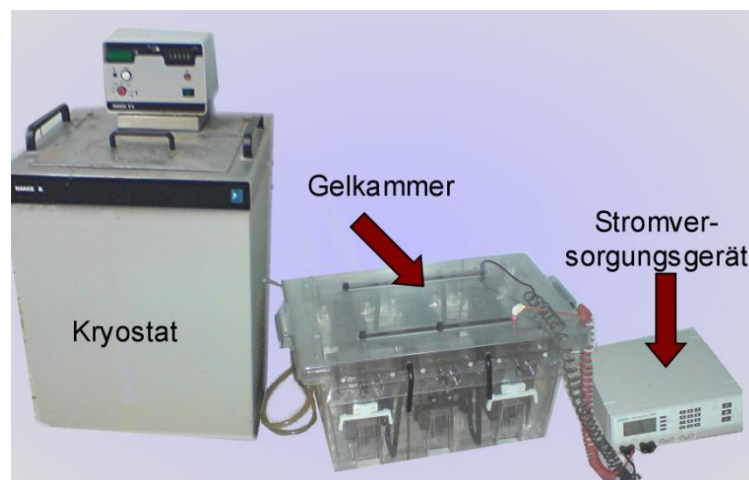


Abb. 4: Geräte für die SDS-PAGE – Kryostat (links), Gelkammer (Mitte), Stromversorgungsgerät (rechts).

5. Färbung und Auswertung

Um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen stehen verschiedene Methoden zur Wahl. Je nach Methode gibt es dazu ein spezielles Färbeprogramm mit verschiedenen Schritten die eingehalten werden müssen. Bei den verschiedenen Methoden unterscheidet man zwischen Absorptionsfarbstoffen, wie Coomassie-Brilliant-Blau oder Silberfärbung und Fluoreszenzfarbstoffen, wie zum Beispiel SyproRuby. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile bezüglich Sensitivität, Störanfälligkeit, Zeitaufwand, etc.

Im Folgenden werden die gefärbten Gele dann mittels Imaging-Geräten digitalisiert. Mit Hilfe von Referenzgelen lassen sich danach die Spots einzelnen Proteingruppen zuweisen. Abbildung 5 zeigt ein so erhaltenes Gel.

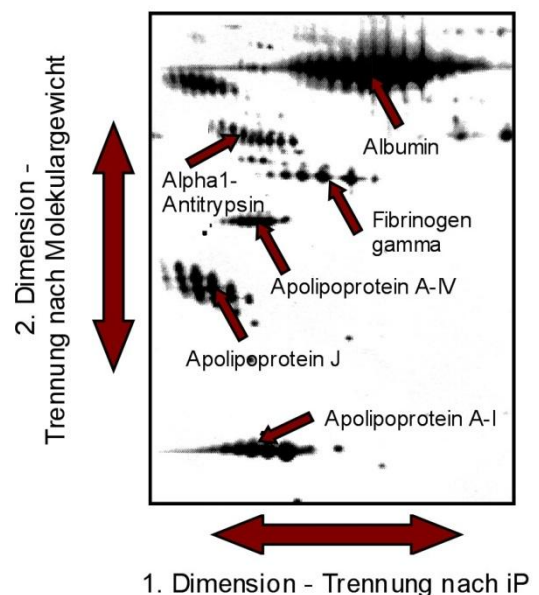


Abb. 5: Gel mit aufgetrennten Proteinspots, die anhand von Referenzgelen identifiziert werden können.

6. State of the Art

Mit Hilfe der 2D-PAGE konnte 1998 gezeigt werden, dass Polysorbat 80 zur Adsorption von Apolipoprotein E führt [3]. Zuvor wurde von Kreuter et. al in einer Reihe erfolgreicher in-vivo-Studien gezeigt, dass Polybutylcyanoacrylat (PBCA)-Nanopartikel die Bluthirnschranke (BHS) passieren können, wenn sie mit Polysorbat 80 stabilisiert werden [4].

Aus diesen Erkenntnissen ergab sich die bahnbrechende Möglichkeit Arzneistoffe über die Blut-Hirnschranke zu transportieren. Durch die Identifizierung von Apo E, also Targeting-vermittelndes Protein, ist es nun möglich weitere Substanzen und Partikeleigenschaften zu ermitteln, die zur vermehrten Adsorption von Apo E führen und somit hocheffizient in der Lage sind Arzneistoffe ins Gehirn zu targeten. In der Zukunft sollen nun auch andere Proteine erforscht werden, die in der Lage sind Arzneistoffe spezifisch in andere Organe oder Gewebe zu transportieren.

7. Literatur

1. J. Klose, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik* 26(3), (1975). pp. 231-43.
2. P.H. O'Farrell, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem* 250(10), (1975). pp. 4007-21.
3. R.H. Müller et al., Medicament excipient particles for tissue-specific application of a medicament. United States Patent 6,288,040, 2001. PharmaSol GmbH.
4. R. Alyautdin, Gothier, D., Petrov, V., Kharkevich, D., Kreuter, J., Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995). pp. 44-48.