

**Untersuchungen
zum molekularen Aufbau von Zell-Zell-Kontakten
und zur differentiellen Expression
von Endothelzellproteinen nach Hypoxie
zur Aufklärung von Pathomechanismen an der
Blut-Hirn-Schranke**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kerstin Sticha (geb. Mikoteit)
aus Eisenach

März 2009

Die Arbeit wurde am Leibnizinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin in der Arbeitsgruppe Zellphysiologie / Molekulare Medizin unter Leitung von PD Dr. Ingolf E. Blasig im Januar 2002 begonnen.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: PD Dr. Ingolf E. Blasig

Disputation am: 15.06.2009

Für Maren und Dirk.

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei denjenigen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig danke ich für sein Interesse an meiner Forschungsarbeit und die Betreuung der Arbeit an der Freien Universität Berlin.

Herrn PD Dr. Ingolf E. Blasig danke ich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit, im Arbeitskreis Zellphysiologie am Leibnizinstitut für Molekulare Pharmakologie praktisch arbeiten zu dürfen und die Betreuung vor Ort.

Herrn Dr. Reiner F. Haseloff danke ich für den regen wissenschaftlichen Austausch, seine offenen Ohren und die unzähligen Geschichten.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie, insbesondere Herrn Dr. Eberhard Krause und Herrn Dr. Michael Schümann für ihre Hilfsbereitschaft und die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse.

Mein herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zellphysiologie am Leibniz-Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, insbesondere danke ich Frau Barbara Eilemann für die Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur. Ausserdem danke ich Christian Köberle, der im Rahmen seiner Diplomarbeit wichtige Vorarbeiten leistete. Meine Arbeit wurde von den Diplomanden Anita Bulczak, Markus Heine, Constanze Wolf und Christian Niehage und der Praktikantin Sonnhild Lehmann begleitet. Ihnen danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit im Labor, die praktische Unterstützung, die fachlichen Diskussionen und schönen zerstreuenden Stunden! Den Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die familiäre Atmosphäre.

Ein herzliches Dankeschön an alle, die mir halfen, die Arbeit über die Jahre hinweg weiterzuführen. Im Besonderen an diejenigen Menschen, die mir durch die Betreuung meiner Kinder die kostbaren Zeitfenster für konzentriertes Arbeiten schufen, vor allem meiner Schwiegermutter Heidi Sticha!

Lieber Dirk, herzlichen Dank für Deine Geduld und Unterstützung!

Inhalt

1	Einleitung	4
1.1	Epithelgewebe	4
1.2	Molekulare Strukturen des Zell-Zell-Kontaktes	5
1.2.1	<i>Tight junction</i> – verschließende Verbindungen	5
1.2.2	Adhärenzverbindungen und Desmosomen – verankernde Verbindungen	8
1.2.3	<i>Gap junction</i> – kommunizierende Verbindungen	11
1.3	„ <i>membrane rafts</i> “ und die Lokalisation von <i>tight junction</i> in diesen Domänen	11
1.4	Epithel und Endothel	14
1.5	Spezielles Abschlussgewebe – die Blut-Hirn-Schranke	15
1.6	Pathologie der Blut-Hirn-Schranke – Hypoxie	18
1.7	Proteomanalyse - Proteomik	19
1.7.1	Methoden der Proteomanalyse	20
1.7.2	Massenspektrometrie	23
1.7.3	Datenbankrecherche	24
1.7.4	Spezielle Methoden der Expressionsanalyse - Markierung	24
1.8	Zielstellung	27
2	Materialien und Methoden	29
2.1	Materialien	29
2.2	Geräte	29
2.3	Methoden	29
2.3.1	Zellkultur	30
2.3.1.1	Normale Rattencholangiocyten (<i>normal rat cholangiocytes</i> - NRC)	30
2.3.1.2	Gehirnkapillarendothelzellen aus der Ratte - <i>rBCEC4</i>	30
2.3.1.3	Markierung von Zellpopulationen mit ¹³ C ₆ Arginin (SILAC)	31
2.3.1.4	Präparation von detergens-unlöslichen Membranfraktionen	32
2.3.1.5	Nonidet P-40 unlösliche Membranfraktion	32
2.3.1.6	Natrium Desoxycholat unlösliche Membranfraktion	33
2.3.1.7	Triton X 100 unlösliche Membranfraktion	34
2.3.1.8	Präparation von <i>detergent resistant membrane fractions</i> aus NRC	35
2.3.1.9	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	36
2.3.1.10	Proteinkonzentrationsbestimmung mit 2-D Quant Anwenderpaket	36
2.3.2	Elektrophoretische Techniken	37
2.3.2.1	Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)	37
2.3.2.2	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (IEF/SDS PAGE)	38
2.3.2.3	Trägerfreie Isoelektrische Fokussierung - Rotofor™	40
2.3.2.4	Modifizierte Polyacrylamidgelelektrophorese - 16-BAC/SDS PAGE	41
2.3.3	Färbung von Gelen mit Coomassie Brilliant Blue G-250	42
2.3.4	Enzymatische Spaltung der Proteine im Gel	43
2.3.5	Identifizierung von Proteinen mit Massenspektrometrie	44
2.3.6	Datenbankrecherche und Quantifizierung	45
2.3.7	Immunoblot	47
2.3.8	Immunfluoreszenz	48

2.3.9	Bestimmung des Cholesterolgehaltes.....	49
2.3.10	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Differentielle Proteinexpression in Gehirn-kapillarendothelzellen nach 24 h Hypoxie.....	50
3.1.1	Untersuchungen zur differentiellen Proteinexpression von Gehirnkapillarendothelzellen nach 24h Hypoxie mit zweidimensionaler Gelelektrophorese	50
3.1.2	Untersuchungen zur differentiellen Proteinexpression von Gehirnkapillarendothelzellen nach 24h Hypoxie mit Fraktionierung durch Rotofor™	52
3.2	Einfluss von Cholesterolentzug auf <i>tight junction</i> Proteine	58
3.2.1	Vorbereitende Untersuchungen	58
3.2.2	Einfluss von Cholesterolentzug mit M β CD auf NRC Zellen	59
3.2.3	Einfluss von Cholesterolentzug mit M β CD auf ausgewählte Proteine.....	60
3.2.4	Einfluss von Cholesterolentzug mit M β CD auf die Lokalisation ausgewählter Proteine	63
3.3	Ergebnisse zur Identifizierung von Zell-Kontakt-Proteinen aus detergens-unlöslichen Membranfraktionen aus Rattenleber.....	68
3.3.1	Präparation von detergens-unlöslichen Fraktionen und Nachweis der Anreicherung von <i>tight junction</i> Proteinen	68
3.3.2	Identifizierung ausgewählter Proteine aus detergens-unlöslichen Membranfraktionen nach Auftrennung mit zweidimensionalen elektrophoretischen Techniken	70
3.3.3	Identifizierung ausgewählter Proteine aus detergens-unlöslichen Membranfraktionen nach eindimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung.....	74
4	Diskussion	82
4.1	Differentielle Proteinexpression in Gehirnkapillarendothelzellen nach Hypoxie.....	84
4.2	Einfluss von Cholesterolentzug auf <i>tight junction</i> Proteine	86
4.3	Identifizierung von Zell-Kontakt-Proteinen aus detergens-unlöslichen Membranfraktionen aus Rattenleber.....	91
4.4	Ausblick	100
5	Zusammenfassung	101
5.1	Zusammenfassung	101
5.2	<i>abstract</i>	103
6	Literatur	104
7	Anhang	114
7.1	Abkürzungen.....	114
7.2	Tabellen	116

1 Einleitung

1.1 Epithelgewebe

Im Laufe der Evolution entstanden immer besser an die Umwelt angepasste und auf bestimmte Funktionen spezialisierte Gewebe- und Zelltypen. Durch starke Differenzierung bildeten sich unter anderem Deckgewebe - Epithelien, die Organstrukturen effektiv von der äußeren Umgebung abgrenzen. Diese schützen das Organ bzw. die Umgebung eines Organs vor dem jeweils andersartigen Milieu (Barriere) und sichern die selektive Aufnahme und Abgabe von Substanzen zum Erhalt der optimalen Bedingungen (Homöostase). Das flächenmäßig größte Epithelgewebe stellt die Epidermis der Haut dar, die mit einer Gesamtfläche von bis zu 2 m² den Körper des Menschen vor Umwelteinflüssen schützt und die Körpertemperatur reguliert. Das Epithelgewebe des Darmes wiederum ist für die Resorption von durch Enzymwirkung aufgeschlossenen Nahrungsbestandteilen verantwortlich und schützt sich selbst effektiv vor dem aggressiven, zersetzenden Milieu im Darmlumen.

Im engeren Sinne bezeichnet das „Epithel“ alle mit der Außenwelt in Kontakt stehenden Abschlussgewebe (Haut und Schleimhäute). Das Endothel stellt eine spezielle Form des Epithels dar. Es bezeichnet die Deckgewebe, die körpereigene Strukturen nicht gegen die Außenwelt, sondern gegen andere Organstrukturen abgrenzen. Dies trifft auf die zum Gefäßlumen hin gerichteten Zellen der obersten Wandschicht des Lymphsystems und des Herz-Kreislaufsystems zu. Das dichteste Endothel stellen die Zellen im Blutkapillarsystem des Gehirns dar. Es zeichnet sich durch besonders undurchlässige Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen aus und wird aus diesem Grund als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet.

Die Merkmale von Endothel- und Epithelgewebe werden zum einen durch die Eigenschaften der beteiligten Zellen bestimmt, zum anderen durch die konkreten Zell-Zell-Kontakte, die sich zwischen benachbarten Zellen ausbilden.

1.2 Molekulare Strukturen des Zell-Zell-Kontaktes

Vier verschiedene Molekülkomplexe sind an der lateralen Verbindung benachbarter Epithelzellen beteiligt. Hierzu zählen die *tight junction*, die den dichten Verschluss des interzellulären Raumes an der dem Lumen zugewandten Zellseite (apikale Seite) bilden. Des Weiteren leisten die Adhärenzverbindungen gemeinsam mit Desmosomen einen Beitrag für eine mechanisch stabile Verbindung, während *gap junction* für die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen verantwortlich sind (siehe Abb. 1).

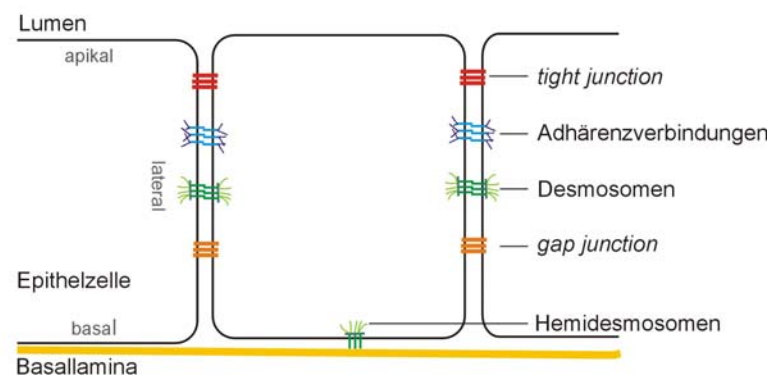


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der verschiedenen Molekülkomplexe, die am Kontakt zwischen benachbarten Epithelzellen beteiligt sind.

1.2.1 *Tight junction* – verschließende Verbindungen

Die Diffusion im interzellulären Spalt (parazelluläre Diffusion) wird durch *tight junction* kontrolliert, wobei deren Morphologie, Permeabilität und Ionenselektivität zwischen Geweben und Spezies variieren kann. Außerdem trennen *tight junction* die Plasmamembran in die apikale, die dem Lumen hin zugewandten Zellseite, sowie die baso-laterale und basale Seite einer Zelle. Als dynamische Strukturen werden sie im natürlichen Prozess und bei entsprechender Stimulation regelmäßig reorganisiert (Lutz 1997). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen bilden *tight junction* kontinuierliche intramembranöse Stränge, die rund um die apikale Seite einer Zelle angeordnet sind und mit denen benachbarter Zellen in Wechselwirkung treten. Dieser Bereich verschließt den parazellulären Spalt dicht und wird als *zonula occludens* bezeichnet. Der molekulare Aufbau von *tight junction* ist vereinfacht in Abb. 2 dargestellt.

Einleitung

Occludin ist das erste entdeckte transmembranale *tight junction* Protein (Furuse 1993) mit einem Molekulargewicht von rund 60 kDa. Das komplette Molekül wird aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären und einer intrazellulären Schleife sowie den zytosolischen N- bzw. C-Termini gebildet. Es gibt Hinweise darauf, dass Occludin vorwiegend phosphoryliert in *tight junction* vorliegt und in nicht phosphoryliertem Zustand bevorzugt in der basolateralen Zytoplasmamembran lokalisiert ist (Sakakibara 1997). In Mäusen, in denen die Occludinexpression unterdrückt wurde (sogenannte *Knock-out-Mäuse*), konnten keine offensichtlichen strukturellen oder funktionellen Störungen der *tight junction* beobachtet werden. Sie fallen allerdings durch Wachstumsretardation, chronische Entzündungen, Hyperplasie des Magenepithels und Calcifizierung des Gehirns auf. Männliche Ratten ohne Occludinexpression sind steril (Saitou 2000). Die Funktion von Occludin in *tight junction* ist noch nicht abschließend geklärt.

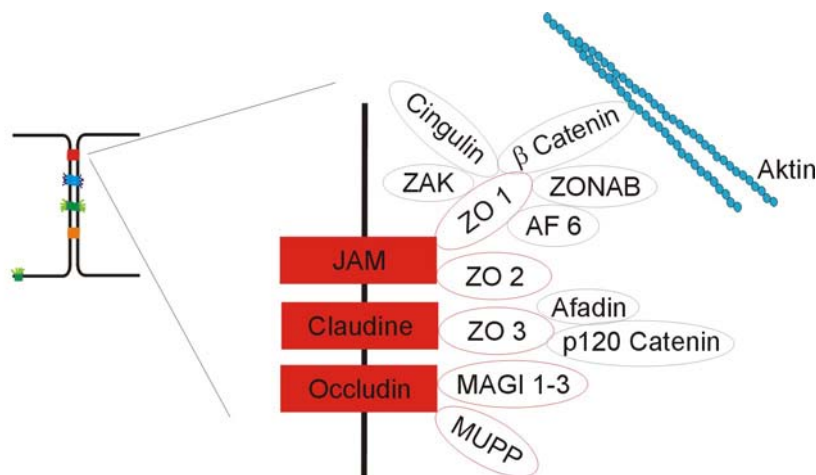


Abb. 2: Vereinfachtes Modell der Proteine und einigen molekularen Interaktionspartnern der *tight junction*

Die transmembranalen Proteine JAM, Claudine und Occludin sind mit einem roten Rechteck unterlegt, während die membranassoziierten *tight junction* Proteine mit einer roten Ellipse gekennzeichnet sind. Mehrere mit diesen Proteinen wechselwirkende Proteine sind dargestellt.

Weitere Transmembranproteine der *tight junction* werden in der Familie der **Claudine** zusammengefasst. In der Proteindatenbank Swissprot (<http://www.expasy.org/sprot/>) sind derzeit 24 verschiedene menschliche Claudine (Bezeichnung Claudin-1 bis Claudin-24) verzeichnet, von denen Claudin-1 und Claudin-2 erstmals 1998 beschrieben wurden (Furuse 1998). Das Molekulargewicht der Claudine schwankt zwischen 20 und 27 kDa. In der Zelle zeigt das Protein vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre, eine intrazelluläre Schleife und den zytosolischen N- und C-Terminus. Die Aminosäurezusammensetzung der zwei extrazellulären Schleifen variiert zwischen den einzelnen

Claudinen sehr stark. Der daraus resultierende isoelektrische Punkt der einzelnen Schleifen liegt jeweils zwischen pH 4 und pH 10. Dieser, bzw. die punktuelle Exposition von negativen und positiven Ladungen, bestimmt die unterschiedliche Ionenselektivität der *tight junction* in den verschiedenen Epithelien (Mitic 2001, Krause 2008). Durch Transfektionsstudien konnten homo- und heterophile Wechselwirkungen von Claudinen benachbarter Zellen nachgewiesen werden (Kubota 1999; Furuse 1999), eine Oligomerisierung wird diskutiert (Furuse 1998; Blasig 2006). Des Weiteren besitzen Claudine am C-Terminus eine spezielle Aminosäureabfolge, die PDZ-Bindungs-Domäne, über die sie neben anderen Proteinen mit den membranassoziierten bzw. zytosolischen *tight junction* Molekülen ZO-1, ZO-2, ZO-3 in Wechselwirkung treten können (Itoh 1999).

Das ***junction adhesion molecule 1*** (JAM-1) wurde auch 1998 erstmals beschrieben (Martin-Padura 1998). Dieses Protein und die weiteren drei Isoformen JAM-2 bis JAM-4, besitzen ein Molekulargewicht von rund 43 kDa, gehören zur IgG Superfamilie und zeichnen sich demzufolge durch eine Transmembrandomäne und zwei sogenannte extrazelluläre V-typ Ig Domänen aus. Diese Domänen können mit denen benachbarter JAM-Moleküle in homophile und heterophile Wechselwirkungen treten (Kostrewa 2001; Arrate 2001). Am C-Terminus besitzen auch JAM-Proteine die charakteristische PDZ-Domänen bindende Aminosäuresequenz. Sie sind möglicherweise in die Regulation der Permeabilität von *tight junction* und die transendotheliale Migration von Leukozyten involviert (Forrest 2003).

Die beschriebenen transmembranalen *tight junction* Proteine treten mit zytosolischen Adapterproteinen in Wechselwirkung, die wiederum direkt oder indirekt über deren C-Terminus eine Bindung zum Zytoskelett der Zelle vermitteln (Fanning 1998).

Die sogenannten ***Zonula occludentes*** (ZO) Proteine gehören aufgrund einer, allerdings inaktiven, Guanylatkinasedomäne zur MAGUK – Familie (*membrane associated guanylate kinase family*). Die drei *tight junction*-assoziierten MAGUK-Proteine (ZO-1, -2, -3) enthalten weitere Sequenzmotive dieser Familie wie z.B. eine Aminosäuresequenz für nucleäre Lokalisation, ein Export-Signal und eine *leucin-zipperlike sequence*. **ZO-1** war das erste, an *tight junction* lokalisierte, identifizierte Protein (Stevenson 1986). Es kann unter anderem mit weiteren ZO-Proteinen (ZO-2 und ZO-3), Claudinen, Occludin, Cingulin, JAM-1, AF-6 und den Aktinfilamenten in Wechselwirkung treten (Schneeberger 2004). Damit übernimmt es eine gerüstbildende Funktion. Außerdem wird über eine Funktion innerhalb der Zell-Zell-Signaltransduktion diskutiert, da Wechselwirkungen mit

Einleitung

β -Catenin in Adhärenzverbindungen und Connexin 43 aus *gap junction* nachweisbar sind (Reichert 2000; Hunter 2005). ZO-1 assoziierte Kinase (ZAK), und ZO-1 *nucleic acid binding protein* (ZONAB), ein Transkriptionsfaktor, können an ZO-1 binden. Die *Zonula occludentes* Proteine 2 (**ZO-2**, 160kDa) (Gumbiner 1991) und 3 (**ZO-3**; 130kDa) (Balda 1991) können auch mit Claudinen, ZO-1, und Occludin in Wechselwirkung treten (Schneeberger 2004). ZO-2 bindet an das Aktin-Zytoskelett und ZO-3 kann mit Afadin und p120 Catenin in Interaktion treten.

Die **MAGI -1, -2, -3** Proteine repräsentieren eine weitere Proteinfamilie, die mit dem zytosolischen Teil der *tight junction* interagieren und die eine PDZ-Bindungs-Domäne enthalten.

MUPP-1 ist ein weiteres zytosolisches *tight junction* Protein mit mehreren PDZ-Bindungs-Domänen, das vermutlich als gerüstbildendes Protein agiert (Hamazaki 2002), und in der Regulation von Epithelzellwachstum und -differenzierung eine Rolle spielen könnte.

1.2.2 Adhärenzverbindungen und Desmosomen – verankernde Verbindungen

Adhärenz-Verbindungen (*adherens junction*), und **Desmosomen** sind verantwortlich für eine mechanisch stabile Verbindung zwischen einzelnen Zellen eines Gewebes. Hauptkomponenten in beiden Strukturen sind Transmembranproteine der Cadherin-familie. Diese Proteine werden bei Adhärenz-Verbindungen auf der zytosolischen Seite durch einen Adhäsions-Plaques mit dem Aktin-Zytoskelett und bei Desmosomen mit Intermediärfilamenten verbunden.

Adhärenz-Verbindungen bilden in Epithelzellen einen durchgängigen Gürtel um die Zelle, der an der apikal / basolateralen Seite der Zelle direkt unter den *tight junction* angesiedelt ist und mit Proteinen aus Adhärenzverbindungen benachbarter Zellen in Kontakt steht. Aus der Proteinfamilie der Cadherine ist **E-Cadherin** die wichtigste Komponente in Epithelzellen. Die Struktur von E-Cadherin zeichnet sich durch fünf kurze, sich wiederholende Cadherin-Motive (polare Ectodomänen), eine Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen Teil aus. Cadherine sind in der Lage durch Interaktion mit einem weiteren Cadherinmolekül der gleichen Plasmamembran ein Dimer zu bilden (cis-Wechselwirkungen), das wiederum mit einem Dimer der benachbarten Zelle

in Wechselwirkung tritt (trans-Wechselwirkungen). Diese Interaktionen finden nur in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen statt.

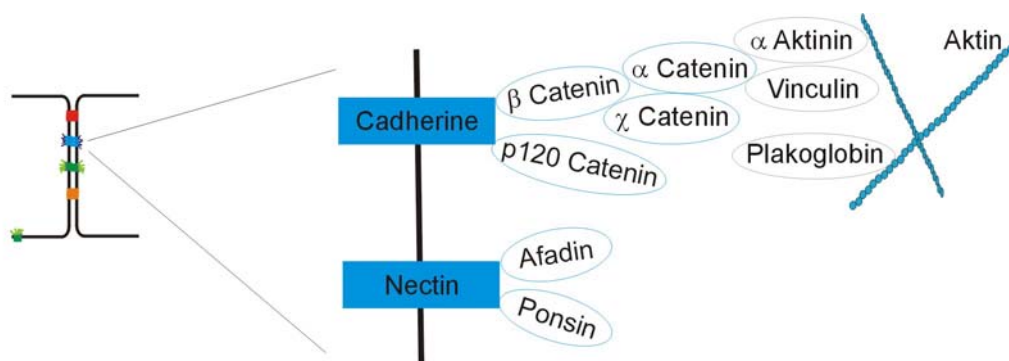


Abb. 3: Vereinfachtes Modell der Proteine und einigen molekularen Interaktionspartnern von Adhärenzverbindungen

Die transmembranalen Proteine Cadherin und Nectin sind mit einem blauen Rechteck unterlegt, während die membranassoziierten und damit direkt interagierenden Proteine mit einer blauen Ellipse gekennzeichnet sind. Weitere, mit diesem Komplex wechselwirkende, Proteine sind dargestellt.

Die Verknüpfung zum Zytoskelett wird über die zytoplasmatische Bindung von β -Catenin, an α -Catenin bzw. Aktin erreicht (siehe Abb. 3). Eine Bindung mit p120 Catenin fördert die Gruppierung von mehreren Cadherinmolekülen an der Zelloberfläche und ermöglicht so die Bildung von festen und stabilen Zell-Zell-Kontakten. Des Weiteren können γ -Catenin, Vinculin, α -Aktinin und Plakoglobin mit diesem Komplex in Wechselwirkung treten. **Nectin-2** ist eine weitere transmembranale, allerdings Ca^{2+} unabhängige, Komponente der Adhärenz-Verbindungen. Nectin-2 gehört der Immunglobulin Superfamilie an und besteht aus 3 Ectodomänen, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Teil. Es werden ähnliche Zell-Zell-Kontakt vermittelnde cis- und trans-Wechselwirkungen wie die der Cadherine beschrieben. Eine Verknüpfung mit dem Zytoskelett wird durch die Bindung von I-Afadin und Ponsin ermöglicht.

Desmosomen hingegen gelten als mechanische Verbindungen zwischen benachbarten Zellen und verteilen Zug- und Scherkräfte im gesamten Epithel und dem darunterliegenden Bindegewebe. Die desmosomalen Cadherine Desmocollin (Dsc) und Desmoglein (Dsg) (siehe Abb. 4) sind transmembranale Glycoproteine, von denen 3 bzw. 4 Isoformen in unterschiedlichen Geweben bekannt sind. Ihr extrazellulärer Teil besteht unter anderem aus einer sich vierfach wiederholenden Sequenz (*extracellular cadherin repeat*). Diese Sequenz kann mit einer ähnlichen Sequenz benachbarter Zellen dimerisieren und bildet so die Grundlage für eine feste interzelluläre Verknüpfung (Syed 2002).

Einleitung

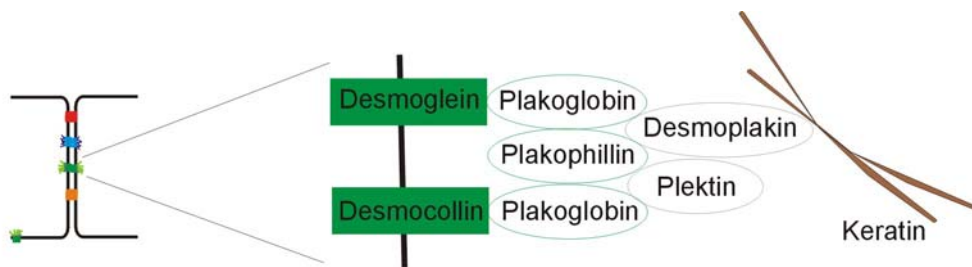


Abb. 4: Vereinfachtes Modell der Proteine und einigen molekularen Interaktionspartnern von Desmosomen

Die transmembranalen Proteine Desmoglein und Desmocollin sind mit einem grünen Rechteck unterlegt, während die membranassoziierten und damit direkt interagierenden Proteine mit einer grünen Ellipse gekennzeichnet sind. Über die Proteine Desmoplakin und Plektin wird eine Verbindung zu Intermediärfilamenten aus Keratinen geschaffen.

Die desmosomalen Plaque-Proteine können zwei Proteinfamilien zugeordnet werden. Während Plakoglobin und Plakophilin mit ihren 12 bzw. 10 Armadillo – Sequenz Wiederholungen Vertreter der *armadillo-repeat* Familie sind, gehören Desmoplakin und Plektin zur Plakin-Familie. Das bedeutendste desmosomale Plaque Protein ist Desmoplakin, das wiederum in zwei Isoformen in Desmosomen zu finden ist (Huber 2003) Es ist erforderlich für deren korrekten Aufbau und die Assoziation zum Intermediärfilamentnetzwerk. Plakoglobin und Plakophilin nehmen nicht nur strukturelle Funktionen wahr, sondern sind auch an regulatorischen und Signalprozessen beteiligt (Hatzfeld 1999; Leung 2002).

Verankernde Zell-Matrix Verbindungen werden auch als **Fokalkontakte** bezeichnet. Auch sie bestehen aus integralen Membranproteinen (Integrinen), die mit Anheftungsproteinen (wie z.B. Talin, α -Actinin, Filamin) einen festen Kontakt zu Aktinfilamenten herstellen (siehe Abb. 5).

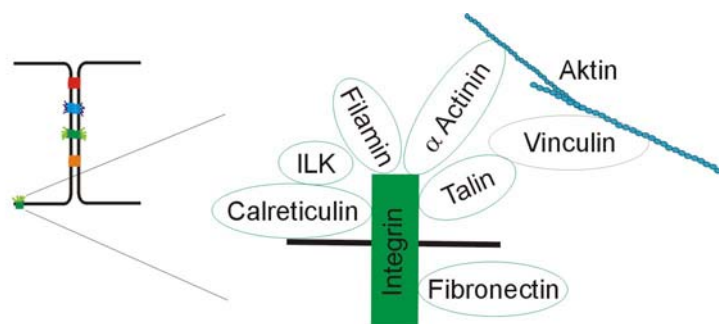


Abb. 5: Vereinfachtes Modell von Fokalkontakten. Das transmembranale Protein Integrin ist mit einem grünen Rechteck unterlegt, während die damit direkt interagierenden Proteine mit einer grünen Ellipse gekennzeichnet sind. Über die Proteine Talin, α -Actinin, Vinculin bzw. Filamin wird eine Verbindung zu Aktinfilamenten geschaffen. Eine Reihe von weiteren Bindungspartnern ist beschrieben [z.B. *Integrin linked kinase* (ILK), Calreticulin].

1.2.3 *Gap junction* – kommunizierende Verbindungen

Die interzelluläre Kommunikation wird durch die Bildung von **gap junction** gewährleistet. Diese werden aus je zwei Halbkanälen der beteiligten Zellen gebildet, die aus einem Hexamer aus Connexinen, dem Connexon, bestehen (siehe Abb. 6). Diese Kanäle ermöglichen die Verbreitung elektrischer Impulse und den Transfer kleiner Moleküle bis 1000 Da (z.B. anorganische Ionen, Zucker, Aminosäuren) von Zelle zu Zelle.

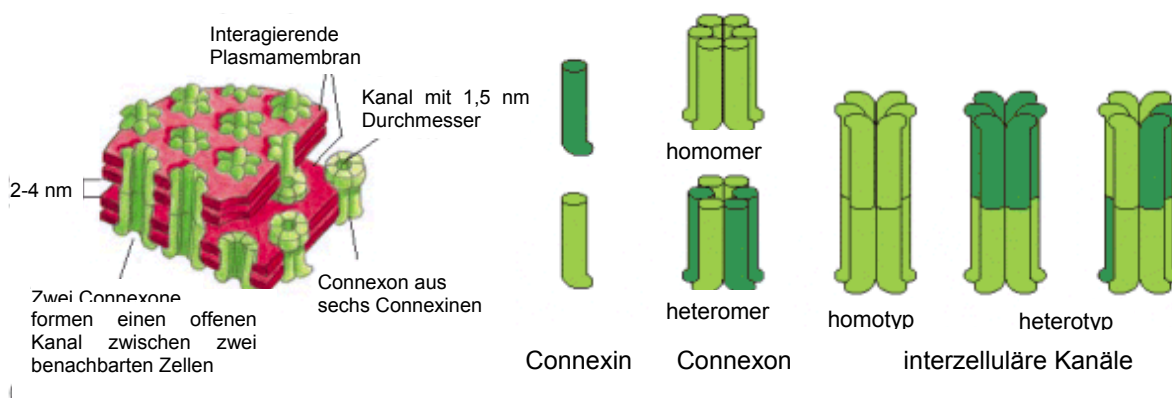


Abb. 6: Schematische Darstellung von gap junction [modifiziert nach (Alberts 2003)]

Connexine bestehen aus vier transmembranalen α -Helices, zwei extrazellulären und einer intrazellulären Schleife und den zytosolischen N- und C-Termini. Die Unterschiede zwischen den Sequenzen der 21 im Menschen beschriebenen Connexine befinden sich vorrangig im C-Terminus, wobei das geschätzte Gesamtmolekulargewicht (in kDa) für die Bezeichnung der einzelnen Connexine herangezogen wird. Die Expression ist abhängig von Gewebe und Zellart, wodurch die Eigenschaften der Kanäle maßgeblich bestimmt werden. Die Regulation erfolgt über (De-) Phosphorylierung der Connexine, den intrazellulären pH sowie die Calciumkonzentration.

1.3 „*membrane rafts*“ und die Lokalisation von *tight junction* in diesen Domänen

Die „*raft*-Hypothese“ wurde im Jahr 1997 von Kai Simons und seinen Mitarbeitern aufgestellt (Simons 1997) und begründete sich auf der Beobachtung, dass verschiedene Lipid-Spezies asymmetrisch an den lateralen Seiten einer Zelle und innerhalb der inneren und äußeren Biomembran vorliegen. Diese These wird durch die Beobachtung von Membranstrukturen an Modell-Membranen unterstützt.

Einleitung

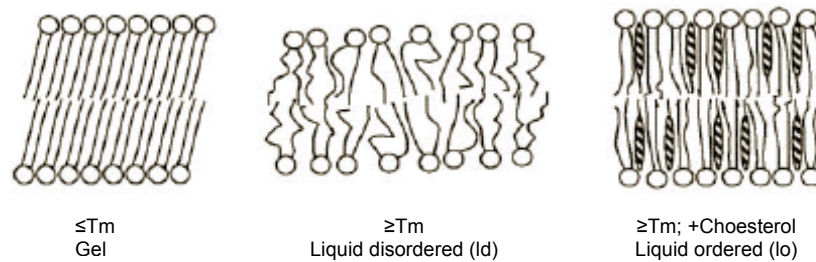


Abb. 7: Strukturen einer Biomembran Doppelschicht

Einige Biomembranen bilden unterhalb ihrer Schmelztemperatur (T_m) eine feste Gelphase (Gel), die oberhalb ihrer Schmelztemperatur zu einer flüssig-ungeordneten Phase (*liquid disordered* – Ld) schmilzt. Durch Cholesterol werden die Acylketten der Lipide geordnet, während die Fluidität gegenüber dem Gelzustand erhalten bleibt [nach (Munro 2003)].

Während einfache Phospholipid Doppelschichten oberhalb ihrer Schmelztemperatur eine ungeordnete Struktur zeigen (*liquid disordered* – Ld) (siehe Abb. 7), bilden sich in Anwesenheit von Cholesterol flüssig-geordnete Phasenbereiche aus (*liquid ordered* – Lo).

Bei der „*raft*-Hypothese“ wird angenommen, dass sich in Biomembranen aus Sphingolipiden und Cholesterol bevorzugt *liquid ordered* Membranbereiche bilden, und diese als frei bewegliche, starre Flöße, sogenannte Microdomänen, eine Plattform für inkorporierte Proteine bestimmter Eigenschaften bilden.

Seit dieser Publikation wurde mit verschiedenen Ansätzen versucht, die Existenz, den Aufbau und die ursächlichen Bildungsmechanismen von *raft*-Strukturen in der Zelle aufzuklären. In deren Folge werden *raft*-Strukturen als kleine (10-200 nm), heterogene, stark dynamische, sterol- und sphingolipidangereicherte Domänen definiert, die zelluläre Prozesse kompartimentieren und durch Protein-Protein – oder Protein-Lipid-Interaktionen zu größeren Plattformen stabilisiert werden können. Es wurde vorgeschlagen, den Begriff „*lipid raft*“ gegen „*membrane raft*“ zu ersetzen (Pike 2006).

Ursächliche Mechanismen der Bildung von *membrane rafts* werden noch diskutiert. Linda Pike stellte fest, dass *rafts* keine einheitliche Plattform, sondern eine Mischung von Domänen unterschiedlicher Zusammensetzung darstellen. Sie postulierte das *induced fit model*, bei dem davon ausgegangen wird, dass individuelle *raft*-Proteine mit verschiedenen *raft*-Lipiden interagieren und so eine Optimierung der Stabilität von Protein-Lipidkomplexen erreichen (Pike 2004). Dies ähnelt der Theorie der *lipid shell* von Richard Anderson, der davon ausgeht, dass ein Protein von einem Komplex aus Cholesterol und Sphingolipiden ummantelt wird (Anderson 2002). Akihiro Kusumi (Kusumi 2005) formuliert die Hypothese, dass die Plasmamembran in kleine (30-230 nm)

Kompartimente untergliedert ist, in denen Proteine und Lipidmoleküle inkorporiert sind. Das Aktin-Zytoskelett fungiert dabei als Barriere. Die verankerten Transmembranproteine behindern die Mobilität benachbarter Moleküle und stabilisieren diese in dem Kompartiment (Kusumi 2005). John Hancock (Hancock 2006) hat Hinweise auf sehr kleine (< 10 nm), sehr kurzlebige (< 0,1 ms) Domänen, die durch Proteine stabilisiert werden können und mit weiteren Protein-Lipidkomplexen zu größeren Plattformen fusionieren. Im Unterschied zu anderen Theorien initiieren beim ersten Bildungsschritt Proteine ihre Umgebung (Hancock 2006).

Wegen ihrer charakteristischen Lipidzusammensetzung wird davon ausgegangen, dass *membrane raft* Domänen im Gegensatz zu der sie umgebenden Membran stark geordnet sind und schwer bzw. unlöslich in nichtionischen Detergentienlösungen (z.B. 1 % Triton X 100) sind. Diese Eigenschaft stellt eine der wenigen indirekten Möglichkeiten für Studien zur molekularen Zusammensetzung der *membrane rafts* dar. Aus diesem Grund werden in der Literatur die Begriffe *lipid rafts* bzw. *membrane rafts* häufig mit detergens-unlösliche Membranfraktion (*detergent resistant membrane fractions* – DRM) gleichgestellt oder mit cholesterol-angereicherten detergens-unlöslichen glycolipid angereicherten *rafts* (*Cholesterol enriched detergent insoluble glycolipid raft* – DIG) synonym verwendet (Nusrat 2000; Brown 1997).

Auch die Lokalisation von *tight junction* in *membrane raft* wird erörtert. Es gibt Hinweise auf eine Anreicherung von *tight junction* Proteinen in DIG. Außerdem kann das Transmembranprotein Occludin kolokalisiert zu Caveolin-1, einem in DIG enthaltenen Protein, in der intakten Zelle detektiert werden (Nusrat 2000).

Eine Methode für Untersuchungen von *lipid raft* stellt der Entzug von Cholesterol mit einem spezifisch Cholesterol entziehenden Agens dar (Foster 2003). Hierfür steht z.B. Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) zur Verfügung, in dessen Ringstruktur Cholesterol gebunden werden kann und das damit der Biomembran entzogen wird. Hierdurch werden mit Cholesterol angereicherte *raft* Domänen zerstört, und die enthaltenen Proteine orientieren sich innerhalb der Zelle neu. Diese Veränderungen können im Vergleich mit unbehandelten Zellen aufgeklärt und untersucht werden.

1.4 Epithel und Endothel

Die speziellen Anforderungen an Endothelgewebe spiegeln sich in der Anpassung der Zell-Kontakt-Strukturen wider. Während epitheliales Gewebe hauptsächlich als Barriere fungiert und die Homöostase sicherstellt, regulieren endotheliale Gewebe die Permeabilität von im Plasma gelösten Substanzen bzw. die Infiltration von Leukocyten in entzündetes Gewebe (Johnson-Leger 2000).

Epithelien und Endothelien werden während der Organo- bzw. Histogenese aus unterschiedlichen Keimblättern gebildet. Während sich die Epithelien des Atmungs- bzw. des Verdauungstraktes aus dem inneren Keimblatt (Entoderm) entwickeln, differenzieren sich aus dem mittleren Keimblatt (Mesoderm) zunehmend die Endothelien des Lymphsystems und des Blutkreislaufes, während das äußere Keimblatt (Ektoderm) sich zum Oberflächenepithel der Sinnesorgane formt.

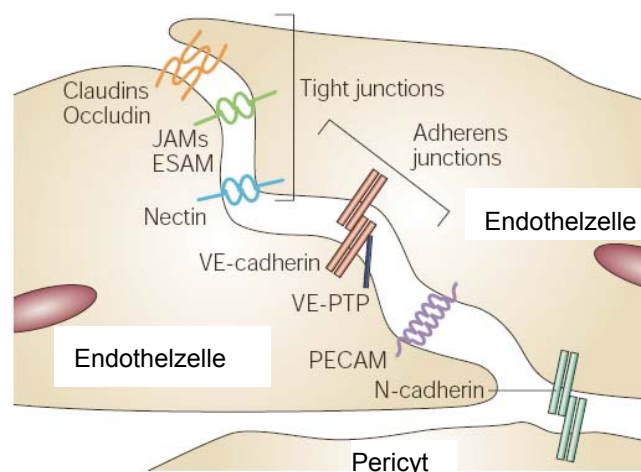


Abb. 8: Molekulare Organisation von endothelialen Zell-Zell-Kontakten [nach (Dejana 2004)]
Claudine, Occludin, JAM und ESAM sind im *tight junction* Komplex organisiert. VE-Cadherin und dessen bindendes Protein VE-PTP bilden die Grundstruktur der Adhärenzverbindungen, Nectin kann in *tight junction* und Adhärenzverbindungen nachgewiesen werden. PECAM und N-Cadherin werden exprimiert. Es fehlen desmosomale Strukturen.

Im Aufbau von Endothelien ist die weniger geordnete Abfolge der junctionalen Strukturen an der basolateralen Seite der Zelle und das Fehlen von Desmosomen grundlegender Unterschied zu Epithelien. Auch die molekulare Zusammensetzung der Zell-Kontakt-Komplexe zeigt charakteristische Modifikationen. In *tight junction* werden aus der gesamten Claudin-Familie Claudin-1, -5 und -12 und zusätzlich das *endothelial cell selective adhesion molecule* (ESAM) exprimiert. In Adhärenzverbindungen endothelialer Zel-

len dominiert zum Beispiel das *vascular endothelial cadherin* (VE-Cadherin), an welches *vascular endothelial protein tyrosine phosphatase* (VE-PTP) binden kann. Nectin kann in *tight junction* sowie in Adhärenzverbindungen gefunden werden. In *gap junction* wurden in endothelialen Zellen Connexin 37, 40, und 43 gefunden. Außerdem kann *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM) und *Neuronal Cadherin* (N-Cadherin) nachgewiesen werden. *Tight junction* und Adhärenzverbindungen bilden ein kontinuierliches gürtelartiges System ähnlich dem in Epithelzellen.

Die Organisation der endothelialen Zell-Zell-Kontakte ist vereinfacht in Abb. 8 dargestellt. Sie variiert je nach organspezifischen Erfordernissen. Beispielsweise erlauben postkapilläre kleine Venen die dynamische Bewegung von zirkulierenden Zellen und Plasmaproteinen indem sie nur wenige *tight junction* ausbilden. Im Gegensatz dazu gelten die Endothelzellen der Kapillaren im Gehirn u.a. wegen einer hohen Konzentration an *tight junction* als sehr dicht (Rubin 1999; Wolburg 2002).

1.5 Spezielles Abschlussgewebe – die Blut-Hirn-Schranke

Um die Funktion des Gehirns als zentrales Steuerorgan zu gewährleisten, ist die Aufrechterhaltung optimaler Bedingungen für das neuronale Gewebe erforderlich. Während zum einen der hohe metabolische Bedarf an Nährstoffen gesichert sein muss, reagiert andererseits das neuronale Gewebe sehr sensibel auf eine Vielzahl im Blut gelöster Stoffe.



Abb. 9: Plastinat des cerebralen Blutgefäßsystems des Menschen (Neuwelt 2004).

Den ersten experimentellen Hinweis auf eine trennende Struktur zwischen Blutgefäßen und Gehirn publizierte Paul Ehrlich 1885 nach der Beobachtung, dass nach Injektion eines Farbstoffes in die Blutbahn einer Ratte jedes Organ, mit Ausnahme von Gehirn

Einleitung

und Rückenmark, angefärbt wurden (Ehrlich 1885). Die Grenzfläche zwischen Zentralnervensystem und Kapillarsystem des Blutkreislaufs wird demzufolge historisch als Blut-Hirn-Schranke bezeichnet. Sie stellt die Homöostase durch Vermittlung des Nährstofftransportes, Regulation der Ionenkonzentration, und als Barriere für im Blut befindliche Stoffe sicher.

Der Umfang der Kapillaren wird durch sich selbst berührende **Endothelzellen** gebildet (siehe Abb. 10). Diese zeichnen sich durch erniedrigte pinozytotische Aktivität und eine erhöhte Mitochondrienanzahl aus, was auf eine hohe energieabhängige Transportleistung schließen lässt (Sedlakova 1999; Oldendorf 1977). Der parazelluläre Raum zwischen Endothelzellen wird von kontinuierlichen **tight junction** sehr dicht verschlossen. Verglichen mit peripheren Kapillaren können 100-fach höhere Werte des trans-endothelialen Widerstandes (TER) ($1000 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$) gemessen werden. Auf molekularer Ebene kann u.a. eine höhere Occludinexpression in Gehirnkapillarendothelzellen verglichen mit Aortaendothelzellen beobachtet werden (Hirase 1997).

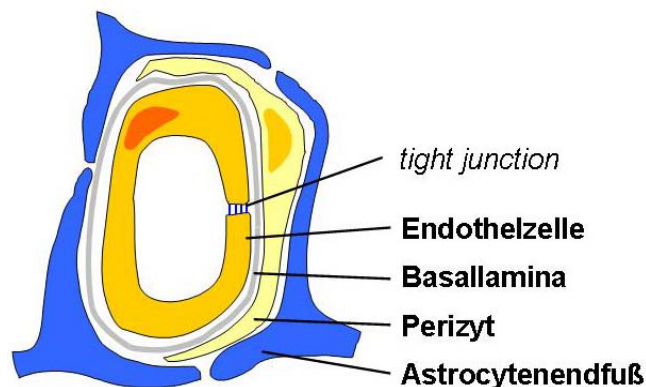


Abb. 10: Schematische Darstellung der Blut-Hirnschranke im Querschnitt

Die Endothelzelle ist von einer proteinreichen Matrix, der **Basallamina** umschlossen. Neben Collagen Typ IV, Laminin und Fibronectin bilden auch Proteoglycane wie z.B. Heparansulfat und andere Matrixproteine diese 30 - 40 nm dicke Schicht (Farkas 2001), die als Anker für Fokalkontakte der Endothelzellen gilt (Hynes 1992). In diese Lamina eingebettet liegen **Pericyten**, die durch *gap junction* mit Endothelzellen verknüpft sind und so über Ionenpotentiale und kleine Moleküle miteinander in Wechselwirkung treten können. Die Funktion von Pericyten ist noch nicht abschließend geklärt. Sie stellen kontraktile Zellen dar, die, ähnlich den glatten Muskeln in größeren Gefäßen, möglicherweise den mikrovaskulären Blutfluß regulieren (Herman 1987). Des Weiteren wird eine Rolle bei der Steuerung des Gefäßwachstums diskutiert (Risau 1997). Ein dritter Zelltyp

ist am Aufbau der Hirnkapillaren beteiligt. **Astrocyten** umschließen den Kapillare-Zellkomplex auf der hirnzugewandten Seite zu fast 90 % mit ihren Ausläufern, den sogenannten Astrocyten-endfüßen (Rubin 1999). Diese großen sternförmigen Zellen werden auch als Makroglia bezeichnet. Der Beitrag dieses Zelltypes zur Schrankenfunktion der Blut-Hirn-Schranke ist noch nicht abschließend geklärt. Durch Abgabe von löslichen Faktoren beeinflussen sie die Differenzierung von Endothelzellen (Bernacki 2008) und verändern die Schrankeneigenschaften im benachbarten Endothel (Sobue 1999).

Die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke wird von einigen Substanzen auf unterschiedlichen Wegen umgangen. Kleinen Molekülen, wie z.B. Wassermolekülen ist es möglich, die *tight junction* zu durchdringen und parazellulär durch Diffusion dem osmotischen Gradienten zu folgen. Sauerstoff und lipidlösliche Substanzen diffundieren durch die Membran der Endothelzellen. Diese Moleküle können zum einen durch spezifische Enzyme wie γ -Glutamyltransferase, alkalische Phosphatase oder aromatische Säuren-Decarboxylase u.a. (metabolische Barriere) in der Endothelzelle modifiziert werden (Cornford 2002). Zum anderen werden eine Reihe von Transportern exprimiert, die direkte Schutz- bzw. Entgiftungsfunktionen ausüben. Hierzu zählen Proteine wie das P-Glycoprotein (P-Gp bzw. *multi-drug-resistance 1*, MDR 1). Diese energieabhängigen Transporter sorgen für eine Rückführung von im Gehirn nicht benötigten, bzw. möglicherweise toxischen Substanzen in das Lumen der Kapillaren. Diese Transporter erlangen bei der Therapie von im ZNS lokalisierten Erkrankungen an Bedeutung, da sie das Erreichen einer optimalen Wirkkonzentration von Arzneistoffen am Wirkort im Gehirn verhindern können.

Zum gerichteten Transport benötigter Nährstoffe durch die Endothelzelle sind unterschiedlichste Transporter im Einsatz. Wichtigstes neuronales Substrat zur Energiegewinnung ist Glucose. Um die Versorgung des Hirnes sicherzustellen, transportiert eine Endothelzelle pro Minute die 10-fache Menge ihres eigenen Gewichtes an Glucose in die interstitielle Flüssigkeit (Lamanna 1985). Dies wird über erleichterten Transport durch Glucose-transportierende Proteine (GLUT) sichergestellt, deren Konzentration nach der in Erythrocyten in Gehirnkapillarendothelzellen am höchsten im ganzen Körper ist (Gjedde 1983). Weitere spezifische Transportsysteme für Aminosäuren, Monocarbonsäuren, und Peptide ermöglichen die selektive Extraktion von Nährstoffen aus dem Blut in das Hirngewebe. Aktive Transportsysteme sorgen für einen gerichteten Transport entgegen dem elektrochemischen Gradienten. Sie sind eng an eine Energiequelle des Stoffwechsels gekoppelt (z.B. ATP-Hydrolyse oder einen Ionengradienten). Rezeptor-

vermittelte Transzytose wird vor allem für größere Peptide genutzt, wie z.B. für Transferrin und Insulin (Cornford 2002).

1.6 Pathologie der Blut-Hirn-Schranke – Hypoxie

Der Schlaganfall ist mit 15 % aller Todesfälle die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Zudem stellt er die häufigste Ursache für erworbene Behinderungen im Erwachsenenalter dar. Hierbei tritt eine plötzliche Minderversorgung (Ischämie) des Gehirns mit Nährstoffen auf, wobei der Mangel an Sauerstoff und Glucose besonders relevant ist. Als Hypoxie wird der alleinige Sauerstoffmangel bezeichnet.

Die Reaktionen der Blut-Hirn-Schranke sind sehr komplex. Der Stoffwechsel wird von aerober auf anaerobe Glycolyse umgestellt. Infolge dessen tritt eine Übersäuerung durch Anreicherung von Laktat im ischämischen Gewebe ein. Das Immunsystem wird durch das Auftreten von Leukocyten-Adhäsionsrezeptoren aktiviert (Okada 1994). Unter anderem werden von Leukocyten Signalkaskaden für die Desorganisation von *tight junction* induziert (Bolton 1998). Hieran sind beispielsweise Zytokine, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), und Stickstoffmonoxid beteiligt (Ballabh 2004). Durch Zerstörung der *tight junction* ist die parazelluläre Durchlässigkeit erhöht. Es folgen erhöhter Ioneneinstrom und verminderter Rücktransport aus den Endothelzellen (Witt 2003). Auch ein vermehrter vesikulärer Transport kann festgestellt werden (Plateel 1997). In dessen Folge kommt es zu ödematösen Schwellungen. Der neuronale Zelltod stellt eine mögliche Konsequenz aus den Entzündungsreaktionen und dem Auftreten von Ödemen dar.

Die molekularen Reaktionsmechanismen der Gehirnkapillarendothelzellen auf Mangelversorgung wie Ischämie / Hypoxie sind noch nicht abschließend untersucht. Das Transmembranprotein Occludin und das an *tight junction* assoziierte Protein ZO-1 erscheinen nach Hypoxie in der Expression vermindert, und es gibt Hinweise auf eine Modifikation der Phosphorylierung (Witt 2003; Fischer 2002). Die in normalen Zellen kontinuierlichen Immunfluoreszenzsignale von Occludin, ZO-1 und ZO-2 an den Zellgrenzen werden nach Hypoxie als diskontinuierliche Signale detektiert (Mark 2002). Die Aktinexpression ist nach Hypoxie erhöht und erhöht sich weiter nach erfolgter Reoxygenierung. Dies wird durch die vermehrte Detektion von Aktin-Stress-Fasern bestätigt (Mark 2002).

1.7 Proteomanalyse - Proteomik

Die Bezeichnung Proteom wurde erstmals 1995 schriftlich in der wissenschaftlichen Welt eingeführt und umfasst die Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes, bzw. eines Organismus (Wilkins 1996). Das wissenschaftliche Gebiet der Proteomanalyse (Proteomik) widmet sich demzufolge der Analyse von Proteinen, deren Expression, Struktur und Funktion in großem Maßstab. Die Proteomanalyse lässt sich in zwei Teilgebiete untergliedern. Die so genannte funktionelle Proteomanalyse beschäftigt sich mit der Aufklärung von Multiproteinkomplexen, Signalwegen bzw. charakteristischer Proteinaktivität, während bei Arbeiten innerhalb der Expressionsproteomik die vergleichende quantitative Analyse von Proteinen im Vordergrund steht. Ziele beider Teilgebiete sind unter anderem die Grundlagenforschung zur Identifizierung von Targetproteinen für die pharmakologische Einflussnahme bzw. die Verbesserung von Diagnoseverfahren von Krankheiten und zur Prognose von Resistenzen.

Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom nicht in jeder Zelle eines Organismus und zu jedem Zeitpunkt konstant, sondern in höchstem Maße dynamisch (siehe Abb. 11).

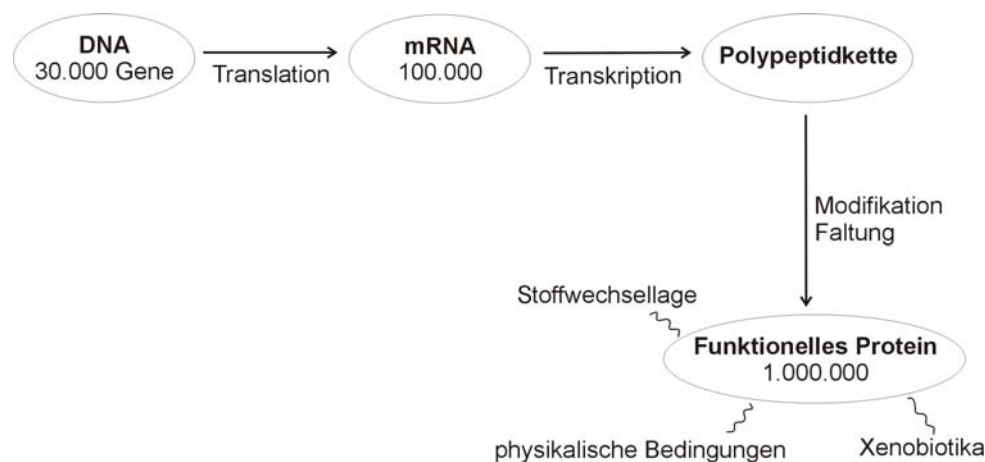


Abb. 11: Schema der theoretisch möglichen Anzahl von Genen und Proteinen innerhalb eines Organismus, modifiziert nach (Stults 2005).

Durch Translation können aus ca. 30.000 Genen rund 100.000 mRNA Stränge produziert werden, die durch Transkription und Modifizierungen in ca. 1.000.000 theoretisch mögliche Proteine übersetzt werden können.

Zum einen ist die Proteinzusammensetzung von der organ- bzw. zellspezifischen Genexpression abhängig. Zum anderen haben viele äußere Faktoren z.B. Stoffwechsellage, Änderungen physikalischer Parameter und Xenobiotika durch Induktion verschiedener

Einleitung

Signalfaktoren einen Einfluss auf chemische Modifikationen an den Polypeptidketten, die wiederum grundlegend für die Funktion der Proteine von Bedeutung sind.

Diese Variabilität und enorme Mengendifferenz von Proteinen innerhalb einer Zelle stellen hohe Anforderungen an die zu verwendenden Techniken innerhalb dieses Forschungszweiges.

1.7.1 Methoden der Proteomanalyse

Aus drei unterschiedlichen Fachgebieten werden Technologien als Grundlage für gegenwärtige Proteomanalysen genutzt. Die **Biochemie** liefert eine reichhaltige Quelle für Methoden der Fraktionierung komplexer Proteingemische. Des Weiteren werden Methoden der **Massenspektrometrie** zur Analyse von Proteinen bzw. Peptiden genutzt und mit Hilfe der **Bioinformatik** werden die massenspektrometrischen Daten ausgewertet. Entwicklungen innerhalb der Proteomanalytik werden im Wesentlichen von Entwicklungen innerhalb dieser drei Fachgebiete bestimmt, die im Folgenden näher dargestellt werden.

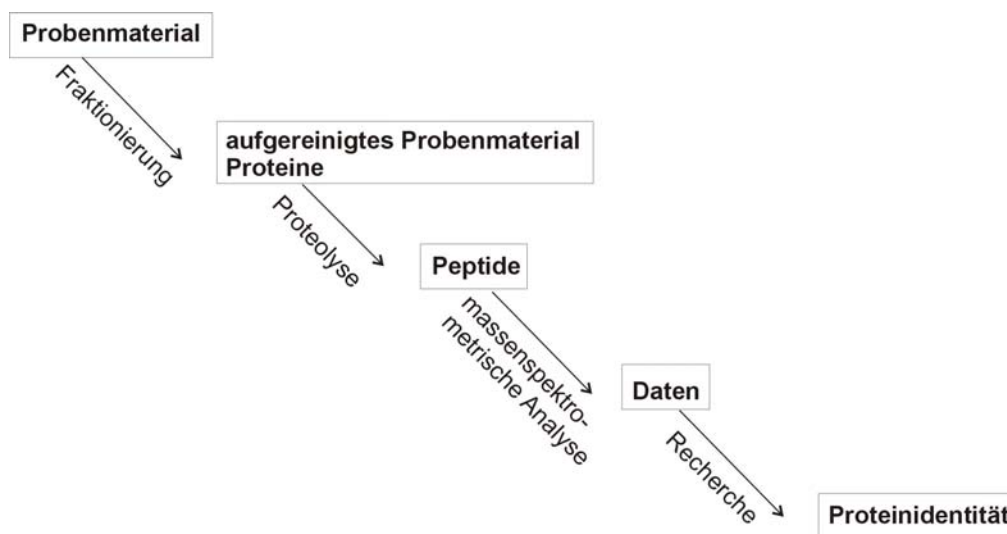


Abb. 12: Grundlegender Aufbau typischer Experimente innerhalb der Proteomanalytik
Das Probenmaterial wird mit Hilfe biochemischer Methoden fraktioniert, die erhaltenen Proteingemische enzymatisch gespalten, mit massenspektrometrischen Methoden analysiert und die daraus hervorgegangenen Daten bioinformatisch ausgewertet.

Wie in Abb. 11 beschrieben, kann bei einer Anzahl von 25 - 30.000 Genen von rund 1.000.000 theoretisch möglichen Proteinen innerhalb einer Zelle ausgegangen werden. Da nicht alle Gene permanent transkribiert werden, verringert sich diese Anzahl der Proteine um ca. die Hälfte bis zu einem Zwanzigstel (Anderson 2002; Pieper 2003). Diese

mindestens 50.000 unterschiedlichen Proteine können außerdem in Konzentrationsunterschieden von bis zu 10 Größenordnungen vorliegen (Rammensee 2004). Diese Variabilität und Mengendifferenz erfordert leistungsfähige Trennmethode, um Proteine mit speziellen Eigenschaften z.B. niedrig exprimierte oder hydrophobe (Membran-) Proteine nicht zu vernachlässigen oder ausgewählte Proteine zu selektionieren.

Lange etabliert in der klassischen biochemischen Analyse ist die **fraktionierende Zentrifugation** (Deduve 1959) bei der mit Hilfe unterschiedlicher Zentrifugalkräfte eine Trennung von subzellulären Strukturen wie Nuclei, Mitochondrien, Lysosomen usw. möglich ist. In Verbindung mit Detergentien können auch lösliche und unlösliche Proteinfraktionen gewonnen werden.

Weitere Standardmethoden bedienen sich der Elektrophorese, der gerichteten Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Die gelbasierte Auftrennung nach dem Molekulargewicht mittels Natriumdodecylsulfat (**SDS-Gelelektrophorese**) besitzt bis heute große Bedeutung innerhalb der Proteinbiochemie unter Beweis (Laemmli 1970).

Die Entwicklung der **zweidimensionalen Gelelektrophorese** (2DE) erlaubte erstmals die Auftrennung eines komplexen Proteingemisches von bis zu 10.000 Proteinen nach isoelektrischem Punkt mit isoelektrischer Fokussierung (IEF) und anschließend nach dem Molekulargewicht (Klose 1995; O'Farrell 1975). Diese Methode gilt als die initiale Technik, mit der die Proteomforschung möglich wurde. Trotz der Leistungsfähigkeit, der Darstellung von über 10.000 Proteinspots auf einem Gel (Klose 1995), werden mit der 2DE seltener niedrig exprimierte Proteine und Membranproteine dargestellt. Zur Erfassung hydrophober Proteine wurden alternative zweidimensionale Auftrennungsmethoden mit z.B. zweimaliger Auftrennung nach dem Molekulargewicht mit unterschiedlichen Detergentien (z.B. 16 - Benzyltrimethylammoniumchlorid / SDS – Gel-elektrophorese) entwickelt (Hartinger 1996).

Auch **gelfreie Elektrophoresesysteme** wurden konstruiert. Mit diesen kann eine größere Menge Proteinprobe mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) in mehrere Fraktionen unterschiedlichen pH-Wertes getrennt werden. Die Firma BioRad bietet das sogenannte RotoforTM an (Bier 1998). Mit dieser Apparatur können 20 Fraktionen unterschiedlichen pH-Wertes gewonnen werden. Eine Besonderheit dieses Gerätes ist die horizontale Drehung des Probenbehälters, um der Elektrodekantation durch die Schwerkraft entgegenzuwirken. Andere gelfreie Elektrophoresesysteme wurden entwickelt, wie

Einleitung

z.B. die Apparatur Octopus (Dr. Weber GmbH, Kirchheim), mit der die kontinuierliche Elektrophorese in 96 Fraktionen (*free flow electrophoresis* - FFE) möglich ist (Kuhn 1989).

Um die Komplexität der Probe zu verringern, werden innerhalb der Proteomanalyse häufig **chromatographische Techniken** angewandt, bei denen Proteine bzw. deren enzymatisch gespaltene Peptidfragmente mit definierten Eigenschaften aufgetrennt oder selektiert werden. Beispielsweise werden phosphorylierte Proteine mit immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (Cao 1999) und glycosylierte Proteine mit Lektin-Affinitätschromatographie (Geng 2001) konzentriert. Chromatographische Standardmethoden wie Ionenaustauschchromatographie (Krapfenbauer 2003) oder eine Chromatographie an einer hydrophoben Matrix (*reversed phase chromatographie*) werden der massenspektrometrischen Analyse oft vorangestellt.

Sehr elegant vereint die SELDI (*surface enhanced laser desorption ionisation*) – Chip-technologie die Selektion von Proteinen aus einer Mischung durch oberflächenchemische Vorgänge mit anschließender massenspektrometrischer Analyse. Hierbei können Proteine an unterschiedlich ausgestatteten Oberflächen über Ionenaustausch, hydrophobe Assoziation, Chelatierung von Metallen, Proteinliganden (Antikörper) oder anderen auf einem Chip binden. Anschließend werden sie mit einer Matrix versetzt und ähnlich dem Verfahren der MALDI-MS vermessen (Elek 2006).

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen können spezifische Proteine aus einer Proteinmischung mittels Immunpräzipitation (Figeys 2001) oder gegebenenfalls mit Hilfe einer vorher angebrachten Markierungssequenz extrahiert werden (Terpe 2003).

Die Bandbreite der angewandten Techniken zur Fraktionierung wird durch die hohe Dynamik in der Entwicklung neuer Techniken weiter vergrößert und spiegelt die verschiedenen methodischen Anforderungen wider.

1.7.2 Massenspektrometrie

Moderne Massenspektrometer ermöglichen die Identifizierung von mehreren Proteinen in einer einzelnen Probe und bieten so die Grundlage für die Bearbeitung umfassender proteomanalytischer Fragestellungen.

In den späten 80er Jahren wurde die Massenspektrometrie mit der Bereitstellung von schonenden, biomolekülgeeigneten Ionisierungstechniken revolutioniert. Von besonderer Bedeutung sind die Entwicklung der *electrospray ionisation* (ESI) und der *matrix assisted laser desorption ionisation* (MALDI) (Karas 1988; Fenn 1989). Bei der ESI wird das Proben-Lösungsmittelgemisch beim Ausstoß aus einer Kapillare durch eine sehr hohe elektrische Spannung in kleine Tröpfchen zerrissen. Aufgrund von Abstoßung der gelösten Moleküle zerteilen sich beim Verdampfen des Lösungsmittels diese Tröpfchen weiter. Am Ende des Prozesses liegen die einzelnen Peptide geladen im Vakuum zur Massanalyse vor. Die MALDI genannte Technik arbeitet mit einem definierten Laserimpuls auf ein Kokristallisat aus Matrix (z.B. α -Cyano-4-hydroxymizsäure) und der Peptidmischung, durch den Teile des Kokristallisates abgespalten werden. Die Ladungen der Matrix werden auf Probenmoleküle übertragen und die geladenen Peptide können im Vakuum vermessen werden.

Bei der massenspektrometrischen Analyse wird das unterschiedliche Verhalten von geladenen Teilchen im elektrischen Feld entsprechend ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) ausgenutzt. Hierfür stehen mehrere Techniken zur Auswahl. Die MALDI wird meist mit einem Flugzeitanalysator (*TOF-time of flight*) kombiniert, bei dem die Analytationen durch ein elektrostatisches Feld beschleunigt werden. Sie erhalten dadurch - bei gleicher kinetischer Energie - eine Geschwindigkeit entsprechend ihrem Verhältnis m/z und können nach einer feldfreien Driftstrecke zeitversetzt detektiert werden. Mit solch einem Vorgehen erhält man ein Spektrum der gemessenen Intensitäten der einzelnen Verhältnisse von Masse zu Ladung. Wurden die Proteine vorher mit einem Enzym gespalten entsteht ein für dieses Protein charakteristisches Peptidmassenspektrum (*peptide mass fingerprint*). Die ESI wird häufig mit der Tandem-Massenspektrometrie kombiniert. Hierbei werden die Analyten nach der ersten Detektion in eine Kollisionszelle geleitet, in der ihnen durch Stöße mit Inertgas Energie zugeführt wird. Daraufhin zerfallen die Peptide im Idealfall an den Peptidbindungen in charakteristische Fragmente, die erneut detektiert werden. Auf diese Weise werden direkte Sequenzinformationen der

Einleitung

Peptide erhalten. Mit dieser Methode ist es möglich mehrere Proteine in einer Probe zu identifizieren.

1.7.3 Datenbankrecherche

Die beginnende Datenflut aus Proteinsequenzen und den zugehörigen Informationen hat 1986 zur Gründung der Proteindatenbank SWISSPROT (<http://www.expasy.org/sprot>) unter Initiative des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik (SIB) geführt. Weitere Datenbanken mit unterschiedlichen Schwerpunkten sind in der darauf folgenden Zeit entstanden (z.B. Spezialisierung auf Zelllinien oder Pflanzen). Die komfortable, Datenbanken zusammenfassende Suchmaschine Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), die 1988 vom *US National Center for Biotechnology Information* (NCBI) gegründet wurde, vereint unter anderem Proteindatenbanken, auch Datensätze von theoretischen Aminosäuresequenzen, die aus der DNA - Sequenz übersetzt wurden.

Die in diesen Datenbanken eingetragenen Proteine werden mit Hilfe einer speziellen Suchmaschine (z.B. MASCOT; <http://www.matrixscience.com>) theoretisch in ihre enzymatischen Spaltprodukte zerlegt und mit den in der massenspektrometrischen Analyse gefundenen Peptiden verglichen. Übereinstimmungen werden in einer Tabelle nach einem internen Wertungssystem (*score*) dargestellt.

1.7.4 Spezielle Methoden der Expressionsanalyse - Markierung

Um Aussagen über die Mengenverhältnisse einzelner Proteine in verschiedenen Zellarten oder Zuständen von Zellen treffen zu können, sind verlässliche Methoden zur Quantifizierung nötig. Während in den Anfangstagen der Proteomanalytik die visualisierten Proteinspots auf zweidimensionalen Gelen densitometrisch einzeln miteinander verglichen wurden, hat sich die Gehaltsbestimmung in Richtung massenspektrometrische Datenanalyse verschoben. Besonders geeignet ist hierfür die Markierung von Proteinen oder Peptiden der zu vergleichenden Gruppen mit leichten bzw. schweren Isotopen. Werden Kontrollgruppe und zu vergleichende Gruppe gemeinsam massenspektrometrisch vermessen, können die im Spektrum erscheinenden Signale normalen (leichten) Peptiden bzw. (nach Markierung) schwereren Peptiden, und somit Kontrollgruppe und Vergleichsgruppe zugeordnet werden. Die Quantifizierung der einzelnen Signale kann über deren Intensität erfolgen (siehe Abb. 13).

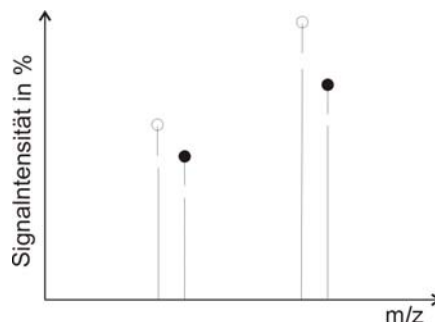


Abb. 13: Vereinfachtes Massenspektrum unmarkierter Probenpeptide (Kreis) und markierter Kontrollpeptide (gefüllter Kreis) zum Vergleich der Mengenverhältnisse

Zur Markierung von Peptiden und Proteinen stehen chemische, enzymatische oder metabolische Methoden zur Verfügung (siehe auch Abb. 14). Beim ICAT (*isotope-coded affinity tag*) genannten Verfahren, einer chemisch markierenden Methode, werden Proteine an Cysteinresten jeweils mit einem leichten bzw. einem schweren Biotinrest tragenden Molekül kovalent verknüpft (Gygi 1999). Mit Hilfe des Biotinrestes können die markierten Proteine vor der massenspektrometrischen Analyse über Affinitätschromatographie angereichert werden. Eine Weiterentwicklung des ICAT stellt das iTRAQ (*isotope-tagging for relative and absolute quantification*) dar (Ross 2004). Hierbei werden isobare Derivate, das heißt in ihrer Molekülmasse identische Derivate, zur Markierung von Peptiden eingesetzt. Erst die Ionisierung während der massenspektrometrischen Analyse führt durch Abspaltung eines definierten Molekülrestes (*balance group*) zur detektierbaren und auswertbaren Massendifferenz. Verschiedene Laufeigenschaften durch Massendifferenz während der chromatographischen Trennung werden so minimiert.

Eine weitere Möglichkeit der Markierung bietet die enzymatische Inkorporierung von Wasser mit dem Sauerstoffisotop ^{18}O (Mirgorodskaya 2000). Dies kann erfolgen, wenn die üblicherweise vor der Massenspektrometrie durchgeführte hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen in Anwesenheit von ^{18}O -haltigem Wasser (H_2^{18}O) durchgeführt wird. Während beim ICAT nur Proteine mit einem Cysteinrest markiert werden, und somit quantifiziert werden können, kann nach dem enzymatischen Einbau von ^{18}O -haltigem Wasser theoretisch jedes Peptid quantifiziert werden.

Durch den Zusatz eines isotopenmarkierten Nährstoffes während der Zellkultivierung kann eine metabolische Markierung erreicht werden. Hierfür haben sich Aminosäuren mit einer hohen Einbaurrate in Proteine und einer geringen Metabolisierungsrate in andere Aminosäuren, wie z.B. ^{13}C markiertes Arginin ($^{13}\text{C}_6$ Arginin) bewährt. Diese Methode wird

Einleitung

in der Literatur als SILAC (*stable isotopic labeling with amino acids in cell culture*) bezeichnet (Ong 2002). Wird für die Hydrolyse der Proteine ein Enzym verwendet, das bei der Spaltung eine Präferenz für die markierte Aminosäure hat (z.B. Trypsin, das an Arginin und Lysinresten bevorzugt spaltet), wird sichergestellt, dass möglichst viele Peptide mit der Aminosäure entstehen, die die Quantifizierbarkeit bestimmt.

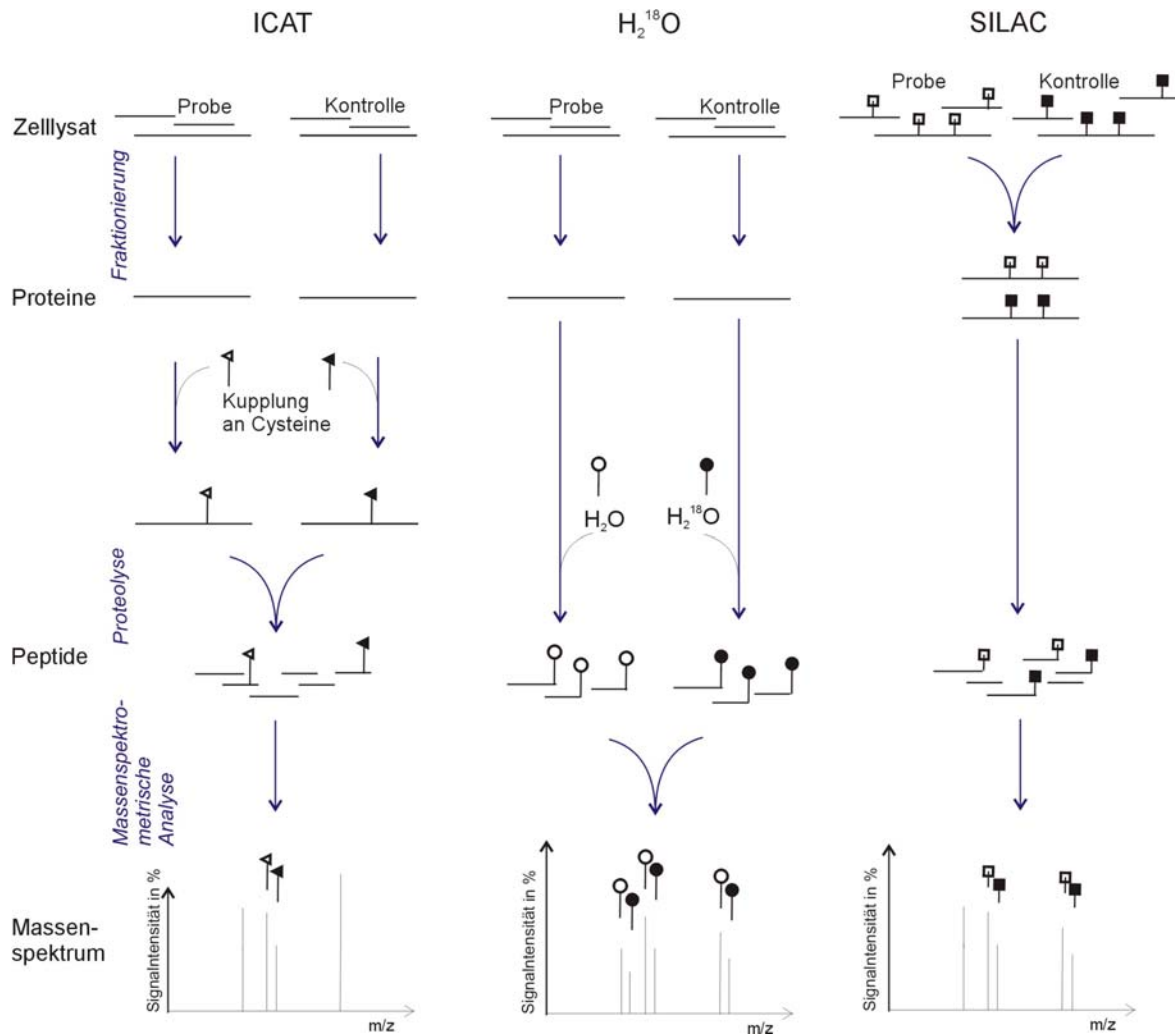


Abb. 14 Schematische Darstellung der Teilschritte bei ICAT; Proteolyse in Anwesenheit von H₂¹⁸O und SILAC zur Expressionsanalyse. Die grundsätzliche Vorgehensweise der Datengewinnung (Fraktionierung des Zellysates, Proteolyse und massenspektrometrische Analyse) ist gleich. Die *isotope-coded affinity tag* (ICAT) genannte Methode arbeitet mit einem zusätzlichen Reaktionsschritt, bei dem das Reagenz an die Proben bzw. Kontrollproteine an Cystein kovalent gekoppelt wird. Die sich anschließende enzymatische Spaltung kann gemeinsam erfolgen. Markiert, und somit quantifizierbar, liegen nur wenige Peptide mit Cysteinrest vor. Vor der Inkorporierung von H₂¹⁸O während der enzymatischen Spaltung werden alle Aufarbeitungsschritte der Probe und Kontrolle getrennt durchgeführt. Theoretisch kann nach der massenspektrometrischen Analyse jedes Peptid quantifiziert werden. Bei der Methode des *stable isotopic labeling with amino acids in cell culture* (SILAC) werden die Proteine während der Zellkultur metabolisch markiert, so dass Probe und Kontrolle direkt nach deren Gewinnung vermischt und gemeinsam prozessiert werden können. Nur markierte Aminosäuren tragende Peptide können quantifiziert werden.

1.8 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum besseren Verständnis der Regulation der Blut-Hirn-Schranke (BHS) unter pathologischen Bedingungen und zur Charakterisierung des molekularen Aufbaus von Zell-Zell-Verbindungen, insbesondere der *tight junction*, beizutragen. Bei den durchzuführenden Arbeiten wurden Methoden der Proteomforschung angewandt.

Pathologische Einflüsse auf die BHS, beispielsweise durch Gefäßverschuß bei Schlaganfall, haben direkte Folgen auf die Funktionsfähigkeit von Endothelzellen und der betroffenen Gehirnabschnitte. Die komplexen Reaktionen der BHS auf die Mangelversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) und Nährstoffen sind nur zum Teil bekannt. Um diese Vorgänge weiter aufzuklären, sollten streßinduzierte Veränderungen der Proteinexpression in Gehirnkapillarendothelzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine modifizierte, auf gelfreier isoelektrischer Fokussierung beruhende zweidimensionale elektrophoretische Proteinseparation etabliert, die durch Kombination mit *stable isotopic labeling with amino acids in cell culture* (SILAC) neben der Auftrennung eines komplexen Proteingemisches mit nachfolgender Identifizierung auch die Quantifizierung von einzelnen Proteinen mit massenspektrometrischer Analytik erlaubte. Auf dieser Grundlage sollten Proteine aufgefunden werden, deren Expression in Gehirnkapillarendothelzellen (rBCEC4) nach 24 Stunden Hypoxie signifikant verändert wurde.

Die BHS ist durch zwei wesentliche Funktionen charakterisiert. Zum einen wird der selektive Transport zum Hirngewebe ermöglicht, zum anderen wird die parazelluläre Diffusion zwischen Endothelzellen durch sehr dichte Verbindungen (*tight junction*) unterbunden. Der exakte molekulare Aufbau und die Regulation der verschließenden Zell-Kontakt-Komplexe waren nur ansatzweise bekannt. In der Literatur wurde vermutet, dass *tight junction* in *membrane rafts* lokalisiert sind. Diese cholesterolreichen Mikrodomänen fungieren unter anderem als Plattform zur Signalübertragung. In dieser Arbeit sollte die Cholesterolabhängigkeit der Lokalisation von *tight junction* ermittelt werden. Es wurde untersucht, welche Wirkungen der Entzug von Cholesterol aus der Plasmamembran von epithelialen Zellen auf *tight junction* Proteine auslöst. Dazu wurden immunfluoreszenzmikroskopische Daten analysiert und die Ergebnisse massenspektrometrischer Untersuchungen im Hinblick auf *tight junction* Proteine präsentiert.

Zielstellung

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Auffindung von Kandidaten für bisher unbekannte, am *tight junction* Komplex beteiligte Proteine. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche detergens-unlösliche Membranfraktionen (*detergent resistant membrane fractions* - DRM) aus Rattenleber extrahiert, die in der Literatur als *tight junction* anreichernde Präparationen beschrieben wurden. Die erhaltenen Extrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die darin enthaltenden Proteine massenspektrometrisch identifiziert, um auf diese Weise einen Beitrag zur Aufklärung des *tight junction* Subproteoms zu leisten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurden die Chemikalien mindestens in Analysenqualität über laborübliche Händler bezogen (Merck KGaA, Darmstadt; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Einige Chemikalien für die Elektrophorese wurden von Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg (Coomassie Brilliant Blue G-250/R250, Glycin, Methylenbisacrylamid, SDS, Servalylt 2-4) bzw. über BioRad Laboratories; München (APS, TEMED, DTT, Harnstoff, Bromphenolblau, Agarose, Trockenmilch) bezogen. Bei dem verwendeten Wasser handelt es sich um demineralisiertes Wasser.

2.2 Geräte

Neben der laborüblichen Ausstattung (Pipetten, Schüttler, Inkubatoren, Tischzentrifugen) sind im Folgenden nur spezielle Geräte und Apparaturen benannt.

Tab. 1: Spezielle Geräte und Apparaturen

Art des Gerätes	Handelsname	Firma, Standort der Firma
Homogenisator	Potter S	B. Braun
Inkubator für Hypoxie-Behandlung	Anaerobic Workstation Concept Plus	Ruskin Technology, UK
Vakuumpzentrifuge	SPD 1010 Speedvac®	Thermo Savant, Hick
Ultrazentrifuge	Optima L-70K	Beckmann, München
Photometer	Spektrophotometer DU640	Beckmann, München
Elektrophorese-Apparaturen	Mini Protean II	BioRad Laboratories; München
	Protean II xi	BioRad Laboratories; München
	Desavor VA	Desaga, Wiesloch
	IEF-Apparatur	Wita GmbH, Teltow
	Rotofor	BioRad Laboratories; München
Immunoblot-Apparatur	Transblot® SD - Semidry transfer cell	BioRad Laboratories; München
Massenspektrometer	Q-Tof Ultima™	Micromass, Manchester, UK
Mikroskop für Immunfluoreszenz	LSM 510 META-UV	Zeiss, Jena

2.3 Methoden

Die im Folgenden aufgeführten Methoden, wurden, wenn keine abweichenden Angaben gemacht werden, bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Proben wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei -20 °C gelagert.

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Normale Rattencholangiocyten (*normal rat cholangiocytes* - NRC)

Diese epitheliale Zelllinie aus den Gallengängen der Leber einer gesunden Ratte wurde in der 36. Passage von Prof. N.F. LaRusso, (Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, USA) zur Verfügung gestellt. Sie wurde nach (Vroman 1996) unter sterilen Standardbedingungen kultiviert (37 °C; 5 % CO₂; 100 % Luftfeuchtigkeit) und im Abstand von 10 Tagen im Verhältnis 1:10 in mit Rattenschwanzcollagen (Roche Diagnostics, Mannheim) beschichtete Zellkulturflaschen (Greiner bio one, Frickenhausen) passagiert. Konfluenz wurde nach 5-7 Tagen erreicht; in den verbleibenden Tagen bildeten die Zellen ihre typische polygonale Form aus. Die erforderliche Medienzusammensetzung ist der Tab.2 zu entnehmen.

Tab. 2: Medienzusammensetzung für NRC

Nr.	Komponente	Hersteller	c
1	DMEM/HAM'S F12	Biochrom, Berlin	
2	fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin	5 %
3	MEM nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	1 %
4	Insulin, Transferrin, Selen A (100x)	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	1 %
5	Chemisch definiertes Lipidkonzentrat (100x)	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	1 %
6	MEM Vitaminlösung (100x)	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	1 %
7	Penicillin-Streptomycin L-Glutamin (100x)	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	100 IE (Pen); 100 mg/l (Strep) 2 mM (Glut)
8	Gentamycin	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	20 mg/l
9	Trypsininhibitor, Sojabohne	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	50 mg/l
10	Rinderhypophysenextrakt	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	30 mg/l
11	Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim	393 µg/l
12	Liothyronin	Sigma-Aldrich, Steinheim	3,4 mg/l
13	Epidermaler Wachstumsfaktor	Gibco/Invitrogen Karlsruhe	25 µg/l
14	Forskolin	Sigma-Aldrich, Steinheim	4,1 mg/l

c - Konzentration

2.3.1.2 Gehirnkapillarendothelzellen aus der Ratte - *rBCEC4*

Die Gehirnkapillarendothelzellen (*rat brain capillary endothelial cells* – *rBCEC4*) wurden im FMP immortalisiert und charakterisiert (Blasig 2001) und unter sterilen Standardbedingungen bei 37 °C; 5 % CO₂; 100 % Luftfeuchtigkeit von Passage 23-30 kultiviert. Das erforderliche Zellkulturmedium setzt sich aus DMEM (4,5 g/l Glucose; 3,7 g/l NaHCO₃) unter Zusatz von 1,2 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 100 µg/ml Heparin; 110 µg/ml Natriumpyruvat (alle Bestandteile von Biochrom, Berlin), 10 µg/ml *endothelial cell growth factor* (Roche Diagnostics, Mannheim) und 10 % fötalem Kälberserum zusammen. Die Zellen erreichten Konfluenz nach 3-5 Tagen und wurden

mit 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 0,05 % Trypsin (Biochrom, Berlin) vom Kulturgefäß gelöst, mit Medium versetzt und im Verhältnis 1:4 in mit Rattenschwanzkollagen beschichtete Zellkulturgefäße passagiert.

Die Zellpopulationen zu Untersuchungen zur differentiellen Expression nach Hypoxie wurden in einer Anaerobic Workstation Concept Plus (Ruskin, UK) bei 37 °C; 100 % Luftfeuchte in einem Gasgemisch aus 90 % Stickstoff; 5 % Wasserstoff und 5 % Kohlendioxid (Air Liquide Deutschland GmbH; Krefeld) für 24 Stunden kultiviert. Vor dem Einbringen der Zellen in diesen speziellen Inkubator wurde das Medium gegen Inkubationsmedium ausgetauscht. Das Inkubationsmedium enthält keinen *endothelial cell growth factor* und einen auf 5 % reduzierten Anteil an fötalem Kälberserum.

Zur Probengewinnung wurde das Medium über den Zellen entfernt, mit *phosphate buffered saline* plus Calcium und Magnesium (PBS + Ca/Mg) gespült, mit AP-Puffer (25mM Tris/HCl pH 7,2; 50 mM KCl, 3 mM EDTA), der eine Proteaseinhibitormischung der Firma Roche (*Complete EDTA-free*) enthielt, versetzt, der Zellrasen mit einem Zellschaber vorsichtig vom Gefäßboden gelöst und die Probenlösung abgenommen. Zur vollständigen Probengewinnung wurde das Kulturgefäß erneut mit AP-Puffer versetzt und mit einem Zellschaber bearbeitet. Die vereinigte Probenlösung wurde zur Abtrennung der intakten Zellen bei 176 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 1 ml AP-Puffer aufgenommen, bei 9000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

2.3.1.3 Markierung von Zellpopulationen mit $^{13}\text{C}_6$ Arginin (SILAC)

Das zugrunde liegende Verfahren wurde erstmals von der Arbeitsgruppe M. Mann (Ong 2002) unter der Bezeichnung *stable isotopic labelling with aminoacids in cell culture* (SILAC) beschrieben.

Hierfür wurde speziell angefertigtes Grundmedium für DMEM/HAMS-F12 bzw. DMEM 4,5 g/l Glucose; 3,7 g/l NaHCO_3 ohne Arginin eingesetzt (Biochrom, Berlin), und der Anteil an Arginin durch $^{13}\text{C}_6$ Arginin (Cambridge Isotope Laboratories, Inc) zugesetzt. Dies entspricht 147,5 mg/l Arginin HCl für DMEM/HAMS-F12 (NRC) bzw. 84 mg/l für DMEM (rBCEC4).

2.3.1.4 Präparation von detergens-unlöslichen Membranfraktionen

Als Ausgangsmaterial für die im Folgenden beschriebenen Präparationen von detergens-unlöslichen Membranfraktionen (*detergent resistant membrane fractions* – DRM) wurde zum Teil Rattenleber verwendet. Hierfür wurden 21 Tage alte, mit standardisiertem Ratten-Haltungs-Futter und Wasser ernährte, zumeist männliche Wistar Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld) anästhesiert, dekapitiert und die Leber extrahiert.

2.3.1.5 Nonidet P-40 unlösliche Membranfraktion

Bei dieser Präparation einer *junctional fraction* nach Tsukita (Tsukita 1989) - (NP40 unlösliche Membranfraktion) handelt es sich im Wesentlichen um eine Anreicherung von Gallenkanalikuli aus der Rattenleber mittels Dichtegradientenzentrifugation und einer nachfolgenden Extraktion von in Nonidet P 40 unlöslichen Membranbestandteilen.

Hierfür wurden 5-7 (60-70 g) frische Rattenlebern in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gewaschen. Dieser, und alle folgenden Schritte wurden bei 4-8 °C Temperatur bzw. auf Eis durchgeführt. Die Lebern wurden einzeln in je 10 ml eines hypotonen Puffers (1 mM Natriumhydrogencarbonat; 0,1 % Aprotinin) unter Zusatz einer Proteaseinhibitormischung der Firma Roche (Complete EDTA-free) in 5-10 cm³ große Stücke geschnitten und 30 Minuten auf Eis gelagert. Nach Homogenisierung mit einem Potter-Homogenisator (1000 U/min; 10 Wiederholungen) wurde die Lebersuspension mit hypotonem Puffer auf 400 ml verdünnt und eine Probe entnommen (Leberhomogenat 1). Anschließend wurde die Lösung zwei Mal durch vierlagige Gaze filtriert und bei 1500 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit einer Lösung aus 55 % Saccharose (ICN Biomedicals Aurora, Ohio; USA) und 0,1 % Aprotinin (Merck Biosciences/Calbiochem; Bad Soden) auf eine Zuckerkonzentration von 48,5 % gebracht und eine Probe eingefroren (Leberhomogenat 2). Anschließend wurde diese Lösung in ultrazentrifugationstaugliche Gefäße überführt, mit einer 42,9 % igen Saccharoselösung vorsichtig überschichtet und bei 100.000 x g 60 Minuten ultrazentrifugiert. An der Phasengrenze zwischen den unterschiedlich konzentrierten Zuckerslösungen war nach der Zentrifugation eine rosafarbene Bande, bestehend aus angereicherten Gallenkanalikuli zu beobachten, die vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen wurde. Die gewonnene Interphase wurde auf 10 % (v/v) mit hypotoner Lösung verdünnt und der aufgereinigte Komplex mit einer nachfolgenden Zentrifugation (4000 x g; 30 Minuten) pelletiert. Dieses Pellet wurde anschließend in Puffer mit Nonidet P-40 (10mM Hepes

pH 7,5; 100mM KCl; 1mM MgCl₂; 0,1 % Nonidet P-40 (Merck Biosciences/Calbiochem; Bad Soden)) resuspendiert, unter Schütteln 20 Minuten inkubiert und mit 60 %iger Saccharoselösung auf 50 % Zucker eingestellt. Die Lösung wurde in geeignete Gefäße überführt und nochmals bei 100.000 x g für 60 Minuten zentrifugiert. Der erneut erscheinende Niederschlag an der Interphase zwischen den beiden unterschiedlich konzentrierten Zuckerlösungen wurde abpipettiert, wieder auf ca. 10 % (v/v) mit hypotonem Puffer verdünnt und kurz bei 4.000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet hatte eine Masse von 200-400 mg und wurde als Nonidet P-40 unlösliche Membranfraktion (*Nonidet P-40 detergent resistant membrane fraction* - NP40-DRM) bezeichnet.

Zur Analyse der erfolgreichen Konzentrierung von Membrankomplexen wurde eine Probe nach der Homogenisierung der Lebern genommen und ein Aliquot der rosafarbenen Bande (Gallenkanalikuli) nach der ersten Ultrazentrifugation zur späteren Bearbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.3.1.6 Natrium Desoxycholat unlösliche Membranfraktion

Das folgende Protokoll beschreibt die Präparation einer an Gallenkanalikuli angereicherten Plasmamembranfraktion aus Rattenleber mittels Dichtegradientenzentrifugation (Hubbard 1983) mit einer anschließenden Extraktion einer in Natrium Desoxycholat unlöslichen Membranfraktion (Hertzberg 1990).

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden entweder bei einer Temperatur von 4-8 °C oder auf Eis durchgeführt. Ausgangsmaterial für diese Präparation waren 5-7 (60-70 g) frische Rattenlebern, die drei Mal in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gewaschen wurden. Anschließend wurden sie in ihrem vierfachen Volumen in Homogenisierungspuffer (5 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 mM MgCl₂; 0,25 M Saccharose = 8,5 %; Proteaseinhibitormischung der Firma Roche) in 5-10 cm³ große Stücke zerteilt und mit einem Potter-Homogenisator (1.000 U/min; 10 Wiederholungen) homogenisiert. Von diesem Leberhomogenat wurde eine Probe (Leberhomogenat 1) abgenommen und eingelagert, bevor es auf 20 % Leber mit STM-Puffer (5 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 mM MgCl₂; 0,25 M Saccharose = 8,5 %) eingestellt wurde. Diese Suspension wurde durch vierlagige, feuchte Gaze filtriert und kurz zentrifugiert (260 x g; 5 Minuten). Der Überstand wurde anschließend erneut zentrifugiert (1.500 x g; 10 Minuten) und das erhaltene Pellet mit 68,4 %iger Saccharoselösung (5 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 mM MgCl₂; 2 M Saccharose = 68,4 %) auf eine Zuckerkonzentration von 48,6 % eingestellt (Leberhomogenat 2). Diese Lösung wurde in geeignete Gefäße überführt, mit STM-Puffer überschichtet

Materialien und Methoden

und bei 82.000 x g; 1,5 Stunden ultrazentrifugiert. An der Grenzschicht zwischen den Zuckerlösungen unterschiedlicher Konzentration war nach der Zentrifugation ein „weißer Schleier“ bestehend aus Gallenkanalikuli angereicherter Plasmamembranfraktion zu beobachten, der vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen wurde. Ein kleiner Teil wurde zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Die erhaltene Interphase wurde mit Puffer M (10 mM Imidazol pH 8; 1 mM EGTA; 0,2 mM DTT; 0,1 % Aprotinin) auf 10 % (v/v) verdünnt und bei 9.700 x g; 10 Minuten pelletiert. Die Pellets wurden vereinigt, in 10-40 ml Puffer M resuspendiert und mit NaOH auf pH 11 eingestellt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurde die gleiche Menge Puffer M Plus (10 mM Imidazol pH 8; 1 mM EGTA; 0,2 mM DTT; 0,1 % Aprotinin; 1 % Natrium Desoxycholat) unter Schütteln langsam hinzugegeben und die in Natrium Desoxycholat unlöslichen Bestandteile bei 9.700 x g 10 Minuten zügig zentrifugiert. Es wurden etwa 100 mg Protein erhalten und als Natrium Desoxycholat unlösliche Membranfraktion (*sodium desoxycholate detergent resistant membrane fraction - DOC-DRM*) bezeichnet.

2.3.1.7 Triton X 100 unlösliche Membranfraktion

Mit dem folgenden Procedere werden Gallenkanalikuli angereicherte Plasmamembranfraktionen aus Rattenleber mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (Hubbard 1983) und anschließend Triton X 100 unlösliche Membranfraktionen separiert [angelehnt an (Gebreselassie 2004)].

Die Anreicherung von Gallenkanalikuli aus Rattenleber wurde wie in Kapitel 2.3.1.6 beschrieben nach (Hubbard 1983) durchgeführt.

Zur Extraktion der Triton X 100 unlöslichen Membranfraktion wurde die Interphase auf 10 % (v/v) mit Basis-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 0,1 % Aprotinin) verdünnt und bei 9.700 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 - 10 ml Basis-Puffer resuspendiert, der pH überprüft, gegebenenfalls auf pH 8 eingestellt, und die Suspension 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde unter Schütteln die gleiche Menge an Basis-Puffer mit 1 % TX100 (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 0,1 % Aprotinin; 1 % Triton X 100; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) langsam hinzugegeben und unverzüglich bei 9.700 x g; 10 Minuten zentrifugiert. Die Ausbeute dieser Präparation lag

bei ca. 400 mg. Sie wurde als Triton X 100 unlösliche Membranfraktion (*Triton X 100 detergent resistant membrane fraction* – TX100-DRM) bezeichnet.

2.3.1.8 Präparation von *detergent resistant membrane fractions* aus NRC

Die Präparation von *detergent resistant membrane fractions* aus NRC ist angelehnt an das von Foster beschriebene Protokoll (Foster 2003). Das Ausgangsmaterial für diese Präparation waren 4 x 175 cm² Zellkulturflaschen (je 30 ml Medium) mit normalen Rattencholangiocyten (NRC), sowie 4 x 175 cm² Flaschen mit ¹³C₆ Arginin markierten NRC als Kontrolle. Diese Zellen wurden am 10. Tag nach Aussaat für 18 Stunden mit serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die unmarkierten Zellen mit 20 mM Methyl-β-cyclodextrin bzw. 2,5 mM EGTA versetzt. Wenn Methyl-β-cyclodextrin zu den Zellen gegeben wurde, wurde bei Versuchs- und Kontrollgruppe Medium ohne Serum und „chemisch definiertes Lipidkonzentrat“ verwendet. Nach einer Stunde Inkubation erfolgte zweifaches Spülen des Zellrasens mit *phosphate buffered saline* plus Calcium und Magnesium (PBS + Ca/Mg). Dieser und alle weiteren Schritte der Präparation wurden bei einer Temperatur von 4-8 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Jede Flasche wurde mit 2,4 ml MBS-Puffer (150 mM NaCl; 25 mM MES/NaOH pH 6,5) incl. Proteaseinhibitor (Complete EDTA-free; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) versetzt, und der Zellrasen mit einem geeigneten Zellschaber vom Gefäßboden abgelöst. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, die erhaltenen Zellsuspensionen vereinigt und bei einer Zentrifugation bei 176 x g für 10 Minuten pelletiert. Anschließend wurde das Pellet erneut in etwa 5 ml MBS TX100 Puffer (150 mM NaCl; 25 mM MES/NaOH pH 6,5; 1 % Triton X 100) suspendiert und im Potter-Homogenisator (1.000 U/min; 10 Wiederholungen) homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 2.000 x g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen, das Pellet in MBS resuspendiert und erneut im Potter-Homogenisator bei 1.000 U/min mit 10 Wiederholungen homogenisiert. Von dieser Probenlösung wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die Probenlösung der markierten Kontrollgruppe und der mit Methyl-β-cyclodextrin behandelten Zellgruppe wurden im Proteinmengenverhältnis 1:1 miteinander gemischt. Diese Lösung wurde mit 90 %iger Saccharoselösung in MBS auf 45 % Zuckerkonzentration eingestellt, in geeignete Gefäße überführt und vorsichtig mit 35 %iger und 5 %iger Saccharoselösung (beide in MBS) überschichtet. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 166.000 x g für 18 Stunden. An der Grenzschicht zwischen der 35 % iger und der 5 %igen Zuckerlösung war nach der Ultrazentrifugation ein weißer Schleier zu beobachten, der vorsichtig mit einer Pipette separiert wurde. Diese Inter-

Materialien und Methoden

phase wurde mindestens 4 x mit MBS verdünnt und erneut bei 166.000 x g für 2 Stunden zentrifugiert. Das erhaltene Pellet hatte eine Masse von 50-100 mg, bestand aus der „lipid rafts angereicherten Membranfraktion“ und wurde in 400 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und entweder direkt auf ein Gel transferiert oder bei –20 °C eingelagert.

2.3.1.9 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration in den Proben wurde nach der Methode von Lowry (Lowry 1951) durchgeführt. Da die Proteine meist in komplexen Stoffgemischen mit Detergentien, Harnstoff bzw. reduzierenden Agentien vorlagen, wurden die Proteine vorher durch Fällung mit Trichloressigsäure von den Begleitstoffen separiert.

Zur Abtrennung der Proteine wurde die jeweilige Probe 1:10 bis 1:100 mit Wasser verdünnt und 100 µl dieser Lösung mit 30 µl einer 1,5 %igen Natriumdesoxycholatlösung versetzt und 10 Minuten geschüttelt. Nach Zugabe von 30 µl 72 %iger Trichloressigsäure wurde gut gemischt und bei 1.500 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und der Niederschlag mit 300 µl Lowry Reagenz (2 % Na₂CO₃; 0,2 M NaOH; 0,02 % Kaliumnatriumtartrat; 0,01 % Kupfer(II)sulfat) resuspendiert. Die erhaltenen Lösungen wurden mit 300 µl Wasser verdünnt und 20 Minuten unter Schütteln inkubiert. Jede Lösung wurde mit 150 µl Folinlösung (1Teil Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz [Sigma] plus 5 Teile Wasser) versetzt und nochmals 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Die Proteinbestimmung erfolgte in Einmalküvetten bei 750 nm im Spektrophotometer DU640 der Firma Beckman. Als Standard diente Rinderserumalbumin (RSA) mit 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg RSA.

2.3.1.10 Proteinkonzentrationsbestimmung mit 2-D Quant Anwenderpaket

Von den Proben der *detergent resistant membrane fraction* (DRM) nach Foster wurde die Proteinkonzentration mit einem bei der Firma Amersham Biosciences erworbenen Anwendungspaket („2D-Quant Kit“) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein spezielles Produkt, mit dem eine Proteinbestimmung auch in Anwesenheit von 2 % SDS, 1 % Triton X 100 bzw. Mercaptoethanol möglich ist.

2.3.2 Elektrophoretische Techniken

2.3.2.1 Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)

Proben für diese biochemische Standardmethode (Laemmli 1970) zum Trennen von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurden mit einem dreifach konzentrierten Probenpuffer versetzt, darin durch kurzeitiges Erhitzen auf 95°C gelöst und auf eine Konzentration von 139 mM Tris/HCl pH 6,8; 1 mM EDTA; 3,3 % SDS; 10 % Mercaptoethanol; 10 % Glycerol und 0,03 ‰ Bromphenolblau) eingestellt. Für die Elektrophorese standen drei Apparaturen für unterschiedlich große Gele zur Verfügung (Kleingele 6 x 8 cm / Normalgele 16 x 16 cm bzw. 16 x 20 cm / Großgele 23 x 30 cm). Kleingele wurden mit der Apparatur Mini Protean II (BioRad, München) produziert. Die benötigten Gellösungen wurden selbst hergestellt (8, 10 oder 12 % Acrylamid/Bisacrylamidfertiglösung 37,5:1; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,4 ‰ TEMED; 0,1 % APS). Normalgele wurden mit der Apparatur Protean II xi (BioRad) und Großgele mit der Desavor VA Apparatur (Desaga GmbH, Wiesloch) aus Trenngellösungen (15 % Acrylamid; 0,2 % N,N' Methylenebisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,3 ‰ TEMED; 0,08 % APS) der Firma WITA GmbH (Teltow) produziert. Das Sammelgel (5 % Acrylamid/Bisacrylamidfertiglösung 37,5:1; 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,1 % TEMED; 0,1 % APS) wurde in allen Fällen selbst gegossen, wobei bei Bedarf Aussparungen für Probenlösung mit Hilfe eines Platzhalters im Sammelgel vorbereitet wurden. Auch der benötigte Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS) war in seiner Zusammensetzung in den Apparaturen identisch. Die Elektrophoresebedingungen waren an die einzelnen Geräte angepasst. In der Apparatur für Kleingele wurde die Elektrophorese bei steigenden Spannungen von 30 V 15 Minuten; 50 V 15 Minuten; 100 V 15 Minuten und 150 V für ~45 Minuten durchgeführt. Das Gerät für Normalgele erforderte steigende Stromstärken von 30 mA 15 Minuten; 50 mA 15 Minuten; 70-90 mA für 2 bis 4 Stunden und die Elektrophorese der Großgele lief bei 120 mA 15 Minuten; und 150-170 mA für 6 bis 8 Stunden. Als Molekulargewichtsstandard wurde Seebly plus 2 (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) oder Prestained SDS PAGE Standard (BioRad) verwendet.

2.3.2.2 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (IEF/SDS PAGE)

Diese Methode, durchgeführt nach dem Protokoll von Klose (Klose 1995), erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach deren isoelektrischem Punkt in der ersten Dimension, mit nachfolgender Auftrennung nach dem Molekulargewicht (SDS - PAGE) als zweite Dimension.

Zur Präparation der löslichen Proteine wurde das Zellpellet mit Harnstoff, DTT und Servalyt 2-4 (Endkonzentration: 9 M Harnstoff, 70 mM DTT (Biomol GmbH, Hamburg), 2% Servalyt 2-4) versetzt und gut gemischt. Der Überstand nach Zentrifugation bei 100.000 x g für 30 Minuten enthält die „löslichen Proteine“ und wurde bis zur Analyse eingefroren.

Um auch schwer lösliche Proteine zu solubilisieren, wurde das Zellpellet in einem Gemisch aus 7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 71 mM DTT (Biomol GmbH, Hamburg); 50 mM CHAPS; 0,5 % Triton X 100; 2 % Servalyt 2-4 unter 30 Minuten Schütteln solubilisiert. Unlösliche Teile der Probe wurden durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 10 Minuten abgetrennt.

Gele für die isoelektrische Fokussierung wurden mit Gellösungen der Firma WITA GmbH, Teltow hergestellt. Vor Verwendung wurden die Gellösungen 15 Minuten mit Helium (Messer Group GmbH; Sulzbach) entgast. In Glaskapillaren (Innendurchmesser 1,5 mm; Länge 23 cm) wurde durch Unterdruck rund 350 µl Separationsgellösung (3,5 % Acrylamid; 0,3 % Piperacin-diacrylamid; 9 M Harnstoff; 5 % Glycerol; 2 % WITA-lyte pH 2-11; 0,6 ‰ TEMED; 0,2 ‰ APS) gesogen. Diese Lösung füllte ca. 20 cm der Kapillare, mit ca. 0,5 cm (für das Cappel) bzw. 2,5cm Abstand (Probenauftrag) bis zum Rand der Kapillare. Nach einer initialen Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde eine Seite des Gels mit 8 µl Cappelösung (12 % Acrylamid; 0,13 % Piperacin-diacrylamid; 9 M Harnstoff; 5 % Glycerol; 2 % WITA-lyte pH 2-11; 0,6 ‰ TEMED; 0,2 ‰ APS) überschichtet. Beide Gelseiten wurden dicht verschlossen und die Kapillaren bis zur Elektrophorese 3 Tage dunkel gelagert.

Der Probenauftrag für die isoelektrische Fokussierung erforderte ein Höchstmaß an Konzentration und handwerklicher Übung. Nachdem beide Gelseiten vom Polymerisationswasser befreit waren, wurden sie mittels eines dünnen Filterpapierstreifens getrocknet. Die Kapillarseite mit dem Cappel wurde mit der mit Helium entgasten Kathodenlösung (9 M Harnstoff; 5 % Glycerin; 5 % Ethylendiamin) luftblasenfrei befüllt und die

Kapillare vertikal in der Apparatur befestigt. Auf die Probenseite wurden nun nacheinander 3 μ l Sephadexlösung (9 M Harnstoff; 2 % WITA-lyte 2-11; Sephadex G 200), 20-35 μ l Probe, 5 μ l Überschichtungslösung (5 M Harnstoff; 5 % Glycerin; 5 % Servalyt pH 2-4) und abschließend entgaste Anodenlösung (3 M Harnstoff; 7,27 % w/v Phosphorsäure) luftblasenfrei geschichtet. Die Kapillare wurde dicht mit dem Anodenreservoir verbunden und die Elektrophorese wurde bei Spannungen von 100 V 60 Minuten; 200 V 60 Minuten; 400 V 17,5 Stunden; 600 V 60 Minuten; 1000 V; 30 Minuten; 1500 V 10 Minuten; 2000 V 5 Minuten durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele durch Druck aus einer aufgesetzten Spritze aus den Gelröhrchen herausgedrückt und 10 Minuten in einer Petrischale in Inkubationslösung (125 mM Tris/H₃PO₄ pH 6,8; 40 % Glycerol; 3 % SDS; 65 mM DTT) äquilibriert. Anschließend wurde durch Zugabe von 240 mM Iodacetamid zu Inkubationslösung und erneutem Schütteln für 10 Minuten alkyliert. Nach dem Abnehmen der Lösung wurden die Petrischalen als Lagergefäße dicht mit Parafilm verschlossen und bei – 20 °C eingelagert.

Für den Lauf der zweiten Dimension wurden Großgele (Desavor VA) verwendet, die ohne Sammelgel gegossen wurden. Auf das Trenngel wurde das Gel der „ersten Dimension“ sehr vorsichtig transferiert, mögliche Luftblasen mit einer Pipette entfernt, und eine Agaroselösung (125 mM Tris/H₃PO₄ pH 6,8; 1 % Agarose; 0,1 % SDS) zum Fixieren aufpipettiert. Nach Erstarren des Agarosegels wurde die Elektrophorese der „zweiten Dimension“ nach oben genannten SDS PAGE Bedingungen durchgeführt werden.

Ein quantitativer Vergleich von 2DE Gelen wurde mit der Phoretix - Software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) durchgeführt. Spots wurden damit automatisch erkannt, die Zuordnung visuell überprüft und die Spotvolumina (Produkt aus Spotgröße und deren Farbintensität) ermittelt, die mit den Werten aus anderen Gelen verglichen wurden. Zu jedem Experiment wurden die quantitativen Daten (Spotintensität) mindestens drei Mal mithilfe des Programmes Phoretix erhoben und aus mindestens zwei verschiedenen 2DE-Gelen bestimmt. Ein Protein wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn sein Spotvolumen um mehr als 50 % zugenommen hat und die Standardabweichung \leq 25 % beträgt.

2.3.2.3 Trägerfreie Isoelektrische Fokussierung - Rotofor™

Die trägerfreie isoelektrische Fokussierung erlaubt die Separierung komplexer Proteingemische nach deren pH in mehrere Fraktionen. Das hierbei genutzte Gerät Rotofor™ (BioRad) ermöglicht die Trennung in 20 unterschiedliche Proben, in denen sich die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes konzentrieren. Der schematische Aufbau des Rotofor Gerätes kann der Abb. 15 entnommen werden.

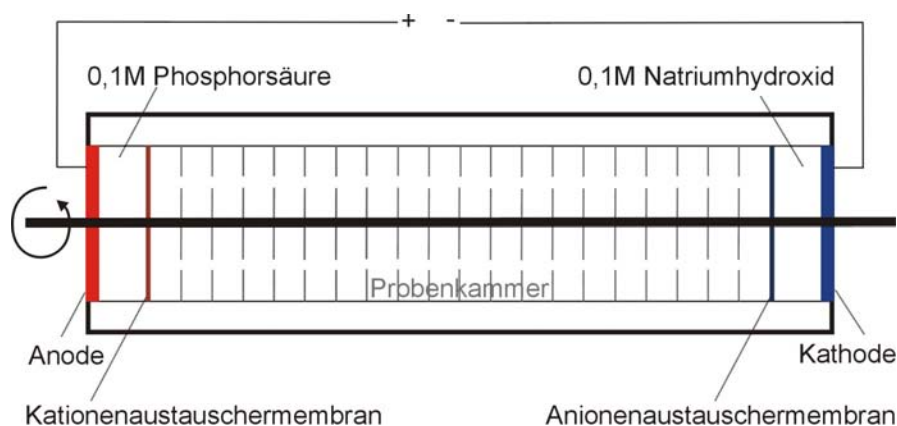


Abb. 15: Schematischer Aufbau Rotofor

Ein zylindrisches Probengefäß ist in 20 durchlässige Abschnitte unterteilt. An der Kathodenseite schließt sich direkt eine Anionenaustauschermembran an, die die Probe von der 0,1 M Natriumhydroxidlösung als Kathodenlösung trennt. Die Anodenseite wird aus Kationenaustauschermembran, 0,1 M Phosphorsäure als Anodenlösung und der Anode gebildet. Die ganze Apparatur ist um eine mittig angebrachte Achse drehbar gelagert um Störungen durch Konvektion entgegenzuwirken. Mit Hilfe eines speziellen Aufsatzes können die Proben am Ende des Laufes gleichzeitig durch Unterdruck abgesaugt werden.

Mit dieser Methode wurden je 0,75-1 g einer Mischung aus mit $^{13}\text{C}_6$ Arginin markierten bzw. mit Hypoxie behandelten, unmarkierten Gehirnkapillarendothelzellen (rBCEC4) in Fraktionen aufgetrennt. Hierzu wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff lysiert und mit Solubilisierungsmitteln versetzt, so dass ein Endvolumen von 9,5 ml mit einer Endkonzentration von 5 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 20 mM DTT; 50 mM CHAPS; 0,5 % Triton X 100 entstand. Die Proben wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und zur Abtrennung ungelöster Bestandteile bei 70.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die

Proteinkonzentrationen der beiden Proben bestimmt, diese im Proteinmengenverhältnis 1:1 vermischt und die Probenlösung, um Schwebeteilchen auszuschließen, durch einen Papierfilter gegeben. Die Probenlösung wurde durch Solubilisierungspuffer (5 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 20 mM DTT; 50 mM CHAPS; 0,5 % Triton X 100) auf ein Volumen von 19 ml ergänzt und durch Zugabe von 1 ml BioLyte® 3/10 auf eine Ampholytkonzentration von 2 % gebracht. Diese Probenlösung wurde vorsichtig in die vorbereitete Rotofor™-Probenkammer eingefüllt, dicht verschlossen und die Elektrophorese bei einer konstanten Leistung von 12 W und der permanenten Drehung der Achse durchgeführt. Beendet wurde die Elektrophorese, wenn die Spannung über eine Stunde konstant blieb. Dies war nach rund 5 Stunden Laufzeit bei einer Spannung von 1,3- 1,6 kV gegeben. Der Kollektoraufsatz wurde angebracht und die Probenfraktionen aus den 20 Probenkammern durch Unterdruck in einzelne Gefäße überführt.

2.3.2.4 Modifizierte Polyacrylamidgelelektrophorese - 16-BAC/SDS PAGE

Hydrophobe Proteine, die bei der isoelektrischen Fokussierung aufgrund der schwächeren Solubilisierungseigenschaften von nichtionischen Detergentien nicht in Lösung gehalten werden können, können mit dieser Methode zweidimensional nach dem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Hartinger 1996). Hierzu wird in der ersten Dimension 16-Benzyltrimethylhexadecylammoniumchlorid (16-BAC) als kationisches Detergens eingesetzt. In der zweiten Dimension werden die Proteine mit einer SDS PAGE aufgetrennt.

Proben für diese Methode wurden mit Solubilisierungsmitteln auf eine Endkonzentration von 3,75 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 125 mM 16-BAC; 685 mM Glycerin; 37,5 mM DTT; 0,85 µM Pyronin gebracht und ~1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Ungelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 Minuten pelletiert. Für Gele der ersten Dimension wurden Kleingele (6 x 8 cm; Mini Protean II, BioRad) bzw. Normalgele (16 x 20 cm; Protean II xi, BioRad) verwendet. Die Polymerisation der Trenngellösung (7,5 % Acrylamid / Bisacrylamidfertiglösung 30 %; 0,7 % Methylenebisacrylamid; 88 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,1; 3,5 M Harnstoff; 2,9 mM 16-BAC; 4,7 mM Ascorbinsäure; 9 µM Eisen(II)sulfat) wurde durch Zugabe von 0,01 % Wasserstoffperoxid initiiert. Die Polymerisationszeit betrug 4 Stunden. Mit 0,006 % Wasserstoffperoxid wurde die Polymerisation des Sammelgels (4 % Acrylamid / Bisacrylamidfertiglösung 30 %; 0,3 % Methylenebisacrylamid; 158 mM Kaliumphosphatpuffer pH 4,1; 2,1 M Harnstoff; 2,2 mM 16-BAC; 5 mM Ascorbinsäure; 5 µM Eisen(II)-

Materialien und Methoden

sulfat) gestartet, wobei mit Platzhaltern Aussparungen für den Probenauftrag eingearbeitet wurden. Nachdem die Probenlösungen aufgetragen waren, wurde die Elektrophorese mit vertauschten Elektroden (16-BAC bewegt sich in Richtung Kathode) in Laufpuffer (2,5 mM 16-BAC; 150 mM Glycin; 50 mM Phosphorsäure) mit steigenden Spannungen (Mini Protean II 30 V 15 Minuten; 50 V 15 Minuten; 100 V 15 Minuten, 150 V für ~45 Minuten / Protean II xi 30 mA 15 Minuten; 50 mA 15 Minuten; 70-90 mA für 2 bis 4 Stunden) durchgeführt. Das Gel wurde nach dem Lauf für 4 x 15 Minuten in Fixierlösung (35 % Isopropanol; 10 % Essigsäure) geschwenkt. Unter Zusatz von 0,15 % Coomassie R250 zu Fixierlösung wurde das Gel für 30 Minuten gefärbt, zur Dokumentation gescannt, in einzelne Banden zerteilt, diese mit Fixierlösung mindestens 3 x 10 Minuten entfärbt und bis zur Verwendung bei -20 °C eingelagert.

Nach Äquilibration des Gelstreifens der „ersten Dimension“ in 100 mM Tris/HCl pH 6,8 für 3 x 10 Minuten konnte eine SDS PAGE durchgeführt werden. Hierzu wurde der Gelstreifen auf ein SDS-Sammelgel luftblasenfrei überführt. Nach 5 Minuten Inkubation mit 3 x SDS-Probenpuffer (Zusammensetzung siehe oben) wurde das Gel mit SDS-Laufpuffer überschichtet und die Elektrophorese unter den oben genannten Bedingungen durchgeführt.

2.3.3 Färbung von Gelen mit Coomassie Brilliant Blue G-250

Dieses Protokoll ist angelehnt an das von Neuhoff beschriebene Protokoll (Neuhoff 1988). Direkt nach der Elektrophorese wurden die Gele mindestens 30 Minuten bis maximal über Nacht in Fixierlösung (2 % Phosphorsäure, 50 % Methanol) geschwenkt. Eindimensionale Gele wurden anschließend kurz mit Wasser abgespült und mindestens 4 Stunden mit Färbelösung (2 % Phosphorsäure, 34 % Methanol, 17 % Ammoniumsulfat und 0,66 ‰ CBB-G-250; Serva) inkubiert. Zweidimensionale Gele wurden nach Fixierung drei Mal je 30 Minuten in Wasser gewaschen. Es folgte eine zweistündige Äquilibration in Inkubationslösung (2 % Phosphorsäure, 34 % Methanol, 17 % Ammoniumsulfat) mit anschließender Färbung in Färbelösung. Diese Gele verblieben mindestens fünf Tage in der Färbelösung, bis sich durch zunehmende Entfärbung des Hintergrundes deutlich Proteinspots bzw. -banden abzeichneten. Anschließend wurden die Gele gescannt, in Folie eingeschweißt und bei 4-7 °C gelagert.

2.3.4 Enzymatische Spaltung der Proteine im Gel

Die folgenden Arbeiten wurden unter besonderem Schutz vor (Keratin-) Kontaminationen durchgeführt. Dieser Schutz beinhaltete ein Haarnetz, Latexhandschuhe über den Laborkittelärmeln und einen besonders sorgfältigen Umgang mit den Proben. Des Weiteren wurde ultrareines Wasser (MilliQ) verwendet.

Proteinspots aus einem zweidimensionalen Gel bzw. Proteinbanden aus einem eindimensionalen Gel, die zur massenspektrometrischen Identifizierung ausgewählt waren, wurden auf einem Leuchttisch mit einer Glaskapillare ausgestochen bzw. mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ca. 1 mm³ große Gelstücke zerkleinert und in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt. Bei der folgenden Prozedur wurden die Gelstücke mit den verschiedenen Lösungen versetzt, 10 Minuten unter Schütteln inkubiert und anschließend die Lösungen mit einer dünnen Pipettenspitze abgesaugt. Die Gelstücke wurden zweimalig mit ~ 400 µl Wasser gewaschen. Es folgte die Zugabe von ~300 µl einer Lösung aus 25 mM Ammoniumbicarbonat, 50 % Acetonitril. Erneut wurde mit Wasser und anschließend der Lösung aus 25 mM Ammoniumbicarbonat, 50 % Acetonitril gewaschen. Rund 100 µl Acetonitril entzog den Gelstücken Wasser und bewirkte deren Schrumpfen. Bei Bedarf wurde dieser Schritt wiederholt. Diese Gelstückchen wurden in einer Vakuumzentrifuge für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Proteinspots zur Analyse mit MALDI-MS wurden je nach Größe mit 5-10 µl Trypsinlösung (32,25 ng/µl; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) rehydratisiert; während Proteinbanden zur Analyse mit nano-LC-MS-MS je nach Größe mit 8-25 µl Trypsinlösung (6,25 ng/µl; Promega GmbH, Mannheim) versetzt wurden. Die dicht verschlossenen Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Während dieser Inkubation spaltete Trypsin die Proteine in definierte Peptide. Nach 16-18 h wurde die Reaktion mit einer Lösung aus 0,5 % Trifluoressigsäure in Acetonitril in der gleichen Menge wie Trypsinlösung gestoppt. Um Proteinfragmente aus dem Gel herauszulösen, wurden die Gelstücke 2-3 Minuten mit Ultraschall behandelt und die Lösung anschließend in saubere HPLC-Glasvials überführt. Die Gelstücke wurden noch je zwei Mal mit 20-30 µl Acetonitril versetzt, 2-5 Minuten geschüttelt, die Lösungen mit den entsprechenden vorherigen Eluatn vereinigt, und in der Vakuumzentrifuge bei 30-40 °C 15-20 Minuten bis auf 1 µl eingeeengt. Schließlich wurden die Proben in 6 µl eines Lösungsmittelgemisches aus 0,1 % Trifluoressigsäure und 10 % Acetonitril in Wasser aufgenommen

Materialien und Methoden

und 2-3 Minuten mit Ultraschall behandelt. Diese Lösung wurde entweder direkt mit nanoLC MS/MS vermessen, oder weiter für die Analyse mit MALDI-MS vorbereitet.

Zur Vorbereitung der MALDI-MS wurde die Lösung 10-mal durch ZipTip[®] Pipettenspitzen (C₁₈, Millipore GmbH, Schwalbach) sehr langsam auf- und abpipettiert. Vorgegangen war die Equilibrierung der ZipTip[®] Pipettenspitzen durch 3-maliges aufziehen von 10 µl eines Acetonitril / Wasser-Gemisches und 3-maliges aufziehen von 10 µl 0,1% Trifluoressigsäure (TFA). Anschließend wurden die ZipTip[®] Pipettenspitzen durch 3-maliges Aufziehen von 0,1% TFA gewaschen, wonach die gebundenen Peptide mit 2,5 µl Extraktionslösung (8 mg/ml α – Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 0,3% TFA : MeCN [1:1]) extrahiert und auf den MALDI-Probenträger aufgetragen wurden.

2.3.5 Identifizierung von Proteinen mit Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Analyse stand ein Tandemmassenspektrometer (Q-Tof Ultima[™]; Waters/Micromass; Manchester; UK) mit vorhergehender Auftrennung der Peptide in einer nanoLC (nanoLC MS/MS) und ein MALDI-TOF Massenspektrometer (Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation; Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA) zur Verfügung.

Zur Analyse mit dem nanoLC-MS/MS wurden, in Abhängigkeit der erwarteten Proteindichte, zwischen 2 und 6 µl Probenlösung auf ein CapLC-Flüssigchromatographiesystem (Micromass) injiziert. Auf einer Vorsäule (PepMap C18, 5 µm, 100 Å, 5 mm x 300 µm i.d., Firma Dionex) wurden die Peptide mit 0,2 % Ameisensäure bei einer Flussrate von 20 µl/min konzentriert, während die Trennung auf einer analytischen Säule (PepMap C18, 3 µm, 100 Å, 150 mm x 75 µm i.d., Firma Dionex) bei einer Flussrate von 200 nl/min mit einem konstanten Gehalt an 0,1 % Ameisensäure und einem steigenden Gradienten von 7,25 % bis 53 % Acetonitril durchgeführt wurde. Das Massenspektrometer operierte im positiven Ionen Modus, wobei PicoTip spray Kapillaren (Firma New Objective) verwendet wurden. Es wurde der m/z Bereich zwischen 300 und 1990 erfasst. Die Scandauer lag bei 1 s. Doppelt und dreifach geladene Peptidionen mit Intensitäten größer als 120 *counts* wurden für das MS/MS selektiert, mit Argon bei einem Druck von 6×10^{-5} mbar in der Kollisionskammer fragmentiert und im m/z Bereich zwischen 50 und 1990 detektiert. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software Mass Lynx[™] (Waters GmbH, Eschborn) in Datensätze umgewandelt, mit denen die enthaltenen Proteine in entsprechenden Datenbanken recherchiert werden konnten.

Die Messungen mit MALDI-MS wurden am Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation im Reflektionsmodus durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV mit 70 % Gitterspannung bei einer Verzögerung von 150 ns. Im Linearmodus waren die Einstellungen: Beschleunigungsspannung 20 kV, 94% Gitterspannung, Verzögerung von 150 ns. Jedes Spektrum entspricht 256 Laserimpulsen.

2.3.6 Datenbankrecherche und Quantifizierung

Die mittels Massenspektrometrie erhaltenen Datensätze wurden im Falle der Expressionsstudien von Rattengehirnkapillarendothelzellen unter Hypoxie mit Hilfe der Suchmaschine von MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) mit Einträgen der Datenbank Swissprot (<http://www.expasy.org/sprot>; Version SwissProt 250506; 222289 sequences; 81585146 residues) verglichen. Dafür werden die in der Datenbank Swissprot eingetragenen Proteine theoretisch mit dem gleichen Enzym gespalten. Die resultierenden theoretischen Proteinfragmente werden mit den Peptidmassenlisten der massenspektrometrischen Analyse verglichen. Übereinstimmende Proteine werden nach einem internen Wertungssystem (*mascot protein score*), der die Proteinmasse, die Anzahl der gefundenen Peptide, deren Identifizierungsgenauigkeit und andere Parameter berücksichtigt, geordnet. Informationen zu Lokalisation und Funktion wurden aus der Datenbank Swissprot entnommen.

Die Quantifizierung wurde mit Hilfe des frei im Internet verfügbaren Programms MSQuant (<http://msquant.sourceforge.net/>) durchgeführt. Mit diesem Programm ist es möglich, die Signalintensität des massenspektrometrischen Signals von argininhaltigen Peptiden mit normalem $^{12}\text{C}_6$ Arginin mit dem des korrespondierenden $^{13}\text{C}_6$ argininhaltigen Peptides in geeigneter Weise darzustellen und deren Intensitäten zu vergleichen. Hierzu werden die Signalintensitäten (*extracted ion current* [XIC] bzw. die Peakhöhe) von ausgewählten, zeitlich kurz aufeinanderfolgenden Spektren (*scans*) gemittelt. Die Peakhöhe der Signale (XIC > 100) des normalen Arginin (behandelte Probe) und des $^{13}\text{C}_6$ Arginin (Kontrolle) wurden ins Verhältnis gesetzt.

Bei den Studien zur Lokalisation von *tight junction* Proteinen in Rattencholangiocyten wurde die Recherche der Proteine wie im Expressionsexperiment der Gehirnkapillarendothelzellen durchgeführt, indem die Daten der Massenspektrometrie mit Einträgen der Datenbank Swissprot (Version SwissProt 240206; 211104 sequences; 77361893 residues bzw. 250506; 222289 sequences; 81585146 residues) verglichen wurden. Aus-

Materialien und Methoden

gewählte Proteine konnten über eindeutig zugeordnete, argininhaltige Peptide mit Hilfe des Programms MassLynx V4.0 quantifiziert werden. Hierzu wurden die zugehörigen MS Signalpeaks dieser eindeutig zugeordneten Peptide und die korrespondierenden Peaks der mit $^{13}\text{C}_6$ Arginin markierten Peptide im Massenspektrum lokalisiert. Mehrere geeignete MS-scans (XIC > 50) wurden kombiniert, die erhaltenen Spektren geglättet (*channels* ± 5 , *smooth 2*, *savitzky golay*) und das Verhältnis der Intensitäten dokumentiert.

Für Studien zu *tight junction* angereicherten Fraktionen wurden die massenspektrometrisch gemessenen Daten mit Einträgen der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Version NCBI Nr 250805; 2791871 *sequences*; 957198397 *residues*) verglichen, da diese auch theoretische, von der Basensequenz der DNA abgeleitete Proteine annotiert hat. Die verwendete Version der Datenbank ist bei den Datensätzen dokumentiert. Es wurden nur Proteine als eindeutig angesehen, von denen mindestens 2 Peptide sequenziert worden waren. Diese Peptide durften nicht schon einmal für ein anderes, in der Ergebnistabelle als wahrscheinlicher geltendes Protein vorgeschlagen sein und der Peptidscore lag bei > *homology* und für mindestens ein Peptid bei > *identity*. Für Informationen über Funktion und Lokalisation der erhaltenen Proteine wurden die einzelnen Proteinsequenzen bei Uniprot (<http://www.expasy.uniprot.org>) einem Sequenzvergleich (BLAST; Program: NCBI BLASTP 1.5.4-Paracel [2003-06-05]) unterzogen, um entsprechende Proteine aus der Datenbank Swissprot (<http://www.expasy.org/sprot>; EXPASY/UniProtKB, 2,839,872 *sequences*; 926,519,776 *total letters*) zu recherchieren, da in dieser Datenbank Informationen zu den Proteinen verfügbar sind. Das datenbankinterne Bewertungssystem (*masscot protein score*) und die Sequenzhomologie zwischen den Einträgen in NCBI und Swissprot wurden dokumentiert und werden bei den relevanten Daten erwähnt. Zum Vergleich aller identifizierten Proteine aus den drei detergens-unlöslichen Fraktionen (DRM) wurden die zugehörigen Zugangsnummern der Datenbank NCBI in der Anwendersoftware Access gegenübergestellt. Wenn nicht anders gekennzeichnet, entsprechen die Datenbankeinträge Proteinen aus Säugetieren (mehrheitlich *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*).

2.3.7 Immunoblot

Immunoblots wurden mit Kleingelen durchgeführt. Das Gel wurde hierbei sofort nach dem Lauf 10 Minuten in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol) äquiliert. Auch die verwendete Nitrocellulosemembran (Hyperfilm™ ECL; Amersham Biosciences, Freiburg) wurde für 10 Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Der Transfer wurde bei einer Spannung von 20 V 30-45 Minuten (Transblot® SD - *semidry transfer cell*; BioRad; München) für ein Gel durchgeführt, wobei Anode, transferpuffergetränktes Filterpapier, Cellulosemembran, das zu blottende Gel, wieder ein transferpuffergetränktes Filterpapier, und die Kathode in horizontaler Richtung luftblasenfrei von unten nach oben übereinander geschichtet waren. Die Transferzeiten erhöhten sich bei gleichzeitigem Transfer mehrerer Gele pro Gel um rund 30 Minuten. Während die Membran nach dem Transfer für ~16 Stunden mit *Tris-buffered saline plus Tween* (TBST – 76,8 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,9 % Natriumchlorid, 0,5 % Tween 20) mit einem Zusatz von 5 % Trockenmilch bei 4 °C geschwenkt wurde, wurde das Gel zur Kontrolle mit Coomassie G-250 gefärbt. Bei den weiteren Schritten wurde TBST zum Teil mit Zusätzen verwendet.

Tab. 3: Primäre Antikörper (AK) für Proteinnachweis mit Immunoblot und Immunfluoreszenz

Primärer Antikörper	Spezies Spendertier	Spezifität	Hersteller	C Immunoblot	C Immunfluoreszenz
Occludin	Kaninchen	polyklonaler AK	Zymed	0,125µg/ml	1,25 µg/ml
Claudin 1	Kaninchen	polyklonaler AK	Zymed	0,125µg/ml	1,25 µg/ml
Claudin 3	Kaninchen	polyklonaler AK	Zymed	0,125µg/ml	1,25 µg/ml
Claudin 4	Maus		Zymed	0,25µg/ml	1,25 µg/ml
Claudin 5	Kaninchen	polyklonaler AK	Zymed	0,125µg/ml	1,25 µg/ml
ZO 1	Maus	monoklonaler AK	Zymed	0,25µg/ml	2,5 µg/ml
ZO 2	Kaninchen	polyklonaler AK	Zymed	0,125µg/ml	1,25 µg/ml
JAM A	Kaninchen	polyklonaler AK	Zymed	0,5µg/ml	5µg/ml
Pan Cadherin	Kaninchen	polyklonaler AK	Sigma	1:1000	1:100
Vinculin	Maus	monoklonaler AK	Sigma	1:2000	1:200
β Aktin	Maus	monoklonaler AK	Sigma	1:2000	
Caveolin 1	Maus	monoklonaler AK	BD	0,25µg/ml	2,5µg/ml
Flotillin	Maus	monoklonaler AK	BD	0,5µg/ml	
Phosphoglyceratkinase	Kaninchen	polyklonaler AK	Abgent	0,5µg/ml	
Anti HIF 1α	Maus	monoklonaler AK	Imgenex	2,1µg/ml	
α-Catenin	Kaninchen	polyklonaler AK	Sigma		1:100
β-Catenin	Kaninchen	polyklonaler AK	Sigma		1:100
Talin	Maus	monoklonaler AK	abcam		232 µg/ml bzw. 93 µg/ml
Glucosetransporter 1	Kaninchen	polyklonaler AK	Chemicon		1:100 1:200

C – Konzentration;

Zymed Laboratories, South San Francisco, USA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; BD – BD Transduction Laboratories; BD Biosciences, Heidelberg; Abgent, Inc.; San Diego, USA; Biocat GmbH, Heidelberg; Imgenex; San Diego, USA; Biomol GmbH, Hamburg; abcam plc. Cambridge, UK; Chemicon; Millipore GmbH, Schwalbach

Materialien und Methoden

Tab. 4: Sekundäre Antikörper (AK) für Proteinnachweis mit Immunoblot und Immunfluoreszenz

Sekundärer Antikörper	Spezies Spendertier	Spezifität	Hersteller	C Immuno-blot	C Immunfluoreszenz
Ziege anti Kaninchen AK HRP konjugiert	Ziege	polyklonaler AK	Zymed	0,2µg/ml	
Ziege Anti Maus AK HRP konjugiert	Ziege	polyklonaler AK	Zymed	0,15µg/ml	
Ziege anti Kaninchen AK Cy3 konjugiert	Ziege	polyklonaler AK	Zymed		4µg/ml
Ziege Anti Maus AK Cy3 konjugiert	Ziege	polyklonaler AK	Zymed		4µg/ml

C – Konzentration
Zymed Laboratories, South San Francisco, USA

Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten wurde die Membran für 1,5 Stunden mit 2,5-5 ml einer Verdünnung des primären Antikörpers (siehe Tab. 3) inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für 10 Minuten, bevor die Lösung des mit Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörpers für 45 Minuten mit der Membran inkubiert wurde. Der primäre Anti-Occludin-Antikörper erforderte einen Zusatz von 1 % Rinderserumalbumin, der entsprechende sekundäre Antikörper (siehe Tab. 4) wurde mit 1 % Trockenmilch in TBST inkubiert. Vor der Analyse des Immunoblots wurden die Membranen vier Mal je 10 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines chemilumineszenz sensitiven Filmes (Amersham Biosciences; Hyperfilm™ ECL) der durch die Luminol Reaktion (ECL Western Blotting Detection Reagents; Amersham Biosciences, Freiburg) belichtet und mit entsprechenden Lösungen entwickelt und fixiert wurde (Kodak; GBX *developer and replenisher*, GBX *fixer and replenisher*).

2.3.8 Immunfluoreszenz

Für den Nachweis von Lokalisation und Expression von Proteinen in NRC bzw. rBCEC4 wurden diese auf mit Rattenschwanzcollagen beschichteten runden Deckgläschen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz (> 95 %) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 5 Minuten in Aceton fixiert und anschließend 1 Minute in eiskaltem Ethanol bzw. PBS inkubiert. Es folgte die „Blockierung“ in Lösung B (1 % RSA; 0,05 % Tween20; 0,02 % Natriumacid) für 10 Minuten und die Inkubation einer Verdünnung des primären Antikörpers (siehe Tab. 3) in Lösung B für 60 Minuten. Diese Lösung wurde durch fünfmalige Inkubation mit Lösung B für je 2 Minuten entfernt und anschließend die Zellen mit dem sekundären Antikörper in Lösung B (siehe Tab. 4) für 30 Minuten behandelt. Auch diese Lösung wurde durch fünfmalige Inkubation mit Lösung B für je 2 Minuten entfernt, bevor das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten direkt auf einen Tropfen *Mounting*

Medium (Aqueous mount, Zytomed) auf einen Objektträger transferiert wurde. Die visuelle Auswertung erfolgte an einem *laser scanning microscope* (LSM 510 META-UV) der Firma Zeiss mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv.

2.3.9 Bestimmung des Cholesterolgehaltes

Die Bestimmung des Cholesterolgehaltes erfolgte mit dem Amplex® Red Cholesterol Assay Kit (Gibco/Invitrogen Karlsruhe), wobei das in der Probe enthaltene Cholesterol mittels einer Cholesteroxidase zum korrespondierenden Keton und Wasserstoffperoxid oxidierte. Unter Zugabe des Amplex Red Reagenz und Merrettichperoxidase wird das entstandene Wasserstoffperoxid zu Resorufin umgesetzt, das bei einer Exzitationswellenlänge von 571 nm angeregt, und bei der Emmissionswellenlänge von 585 nm gemessen wurde. Die Cholesterolkonzentration korrespondiert direkt mit der vermessenen Resorufinkonzentration. Das experimentelle Vorgehen entsprach dem Protokoll des Herstellers.

2.3.10 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Für die Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) wurden NRC Zellen auf kollagenbeschichteten CM-Filtereinsätzen (Durchmesser 12 mm; Porengröße 0,4 µm, Firma Millipore GmbH, Schwalbach) in einer 24 Probenkammern enthaltenden Zellkulturplatte gezüchtet. Je nach Versuchsgruppe wurde zum Messungsbeginn normales Medium oder Medium unter Zusatz von 20 mM MβCD bzw. 2,5 mM EGTA in das innere, den apikalen Bereich der Zellen versorgende Reservoir und das äußere, den basalen Teil der Zellen versorgende Reservoir, gegeben. Die Messung des TEER wurde mit einer Millicell-Elektrode und einem Millicell-Ohmmeter (Firma Millipore GmbH, Schwalbach) zu Beginn der Inkubation sowie 60 und 150 Minuten nach dem Mediumwechsel durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Differentielle Proteinexpression in Gehirnkapillarendothelzellen nach 24 h Hypoxie

3.1.1 Untersuchungen zur differentiellen Proteinexpression von Gehirnkapillarendothelzellen nach 24h Hypoxie mit zweidimensionaler Gelelektrophorese

Als Teil der Blut-Hirn-Schranke fungieren Gehirnkapillarendothelzellen als wichtige Barriere für toxische Substanzen und gewährleisten den gerichteten Transport von Nährstoffen aus dem Blut in das Hirngewebe. Obwohl deren exakte Funktionsweise und Kontrollmechanismen noch nicht vollständig bekannt sind, gibt es Hinweise darauf, dass Stressbedingungen, wie z.B. Ischämie bzw. Hypoxie zu strukturellen, molekularen und funktionellen Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke führen. Die Aufklärung der zellulären Anpassungsmechanismen bei Hypoxie / Reoxygenierung auf die Proteinexpression von Gehirnkapillarendothelzellen (rBCEC4) ist Kern dieses Teiles der Arbeit.

Die differentielle Proteinexpression nach 24h Hypoxie und anschließender Reoxygenierung wurde von rBCEC4 Zellen mit einer zu diesem Zeitpunkt üblichen Vorgehensweise untersucht. Die löslichen Proteine von Kontrollzellen, von Zellen nach 24 h Hypoxie und Zellen nach 24 h Hypoxie und anschließender Reoxygenierung wurden auf zweidimensionalen Gelen aufgetrennt und die Proteinspots mit einem geeigneten Farbstoff (CBB-G-250) visualisiert. Es folgte der densitometrische Vergleich einzelner Proteinspots der verschiedenen Gele. Aus ausgewählten Proteinspots wurden Proteine mit massenspektrometrischen Methoden identifiziert. In Abb. 16 ist ein zweidimensionales Gel mit aufgetrennten löslichen Proteinen von rBCEC4 Zellen nach 24 h Hypoxie dargestellt.

Aus 32 Gelspots konnten 28 Proteine mit einer MS Sequenzbedeckung (*peptide mass fingerprint*) von mindestens 20 % signifikant nachgewiesen werden. Die Identität von vier Proteinen, die mit einer Sequenzbedeckung von 14-20 % identifiziert wurden, wurde mit MS/MS bestätigt. Die Spotvolumina dieser Proteine wurden auf den Gelen aus Kontrollzellen (Normoxie), nach 24 h Hypoxie und mit Reoxygenierung verglichen. Es konnte eine erhöhte Proteinexpression von glykolytischen Enzymen (z.B. α -Enolase; 4,3-fach

erhöht exprimiert) nach 24 h Hypoxie nachgewiesen werden. Des Weiteren waren Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums (Proteindisulfidisomerase; 1,7-fach erhöht exprimiert), des Mitochondriums (Aspartataminotransferase; 7,4-fach erhöht exprimiert) und des Zytoskelettes (α -Aktin; 1,9-fach erhöht exprimiert) erhöht exprimiert.

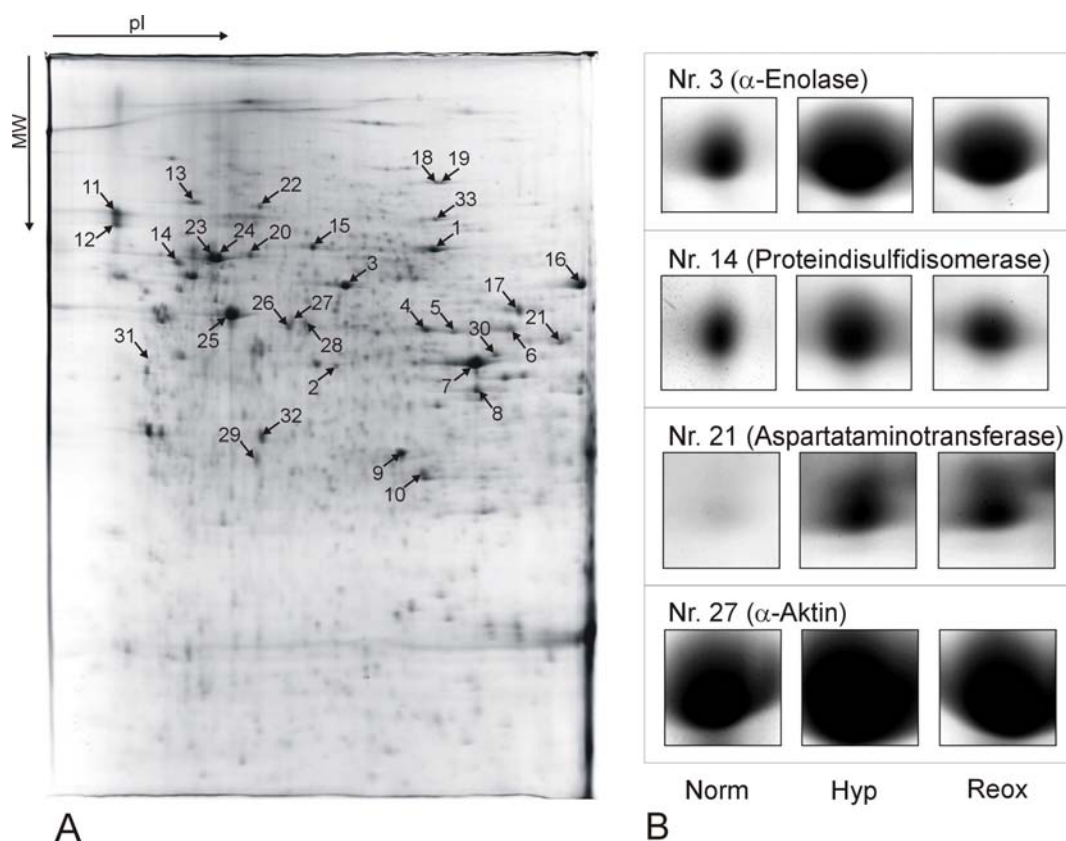


Abb. 16: A) Zweidimensionale Auftrennung ca. 500 μ g löslicher Proteine aus rBCEC4 Zellen nach 24 h Hypoxie; Spots aus denen Proteine identifiziert wurden, sind mit Pfeil und Nummer gekennzeichnet; B) Darstellung ausgewählter Proteinspots aus 2DE Gelen der Normoxie (Norm), Hypoxie (Hyp) und Reoxygenierung (Reox).

Tab. 5: Ausgewählte, differentiell exprimierte Proteine aus rBCEC4 Zellen nach 24 h Hypoxie (Hypox) bzw. 24 h Hypoxie und nachfolgender Reoxygenierung für 24 h (Reox). Zu jedem Experiment wurden die quantitativen Daten (Spotvolumen) mindestens drei Mal mithilfe des Programmes Phoretix erhoben und aus mindestens zwei verschiedenen 2DE-Gelen bestimmt. Ein Protein wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn sein Spotvolumen um mehr als 50 % zugenommen hat und die Standardabweichung \leq 25 % beträgt.

Spot	Protein	SwissProt Acc.-nr.	Spotvolumen Normoxie, 1,0		Position im 2DE Gel pl/kDa gemessen (pl/kDa theoretisch ^{a)})	MS Sequenzbedeckung [%]
			Hypox	Reox		
3	α -Enolase	P04764	4,3	2,5	5,9/46 (6,2/47)	42
5	Phosphoglyceratkinase	P16617	5,0	13,8	6,9/38 (7,5/44)	38
14	Proteindisulfidisomerase	P07237	1,7	0,4	4,8/55 (4,8/57)	25
21	Aspartataminotransferase	P00507	7,4	6,8	10,2/36 (9,1/47)	53
27	α Aktin	Q61275	1,9	7,1	5,5/39 (5,8/39)	23

a) entsprechend SwissProt <http://www.expasy.org/>

Ergebnisse

Nach Reoxygenierung, bei der die Zellen nach 24 h Hypoxie weitere 24 h unter Normalbedingungen kultiviert werden, wurde für die Mehrzahl der Proteine ein im Vergleich zur Hypoxie verringertes, jedoch im Vergleich zur Kontrolle erhöhtes Expressionsniveau beobachtet. Auffällig war eine weitere Expressionserhöhung nach Reoxygenierung bei Phosphoglyceratkinase (5-fach nach Hypoxie und 13,8-fach nach Reoxygenierung) und α -Aktin (1,9-fach nach Hypoxie und 7,1-fach nach Reoxygenierung). Die vollständige Tabelle der differentiell exprimierten Proteine ist in Tab. 20 im Anhang dargestellt.

Diese Ergebnisse repräsentieren die Expressionsänderung insbesondere von löslichen Proteinen, die in hoher Menge in der Zelle vorliegen und daher auf einem zweidimensionalen Gel hinreichend gut detektierbar sind.

3.1.2 Untersuchungen zur differentiellen Proteinexpression von Gehirnkapillarendothelzellen nach 24h Hypoxie mit Fraktionierung durch RotoforTM

Die klassische zweidimensionale Auftrennung auf Gelen stellt den prominenten Teil der zellulären Proteine dar, während niedrig exprimierte Proteine auf dem Gel keine detektierbare Konzentration erreichen, die eine weitere Analyse, die Identifikation oder die Quantifikation nach sich ziehen könnte. Auch Proteine mit weniger ausgeprägt hydrophilen Eigenschaften (z.B. Membranproteine) werden selten detektiert, da die solubilisierenden Eigenschaften der nichtionischen Detergentien, die während der IEF zur Anwendung kommen, nicht ausreichen. Um die Anzahl der identifizier- und quantifizierbaren Proteine zu erhöhen, wurde die Versuchskonzeption hinsichtlich der Fraktionierungsmethode (trägerfreie isoelektrische Fokussierung, RotoforTM) geändert. Des Weiteren bietet sie verbesserte Möglichkeiten der Identifizierung und Quantifizierung in Kombination mit Tandemmassenspektrometrie und *selective isotopic labelling with aminoacids in cell culture* (SILAC).

Die Labeleffizienz der Proteine mit ¹³C₆ Arginin wurde in rBCEC4 Zellen unter Kontrollbedingungen in Gegenwart von ¹³C₆ Arginin nach Auftrennung auf einem eindimensionalen SDS-Gel mit nano-LC-MS bestimmt. Sie beträgt 89 % \pm 1 %.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die trägerfreie isoelektrische Fokussierung mehrmals mit einer Probe aus rBCEC4 Zellen durchgeführt und anschließend zum Vergleich des pH-Gradienten die pH-Werte der einzelnen Fraktionen mit einem pH-Meter

(Beckmann, München) vermessen. Exemplarisch sind in Abb. 17 pH-Werte einzelner Fraktionen aus zwei separaten Experimenten mit Rotofor™ dargestellt.

Wie in Abb. 17 veranschaulicht, können mittels Rotofor 20 Fraktionen steigender pH-Werte gewonnen werden. Die Vergleichbarkeit der Ausbildung des pH Gradienten zwischen mehreren Rotofor™ Fraktionierungen ist allerdings nicht gegeben. Werden die einzelnen Fraktionen mit einer SDS PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt, sind verschiedene Bandenmuster innerhalb der einzelnen Fraktionen zu erkennen (Daten nicht dargestellt), was auf eine Konzentrierung der Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt zurückzuführen ist. Eine quantitative Analyse der enthaltenen Proteine wird durch die nicht ausreichende Auflösung auf einem eindimensionalen Gel erschwert.

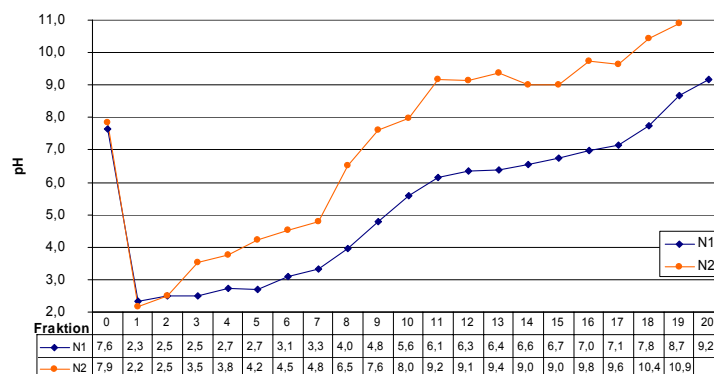


Abb. 17 Graphische Darstellung des pH-Wertes der Fraktionen nach Fraktionierung zweier Proben aus Kontrollzellen mit dem Rotofor™. Die pH-Werte der einzelnen Fraktionen nehmen von Fraktion 1 (nahe Kationenaustauschermembran) zu Fraktion 20 (nahe Anionenaustauschermembran) zu. Die Zunahme unterscheidet sich zwischen den separaten Läufen (N1 kontinuierlich, N2 diskontinuierlich), durchschnittlicher Zunahme (N1 – 0,45 pH Einheiten pro Fraktion; N2 – 0,35 pH Einheiten pro Fraktion).

Die Quantifizierung ist mit einer Methode möglich, bei der die zu vergleichenden Proben vor der Fraktionierung markiert vorliegen, gemischt und gemeinsam im Rotofor™ separiert werden. Als geeignete Methode wurde die Markierung mit einer isotopenmarkierten Aminosäure ($^{13}\text{C}_6$ Arginin), das *selective isotopic labelling with aminoacids in cell culture* (SILAC) gewählt. Die Bestimmung der relativen Proteinkonzentrationen aus Kontroll- und behandelter Gruppe konnte nach Fraktionierung und Identifizierung durch einen Vergleich der massenspektrometrischen Daten erfolgen

In den folgenden Experimenten wurde die SILAC Methode angewandt. Hierbei wurden rBCEC4 Zellen der Kontrollgruppe in Medium mit $^{13}\text{C}_6$ Arginin, und Zellen, die mit Hypoxie behandelt wurden, in Medium mit normalem Arginin kultiviert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde von jeder Probe die Proteinkonzentration bestimmt und beide Lysate im

Ergebnisse

Proteinkonzentrationsverhältnis 1:1 miteinander gemischt. Anschließend wurden sie im Rotofor™ fraktioniert und die einzelnen Proben nach dem Molekulargewicht mittels SDS PAGE aufgetrennt (siehe Abb. 18).

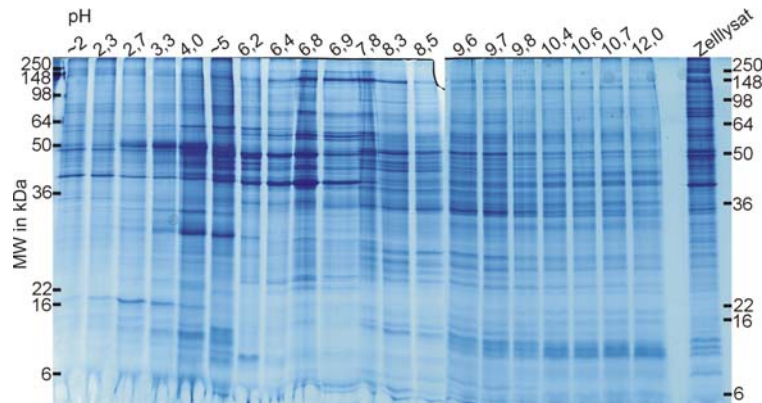


Abb. 18: Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese von 20 Fraktionen eines Rotofor™ - separierten Zelllysates aus rBCEC4 Zellen. Für die Fraktionierung mit dem Rotofor™ wurden je 100 mg Protein aus markierten Zellen der Kontrollgruppe und aus nicht markierten Zellen nach 24 h Hypoxie gemischt. Von jeder Rotofor™ Fraktion wurden 140 µg Protein auf ein SDS PAGE Gel (16 cm x 20 cm) aufgetragen. Die meisten Proteinbanden sind auf wenige Fraktionen konzentriert.

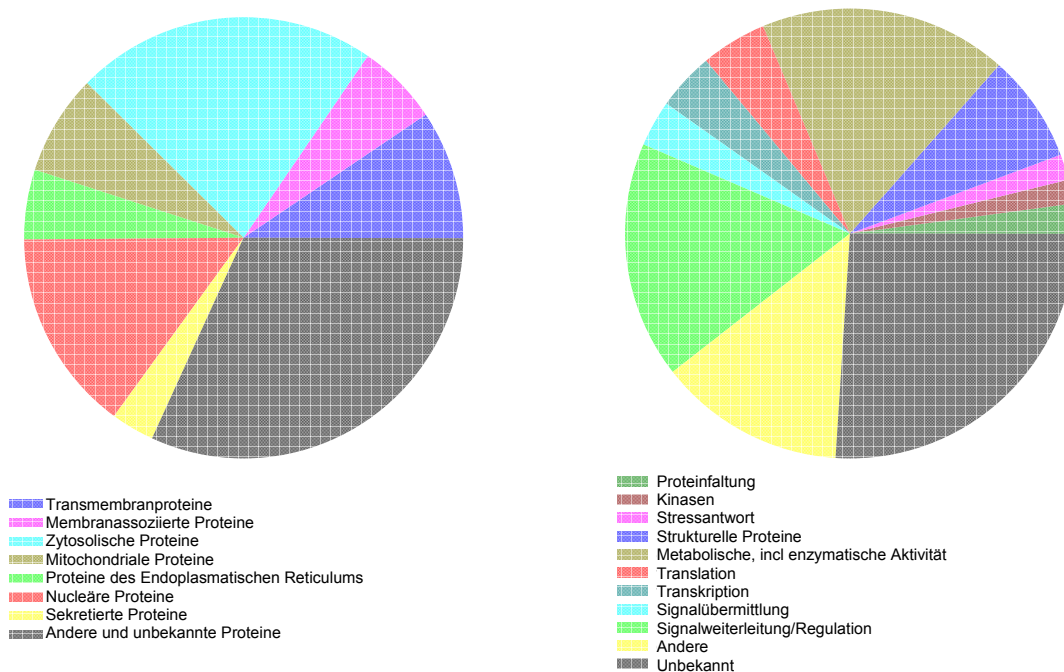


Abb. 19: Übersicht über A) Lokalisation und B) Funktion aller aus rBCEC4 identifizierten Proteine. Aus dem Gel in Abb. 18 wurden 125 Gelstücke (ca. 10 x 1,5 mm) ausgeschnitten in denen etwa 15-20 Proteine pro Gelstück identifiziert wurden. Abb. 19 gibt einen Überblick über die subzelluläre Lokalisation und Funktion der identifizierten Proteine.

Im Hinblick auf die Quantifizierung ist es erforderlich, systematische Fehler der praktischen Probenaufarbeitung aufzuspüren. Eine Fehlerquelle kann die ungenaue Proteinbestimmung mit anschließendem Vermischen der markierten Kontrollprobe und der behandelten Probe im vermeintlichen Proteinmengenverhältnis von 1:1 sein. In Abb. 20 sind einzelne Werte der Expressionsänderung (Verhältnis $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ Arginin) bestimmter Proteine aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Es ist keine einheitliche Tendenz in Richtung höherer oder niedrigerer Expressionsänderungen für Proteine aus einem Experiment zu erkennen.

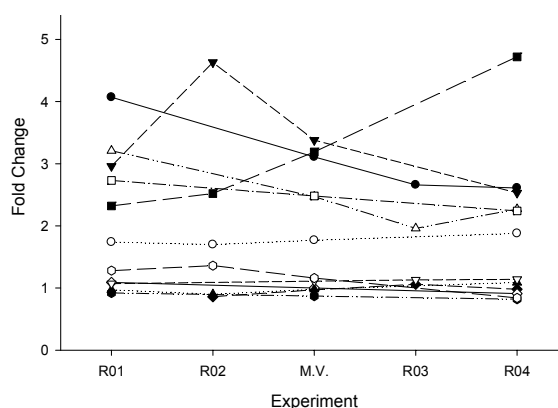


Abb. 20: Werte der Expressionsveränderung (Verhältnis $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ Arginin) einzelner Proteine aus vier Experimenten; M.V. Mittelwert

Der mittlere relative Fehler wurde mit 0.35 für Werte von $R \geq 5$, 0.30 für $5 < R \leq 2$, 0.18 für $2 < R \leq 1.35$, und 0.13 für $1.35 < R \leq 0.75$ berechnet.

Proteine, die in mindestens zwei Experimenten mit einer Expressionserhöhung von $\geq 100\%$ gefunden wurden, sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Erhöht exprimierte Proteine aus rBCEC4 Zellen, nach 24 h Hypoxie.

SwissProt Acc.-Nr.:	Protein	MW	R	SD	QEXP	QPEP	MS	IPEP
P05369	farnesyl pyrophosphate synthetase	40804	15.3	12.6	2	2	170	2
Q63716	peroxiredoxin-1	22095	7.3	5.2	2	12	332	7
Q07936	annexin A2	38523	7.1	2.7	3	10	301	5
Q8R4A1	ERO1-like protein $\alpha^{\#}$	53984	6.9	0.5	2	7	470	8
P09812	glycogen phosphorylase, muscle form	97081	6.7	1.6	2	4	130	3
P17702	60S ribosomal protein L28	15708	6.1	3.0	2	2	65	2
P11167	glucose transporter type 1	53927	5.8	0.3	2	7	128	2
P0C169	histone H2A type 1-C	13966	4.9	2.5	3	3	254	9
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain	36427	3.8	0.6	2	4	165	4
Q9XSJ7	collagen α 1(I) chain $\#$	138677	3.6	2.4	3	15	938	20
P16617	phosphoglycerate kinase 1	44395	3.6	0.9	2	19	302	5
Q9P2E9"	ribosome-binding protein 1	152381	3.5	0.3	2	11	1019	23
Q68FR6	elongation factor 1- γ	49898	3.5	1.4	2	5	365	9

Ergebnisse

SwissProt Acc.-Nr.:	Protein	MW	R	SD	QEXP	QPEP	MS	IPEP
P63018	heat shock cognate 71 kDa protein	70827	3.5	1.9	4	33	1893	53
P68370	tubulin α -1 chain	50104	3.3	1.0	2	6	413	9
P62804	histone H4	11229	3.2	0.8	3	10	339	6
P11980	pyruvate kinase muscle isozyme	57847	3.1	1.2	3	29	1562	35
P42166"	lamina-associated polypeptide 2 isoform α	75315	3.0	1.4	2	3	90	2
Q5E9F5"	transgelin-2	22281	2.9	1.2	2	11	534	13
P04764	α -enolase	46967	2.8	1.0	3	23	1219	26
P30904	macrophage migration inhibitory factor	12338	2.8	1.4	2	10	162	3
P50137	transketolase	67601	2.7	0.9	2	7	745	21
P05197	elongation factor 2	95092	2.6	1.0	3	18	653	17
P04797	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35682	2.6	0.4	3	15	315	7
P13084	nucleophosmin	32540	2.5	1.6	2	3	532	14
Q05052"	oligosaccharyl transferase	49603	2.5	0.7	3	10	296	6
Q99K41"	EMILIN-1 [#]	107518	2.4	0.4	3	13	595	15
Q9Y490"	talin-1	269599	2.4	1.2	2	6	852	15
Q62812	myosin-9	226066	2.4	0.9	2	8	671	17
Q61033"	lamina-associated polypeptide 2	75332	2.4	0.7	2	4	126	4
P05964	protein S100-A6	10028	2.3	0.9	2	6	141	3
P06761	78 kDa glucose-regulated protein [#]	72302	2.3	0.2	2	21	3034	84
P07150	annexin A1	38674	2.3	0.5	3	7	315	3
P04691	tubulin β chain	49931	2.3	0.7	3	15	719	15
P13596	neural cell adhesion molecule 1, 140 kDa isoform	94599	2.2	0.6	2	7	653	14
P10111	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	17732	2.2	0.4	2	7	548	16
Q63617	150 kDa oxygen-regulated protein [#]	111220	2.1	0.5	2	7	965	24
Q9CQN1"	heat shock protein 75 kDa, mitochondrial [#]	80159	2.0	0.7	2	9	505	12
P04961	proliferating cell nuclear antigen	28730	2.0	0.7	2	3	288	5
P09495	tropomyosin α - 4 chain	28361	2.0	0.5	2	9	746	14
Q63081	protein disulfide-isomerase A6 [#]	48143	2.0	0.6	4	15	1340	27
P69897	tubulin β -5 chain	49639	2.0	0.9	3	25	954	17
P26452	40S ribosomal protein SA	32745	2.0	0.4	2	6	285	4
P04937	fibronectin [#]	272341	2.0	0.7	3	23	1012	23
P46413	glutathione synthetase	52312	2.0	0.3	2	2	93	2
P60711	actin, cytoplasmic 1	41710	2.0	0.7	4	18	504	10
P41148"	endoplasmic [#]	92456	2.0	0.5	4	33	1183	31
P04906	glutathione S-transferase P	23492	2.0	0.3	2	3	210	3
Q9R063	peroxiredoxin-5, mitochondrial [#]	22165	2.0	0.2	2	2	538	9
P18418	calreticulin [#]	47966	2.0	0.7	2	20	675	17

[#], Vorläuferprotein,

" Proteinsequenz der Ratte nicht in der Datenbank vorhanden, Proteinsequenz einer anderen Säugetierart identifiziert,

MW – Molekulargewicht entsprechend <http://www.expasy.org/>;

R - Expressionsänderung, Verhältnis C12/C13 Arginin (korrigiert durch Labeleffizienz);

SD - Standardabweichung; QEXP - Anzahl der Experimente, aus denen das Protein quantifiziert wurde;

QPEP - Anzahl der quantifizierten Peptide (incl. Peptide, die mehrmals aus unterschiedlichen Proben eines Experimentes quantifiziert wurden);

MS - Protein Mowse Score (höchster Score aller Experimente);

IPEP - Anzahl der identifizierten Peptide,;

Swissprot Version: 252506

Diese Daten spiegeln eine Erhöhung der Glucoseausnutzung durch rBCEC4 Zellen wider (α -Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase,

Phosphoglyceratkinase, Pyruvatkinase), von Redoxaktivitäten (Glutathionsynthetase, Transketolase, Peroxiredoxin-isoform, *ERO-like 1 α*) als auch von Proteinbiosynthese und -faltung (Elongationsfaktoren, ribosomale Proteine, Proteindisulfidisomerasen, Calreticulin, Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase A). Eine erhöhte Expression wurde des Weiteren für Hitzeschockproteine (HSP's, Endoplasmin) und Strukturproteine (z.B. Aktin, Tubulin, Myosin, Talin, Tropomyosin) gefunden.

Die Daten aus Tab. 6 beziehen sich auf die relativen Proteinmengen der identifizierten Proteine.

Der Glucosetransporter Typ 1 (GLUT1) wurde für Immunfluoreszenzuntersuchungen (Abb. 21) ausgewählt, in denen überprüft werden sollte, ob die erhöhte Expression auch auf funktionaler Ebene wiedergespiegelt wird.

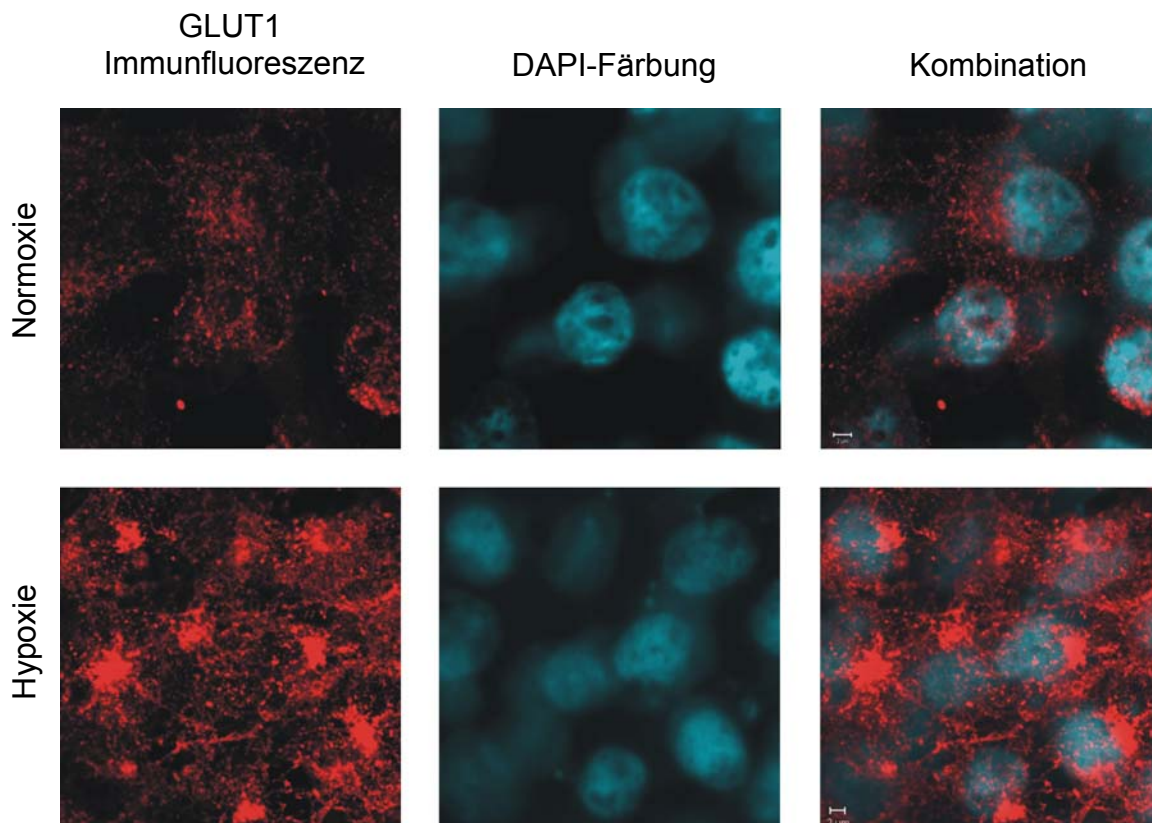


Abb. 21: Immunfluoreszenz zur zellulären Expression und Lokalisation von GLUT1 in rBCEC4.

Die Expressionserhöhung von GLUT1 nach Hypoxie kann mit Immunfluoreszenz bestätigt werden. Eine Lokalisation im Bereich der Plasmamembran wurde jedoch weder unter Kontroll- noch unter Schädigungsbedingungen beobachtet.

3.2 Einfluss von Cholesterolentzug auf *tight junction* Proteine

Die folgenden Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Diskussion um die Lokalisation von *tight junction* Proteinen in *lipid raft* leisten. Hierfür wurde ein Ansatz gewählt, bei dem durch Cholesterolentzug mit Hilfe der Substanz Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) *lipid raft* Strukturen zerstört werden (Foster 2003). Eine mögliche Veränderung der Lokalisation von *tight junction* Proteinen sollte mit unterschiedlichen biochemischen Methoden und der SILAC-Methode aus dem Bereich der Proteomanalyse untersucht werden. Es wurde eine Epithelzelllinie der Gallengänge der Leber (Normale Ratten Cholangiocyten - NRC) als Untersuchungsmaterial gewählt, da in diesen Zellen die Expression von *tight junction* Proteinen Occludin und ZO-1 nachgewiesen ist (Bode 2002).

3.2.1 Vorbereitende Untersuchungen

Die Expression von *tight junction* und weiteren Proteinen des Zell-Zell-Kontaktes wurde in NRC durch Antikörper auf einer Immunoblotmembran eingehend untersucht (Abb. 22).

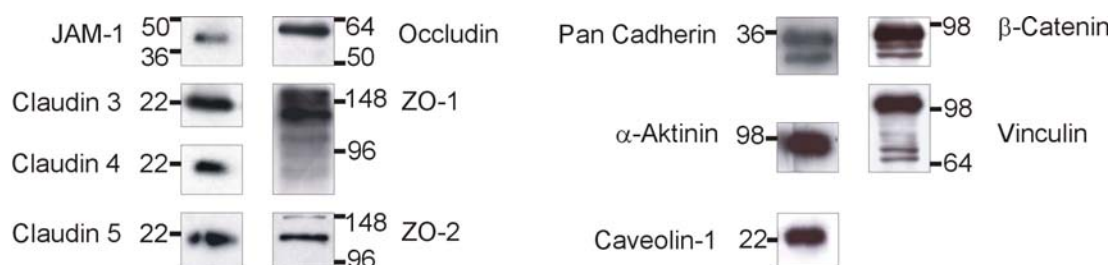


Abb. 22: Ausschnitte aus Immunoblotmembranen zum spezifischen Nachweis der Expression von *tight junction* Proteinen und Proteinen der Adhäsionskontakte sowie dem *raft* assoziierten Protein Caveolin-1 in NRC. Es wurden jeweils 40 μ g NRC-Lysat aufgetragen. Neben den Signalen ist die Position von Molekulargewichtsstandard in kDa gekennzeichnet.

Es konnten die *tight junction* Proteine JAM-1 (32 kDa), Claudin-3 (23 kDa), Claudin-4 (22k Da), Claudin-5 (23k Da), Occludin (59k Da), ZO-1 (195 kDa) und ZO-2 (131 kDa) detektiert werden. Die Expression von Adhäsionskontaktproteinen wie Cadherinen (z.B. Cadherin-4, 32 kDa; Cadherin-23, 36 kDa) mit einem Pan-Cadherin Antikörper, β -Catenin (85 kDa) und den damit interagierenden Proteinen Vinculin (116 kDa) und α -Aktinin (103 kDa) sowie des *raft* assoziierten Proteines Caveolin-1 (20 kDa) wurde nachgewiesen. Dies bestätigte die Eignung der Zelllinie als Untersuchungsmaterial.

3.2.2 Einfluss von Cholesterolentzug mit M β CD auf NRC Zellen

Auf einen zytotoxischen Effekt des Cholesterolentzugs mit 20 mM M β CD auf NRC gab es nach einem Vitalitätstest mit Trypanblau keinen Hinweis. Nach 60 bzw. 150 Minuten Inkubation mit 20 mM M β CD war keine Schädigung der Zellvitalität erkennbar, während nach 270 Minuten rund 1 % zerstörte Zellen mit Trypanblau angefärbt wurden (Bilder nicht dargestellt).

Der transepitheliale Elektrische Widerstand (TEER) ist ein Maß für die Integrität einer konfluenten Zellschicht. Dieser wurde zu Beginn der Inkubation mit 20 mM M β CD, nach 60 und nach 150 Minuten gemessen (siehe Abb. 23).

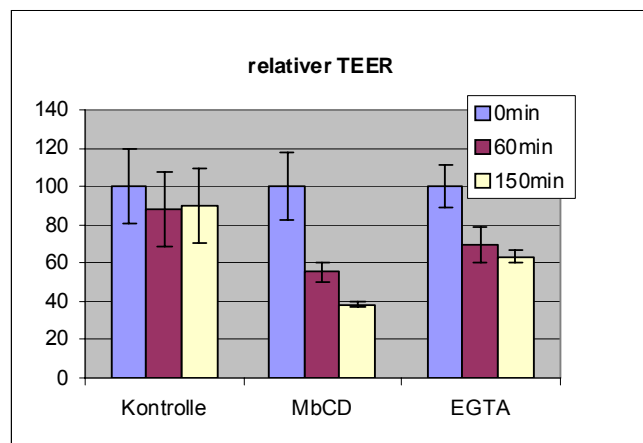


Abb. 23: Diagramm des relativen transepithelialen elektrischen Widerstandes (relativer TEER) von NRC nach Inkubation mit 20 mM M β CD bzw. 2,5 mM EGTA (Positivkontrolle) zu Beginn der Inkubation, sowie nach 60 und 150 Minuten. Kontrolle n=9; M β CD n=11; EGTA n=4 aus zwei unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren wurde diese Größe nach Inkubation mit 2,5 mM EGTA als Positivkontrolle bestimmt. EGTA agiert als Komplexbildner für zweiwertige Kationen. Insbesondere der hierdurch herbeigeführte Ca²⁺ Entzug bewirkt eine Zerstörung der Ca²⁺-abhängigen interzellulären Bindung der Cadherine in Adhäsionskontakten.

Es konnte deutlich eine zeitabhängige Abnahme des TEER, und somit ein Einfluss auf die Integrität der Zell-Zell-Kontakte nach Inkubation mit 20 mM M β CD nachgewiesen werden. Nach 60 Minuten war der Widerstand um 45 %, und nach 150 Minuten um 62 % gesunken. Dies sind größere Veränderungen, als sie nach Ca²⁺ -Entzug durch 2,5 mM EGTA (30 % nach 60 Minuten und 37 % nach 150 Minuten) beobachtet wurden.

3.2.3 Einfluss von Cholesterolentzug mit M β CD auf ausgewählte Proteine

Die Cholesterol komplexierenden Eigenschaften von M β CD ermöglichen die Analyse von Proteinen, die an *lipid raft* Strukturen lokalisiert sind. Wird eine Zellpopulation mit M β CD inkubiert, werden dadurch *lipid raft* zerstört und die darin enthaltenen Proteine orientieren sich neu. Im Anschluss daran können, nach Isolation von *lipid raft* Strukturen (z.B. Präparation von DRM), im Vergleich zur Kontrolle weniger der in *raft* lokalisierten Proteine nachgewiesen werden. Die Kombination mit SILAC erlaubt den quantitativen Vergleich einzelner Proteine von Kontroll- und mit M β CD behandelten Zellen (Foster 2003).

Um die Eignung des bei Foster (Foster 2003) publizierten Versuchsansatzes für NRC Zellen zu testen, wurde die Präparation mit einer mit M β CD behandelten Zellpopulation und einer unbehandelten Kontrollgruppe durchgeführt. Die Produkte wurden mittels Immunoblot gegen das *raft* assoziierte Protein Caveolin-1, des *raft* Protein Flotillin-1 und die *tight junction* Proteine Claudin-3 und Occludin angefärbt (Abb. 24).

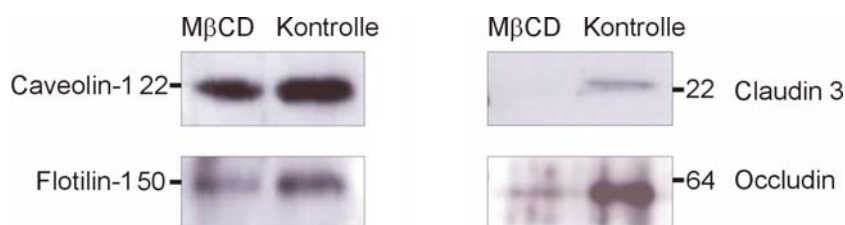


Abb. 24: Immunoblot zum relativen Vergleich des Immunoblotsignals des *raft* assoziierten Proteins Caveolin-1 (20k Da), des *raft* Proteins Flotillin-1 (47 kDa) und der *tight junction* Proteine Claudin-3 (23k Da) und Occludin (59 kDa) nach Behandlung von NRC mit 20 mM M β CD bzw. ohne Behandlung (Kontrolle) und anschließender Präparation der *detergent resistant membrane fractions*. Es wurde je Probe 15 μ g Protein aufgetragen.

Das Immunoblotsignal aller detektierten Proteine ist nach Cholesterolentzug mit M β CD weniger intensiv als das Signal innerhalb der Kontrollgruppe. Dies deutet auf eine Umverteilung der Proteine Caveolin-1, Flotillin-1, Occludin und Claudin-3 nach Cholesterolentzug mit M β CD innerhalb der Zelle hin.

Exaktere Ergebnisse wurden für einige Proteine durch Quantifizierung nach massenspektrometrischer Analyse erhalten. Hierfür wurde die Kontrollgruppe der NRC in Gegenwart von $^{13}\text{C}_6$ -Arginin kultiviert (SILAC) und mit der gleichen Proteinmenge der mit M β CD

behandelten Zellpopulation vermischt. Anschließend wurden *lipid raft* Strukturen durch Präparation der DRM angereichert, die erhaltene Probe auf einem SDS-Gel aufgetrennt und Teile dieses Gels, in denen transmembranale *tight junction* Proteine vermutet werden, massenspektrometrisch vermessen (siehe Abb. 25).

Die Anwesenheit der im Immunoblot untersuchten Proteine konnte mit der massenspektrometrischen Analyse bestätigt werden. Es konnten Flotillin-1, Caveolin-1, Claudin-3; -4; -7 identifiziert werden (siehe Tab. 7).

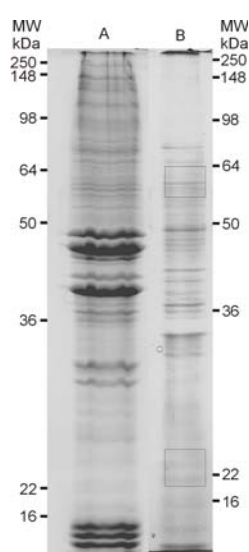


Abb. 25: Eindimensionale Auftrennung (SDS Gel) von 50 µg Gesamtprotein einer im gleichen Proteinmengenverhältnis gemischten Probe aus unbehandelten, in Gegenwart von $^{13}\text{C}_6$ Arginin kultivierten Zellen und mit 20 mM M β CD 1h behandelten Zellen A) vor der DRM Präparation; B) nach der DRM Präparation; Die markierten Bereiche des Gels wurden massenspektrometrisch analysiert.

Tab. 7: Ausgewählte, identifizierte Proteine aus DRM Präparationen. Die Proteine sind in *tight junction* oder in *lipid raft* lokalisiert bzw. diese Lokalisation wird aufgrund eines GPI-Ankers vermutet.

Swissprot Acc-nr.	Proteinname Swissprot	Score	Peptide ges./ident.	Lokalisation
Q63400	claudin-3	198	4/3	<i>tight junction</i>
O35054	claudin-4	63	1/1	<i>tight junction</i>
Q9Z1L1	claudin-7	76	2/1	<i>tight junction</i>
P41350	caveolin-1	467	11/6	<i>raft</i> assoziiert
O08917	flotillin-1	691	11/8	<i>raft</i>
Q63691	monocyte differentiation antigen CD14 [precursor]	674	14/8	GPI-Anker
P27274	membrane attack complex inhibition factor	177	3/2	GPI-Anker

Score : Mascot Proteinscore ; Peptide ges: Anzahl der Identifizierten Peptide ; Peptide ident. – Anzahl der Peptide mit dem Peptidscore >identity.

Ergebnisse

Quantitative Daten konnten von Claudin-4 aus drei Proben und von Claudin-7 aus fünf Proben von jeweils einem Peptid gewonnen werden (siehe Tab. 8). Claudin-4 wurde im Verhältnis zur behandelten Gruppe $3,0 \pm 0,45$ -fach höher detektiert, Claudin-7 $3,5 \pm 0,59$ fach höher. Beide Proteine sind somit von einer Proteinumverteilung innerhalb der Zelle nach Cholesterolentzug betroffen.

Tab. 8: Quantifizierte Peptide von Claudin-4 und Claudin-7 aus mehreren DRM Präparationen mit M β CD-Behandlung in Kombination mit SILAC. Es sind deren spezifische Daten inklusive resultierendem Konzentrationsverhältnis von Kontrolle zu behandelter Gruppe ($XIC(^{13}C_6) / XIC(^{12}C_6)$) dargestellt.

Protein	Protein-score	Sequenz des quantifizierten Peptids	M _{gemessen}	M _{berechnet}	Peptid-score	XIC ¹³ C ₆ K	XIC ¹² C ₆ beh.	XIC ¹³ C ₆ / ¹² C ₆
claudin-4	55	MYDSMLALPQDLQAAR + Arg ¹³ C ₆ (R); 2 Oxidation (M)	930.94	1859.87	55	137	38	3,6
claudin-4	63	MYDSMLALPQDLQAAR + Arg ¹³ C ₆ (R); 2 Oxidation (M)	930.93	1859.85	63	522	207	2,5
claudin-4	49	MYDSMLALPQDLQAAR + Arg ¹³ C ₆ (R); 2 Oxidation (M)	621.03	1860.06	49	1004	337	3,0
claudin-7	49	MYDSVLALPAATQATR + Arg ¹³ C ₆ (R); Oxidation (M)	865.53	1729.05	30	1031	259	4,0
claudin-7	72	MYDSVLALPAATQATR + Arg ¹³ C ₆ (R); Oxidation (M)	865.44	1728.87	72	456	106	4,3
claudin-7	76	MYDSVLALPAATQATR + Arg ¹³ C ₆ (R); Oxidation (M)	865.43	1728.85	74	1614	534	3,0
claudin-7	70	MYDSVLALPAATQATR + Arg ¹³ C ₆ (R); Oxidation (M)	577.35	1729.04	70	304	99	3,1
claudin-7	80	MYDSVLALPAATQATR + Arg ¹³ C ₆ (R); Oxidation (M)	865.45	1728.88	75	685	217	3,2

Legende: Proteinscore = Mascot-Proteinscore: Wert der verwendeten Datenbank Mascot für die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Zuordnung der experimentellen Daten zu der Datenbanksequenz (signifikant ab >43); ; M_{gemessen}: gemessenes Masse/Ladungsverhältnis; M_{berechnet}: theoretisches Molekulargewicht; Mascot-Peptidscore: Wert der verwendeten Datenbank Mascot für die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Zuordnung der experimentellen Daten zu der Datenbanksequenz (signifikant ≥ 43); XIC (13C6) bzw. XIC (12C6): extracted ion current der markierten bzw. unmarkierten Probe (Signalintensität im MS Spektrum); K: Kontrolle, beh: behandelte Zellen

3.2.4 Einfluss von Cholesterolentzug mit M β CD auf die Lokalisation ausgewählter Proteine

Um die Veränderungen von *tight junction* Proteinen innerhalb der Zelle nach Cholesterol- bzw. Calciumentzug beurteilen zu können, wurden mit 20 mM M β CD bzw. 2,5 mM EGTA behandelte Zellen nach 60, 150 und 270 Minuten Inkubation auf einem Deckgläschen fixiert, mit entsprechenden Antikörpern inkubiert und unter einem Konfokalmikroskop ausgewertet.

Die unbehandelte Kontrolle, bei der Claudin-1 angefärbt wurde (Abb. 26), zeigt in der Aufsicht ein deutliches Signal in der Nähe der Plasmamembran. Im Querschnitt konnte es der apikalen Spitze der lateralen Membran zugeordnet werden. Des Weiteren wurden vesikelartige Strukturen innerhalb des Zytoplasms detektiert.

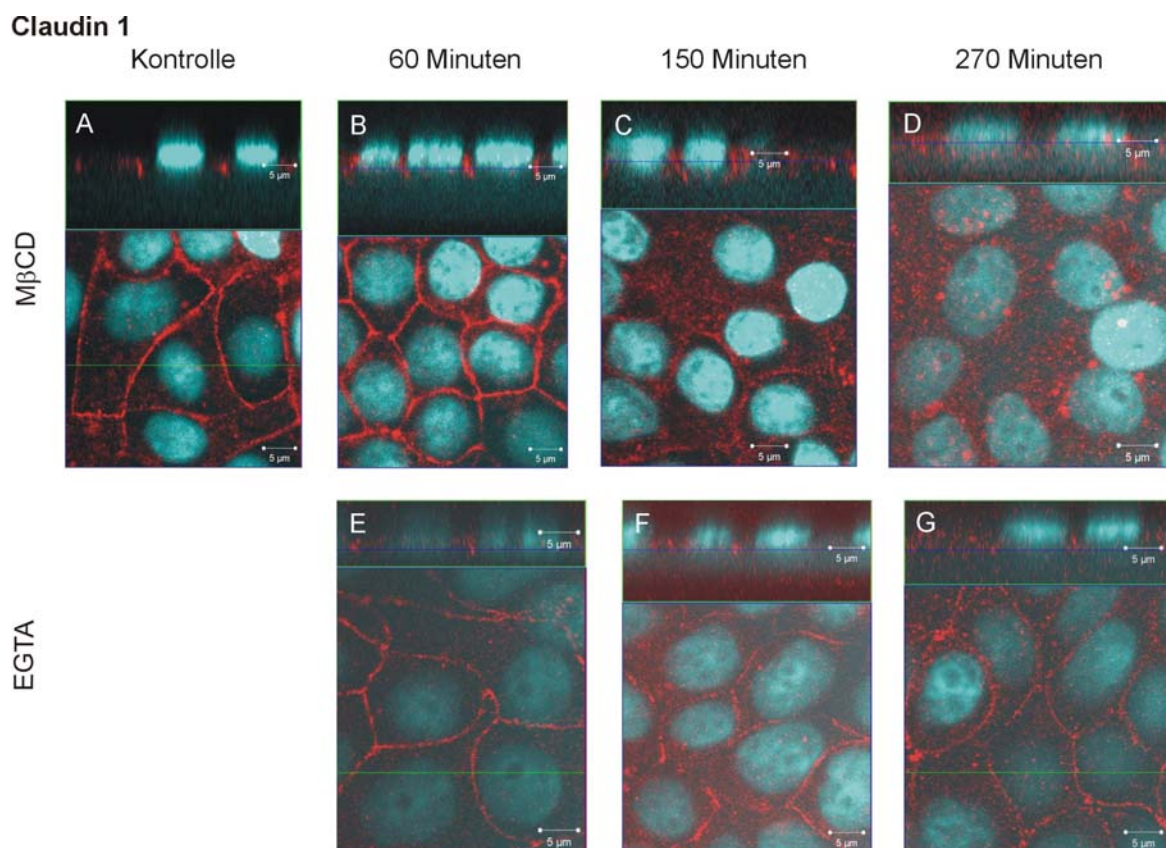


Abb. 26: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder von NRC Zellen gegen das transmembranale *tight junction* Protein Claudin-1 (rotes Signal). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaues Signal). Die Bilder zeigen im oberen Teil einen vertikalen Schnitt durch die Zellschicht, während im unteren Teil die Aufsicht auf die horizontale Ebene dargestellt ist.

A) Kontrolle bzw. mit 20 mM M β CD behandelte Zellen nach B) 60 Minuten; C) 150 Minuten; D) 270 Minuten. Außerdem mit 2,5 mM EGTA behandelte Zellen nach E) 60 Minuten; F) 150 Minuten; G) 270 Minuten.

Ergebnisse

Nach 60 Minuten Inkubation mit M β CD war das Signal in der lateralen Plasmamembran verbreitert. Eine deutliche Abschwächung des Signals in der Plasmamembran war nach 150 Minuten Inkubation mit M β CD zu beobachten. Diese Abschwächung ging mit einer deutlich größeren Anzahl an intrazellulären Vesikeln einher. Dieser Effekt wurde nach 270 Minuten Inkubation mit M β CD verstärkt. In der Plasmamembran werden unter diesen Bedingungen keine Claudin-1 Signale detektiert, während im gesamten intrazellulären Bereich die Anzahl der Vesikel zunimmt. Nach 60 Minuten Inkubation mit EGTA ist ein abgeschwächtes Claudin-1 Signal innerhalb der Plasmamembran zu beobachten. Dieses Signal verringert sich nach weiterer Inkubation (150 Minuten). Intrazellulär treten vermehrt Vesikel auf. Nach 270 Minuten wird im Gegensatz zu den Beobachtungen nach Inkubation mit M β CD Claudin-1 noch an der Plasmamembran detektiert.

Claudin-3 wird in unbehandelten Zellen nahe der Plasmamembran detektiert (Abb. 27). Im Querschnitt kann dieser Bereich auf ca. 2 μm an der apikalen Spitze der lateralen Plasmamembran eingegrenzt werden.

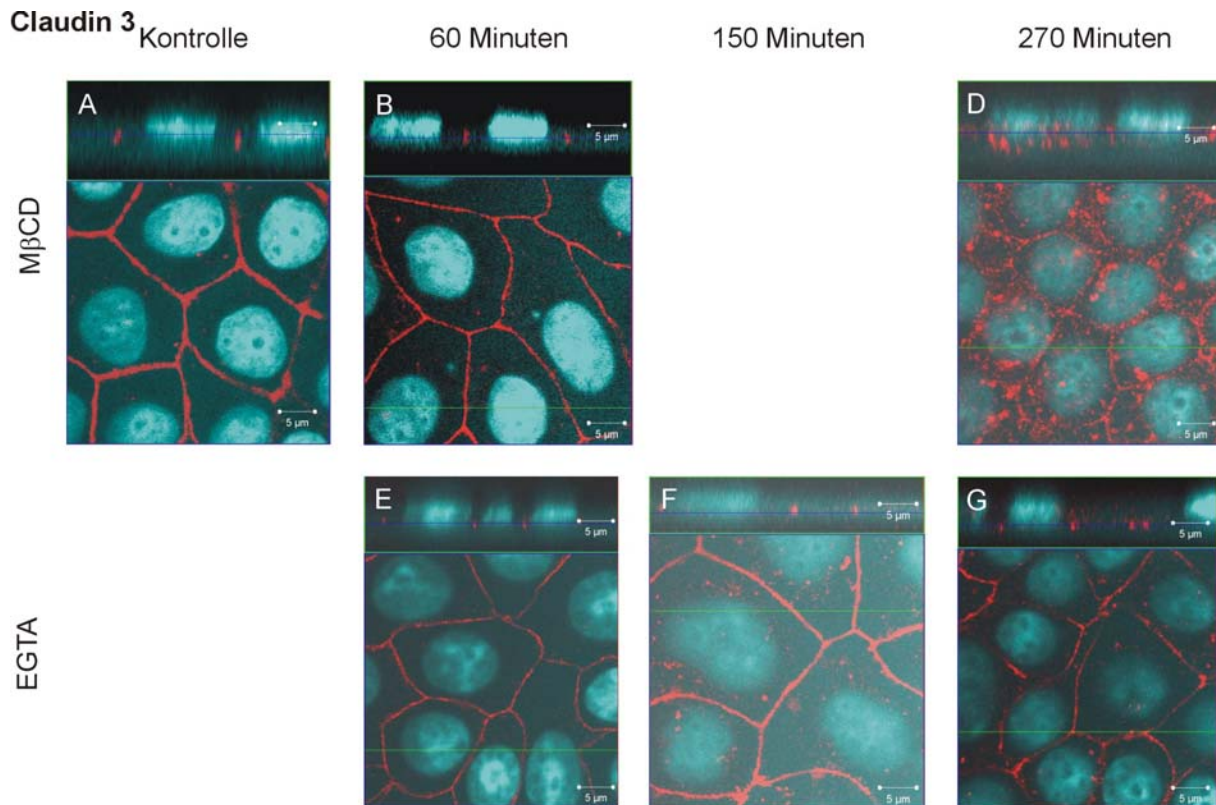


Abb. 27: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder von NRC Zellen gegen das transmembranale *tight junction* Protein Claudin-3 (rotes Signal). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaues Signal). Die Bilder zeigen im oberen Teil einen vertikalen Schnitt durch die Zellschicht, während im unteren Teil die Aufsicht auf die horizontale Ebene dargestellt ist.

A) Kontrolle bzw. mit 20 mM M β CD behandelte Zellen nach B) 60 Minuten; C) 150 Minuten; D) 270 Minuten. Außerdem mit 2,5 mM EGTA behandelte Zellen nach E) 60 Minuten; F) 150 Minuten; G) 270 Minuten.

Nach 60 Minuten Inkubation mit M β CD ist ein schwaches intrazelluläres Signal zu erkennen. Eine Inkubation mit M β CD führt nach 270 Minuten zu einem abgeschwächten, unterbrochenen Signal an der Plasmamembran und einer vermehrten Anzahl von intrazellulären Vesikeln. Nach 270 Minuten Inkubation mit 2,5 mM EGTA ist keine deutliche Veränderung des Signals von Claudin-3 zu beobachten.

Ergebnisse

In unbehandelten NRC Zellen ist Claudin-4 in einem gut abgegrenzten Bereich der lateralen Plasmamembran an der apikalen Seite der Zelle zu detektieren (Abb. 28). Es sind wenige vesikelartige Strukturen angefärbt. Nach 60 Minuten Inkubation mit 20 mM M β CD hat sich das Signal an der Plasmamembran deutlich verbreitert. Dieser Effekt verstärkt sich nach weiteren 90 Minuten Inkubation (150 Minuten) mit M β CD zu einem Signal über die gesamte laterale Membran. Nach 270 Minuten ist in der Aufsicht noch ein Signal an der Plasmamembran zu erkennen. Im intrazellulären Bereich treten vermehrt vesikelartige Strukturen auf.

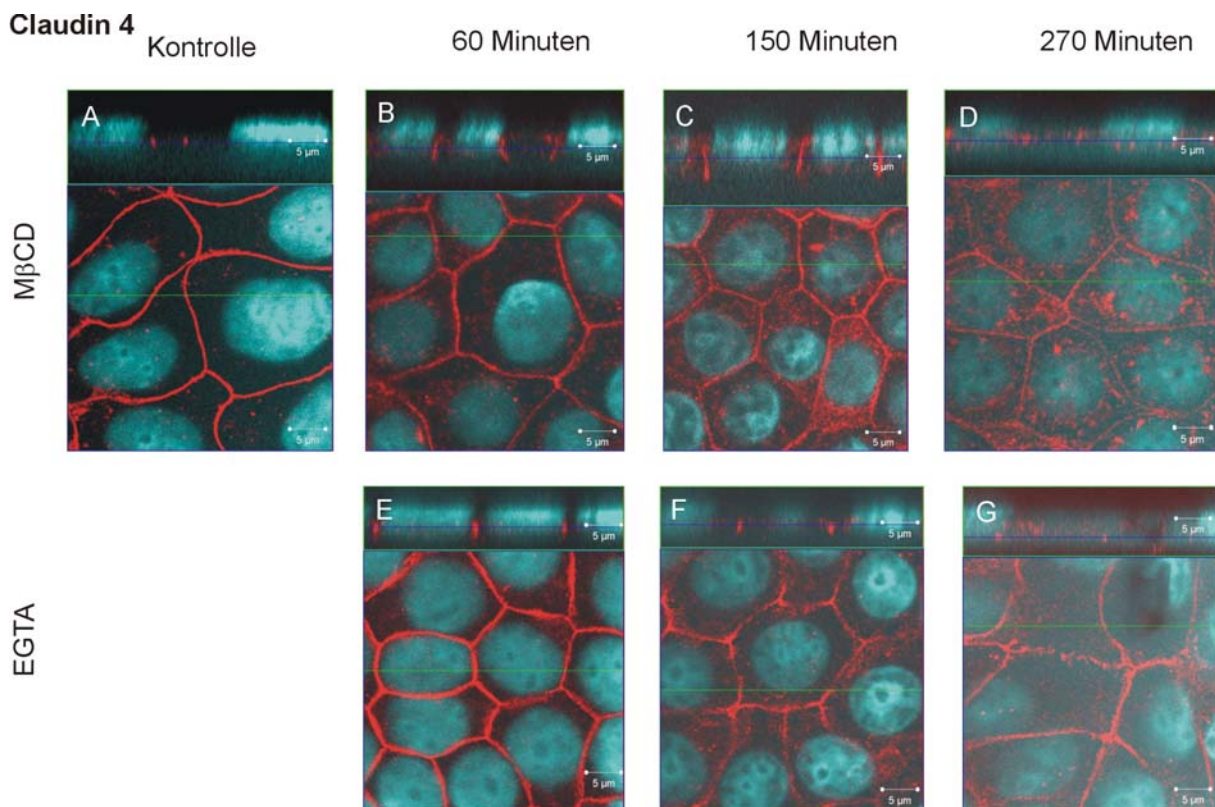


Abb. 28: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder von NRC Zellen gegen das transmembranale *tight junction* Protein Claudin-4 (rotes Signal). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaues Signal). Die Bilder zeigen im oberen Teil einen vertikalen Schnitt durch die Zellschicht, während im unteren Teil die Aufsicht auf die horizontale Ebene dargestellt ist.

A) Kontrolle bzw. mit 20 mM M β CD behandelte Zellen nach B) 60 Minuten; C) 150 Minuten; D) 270 Minuten. Außerdem mit 2,5 mM EGTA behandelte Zellen nach E) 60 Minuten; F) 150 Minuten; G) 270 Minuten.

Nach 60 Minuten Inkubation mit EGTA kann ein breiteres Signal an der lateralen Seite der Zelle beobachtet werden als unter Kontrollbedingungen. Weitere 90 Minuten Inkubation (150 Minuten) führen zu einer Auflösung des klaren Signals an der Plasmamembran. In vielen kleinen Punkten scheint sich das Signal von der Plasmamembran in die Zelle zu verteilen. Dieser Effekt ist nach 270 Minuten Inkubation mit EGTA am stärksten.

Verglichen mit der Inkubation mit M β CD fällt auf, dass keine großen vesikelartigen Strukturen im intrazellulären Raum zu beobachten sind.

In mit M β CD behandelten und unbehandelten Zellen konnte ein definiertes Signal für ZO1 an der apikalen Spitze der lateralen Membran detektiert werden (Abb. 29).

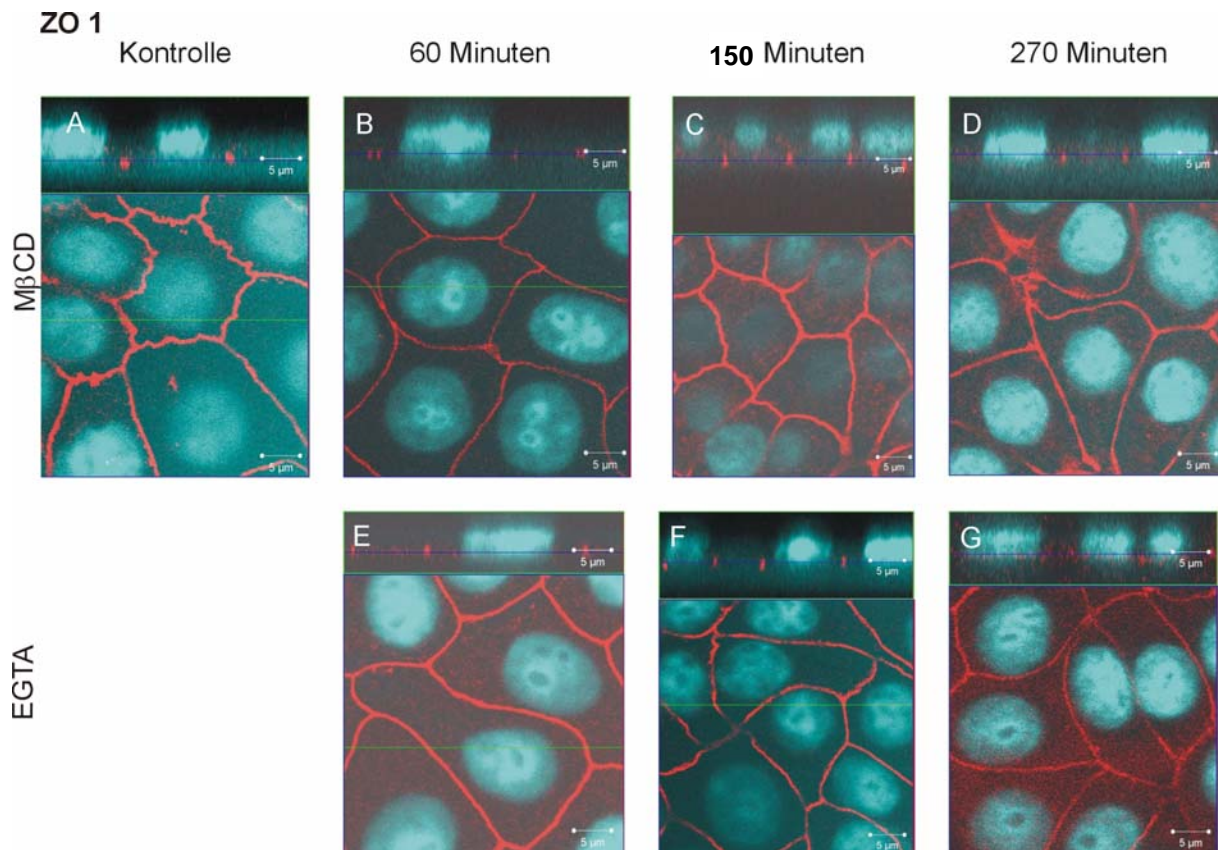


Abb. 29: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder von NRC Zellen gegen das *tight junction* assoziierte Protein ZO 1 (rotes Signal). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaues Signal). Die Bilder zeigen im oberen Teil einen vertikalen Schnitt durch die Zellschicht, während im unteren Teil die Aufsicht auf die horizontale Ebene dargestellt ist.

A) Kontrolle bzw. mit 20 mM M β CD behandelte Zellen nach B) 60 Minuten; C) 150 Minuten; D) 270 Minuten. Außerdem mit 2,5 mM EGTA behandelte Zellen nach E) 60 Minuten; F) 150 Minuten; G) 270 Minuten.

Nach 150 bzw. 270 Minuten Inkubation mit M β CD treten vereinzelt intrazelluläre Signale auf. Nach 150 Minuten Inkubation mit EGTA ist keine Veränderung der Lokalisation von ZO1 erkennbar. Erst nach 270 Minuten Inkubation scheint sich das Signal, ähnlich dem des Claudin-4, punktuell von der Plasmamembran zu entfernen. Es treten auch hier keine vesikelartigen Strukturen auf.

3.3 Ergebnisse zur Identifizierung von Zell-Kontakt-Proteinen aus detergens-unlöslichen Membranfraktionen aus Rattenleber

Zwischen benachbarten Zellen übernehmen verschiedene Zell-Kontakt-Komplexe spezifische Aufgaben. Die parazelluläre Barriere wird von *tight junction* gebildet, die je nach Gewebetyp unterschiedlich dicht ausgebildet wird. Es sind mind. 35 *tight junction* Proteine (Occludin, Claudine, JAM-, ZO-, MAGI- MUPP- Proteine) bekannt, deren Regulationsmechanismen, z.B. bei der Öffnung der BHS unter pathologischen Bedingungen. Ziel der im Folgenden vorgestellten Untersuchungen war es, Proteine zu identifizieren, die möglicherweise eine Rolle im *tight junction* Komplex spielen.

Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Präparationen zur Anreicherung von *tight junction* Proteinen durchgeführt und alle enthaltenen Proteine massenspektrometrisch bestimmt. Es wurde erwartet, neben bekannten *tight junction* Proteinen auch solche zu identifizieren, die einen bisher unbekanntem Beitrag zu Struktur und / oder Funktion von Zellkontakten leisten.

3.3.1 Präparation von detergens-unlöslichen Fraktionen und Nachweis der Anreicherung von *tight junction* Proteinen

In der Literatur wurden mehrere Präparationen beschrieben, die *tight junction* Proteine anreichern. Sie beruhen alle auf der Anreicherung von Gallenkanalikuli aus der Leber von Ratte oder Maus und der anschließenden Extraktion einer detergens-unlöslichen Membranfraktion (*detergent resisistant membrane fraction* - DRM). In der von Tsukita beschriebenen Präparation der „*junctional fraction*“ wird Nonidet P-40 (NP40) verwendet (Tsukita 1989), während Hertzberg mit Natrium Desoxycholat (DOC) extrahiert (Hertzberg 1990). Im von Gebreselassie (Gebreselassie 2004) beschriebenen Protokoll zur Präparation von sogenannten *raft* Microdomänen (Gebreselassie 2004), in denen nach (Nusrat 2000) *tight junction* lokalisiert sind, wird Triton X 100 (TX100) genutzt. Im Folgenden wird vereinfachend die Bezeichnung NP40 DRM, DOC DRM, und TX100 DRM verwendet.

Die Ausbeute an DOC DRM war mit 100 mg Probenmaterial bei 60-70 g frischer Rattenleber als Ausgangsmaterial sehr gering. Bei Extraktion mit NP40 bzw. mit TX100 wurden höhere Erträge mit etwa 400 mg erzielt.

Um die erfolgreiche Anreicherung von *tight junction* Proteinen in den einzelnen Präparationen sicherzustellen, wurden relevante Proteine mittels Immunoblot in Zwischenprodukten und den Endprodukten der Präparationen detektiert (siehe Abb. 30).

Die dargestellten Ausschnitte der Immunoblots zeigen bei gleicher aufgetragener Proteinmenge eine deutliche Zunahme der Signale innerhalb der einzelnen Präparationschritte jeder Präparation gegen die transmembranalen *tight junction* Proteine Claudin-3, Occludin und JAM-1 sowie des *raft* Proteins Flotillin und des *raft* assoziierten Proteins Caveolin 1. Somit konnte gezeigt werden, dass die Präparation der detergens-unlöslichen Membranfraktionen mit DOC, TX100, bzw. NP40 in einer Anreicherung von *tight junction* Proteinen resultieren. Für die Präparation der DOC DRM bzw. der NP40 DRM konnte erwartungsgemäß ein abnehmendes Signal für das zytosolische Enzym Phosphoglyceratkinase detektiert werden.

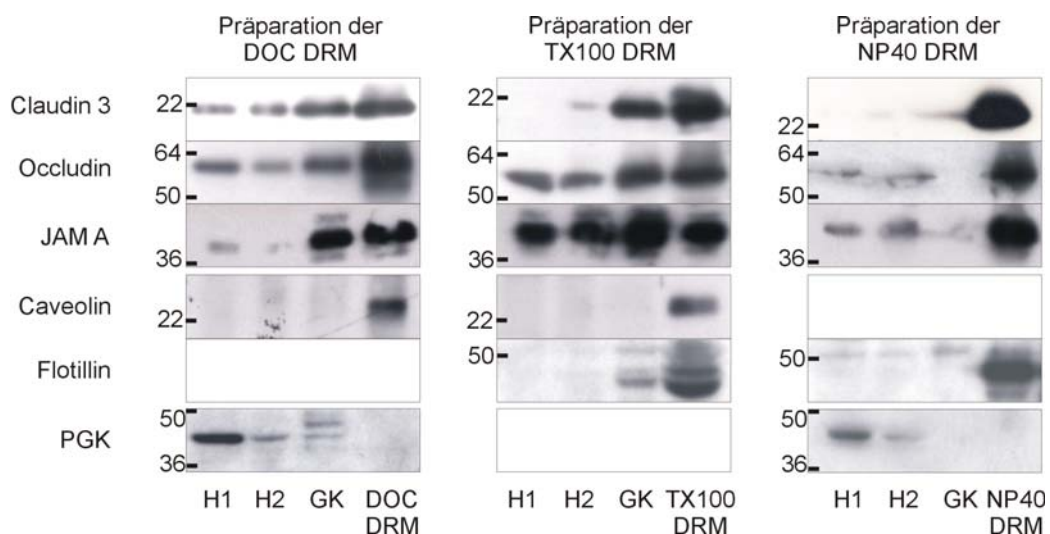


Abb. 30: Immunoblot von Fraktionen aus Präparationen von detergens-unlöslichen Membranfraktionen (DRM)

Es wurden jeweils 30 µg der Fraktionen von Leberhomogenat 1 (LH1); Leberhomogenat 2 (LH2); Gallenkanalikuli (GK) und des erhaltenen Endproduktes (DRM) auf einem SDS-Gel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Membran wurden mit Antikörpern transmembranale *tight junction* Proteine (Claudin-3, MW = 22 kDa; Occludin, MW = 59 kDa; JAM-1, MW = 32 kDa); das *raft* assoziierte Protein Caveolin-1 (MW = 22 kDa), das *raft* Protein Flotillin (MW = 48 kDa) und das zytosolische Protein Phosphoglyceratkinase (PGK, MW = 44 kDa) detektiert.

3.3.2 Identifizierung ausgewählter Proteine aus detergens-unlöslichen Membranfraktionen nach Auftrennung mit zweidimensionalen elektrophoretischen Techniken

Um einen ersten Eindruck über die Komplexität der Proteine in den DRM Fraktionen zu erhalten, und um einzelne Proteine massenspektrometrisch identifizieren zu können, wurden die Produkte der DOC DRM und der NP40 DRM mit zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese (IEF/SDS PAGE) aufgetrennt und die erhaltenen Gele mit Coomassie G-250 gefärbt.

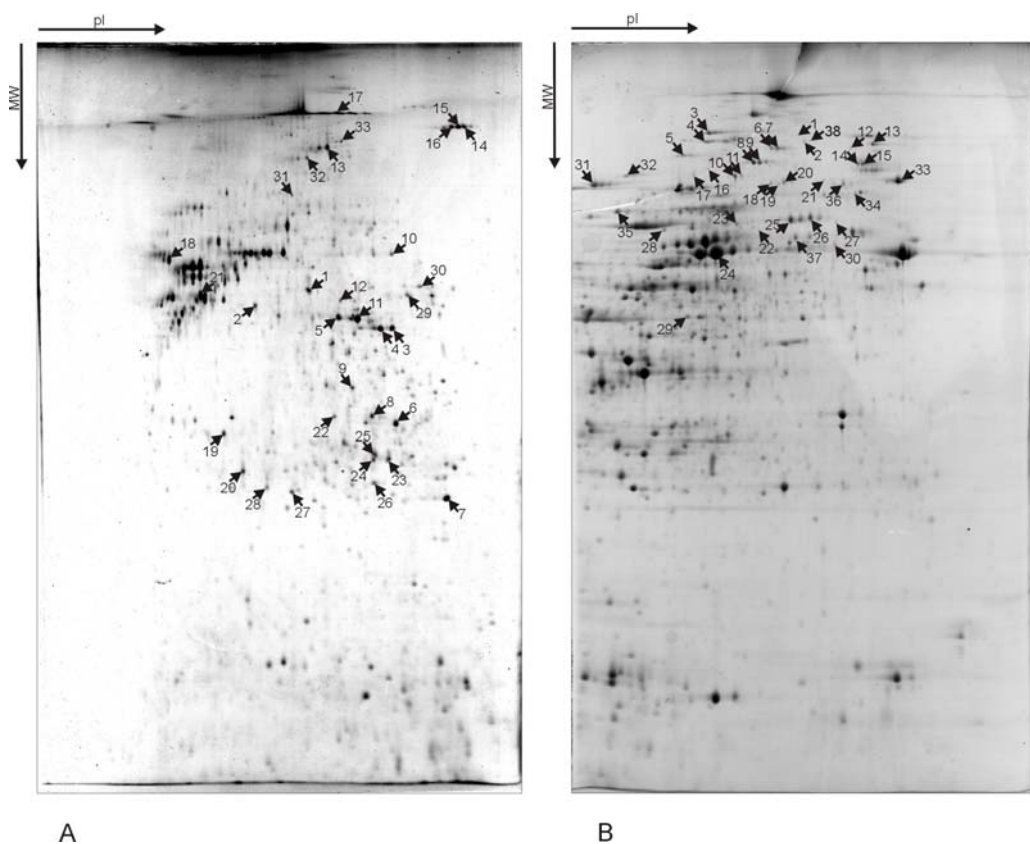


Abb. 31: Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese von A) rund 150 μg DOC DRM; und B) rund 225 μg NP40 DRM nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht (IEF/SDS). Mit Pfeilen und Nummern sind die massenspektrometrisch analysierten Spots gekennzeichnet.

Auf den Gelen konnten je rund 500 Proteinspots detektiert werden (siehe Abb. 31). Einige gut abgegrenzte Proteinspots wurden ausgeschnitten, mit MALDI MS untersucht und gegebenenfalls mit nanoLC-MS/MS bestätigt. Die massenspektrometrische Analyse führte zur Identifikation von 29 Proteinen aus 31 Spots des Gels der DOC DRM bzw. 42 Proteinen aus 38 Spots eines Gels der NP40 DRM. Den Tab. 9 und 10 können ausgewählte identifizierte Proteine und Informationen zu deren subzellulärer Lokalisation ent-

nommen werden. Die identifizierten Proteine aller analysierten Spots sind in den Tabellen im Anhang zusammengefasst.

Aus dem IEF/SDS-Gel der DOC DRM wurden 29 Proteine identifiziert, von denen zwölf Proteine im Zytosol und acht Proteine in der mitochondrialen Matrix lokalisiert sind. Fünf der identifizierten Proteine sind vorwiegend extrazellulär zu finden und vier Proteine sind in/an Membranen lokalisiert. Hierbei handelt es sich zum einen um alpha und beta Kette der katalytischen Untereinheit und eine, den Protonenkanal formende Untereinheit-d der ATP-Synthase der mitochondrialen Membran. Desmoplakin 1 als membranassoziertes Protein stellt ein identifiziertes Plasmamembranprotein dar.

Unter den 42 identifizierten Proteinen der NP40 DRM bilden die löslichen Proteine der mitochondrialen Matrix (16 Proteine) und des Zytosols (13 Proteine) die mengenmäßig größten Gruppen. Zwei identifizierte Proteine sind vorwiegend am Endoplasmatischem Retikulum und eines extrazellulär zu finden. Zehn Membranproteine wurden identifiziert. Hierzu gehört das mitochondriale Transmembranprotein Mitofillin unbekannter Funktion, das Calcium-bindende mitochondriale Carrierprotein Aralar2 sowie NADH-ubiquinone Oxidoreduktase (75 kDa Untereinheit). In diesem Gel wurden alpha und beta-Kette der ATP-Synthase identifiziert. Des Weiteren wurde die Lange-Ketten-Fettsäureligase 1, ein Enzym der β -Oxidation, gefunden und ein Protein, das dem Lipoprotein-abhängigem Protein 1B, das auf der Zelloberfläche die rezeptorvermittelte Endozytose initiiert, ähnlich ist. Außerdem konnte ein junctionales Plaque-protein, Desmoplakin 3, identifiziert werden.

Tab. 9: Ausgewählte identifizierte Proteine aus einem zweidimensionalen Gel (IEF/SDS) der DOC DRM, nach subzellulärer Lokalisation geordnet.

Spot	Proteinname NCBI / Swissprot *	NCBI Acc.-nr.	Swissprot Acc.-nr.	Score	Peptide ges./ ident	Lok
19	ATP synthase β subunit	179279	P06576	122	2/2	MM
21	rat Liver F1-Atpase, chain A / ATP synthase subunit α	6729934	P15999	81	2/1	MM
25	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	9506411	P31399	86	2/1	MM
31	desmoplakin I	2134996	P15924	222	6/4	PM
5	arginase 1	8392920	P07824	76	2/2	ZP
27	arginosuccinate synthetase	25453414	P09034	158	4/3	ZP
6	glutamate dehydrogenase 1	4885281	P00367	105	2/2	MP
13	carbamoyl-phosphate synthetase 1	21361331	P07756	118	4/3	MP

*nur bei abweichender Namensgebung

Score – Mascot Proteinscore, Peptide ges: Anzahl der Identifizierten Peptide ; Peptide ident. – Anzahl der Peptide mit dem Peptidscore >identity.

Lok – Lokalisation; PM-Plasmamembran, ZP-Zytoplasma; MM-Mitochondriale Membran, MP-Mitochondriales Plasma, EX-Extrazelluläre Matrix

Sequenzhomologie zwischen den annotierten Proteinen der Datenbank NCBI mit denen der Datenbank Swissprot $\geq 92\%$ (NCBI Version: 20030509 (1428067 sequences; 458894995 residues), SwissProt: Uniprot/Swissprot 7.03.2006, 211104 Einträge; Uniprot/TrEMBL 7.03.2006, 2638494 Einträge)

Ergebnisse

Mehrere Proteine konnten in beiden Präparationen identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Arginase 1 und Argininosuccinatsynthase, zwei zytoplasmatische Enzyme des Harnstoffzyklus, das mitochondriale Enzym Glutamatdehydrogenase und zwei regulatorische Untereinheiten (alpha und beta Kette) des mitochondrialen Transmembranproteines ATP Synthase.

Tab. 10: Ausgewählte identifizierte Proteine aus einem zweidimensionalen Gel (IEF/SDS) der NP-40 DRM, nach subzellulärer Lokalisation geordnet.

Spot	Name NCBI / Name Swissprot [*]	NCBI Acc-nr.	Swissprot Acc-nr.	Score	Peptide ges./ident.	Lok
14	unnamed protein product / (mitofilin) mitochondrial inner membrane protein	26328849	Q8CAQ8 ^{a)}	331	7/5	MM
38	solute carrier family 25, member 13 ¹⁾ / calcium-binding mitochondrial carrier protein aralar2	7657583	Q9QXX4	444 ¹⁾	9/8 ¹⁾	MM
15	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	128826	P28331	109	2/2	MM
24	ATP synthase α chain	114523	P15999	1398	47/27	MM
30	H ⁺ -transporting two-sector ATPase β chain	92350	P10719	107	2/1	MM
20	long-chain-fatty-acid - CoA ligase 1	25742739	P18163	70	2/1	MM
19	junction plakoglobin, desmoplakin-3	130257	P14923	100	3/1	PM
29	arginase-1	114146	P07824	223	6/4	ZP
17	argininosuccinate synthase	68639	P14568	143	3/2	ZP
22	glutamate dehydrogenase 1	118533	P00366	124	2/2	MP
28	HMG CoA synthase	555835	P54869	74	2/2	MP

*bei abweichender Namensgebung

Sequenzhomologie zwischen den annotierten Proteinen der Datenbank NCBI mit denen der Datenbank Swissprot $\geq 90\%$;

a) Sequenzhomologie $90\% \geq x \geq 80\%$

Score : Mascot Proteinscore ; Peptide ges: Anzahl der Identifizierten Peptide ; Peptide ident. – Anzahl der Peptide mit dem Peptidscore $>$ identity.

Lok – Lokalisation: ZP-Zytoplasma; PM-Plasmamembran, MM-Mitochondriale Membran; MP-Mitochondriales Plasma; ER-Endoplasmatisches Reticulum, N-Nucleus, EX-Extrazelluläre Matrix

NCBI Version: 20030509 (1428067 sequences; 458894995 residues) 1) 20070421 (4872416 sequences; 1684850502 residues)

SwissProt: Uniprot/Swissprot 7.03.2006, 211104 Einträge; Uniprot/TrEMBL 7.03.2006, 2638494 Einträge

Die Endprodukte der gleichen Präparationen wurden mit einer alternativen zweidimensionalen Gelelektrophorese (16-BAC / SDS) nach dem Molekulargewicht separiert. Diese Methode stellt gerade für Membranproteine eine geeignete zweidimensionale Auftrennungsmethode dar, da das ionische Detergens der ersten Dimension (16-Benzyltrimethylammoniumchlorid) größere solubilisierende Eigenschaften hat, als die für die isoelektrische Fokussierung üblichen nichtionischen Detergentien. Die erhaltenen Gele sind in Abb. 32 dargestellt.

Aus dem Gel nach zweidimensionaler 16-BAC/SDS Elektrophorese der DOC DRM wurden aus 6 Spots sieben verschiedene Proteine identifiziert (siehe Tab. 11). Neben vier Proteinen, die im mitochondrialen Plasma lokalisiert sind, wurden zwei Proteine aus dem Zytosol und ein Protein aus der mitochondrialen Membran identifiziert.

Vier dieser Proteine konnten auch im Gel der IEF/SDS identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um das in den Harnstoffwechsel involvierte Enzym Arginase 1, das zytosolische Enzym Glutamatdehydrogenase 1, die alpha Kette der ATP-Synthase und das mitochondriale Matrixprotein Carbamoylphosphatsynthase 1. Des Weiteren wurde das in die Ketonkörpersynthese involvierte Enzym HMG-CoA Synthase identifiziert, das bereits im IEF/SDS Gel der NP40 DRM gefunden werden konnte.

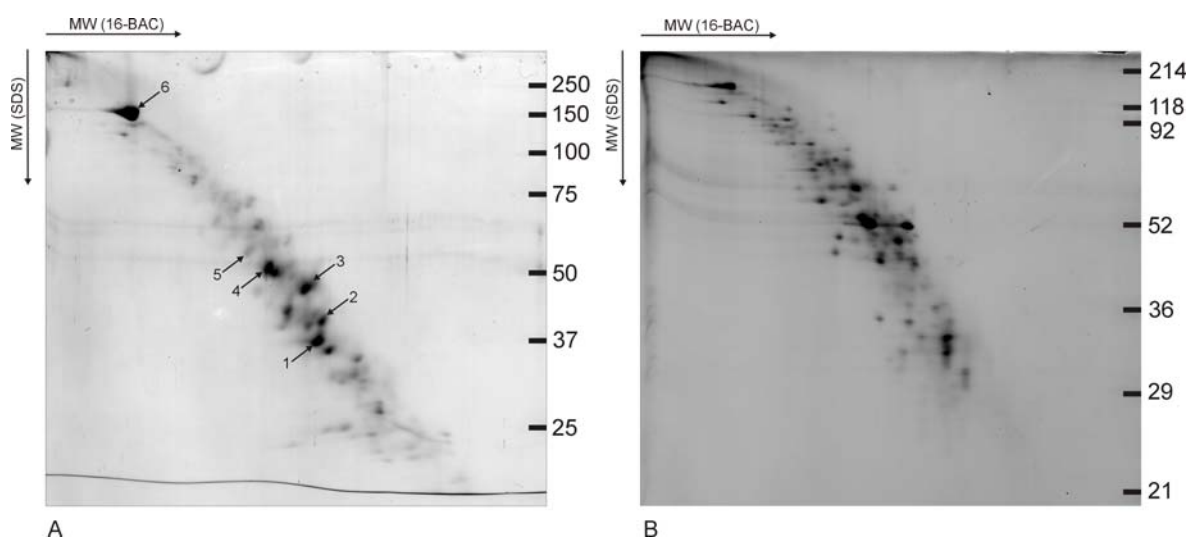


Abb. 32: Zweidimensionale Auftrennung nach dem Molekulargewicht (16-BAC/SDS) von A) 100 µg DOC unlöslicher Membranfraktion; B) 100 µg NP40 unlöslicher Membranfraktion

Tab. 11: Identifizierte Proteine aus einem zweidimensionalen Gel (16-BAC/SDS) der in DOC unlöslichen Membranfraktion, nach Spotnummern geordnet.

Spot	Proteinname	Swissprot Acc-nr.	MW _{Gel} [kDa]	MW _{gemessen} [kDa] (kDa / pI _{theoret.} ^{a)})	Lok
1	arginase-1	P07824	36	35 / 6,7	ZP
2	actin, cytoplasmic 1 (β actin)	P60709	39	42 / 5,3	ZP
3	HMG-CoA synthase, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	P54869	45	54 / 8,0	MP
4_1	glutamate dehydrogenase 1	P00367	51	61 / 7,6	MP
4_2	ATP synthase α chain	P15999	51	58 / 9,2	MM
5	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor / mitochondrial matrix protein P1	P63039	55	61 / 5,9	MP
6	carbamoyl-phosphate synthase I	P07756	150	164 / 6,3	MP

a) entsprechend <http://www.expasy.org/>

Lok – Lokalisation: ZP-Zytoplasma, MP-Mitochondriales Plasma, MM-Mitochondriale Membran

Mascotproteinscore / Anzahl der identifizierten Peptide können wegen Datenverlust leider nicht wiedergegeben werden.

Ergebnisse

Zusammenfassend stellt Tab. 12 die Anzahl und Lokalisation der identifizierten Proteine aus DOC DRM und NP40 DRM aus IEF/SDS Gelen und 16-BAC/SDS Gelen dar.

Tab. 12: Übersicht zur zweidimensionalen Auftrennung, Analyse und Lokalisation identifizierter Proteine aus DOC DRM und NP40 DRM

	IEF/SDS		16-BAC/SDS	
	DOC unlösl. Fraktion	NP40 unlösl. Fraktion	DOC unlösl. Fraktion	NP40 unlösl. Fraktion
Spots detektiert	~500	~500	~70	~90
Spots mit MS analysiert	31	38	6	0
identifizierte Proteine	29	42	7	-
subzelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine				
Zellmembran	1	1	-	-
Mitochondriale Membran	3	9	1	-
Mitochondriale Matrix	8	16	4	-
Zytosol	12	13	2	-
Endoplasmatisches Retikulum	-	2	-	-
Extrazellulär	5	1	-	-

3.3.3 Identifizierung ausgewählter Proteine aus detergens-unlöslichen Membranfraktionen nach eindimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung

Durch die massenspektrometrische Analyse einiger Spots auf 2DE Gelen der DOC DRM bzw. NP40 DRM wurden die Grenzen der zweidimensionalen Auftrennung deutlich. Gerade in der Präparation einer detergens-unlöslichen Membranfraktion wurde die Identifizierung eines überwiegenden Teiles von Membranproteinen erwartet. Eine veränderte Versuchskonzeption unter Umgehung der zweidimensionalen Auftrennung sollte die Identifizierung einer größeren Anzahl an Membranproteinen ermöglichen. Es wurde angestrebt, drei verschiedenen DRM Präparationen eindimensional aufzutrennen und die erhaltenen Banden vollständig mit Massenspektrometrie zu analysieren.

Die unlöslichen Membranfraktionen (DRM) nach DOC, NP40, TX100 Extraktion wurden eindimensional mittels SDS Gelelektrophorese auf Großgelen mit einer Länge von 30 cm aufgetrennt und anschließend mit Coomassie G250 gefärbt (Abb. 33).

Nach Dokumentation der Gele durch Scannen wurden die Gelstreifen horizontal in ca. 80 Fragmente zerteilt. Die in den Gelstücken enthaltenen Proteine wurden proteolytisch durch Trypsin gespalten, für die massenspektrometrische Bestimmung vorbereitet und anschließend mit nanoLC-MS/MS massenspektrometrisch analysiert. Dieses Vorgehen sollte den Verlust von hydrophoben Proteinen während der elektrophoretischen Auftrennung minimieren und die Identifizierung möglichst vieler Proteine sicherstellen.

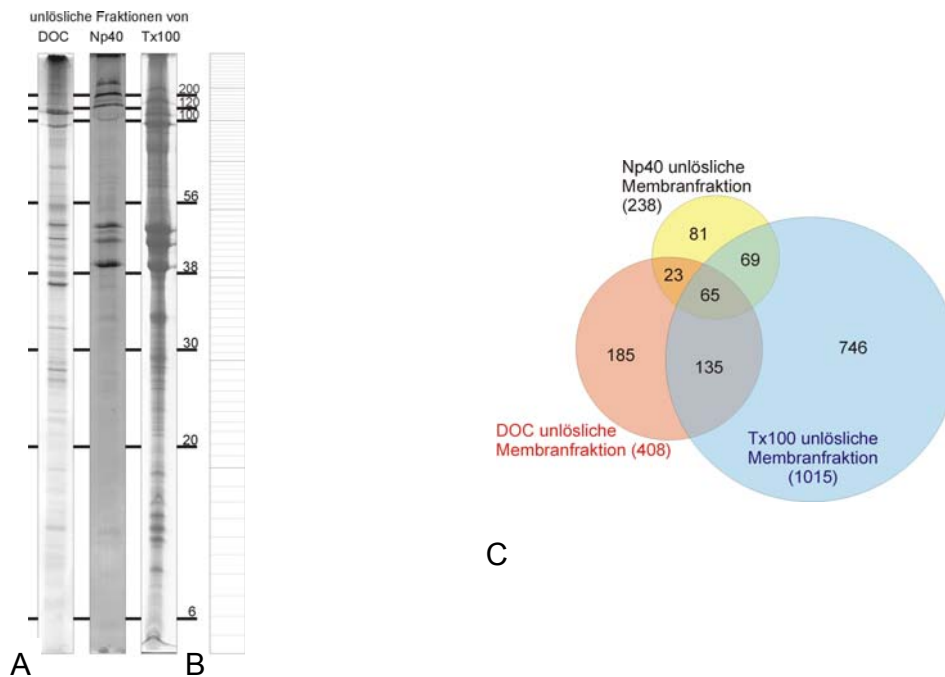


Abb. 33: A) Eindimensionale Auftrennung von 440 μ g DOC DRM, 440 μ g NP40 DRM und 145 μ g TX100 DRM auf einem SDS Gel (15% Acrylamid), B) Fragmentierungsschema der eindimensionalen Banden zur Probengewinnung für die massenspektrometrische Analyse. C) Darstellung der insgesamt identifizierten Proteine mit Schnittmengen aus den verschiedenen detergenten-unlöslichen Membranfraktionen (DRM).

Wie in Abb. 33 veranschaulicht, konnten 238 Proteine in der NP40 DRM, 408 unterschiedliche Proteine in der DOC DRM und 1015 Proteine in der TX100 DRM eindeutig identifiziert werden. Einige der Proteine wurden in zwei bzw. in allen drei Präparationen übereinstimmend identifiziert. Insgesamt 65 Proteine wurden in allen drei Präparationen gefunden, 23 Proteine wurden in DOC DRM und NP40 DRM, 135 Proteine in DOC DRM und TX100 DRM und 69 Proteine in TX100 DRM und NP40 DRM identifiziert. Die Recherche nach Lokalisation und funktioneller Bedeutung in der Zelle wurde auf Proteine beschränkt, die in mindestens zwei Präparationen identifiziert wurden. In Tab. 13 ist eine Zusammenfassung nach Lokalisation dieser Proteine dargestellt.

Ergebnisse

Tab. 13: Lokalisation der in mindestens zwei Präparationen gemeinsam identifizierten Proteine.

Lokalisation	DOC / TX100 / NP40 DRM	DOC / NP40 DRM	DOC / TX100 DRM	TX100 / NP40 DRM
Zellkontakt	6	3	8	19
Zellmembran	8	3	16	3
Mitochondriale Membran	9	6	35	1
Mitochondriale Matrix	12	2	30	2
Zytosol	8	4	11	6
Zytoskelett	8	0	2	14
Organell	8	3	23	16
Extrazellulär	6	1	4	3
Unbekannte Lokalisation	0	1	6	5
Summe identifizierter Proteine	65	23	135	69

Organell – unter diesem Begriff sind Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum, Ribosomen, Peroxisomen, Mikrosomen, Vakuolen und dem Nucleus zusammengefasst.

Ausgewählte Proteine der verschiedenen Schnittmengen, d.h. Proteine des Zell-Zell-Kontaktes, Proteine der Zellmembran und Proteine, zu denen keine Information in den üblichen Datenbanken verfügbar war, wurden in den Tabellen 14-17 zusammengefasst. Die vollständigen Tabellen der in mindestens zwei Präparationen gefundenen Proteine sind im Anhang dargestellt

Unter den 65 in DOC DRM, TX100 DRM und NP40 DRM identifizierten Proteinen (Tab. 14) sind 6 Proteine, für die eine Beteiligung am Zell-Zell-Kontakt bekannt ist. Hierzu gehören die transmembranalen Proteine Connexin 32, ein Protein der *gap junction*, und Desmoglein, eine Hauptkomponente in Desmosomen. Das zytosolische Protein Cingulin ist an der Bildung von *tight junction* beteiligt und β -Catenin und α -Aktinin verbinden das Aktinfilamentnetzwerk unter anderem mit Zell-Kontakt-Strukturen. Ein als Adapterprotein bei der Bildung von Signalkomplexen agierendes Protein wird mit unterschiedlicher Bezeichnung in den Datenbanken NCBI (*Arg/Abl-interacting protein ArgBP2*) bzw. SwissProt (*Sorbin and SH3-containing protein 2*) geführt.

Tab. 14: In DOC DRM, TX100 DRM und NP40 DRM gemeinsam identifizierte Plasmamembranproteine. Es ist Name und Accessionnummer (Acc-nr.) der Datenbanken NCBI* und SwissProt** (nach Sequenzrecherche [BLAST]) des identifizierten Proteins angegeben. Informationen zu Lokalisation und Funktion aus SwissProt.

Lok	Proteinname NCBI / SP	Funktion/ Katalytische Aktivität	NCBI Acc-nr.	SP Acc-nr.
K	actinin α 4	verknüpft Aktin mit intrazellulären Strukturen	11230802	P57780
K	β -catenin	bindet an zytoplasmische Domäne von E-Cadherin (Adhärenzverbindungen), Verknüpfung mit Aktinfilamentnetzwerk	479677	P26233
K	PREDICTED: similar to Cgn protein / Cingulin ^{a)}	beteiligt an Ausbildung und Regulation von <i>tight junction</i> ; interagiert mit ZO-1	62643870	P59242
K	PREDICTED: similar to desmoglein 2 ^{b)}	Komponente an Desmosomen, beteiligt an Interaktionen von Plaqueproteinen und Intermediärfilamenten	62664095	O55111
K	gap junction protein Cx32	Komponente der <i>gap junction</i>	477928	P08033
K	Arg/Abl-interacting protein ArgBP2 / sorbin and SH3-containing protein 2	Adapterprotein mit Funktion bei der Bildung von Signalkomplexen, Kontrolle von Zelladhäsion und Motilität, Kolokalisiert mit Aktin, u.a. an Zelladhäsionskontakten / <i>rafts</i>	16758606	O35413
ZM	5' nucleotidase	hydrolysiert extrazelluläre Nucleotide in membranpermeable Nucleoside, Lipid-Anker	11024643	P21588
ZM	canalicular multispecific organic anion transporter	vermittelt hepatobiliäre Exkretion von organischen Anionen, angereichert in der Leber, ABC-Transporter-Familie	1405353	Q63120
ZM	RB13-6 antigen / ectonucleotide pyrophosphatase	spaltet Phosphodiester- und Phosphosulfatbindungen (Deoxynucleotide, Nucleotidzucker, und NAD)	806379	P97675
ZM	cell surface glycoprotein OX47 precursor / basigin	beteiligt in Spermatogenese, Embryoimplantation, Bildung des neuralen Netzwerkes, und Tumorprogression	111503 ⁺	Q6GT74
ZM	Na,K-ATPase α -1 subunit	katalysiert Hydrolyse von ATP, gekoppelt mit dem Na/K-Austausch durch die Plasmamembran, Teil der katalytischen Komponente	205632	P06685
ZM	porin 31HM / voltage-dependent anion-selective channel protein 1	bildet Kanal zur Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen, beteiligt an Regulation des Zellvolumens und Apoptose	238427	P21796
ZM	membrane-bound aminopeptidase P	Freisetzung von N-terminalen Aminosäuren, z.B. beteiligt an Entzündungsprozessen, metabolisiert Bradykinin	13560983	Q99MA2
ZM	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2 / MOSC domain-containing protein 2, mito*	katalytische Komponente eines Komplexes, der N-hydroxybindungen reduziert, z.B. Benzamidoxim	38511548	O88994

Lok – subzelluläre Lokalisation, K- Zellkontakt, M – Zellmembran;

*NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>; ** SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>;

ohne Angabe: Sequenzhomologie zwischen NCBI- und SwissProt mindestens 90%a) Sequenzhomologie zwischen NCBI- und SwissProt 80-90%; b) Sequenzhomologie zwischen NCBI- und SwissProt 70-80%

Stand Okt. 2008 (außer +Stand Feb 2007)

Ergebnisse

Von 23 Proteinen, die in der DOC DRM und NP40 DRM identifiziert wurden (Tab. 15), konnten drei Proteine dem Zell-Zell-Kontakt zugeordnet werden. Es wurde ein Transmembranprotein der Adhärenzverbindungen (N-Cadherin), ein Transmembranprotein der Fokalkontakte (Integrin α) sowie das daran bindende Protein Annexin A2 gefunden. Zum Protein Ab2-219 war keine Information zu Lokalisation bzw. Funktion recherchierbar.

Tab. 15: Ausgewählte, in DOC DRM und NP40 DRM gemeinsam identifizierte Proteine. Es ist Name und Accessionnummer (Acc-nr.) der Datenbanken NCBI* und SwissProt** (nach Sequenzrecherche [BLAST]) des identifizierten Proteins angegeben. Informationen zu Lokalisation und Funktion aus SwissProt.

Lok	Proteinname NCBI / SP	Funktion/ Katalytische Aktivität	NCBI Acc-nr.	SP Acc-nr.
K	neural-cadherin precursor (N-cadherin) (cadherin-2)	calciumabhängige Komponente von Adhärenzverbindungen	115424	P15116
K	integrin α -1	Rezeptor für Laminin und Collagen an Fokalkontakten	2829468	P56199
K	calpactin I heavy chain; annexin A2	vernetzt Phospholipide der Plasmamembran mit Aktin und dem Zytoskelett, möglicherweise an Exozytose beteiligt	312253	Q07936
ZM	radixin ^{a)}	verbindet stumpfes Ende von Aktinfilamenten mit Plasmamembran, an Unterseite von Adhärenzverbindungen angereichert	299787	P26043
ZM	Na/K-transporting ATPase β -1 chain	katalysiert Hydrolyse von ATP, gekoppelt mit dem Na/K-Austausch durch die Plasmamembran, reguliert Anzahl der Transporter innerhalb der Membran	54130	P14094
ZM	unnamed protein product / Na/K transporting ATPase α -chain precursor	katalysiert Hydrolyse von ATP, gekoppelt mit dem Na/K-Austausch durch die Plasmamembran, Teil der katalytischen Komponente	64400	P05025
-	Ab1-219	-*	33086486	Q7TP88

*NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>; ** SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>

Lok – subzelluläre Lokalisation, K- Zellkontakt, ZM – Zellmembran;

ohne Angabe: Sequenzhomologie zwischen NCBI- und SwissProt mindestens 90%; a) Sequenzhomologie 79%;

Stand Okt. 2008

Von den 69 gemeinsam in den Tx100 DRM und NP40 DRM identifizierten Proteinen sind 19 am Zellkontakt lokalisiert (Tab. 16). P120-Catenin und α -Catenin verbinden Adhärenzkontakte mit Aktinfilamenten, Desmoplakin III, Plakoglobin und Plakophilin sind als Plaqueproteine an Adhärenzverbindungen bzw. Desmosomen bekannt. Des Weiteren wurden mehrere Varianten des Proteins Plektin und Desmoplakin gefunden, die desmosomale Komponenten mit Intermediärfilamenten verknüpfen. Talin, *integrin linked kinase* und Ponsin sind Proteine, die die Bindung von Fokalkontakten zum Zytoskelett herstellen. Drei weitere Proteine konnten der Zellmembran zugeordnet werden. Zu fünf Proteinen war keine Information in Swissprot dokumentiert, von denen für mindestens zwei Proteine eine Wechselwirkung mit Zell-Zell-Kontakten möglich scheint.

Tab. 16: Ausgewählte, in TX100 DRM und NP40 DRM gemeinsam identifizierte Proteine. Es ist Name und Accessionnummer (Acc-nr.) der Datenbanken NCBI* und SwissProt** (nach Sequenzrecherche [BLAST]) des identifizierten Proteins angegeben. Informationen zu Lokalisation und Funktion aus SwissProt.

Lok	Proteinname NCBI / Swissprot	Funktion/ Katalytische Aktivität	NCBI Acc-nr.	SP Acc-nr.
K	catenin (cadherin-associated protein), α 1	Komponente von Adhärenzverbindungen, verbindet Cadherine mit Aktinfilamenten	55742755	Q5U302
K	p120 / catenin δ -1	Komponente des Adhäsionskomplexes	53545	P30999
K	junction plakoglobin = desmoplakin III	Plaueprotein an Adhärenzverbindungen und Desmosomen	41529837	Q6P0K8
K	plakoglobin	Plaueprotein an Adhärenzverbindungen und Desmosomen	1497985	P70565
K	plakophilin 2 / putative uncharacterized protein Pkp2	Komponente in Desmosomen	21312960	Q9CQ73
K	plectin 1 ^{a)}	verketet intermediärfilamente mit Mikrotubuli und Microfilamenten, verankert Intermediärfilamente mit Desmosomen	13540714	P30427
K	plectin 1		40849886	Q6S3A5
K	plectin 1 isoform 1 / plectin 1		41322904	Q6S394
K	plectin 2		40849888	Q6S3A4
K	plectin 9 / plectin 1		40849902	Q6S3A5
K	PREDICTED: desmoplakin / desmoplakin ^{a)}	Komponente von Desmosomen, verknüpft Intermediärfilamente mit Desmosomen	55625836	P15924
K	PREDICTED: similar to desmoplakin isoform II / DSP variant protein (fragment) ^{a)}		62663429	Q4LE79
K	PREDICTED: desmoplakin isoform I / desmoplakin ^{a)}		63641940	P15924
K	Dsp protein ^{a)}		67678070	Q4QQR7
K	talin / talin-1	verbindet Integrine (Fokalkontakte) mit Zytoskelett	227256	P26039
K	talin / Talin-1		4235275	Q9Y490
K	PREDICTED: similar to talin 2 / talin-2 ^{a)}		50752817	Q9Y4G6
K	integrin-linked protein kinase	Proteinkinase, reguliert Integrin-vermittelte Signaltransduktion an Fokalkontakten	6754342	O55222
K	c-Cbl associated protein CAP / sorbin and SH3 domain-containing protein 1 (ponsin)	erforderlich für Insulin-stimulierten Glukose-transport, involviert in die Ausbildung von Fokalkontakten und Aktin-Stress-Fibrillen	21745353	Q62417
ZM	PREDICTED: similar to junction-associated coiled-coil protein / junction-associated coiled-coil protein ^{b)} = JACOB = cingulin-like protein 1	vermutlich in Verankerung des apikalen junctionalen Komplex (besonders <i>tight junction</i>) zum Zytoskelett involviert (Ohnishi 2004)	62653885	Q6AW69
nb	PREDICTED: similar to Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	IQGAP2 ist erforderlich für die Cadherin-vermittelte Zell-Zell Adhäsion in Embryos von <i>Xenopus laevis</i> (Yamashiro 2007) IQGAPs binden Calmodulin und vernetzen F-actin (Stockinger 2006)	63655455	Q3UQ44
nb	sorbin and SH3 domain containing 3	-* (O60504-Vinexin – an Zell-Zell- und Fokalkontakten – fördert Heraufregulation von Aktin-Stress-Fibern und spielt eine Rolle bei der Ausbreitung von Zellen)	54114997	Q5XIL4
nb	PREDICTED: Bcl2-associated athanogene 3 / Bcl2-associated athanogene 3 (pred)	inhibiert Chaperonaktivität von HSP70/ HSC70, zeigt anti-apoptotische Aktivität	62641368	Q5U2U8

*NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>; ** SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>

Lok – subzelluläre Lokalisation, K- Zellkontakt, ZM – Zellmembran; nb – nicht bekannt

ohne Angabe: Sequenzhomologie zwischen NCBI- und SwissProt mindestens 90%; a) Sequenzhomologie 80-90%; b) Sequenzhomologie 70-80%;

Stand Okt. 2008

Ergebnisse

Von den 135 in den TX100 DRM und DOC DRM identifizierten Proteinen sind 8 Proteine am Zell-Zell-Kontakt beteiligt (Tab. 17). Es wurden die Transmembranproteine JAM und Claudin-3 aus den *tight junction* identifiziert, sowie das daran bindende Protein ZO-1. Aus den Adhärenzverbindungen wurde das Transmembranprotein N-Cadherin und das zytosolische Protein α -Catenin gefunden. Außerdem wurden Desmoplakin I und Desmoplakin III identifiziert. Weitere 16 Proteine sind an der Zellmembran lokalisiert. Zu 6 Proteinen waren keine Informationen in Swissprot, und nur zum Teil in Literaturdatenbanken verfügbar.

Tab. 17: Ausgewählte, in DOC DRM und TX100 DRM gemeinsam identifizierte Proteine. Es ist Name und Accessionnummer (Acc-nr.) der Datenbanken NCBI* und SwissProt** (nach Sequenzrecherche [BLAST]) des identifizierten Proteins angegeben. Informationen zu Lokalisation und Funktion aus SwissProt.

Lok	Proteinname NCBI / Swissprot	Funktion / katalytische Aktivität	NCBI Acc-nr.	Swissprot Acc-nr.
K	junction adhesion molecule	involviert in die Integrität der epithelialen Barriere, reguliert die Transmigration von Monocyten, vermutlich an Bildung von epithelialen <i>tight junction</i> beteiligt	5457119	Q9Y5B2
K	claudin 3 ^{b)}	Komponente der <i>tight junction</i>	6753438	Q9Z0G9
K	<i>tight junction protein</i> ZO-1	involviert in Ausbildung von <i>tight junction</i> und deren Stabilisierung	292938	Q07157
K	PREDICTED: similar to ZO-1 / <i>tight junction protein</i> ZO-1 ^{a)}	involviert in Ausbildung von <i>tight junction</i> und deren Stabilisierung	62640685	P39447
K	unnamed protein product / neural-cadherin precursor (N-cadherin)	Komponente in Adhärenzverbindungen, Calcium-abhängig	34999	P19022
K	PREDICTED: catenin, α 1 / α -1 catenin	bindet an die zytosolische Domäne von Cadherinen (Adhärenzverbindungen) und verknüpft diese mit dem Aktinfilamentnetzwerk	55624840	P35221
K	junction plakoglobin (desmoplakin III)	Plaquesprotein an Adhärenzverbindungen und Desmosomen	130257	P14923
K	desmoplakin I / desmoplakin ^{a)}	Komponente von Desmosomen, verknüpft Intermediärfilamente mit Desmosomen	1147813	P15924
ZM	radixin ^{b)}	bindet das stumpfe Ende von Aktinfilamenten an die Plasmamembran, angereichert an Unterseite von Adhärenzverbindungen	6677699	Q3U111
ZM	PREDICTED: similar to vinculin / vinculin (metavinculin) ^{a)}	Anheftung von Aktinmikrofilamenten an die Plasmamembran, Rolle bei Zellmorphologie und Fortbewegung	62661011	P18206
ZM	lin-7 homolog C	Etablierung und Bildung der asymmetrischen Verteilung von Membranproteinen in polarisierten Zellen, der dreigeteilte Komplex aus LIN7 (A,B, oder C), CASK und APBA1 verbindet möglicherweise synaptische Exozytose mit Zelladhäsion im Gehirn. (Butz 1998)	11177888	Q79210
ZM	fatty acid binding/transport protein / platelet glycoprotein 4	Funktion bei Transport und/oder Regulator des Fettsäuretransportes, möglicherweise Funktion als Zell-Adhäsionsmolekül, an Caveolae lokalisiert (Aboulaich 2004)	1083660	Q07969
ZM	CD14 / monocyte differentiation antigen CD14 precursor	Immunantwort auf bakterielle Liposaccharide, reguliert Zelloberflächenmoleküle in ihrer Expression herauf (incl. Adhäsionsmoleküle), Lipid-anker	1262920	Q63691
ZM	syntaxin 4A	t-SNARE (Schlüsselfaktor für die Fusion von Plasmamembranen); Translokation von SLC2A4 von intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran	13592099	Q08850
ZM	asialoglycoprotein receptor / asialoglycoprotein receptor 1	vermittelt die Endozytose von Glycoproteinen, in der Leber angereichert	202988	P02706
ZM	GTP-binding regulatory protein Gi α -2 chain – bovine (fragments)	an Signaltransduktion beteiligt	89580	Q7M3G9

Ergebnisse

ZM	solute carrier organic anion transporter family, member 1a4	vermittelt den Natrium-unabhängigen Transport von organischen Anionen aus Leber und Hirn	18777755	O35913
ZM	P-glycoprotein sister / bile salt export pump	ATPabhängige Sekretion von Gallensalzen in den Kanalikulus von Hepatozyten, in der Leber angereichert, ABC-Transporter-Familie	3273484	O70127
ZM	dipeptidyl peptidase IV	N-terminale Freisetzung von Dipeptiden aus Polypeptiden, in Gallenkanälen angereichert	203974	P14740
ZM	aminopeptidase M / aminopeptidase N	Aminopeptidase mit ausgedehnter Spezifität, z.B. finale Spaltung von Peptiden nach gastrischer Hydrolyse, Metabolisierung regulatorischer Peptide	601865	P15684
ZM	Na/K-transporting ATPase β -1 chain	katalysiert Hydrolyse von ATP, gekoppelt mit dem Na/K-Austausch durch die Plasmamembran, Reguliert Anzahl der Transporter innerhalb der Membran	6753138	P14094
ZM	nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8	hydrolysiert ATP bzw. ADP	47027434	Q5DRK1
ZM	EFR3 homolog A	in Plasmamembran lokalisiert (Munemoto 2004)	62652504	Q8BG67
nb	transmembrane protein 126A [mus musculus]	-*	13384870	Q9D8Y1
nb	transmembrane protein 126A [rattus norvegicus]	-*	57921071	Q5HZA9
nb	lyn B protein	<i>Tyr protein kinase family</i> , enthält SH3 Domäne	187271	Q6NUK7
nb	mettl7b protein / methyltransferase-like protein 7B	möglicherweise Methyltransferaseaktivität; Lokalisation: ER Membran; Periphere Membran, Lipid Tröpfchen, konzentriert im perinucleären Bereich des ER und umgebenden Lipidtröpfchen	19354269	Q9DD20
nb	NIPSNAP-related protein / nipsnap homolog 3A	möglicherweise eine Rolle beim vesikulären Transport (NIPSNAP4 liegt an Membranen assoziiert und teilweise in rafts vor) (Buechler 2004)	57164107	Q5M949
nb	PREDICTED: similar to coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain con / Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3 ^{a)}	-* im Komplex mit Mitofillin und DnaJC11, eventuell an Proteinimport und Erhaltung der mitochondrialen Struktur beteiligt (Xie 2007)	62646993	Q9CRB9

*NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>; ** SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>
 Lok – subzelluläre Lokalisation, K- Zellkontakt, ZM – Zellmembran; nb – nicht bekannt
 ohne Angabe: Sequenzhomologie zwischen NCBI- und SwissProt mindestens 90%; a) Sequenzhomologie 80-90%; b) Sequenzhomologie 70-80%;
 Stand Okt. 2008

4 Diskussion

Das Gehirn von Säugern ist durch eine effektive physiologische Barriere, die Blut-Hirn-Schranke (BHS), vom Blutkreislauf getrennt. Sie dient als Schutz des sensiblen Nervengewebes, indem sie einerseits das optimale Milieu für das Gehirn aufrechterhält (Homöostase), andererseits dieses aber vor im Blut transportierten potentiell toxischen Stoffen schützt. Wichtigstes Element zur Bildung der BHS sind Endothelzellen der Blutkapillaren, die über eine Vielzahl von selektiven Transportern den Nährstoffbedarf des Gehirns sicherstellen und durch sehr dichte interzelluläre Verbindungen (*tight junction*) die freie Diffusion zwischen Endothelzellen unterbinden. Pathologische Prozesse, wie beispielsweise Gefäßverschuß bei Schlaganfall, haben direkte Folgen auf die Funktionsfähigkeit von Endothelzellen und der betroffenen Gehirnabschnitte.

Das Ziel der vorzustellenden Arbeit ist es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Regulation der Blut-Hirn-Schranke (BHS) unter pathologischen Bedingungen und des molekularen Aufbaus von Zell-Zell-Verbindungen, insbesondere der *tight junction* zu leisten. Zu diesem Zweck wurden Untersuchungen zur differentiellen Proteinexpression nach 24 Stunden Hypoxie in Gehirnkapillarendothelzellen (rBCEC4) durchgeführt. Um den molekularen Aufbau und die Umgebung der *tight junction* weiter aufzuklären, wurde die Cholesterolabhängigkeit der Lokalisation von *tight junction* Proteinen untersucht. Außerdem wurden mehrere *tight junction* angereicherte Präparationen (*detergent resistant membrane fractions* - DRM) mit massenspektrometrischen Techniken analysiert, um Kandidaten für bisher unbekannte, am *tight junction* Komplex beteiligte Proteine zu finden.

Bei den durchgeführten Arbeiten wurden Methoden der Proteomforschung angewandt. In deren Fokus liegt die umfassende Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen aus Zellen oder Geweben zu einem definierten Zeitpunkt und zu definierten Bedingungen. Eine Reihe von Techniken zur Separation von Proteinen aus organischem Material (z.B. fraktionierende Zentrifugation, elektrophoretische Techniken, chromatographische Methoden, Immunpräzipitation) stehen zur Probenvorbereitung zur Verfügung. Die (meist) anschließende massenspektrometrische Analyse erlaubt heute die Identifizierung von mehr 100 Proteinen in einer Probe. Die Kombination mit Quantifizierungsmethoden (z.B. *stable isotopic labeling with amino acids in cell culture* - SILAC) ermöglicht die Bestimmung der relativen Mengen einzelner Proteine zur Ermittlung von veränderter Prote-

inexpression von z.B. Kontrollzellen im Gegensatz zu pathologischen Zellzuständen oder zum Einfluss von Störfaktoren.

Die hier anfänglich durchgeführte klassische zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) ist eine leistungsfähige Methode zur Trennung und visuellen Darstellung eines Proteingemisches von mehr als 10000 Proteinen (Klose 1995), stellt aber aufgrund der beschränkten Kompatibilität mit ionischen Detergentien vorwiegend hydrophile Proteine dar (Tab. 12). Durch spezielle, angepasste Detergentienmischungen kann versucht werden, diese Einschränkung weiter zu minimieren (Valcu 2006). Die modifizierte zweidimensionale Auftrennung nach dem Molekulargewicht durch ein kationisches und ein anionisches Detergens (16-BAC) stellt eine Möglichkeit zur zweidimensionalen Darstellung von hydrophoben Proteinen dar, da die ionischen Detergentien durch ihre höhere Polarität Proteine besser solubilisieren können (Hartinger 1996). Leider können bedeutend weniger (rund 1/5) Proteine als mit der klassischen 2DE dargestellt werden (siehe Tab. 12). Dies liegt in der Proteinauftrennung entlang einer Diagonalen begründet. Da die Sensitivität der Proteinfärbung im Gel geringer als das Detektionslimit der Massenspektrometrie ist, muss bei einem spotorientierten Ausschneiden von einer unvollständigen Analyse ausgegangen werden. Die gelfreie isoelektrische Fokussierung (z.B. mit Rotofor) ermöglicht die Separation einer komplexen Proteinemischung in 20 Fraktionen nach dem pH-Wert. Nach SDS-PAGE wird ein modifiziertes zweidimensionales Gel erhalten (siehe Abb. 32). Da verschiedene Proteine in Abhängigkeit vom pI überlappend in mehreren Fraktionen konzentriert werden, wird die Wiederfindung in separaten Experimenten erschwert. Die SILAC-Methode (Ong 2002) stellt in Kombination mit Rotofor eine verlässliche und praktikable Methode zur Quantifizierung dar. Obwohl auch hier mit einem begrenzten Spektrum an Detergentien gearbeitet wird, wurden überraschenderweise viele hydrophobe (Membran-)Proteine identifiziert (siehe Abb. 19). In dieser Arbeit wurde ausserdem ein Ansatz unter Umgehung zweidimensionaler Separationstechniken gewählt. Dabei lag die Priorität auf der Selektion einer bestimmten Proteingruppe (*lipid rafts*) durch die Probenaufarbeitung.

4.1 Differentielle Proteinexpression in Gehirnkapillarendothelzellen nach Hypoxie

Da pathologische Veränderungen der BHS, z.B. durch die Mangelversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nach einem Schlaganfall, gravierende Folgen für die Funktionsfähigkeit des betroffenen Gehirnabschnittes mit sich bringen, ist die Aufklärung der Schädigung zugrunde liegenden Mechanismen im Hinblick auf eine mögliche pharmakologische Intervention von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Hypoxie auf Gehirnkapillarendothelzellen untersucht.

Die bei diesen Studien zur differentiellen Expression angewandte modifizierte zweidimensionale Gelelektrophorese (trägerfreie isoelektrische Fokussierung - Rotofor / SDS-PAGE) ermöglichte eine umfangreiche Identifizierung von in rBCEC4 Zellen exprimierten Proteinen. Überraschenderweise konnten trotz der begrenzten Detergentienauswahl viele lipophile Proteine identifiziert und quantifiziert werden.

Systematische Fehler, wie z.B. durch ungenaue Mischung der Proben, sind in diesen Experimenten nach Abb. 20 von untergeordneter Bedeutung.

In Tab. 6 sind quantifizierte Proteine unterschiedlicher Lokalisation und Funktion angegeben, deren Expression mindestens um das Doppelte erhöht war. Wie schon früher gezeigt, wurden Stress-Proteine erhöht exprimiert (Haseloff 2006), wie auch Enzyme der Glycolyse mit erhöhter Aktivität gefunden. Für einige Proteine ist noch keine vermehrte Expression unter Hypoxie bekannt. Dies gilt für Farnesylpyrophosphat synthetase, ein in die Cholesterolsynthese involviertes Enzym, für ribosomenbindendes Protein 1, EMILIN 1 und Oligosaccharyltransferase, ein an der Proteinglycosylierung beteiligtes Enzym.

Einige der anderen stark heraufregulierten Proteine wurden schon im Zusammenhang mit zellulären Reaktionen auf Stress diskutiert, wobei für kein Protein eine erhöhte Expression in Gehirnkapillarendothelzellen unter diesen Bedingungen bis dato bekannt war. In Gehirndothelzellen wurde nach Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies eine erhöhte Expression von Peroxiredoxin 1 und in dessen Folge ein Schutz der Integrität der Endothelzellschicht nachgewiesen (Schreibelt 2007). Einige Isoformen des Annexin, im speziellen auch Annexin A2, binden pH-abhängig an Zellmembranen und können so im hypoxischen Zustand als pH-Sensor fungieren (Monastyrskaya 2008). Die

entsprechende mRNA von Annexin A2 und ERO1 (Endoplasmatisches Reticulum Oxidoreductin1) wurde in ischemisch behandeltem Cortex der Ratte erhöht exprimiert gefunden. Die erhöhte Expression von ERO1 ist konsistent mit der erhöhten Expression von Proteindisulfidisomerase (PDI) unserer vorhergehenden Untersuchung (Haseloff 2006), da ERO1 für die Reoxidation von reduzierter PDI erforderlich ist. Hypoxie induziert in Hepatozyten einen vorübergehenden Anstieg der Inosinkonzentration, die eine erhöhte Glycogenphosphorylaseaktivität nach sich zieht (Guinzberg 2006). Durch oxidative Umgebung wird Bleomycinhydrolase induziert, die in Neuronen als Marker für die Alzheimer-Krankheit gilt (Raina 1999). Collagen 1A1 wird in humanen Fibroblasten nach Hypoxie auf mRNA Ebene heraufreguliert, was in einer dreifach erhöhten Proteinkonzentration resultiert (Falanga 2002). Elongationsfaktor 1 (EF1) besteht aus 5 Untereinheiten (alpha, beta, delta und gamma) von denen die Untereinheit EF1 alpha nach radioaktiver Strahlung rund 6-fach erhöht exprimiert gefunden wurde (Eleuterio 2008), während sie in der chronisch-hypoxischen Niere herabreguliert nachgewiesen wurde (Son 2008). Während Hypoxie wird die Translation der mRNA durch Suppression verschiedener Schlüsselregulatoren, u.a. von Elongationsfaktor 2, unterdrückt (Liu 2006). Nach Wasserstoffperoxidbehandlung in humanen Zellen der Retina ist Tubulin alpha im Expressionsprofil erhöht (Paron 2004). Transgelin-2 scheint in der zellulären Differenzierung eine Rolle zu spielen (Hoffrogge 2006) wird allerdings auch als diagnostischer Marker für hepatozelluläre Karzinoma diskutiert (Shi 2005), Die Freisetzung von *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) im ischemischen Herzen zeigt protektive Effekte (Miller 2008), während andere Autoren (Hira 2005) über ungünstige Effekte durch MIF bei der Kanzerogenese durch pro-angiogenetische Aktivität berichten. In der schon erwähnten Arbeit (Paron 2004), in der humane epitheliale Linsenzellen mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden, ist auch Nucleophosmin rund 5-fach erhöht exprimiert beschrieben, des Weiteren führt die Exposition von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) mit oxidiertem LDL zur Unterdrückung der Zellproliferation was u.a. auf eine Modifikation von Nucleophosmin zurückzuführen ist (Kinumi 2005). Nach Ischämie-induziertem Nierenversagen werden erhöhte Level von Neural cell adhesion molecule gefunden (Kinumi 2005). Das Protein *150 kda oxygen-regulated protein* wird in Fibroblasten der Haut nach Hypoxie erhöht exprimiert (Boraldi 2007).

Die weitere Charakterisierung eines Proteines nach beobachteter Expressionserhöhung verdeutlicht die Grenzen des proteomischen Ansatzes. In rBCEC4 Zellen konnte GLUT1 nach Hypoxie mit einem stärkeren Signal der Immunfluoreszenz beobachtet werden, als unter normalen Bedingungen. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass sich

diese erhöhte Expression vermutlich nicht auf die funktionelle Ebene erstreckt, da die verstärkten Signale eher im zytoplasmatischen Raum, als an der Plasmamembran, in der Glucosetransporter üblicherweise funktionstüchtig lokalisiert sind, zu finden sind. Dies korrespondiert mit Daten, die an Zellkulturen von koronaren Endothelzellen gewonnen wurden, bei denen die für Glucosetransporter in intakten Endothelien häufige luminal / abluminale Lokalisation und die Nachbarschaft zu Zell-Zell-Kontakten fehlte (Gaudreault 2008). In humanen Adipocyten konnten nach Hypoxie erhöhte Werte für GLUT1 Genexpression, Proteinexpression und Glucosetransport nachgewiesen werden (Trayhurn 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass eine komplexe Proteinmischung nach metabolischer Markierung und Separation mittels gelfreier isoelektrischer Fokussierung und SDS-PAGE eine qualitative und quantitative massenspektrometrische Analyse von niedrig exprimierten Proteinen und lipophilen Proteinen gestattet. Dieser Ansatz kann auf andere Zelllinien und verschiedene Effektoren übertragen werden, sofern Expressionsniveaus von Proteinen zu untersuchen sind. Nach hypoxischer Behandlung von Gehirnkapillarendothelzellen wurden mehrere erhöht exprimierte Proteine nachgewiesen, von denen einige in der Literatur noch nicht im Zusammenhang mit Hypoxie beschrieben sind. Wie am Beispiel des Glucosetransporter 1 (GLUT1) demonstriert werden konnte, ist die Validierung der erhaltenen Daten von gravierender Bedeutung für die Übertragbarkeit der Daten der Proteinexpression auf die funktionale Ebene. Immunfluoreszenz von GLUT1 bestätigte eine erhöhte Expression dieses Proteins nach Hypoxie, das jedoch eine unphysiologische Lokalisation aufwies.

4.2 Einfluss von Cholesterolentzug auf *tight junction* Proteine

Während die oben diskutierte Kombination von modifizierter zweidimensionaler Auftrennung (trägerfreie isoelektrische Fokussierung / SDS Gel) und SILAC zur Quantifizierung der Expression von Proteinen unterschiedlichen subzellulären Ursprungs und verschiedener Funktionen angewandt wurde, liegt der Fokus hier auf der Charakterisierung funktioneller Einheiten innerhalb der Zelle - *tight junction* bzw. *membrane raft*.

Epitheliale Gewebe sind für die Abgrenzung von äusseren und inneren Körperoberflächen notwendig. Dabei übernehmen sie charakteristische Funktionen wie z. B. die Resorption von Nahrungsbestandteilen im Darmlumen oder den mechanischen Schutz

der Epidermis der Haut. Die auskleidenden Zellen des Herz-Kreislaufs und Lymphsystems werden als Endothelzellen bezeichnet. Ihre Funktion besteht in der Weiterleitung von Lymphe oder Blut und im Stoffaustausch mit umliegendem Gewebe. Das dichteste Epithel stellt das endotheliale Blutkapillarsystem im Gehirn dar. Grundlegender Bestandteil der Epithelien ist, neben den Epithelzellen selbst, der Verschluss des parazellulären Spaltes durch einen Gürtel um den apikalen Teil jeder einzelnen Epithelzelle. Auf molekularer Ebene ist hierfür der *tight junction* Proteinkomplex verantwortlich. Unter Einfluss von pathologischen Bedingungen kann die Effektivität der Barriere eingeschränkt sein, in dessen Folge beispielsweise durch das Endothel von Gehirnblutkapillaren der Eintritt von im Gehirn toxisch wirkenden Blutbestandteilen ermöglicht wird. Um diese Prozesse besser verstehen zu können ist die genaue Kenntnis der molekularen Zusammensetzung der *tight junction*, ihrer Regulation und die Verknüpfung zu weiteren Regulationsmechanismen notwendig.

Die im Jahr 1997 erstmals publizierte Hypothese der *lipid raft* bzw. *membrane raft* als frei diffusible, stabile, laterale Ansammlung von Sphingolipiden und Cholesterol stellt ein wichtiges Ordnungsprinzip für Biomembranen dar. Durch selektiven Ein-/Ausschluss von Proteinen fördern sie spezifische Interaktionen zwischen Proteinen z.B. als kurzzeitige Signalplattform oder zur Zusammenstellung von Proteinen zur Endo-/Exozytose (Hancock 2006). Bis dato war es nicht möglich, *lipid raft* Strukturen direkt in einer lebenden Zelle zu analysieren. Als indirekte Methode stehen für Untersuchungen zu Eigenschaften von *membrane raft* Modellmembranen zur Verfügung. In *membrane raft* inkorporierte Proteine sind durch ihre hydrophobe Lipidumgebung schlecht in milden Detergentien löslich. Dieses Kriterium kann für Studien zu enthaltenen Proteinen herangezogen werden, wobei sich als Standardpräparation die Extraktion mit 1 % Triton X 100 bei 4 °C und anschließender Flotation im Dichtegradienten etabliert hat (Simons 1997). Mehrere gedankliche Ansätze vereinigen sich mit diesem praktischen Vorgehen. Das Endprodukt dieser Präparation wird synonym als detergent-unlösliche Membranfraktion (*detergent resistant membrane fraction* – DRM) (Brown 1997) und cholesterol-angereicherte detergent-unlösliche Glycolipid angereicherte *raft* (*Cholesterol enriched detergent insoluble glycolipid raft* – DIG) (Nusrat 2000) bezeichnet.

Die Zerstörung von *lipid raft*, z.B. durch Cholesterolentzug, und die damit erzwungene Freisetzung integrierter Proteine ermöglicht die Untersuchung von Einzelkomponenten. Hierfür stehen Substanzen wie z.B. Methyl- β -cyclodextrin zur Verfügung (M β CD). M β CD setzt sich aus einem Ring aus sieben kondensierten methylierten Cyclopyranosemole-

Diskussion

külen zusammen, in dessen Mitte ein Cholesterolemolekül eingeschlossen werden kann. Wie gezeigt, wirkt es nicht toxisch auf NRC Zellen und ist neben Immunfluoreszenzuntersuchungen in Kombination mit *stable isotopic labelling with aminoacids in cell culture* (SILAC) für Studien einzelner Proteine nach Cholesterolentzug geeignet (Foster 2003).

Die Lokalisation von *tight junction* Proteinen in *membrane raft* steht in der Diskussion. *Tight junction* Proteine werden in DIG angereichert gefunden, und das Transmembranprotein Occludin wird in der intakten Zelle in Nachbarschaft zu Caveolin-1, einem in DIG enthaltenen Protein, detektiert (Nusrat 2000). Zur weiteren Aufklärung der molekularen Umgebung von *tight junction*, unter besonderer Berücksichtigung des Cholesterols, wurden NRC Zellen mit dem cholesterolbindenden Agens M β CD behandelt, und Untersuchungen zur Funktion der Zell-Zell-Kontakte und zur Lokalisation von *tight junction* Proteinen durchgeführt.

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) kann zu Messungen der Integrität einer Epithelschicht herangezogen werden. In NRC war nach Inkubation mit 2,5 mM EGTA eine Reduktion des TEER um 37 % zu beobachten, die auf die Lösung der calciumabhängigen Assoziation von Cadherinen zurückzuführen ist. Nach Inkubation mit 20 mM M β CD für 150 Minuten war eine Abnahme des TEER um 62 % zu beobachten. Diese Daten spiegeln den durch Cholesterolentzug nötigen Umbau der Proteine des Zell-Zell-Kontaktes wider. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Veränderung des TEER die Summe aus verschiedenen cholesterolabhängigen Umstrukturierungen innerhalb der Zelle darstellt. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die dem Adhärenzkomplex zugrunde liegenden Cadherine in Plasmamembranen mit *lipid raft* assoziiert sind, und dass sie nach Behandlung mit M β CD nicht mehr in DRM nachgewiesen werden können (Causeret 2005). Einige Connexine (Cx 32, Cx 36, Cx 43, Cx 46), Proteine der *gap junction*, assoziieren mit Caveolin enthaltenden *lipid raft* (Miceli 2001), andere sind ausgeschlossen (Cx26, Cx50) (Cascio 2005). Es wurden um Connexin 26 und Connexin 32 unterschiedliche Lipidumgebungen gefunden. Daraus ergeben sich möglicherweise wichtige funktionelle Konsequenzen, bei denen *rafts* für den Transport von Connexinkanälen zu *gap junction* nötig sein könnten (Locke 2005). Die Anpassung von *tight junction* an Cholesterolentzug mit M β CD wurde in mehreren Zelllinien beschrieben und wird im folgenden Abschnitt detailliert diskutiert (Lambert 2005; Lambert 2007; Lynch 2007). Des Weiteren hat der Cholesterolentzug Auswirkungen auf die physikalischen

Eigenschaften der Biomembran. Insbesondere ist eine erniedrigte Fluidität durch vermehrte Bildung von Abschnitten mit Gelphasen innerhalb der Membran und eine erhöhte Permeabilität zu beobachten. Eine Cholesterolsenkung mit M β CD inhibiert die clathrin-vermittelte Endozytose (Hancock 2006) sowie Exozytose (Salaun 2004). Übereinstimmend mit unserem Ergebnis wurde in MDCK II Zellen nach 2,5 h Inkubation mit 10 mM M β CD eine Reduktion des TEER um 65 % gemessen (Yu 2005). In CaCo2 Zellen wurde nach 3 h Inkubation mit 10 mM M β CD ein um 85 % gesunkener TEER detektiert (Lambert 2005).

Die Ergebnisse der TEER Messungen wurden im Hinblick auf einzelne Proteine der *tight junction* durch Immunoblot vertieft. Die Proteine Caveolin-1, Flotilin-1, Occludin und Claudin-3 wurden nach Cholesterolentzug mit M β CD mit verringerter Konzentration in DRM detektiert. Durch Kombination mit SILAC wurden quantitative Daten zur Verteilung von Claudin-4 und Claudin-7 erhalten. Claudin-4 wurde in DRM in der mit M β CD behandelten Gruppe $3,0 \pm 0,45$ fach niedriger detektiert, Claudin-7 $3,5 \pm 0,59$ -fach weniger.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Claudin-3, -4 und Occludin in CaCo2 Zellen nach Inkubation mit 5 mM M β CD in DRM nach TX100 Extraktion nicht mehr vorhanden sind. Claudin-1 verändert seine Verteilung nicht. Allerdings sind diese Proteine nicht mit Flotillin im Dichtegradienten lokalisiert, was bedeutet, dass sie in CaCo2 Zellen nicht in TX100 unlöslichen *lipid raft* lokalisiert sind, Cholesterol aber vermutlich einen stabilisierenden Effekt ausübt (Lambert 2005). Wird Lubrol WX verwendet, bleibt Claudin-1 auch bei Cholesterolentzug in DRM, während sich Claudin-3, -4, -7, Occludin und JAM A aus DRM verringern (Lambert 2007). Da bei diesem Experiment ein für DRM ungewöhnliches Detergens, Lubrol WX, zur Anwendung kam, ist die Vergleichbarkeit zu den vorher genannten Ergebnissen nicht gegeben (Lambert 2007). Aus Experimenten zum Einfluss unterschiedlicher Detergentien in Verbindung mit M β CD auf die Lokalisation im Dichtegradienten wurde geschlossen, dass einige transmembranale *tight junction* Proteine (Occludin, Claudin-2 und -3) in MDCK II Zellen in cholesterolreicher Umgebung vorliegen, und diese mit zytoplasmatischen gerüstbildenden Proteinen assoziiert sind. Andere *tight junction* Proteine wiederum (Claudin-1, -4 und -7) wirken nicht cholesterolbindend, scheinen aber in einem Komplex mit anderen cholesterolbindenden Proteinen assoziiert zu sein (Lynch 2007).

Eine (funktionale) Übereinstimmung des theoretischen Begriffes *membrane raft* und der praktischen Extraktion mit Detergentien wird noch diskutiert. (Lichtenberg 2005). Ein

Diskussion

Detergens wird, bei Kontakt mit einer natürlichen Biomembran, schnell in diese inkorporiert. Dieser, die Membranordnung störender Zusatz, kann durch einen unspezifischen Mechanismus die Bildung von Domänen begünstigen (Heerklotz 2002). Einzelne Proteine werden abhängig von ihren physikochemischen Eigenschaften partiell extrahiert. Auch die Temperaturabhängigkeit der Domänenbildung bzw. deren Extraktion muss berücksichtigt werden (Heerklotz 2002). Die asymmetrische Verteilung von Lipiden zwischen innerer und äußerer Lipidschicht der Biomembran trägt zur Komplexität der Solubilisierungsvorgänge bei (Munro 2003). Zur Vermeidung dieser komplexen Vorgänge wurde ein Protokoll zur detergensfreien Extraktion von *raft*-Strukturen entwickelt (Macdonald 2005).

Obwohl die Identifizierung von Proteinen in DRM keinen Beweis für die Lokalisation in *membrane raft* darstellt, kann dies als ein Hinweis auf eine mögliche Nachbarschaft innerhalb einer Zelle gewertet werden.

Immunfluoreszenzuntersuchungen an NRC zeigen für Claudin-3 und -4 nach 270 Minuten mit 20 mM M β CD ein unterbrochenes Plasmamembransignal. Es waren viele intrazelluläre Vesikel zu detektieren. Claudin-1 zeigt nach gleicher Behandlung kein Signal in der Plasmamembran und viele intrazelluläre Vesikel. In einer bereits erwähnten Publikation mit CaCo2 Zellen, wurde für Claudin-3, -4 und Occludin, nach Behandlung mit M β CD eine Verminderung des Signales in der Plasmamembran festgestellt, während Claudin-1 in der Plasmamembran unverändert bleibt - allerdings sind diese Proteine nicht in DRM mit 1% TX100 mit Flotillin kolokalisiert (Lambert 2005). Das bedeutet, dass die in diesen Zellen enthaltenen *tight junction* nicht in *lipid raft*, aber in einer cholesterolreichen Umgebung vorliegen.

Das zytosolische *tight junction* Protein ZO-1 zeigte erwartungsgemäß keine Veränderung in der Lokalisation nach Cholesterolentzug mit M β CD.

Ein Vergleich der oben genannten Ergebnisse wird durch die unterschiedliche Charakteristik der Zelllinien erschwert. Zum einen hat Spezies, Ursprungsorgan und Dedifferenzierungsstatus der Zellen einen Anteil am Expressionsmuster der verwendeten Zellen, zum anderen aber auch die Erkennung der exprimierten Proteine durch für diese Studien notwendige Antikörper. Beispielsweise wurde hier massenspektrometrisch eindeutig nachgewiesen, dass Claudin-4 in Cholangiocyten, den Gallenkapillaren bildenden Zellen in der Leber, exprimiert wird, obwohl bisher, nach immunologischen Untersuchungen,

davon ausgegangen wurde, dass Claudin-4 in Rattenleber nicht exprimiert wird (Rahner 2001).

Ob *tight junction* in *membrane raft* lokalisiert sind, konnte nicht abschließend geklärt werden. Da die Diskussion um Größe, Stabilität und ursächlichen Bildungsmechanismus von *membrane raft* noch offen lässt, wie Proteine darin organisiert sind, kann diese Frage vorläufig nur mithilfe von Hinweisen zu Cholesterolabhängigkeit und Lipidumgebung beantwortet werden. Es wurde eindeutig eine Cholesterolabhängigkeit der Lokalisation von Occludin, Claudin -1, -3, -4 und -7 in NRC nachgewiesen.

4.3 Identifizierung von Zell-Kontakt-Proteinen aus detergens-unlöslichen Membranfraktionen aus Rattenleber

Die dichte Verbindung zwischen interzellulären *tight junction* Komplexen kann durch ungerichtete Mechanismen (z.B. Ischämie, Trauma) geöffnet werden. Um diese Prozesse besser verstehen zu können, ist die genaue Kenntnis der molekularen Zusammensetzung der *tight junction*, ihrer Regulation und der Verknüpfung zu weiteren Regulationsmechanismen notwendig. Um die molekulare Zusammensetzung von *tight junction* Komplexen zu analysieren, wurden leistungsfähige Methoden der Proteomforschung angewandt.

Mehrere Protokolle zur Anreicherung von *tight junction* Proteinen aus unterschiedlichem biologischem Material wurden publiziert (Tsukita 1989; Hertzberg 1990). Sie basieren größtenteils auf der Extraktion einer detergens-unlöslichen Membranfraktion (DRM). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Präparationen mit drei verschiedenen Detergentien (DOC, NP40, TX100) aus Rattenleber durchgeführt, diese mit verschiedenen elektrophoretischen Methoden (zweidimensionale Gelelektrophorese - 2DE, 16-BAC/SDS-PAGE, SDS-PAGE) aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die identifizierten Proteine der drei unterschiedlichen Präparationen wurden untereinander verglichen und nach zellulärer Lokalisation und Funktion geordnet.

Mehrere der aus zweidimensionalen Gelen identifizierten Proteine aus der DOC DRM und NP40 DRM sind an wichtigen Stoffwechselforgängen der Leber beteiligt. Insbesondere Enzyme des Harnstoffzyklus (Carbamoylphosphat-Synthase, Argininosuccinatsynthase, Arginase 1) konnten mehrmals identifiziert werden. In diesem werden stickstoffhaltige Abbauprodukte des Organismus zu Ammoniak bzw. in über die Niere

Diskussion

ausscheidbaren Harnstoff umgewandelt. Da die identifizierten Enzyme nicht gemeinsam in einem organelltypischen Enzymkomplex, sondern in Mitochondrien (Carbamoylphosphat-Synthase) bzw. dem Zytosol (Argininosuccinatsynthase, Arginase 1) lokalisiert sind, kann davon ausgegangen werden, dass diese Proteine aufgrund ihrer hohen Konzentration in Hepatocyten als Verunreinigung in der Präparation zu finden waren. Desmoplakin 1, das in der DOC DRM, und *junction plakoglobin* (Desmoplakin 3), das in der NP40 DRM identifiziert wurde, repräsentieren identifizierte Proteine des Zell-Zell-Kontaktes. Beide sind membranassoziierte Proteine, die am Aufbau von Desmosomen beteiligt sind. Trotz der mit Immunoblot nachgewiesenen Anreicherung von *tight junction* Proteinen (Occludin, Claudin-3 und JAM-1) durch die Präparationen, war es aufgrund der hydrophoben Eigenschaften und des relativ geringen Expressionsniveaus dieser Proteine nicht möglich, diese auf einem zweidimensionalen Gel aufzutrennen und mit massenspektrometrischen Methoden zu identifizieren.

Bei eingehender Betrachtung der aus DRM identifizierten Proteine aus eindimensionalen Gelen fällt bei einigen Proteinen eine Beteiligung an leberspezifischen Vorgängen auf. Beispielsweise repräsentieren die zur ABC-Transporter Familie zählenden Proteine *canalicular multispecific organic anion transporter* (NP40, DOC und TX100 DRM) und *P-glycoprotein sister* (TX100 und DOC DRM) Proteine der hepatobiliären Exkretion organischer Anionen, während der leberexklusive *asialoglycoprotein receptor* (TX100 und DOC DRM) für die Aufnahme von Glycoproteinen aus dem Blutplasma verantwortlich ist. Auch unter den in ihrer Fülle im Anhang dargestellten detergens-unlöslichen Proteine, die nicht in/an Membranen lokalisiert sind, sind typische Vertreter leberspezifischer Stoffwechselwege zu finden. Es fallen z.B. die schon auf den 2DE-Gelen identifizierten Proteine Carbamoylphosphat Synthetase 1, Arginase (TX100 DRM und DOC DRM) und Argininosuccinatsynthase (DOC DRM und NP40 DRM) des Harnstoffcyclus auf.

Von besonderem Interesse hinsichtlich der Zielstellung war die Identifizierung bereits bekannter Proteine der Zell-Kontakt-Verbindungen, insbesondere der *tight junction*. In Abb. 34 sind diese Proteine den einzelnen Adhäsionskomplexen zugeordnet und farblich nach deren Identifikation in den einzelnen Präparationen dargestellt. Von den 1304 verschiedenen identifizierten Proteinen sind 10 direkt an *tight junction* lokalisiert bzw. interagieren mit *tight junction* Proteinen. Weitere 20 Proteine sind in weiteren Zell-Kontakt-Komplexen lokalisiert.

Während die Transmembranproteine der *tight junction* JAM und Claudin-3 und das *tight junction* assoziierte Protein ZO-1 in der DOC DRM und TX100 DRM gefunden wurden, konnten die Isoformen Claudin-1 und Claudin-14 in der TX100 DRM identifiziert werden. Cingulin, β -Catenin und α Aktinin, die als Verbindung zwischen den *tight junction* und dem Zytoskelett eine wichtige Funktion übernehmen, sind in allen drei Präparationen gefunden worden. Cadherin 1, α und β Catenin, und Plakoglobin sind als Proteine der Adhärenzverbindungen in allen drei Präparation identifiziert worden, während Vinculin in der DOC DRM und TX100 DRM, Afadin, Ponsin und p120 Catenin in der TX100 DRM

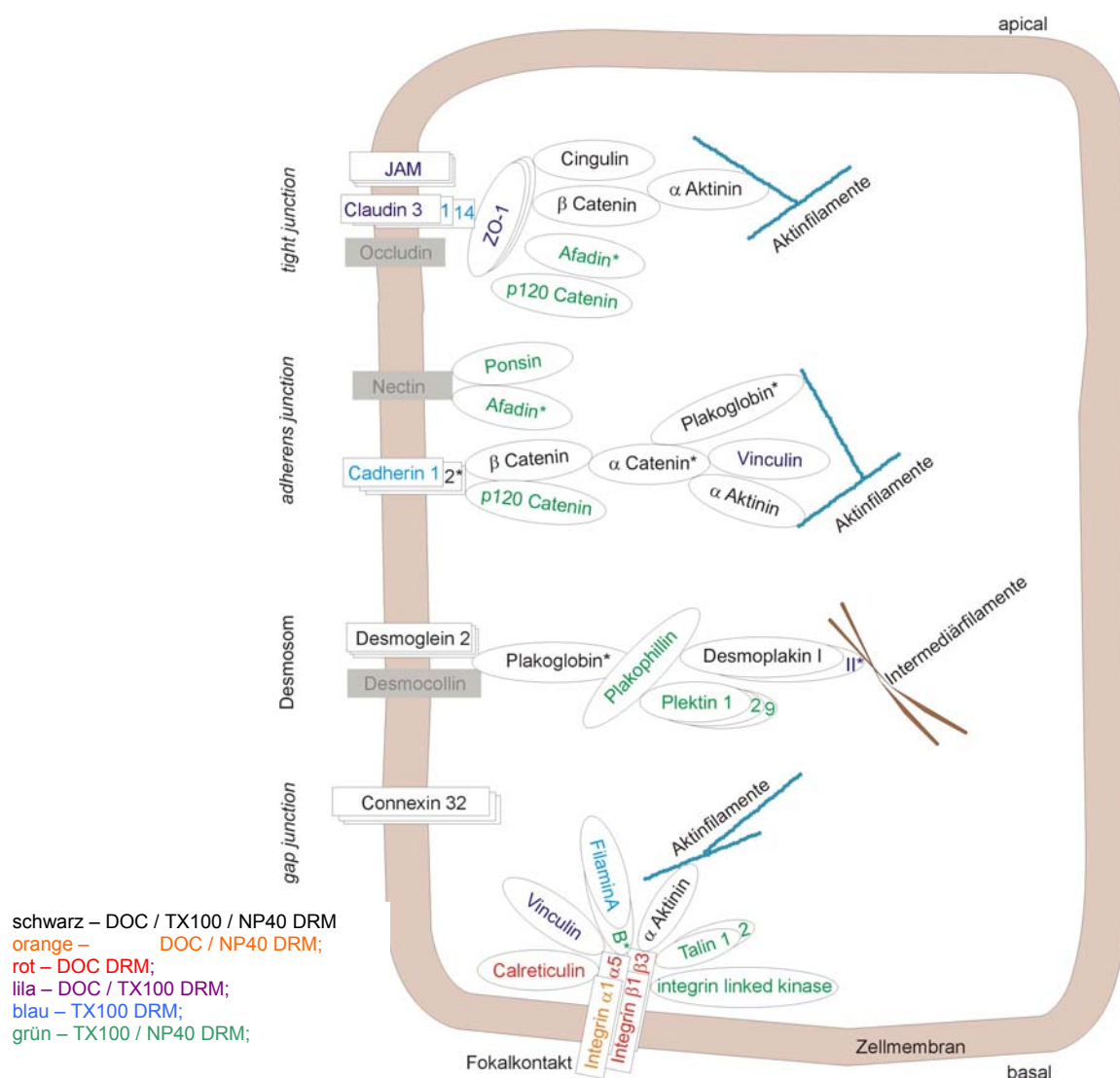


Abb. 34: Schematische Darstellung von identifizierten Proteinen des Zell-Zell-Kontaktes und assoziierter Proteine aus detergens-unlöslichen Fraktionen (DRM) der Rattenleber. Diese sind *tight junction*, *adherens junction*, Desmosom, *gap junction* und Fokalkontakt zugeordnet. Transmembranproteine sind im Rechteck, assoziierte Proteine im Oval dargestellt. Schattierungen deuten mehrere Isoformen eines Proteins an. Es wurden nur identifizierte Proteinisoformen bezeichnet. Grau unterlegte Proteine (Occludin, Nectin, Desmocollin) wurden nicht identifiziert, sind aber zur Vollständigkeit dargestellt. Die Schriftfarbe kodiert die Identifizierung in einzelnen DRM. Die mit *gekennzeichneten Proteine wurden mit verschiedenen Accessionnummern identifiziert.

Diskussion

und NP40 DRM und Cadherin 2 in der TX100 DRM auffindbar waren. Als Komponenten der Desmosomen wurden Desmoglein 2, Plakoglobin und Desmoplakin 2 in den drei Präparationen identifiziert. Plakophilin wurde in der TX100 DRM und NP40 DRM, Desmoplakin 1 in der DOC DRM und TX100 DRM gefunden. Als typischer Vertreter der *gap junction* in Hepatozyten wurde Connexin 32 identifiziert.

Neben schon erwähntem Vinculin und α -Aktinin wurden das Transmembranprotein Integrin- α 1 in den NP40 DRM und DOC DRM und Integrin- α 5, - β 1 und - β 3 in der DOC DRM als am Zell-Matrix-Kontakt beteiligtes Protein gefunden. Des Weiteren wurden hierzu gehörig Talin 1 und 2 sowie *Integrin linked kinase* und Filamin B in TX100 DRM und NP40 DRM, Filamin A in TX100 DRM und Calreticulin in DOC DRM gefunden. Die Transmembranproteine Occludin, Nectin und Desmocollin konnten nicht identifiziert werden.

Die bekannten *tight junction* Proteine sind in den untersuchten Fraktionen nur zum Teil identifiziert worden. Hierfür sind mehrere Gründe denkbar. Zum einen werden abhängig von Gewebe und Differenzierungsstatus nicht alle bekannten *tight junction* Proteine gleichzeitig exprimiert. In Hepatozyten wurde von den 21 bekannten Claudinen bis dato die Expression von Claudin-1, -2, -3, -5 und -14 nachgewiesen (Rahner 2001; Takakuwa 2002; Imamura 2007), von denen Claudin-1, -3, -14 in diesen Experimenten identifiziert werden konnte.

Weiterhin fallen Transmembranproteine und Proteine mit mehreren posttranslationalen Modifizierungen (z.B. Occludin, das mehrfach phosphoryliert vorliegen kann) durch eine geringe Anzahl an mit massenspektrometrischen Methoden detektierbaren Peptiden auf.

Tight junction Komplexe zeigen, verglichen mit anderen subzellulären Strukturen, keine ausreichende Stabilität in Hinsicht auf zusätzliche Reinigungsprozesse während der Präparation (Hertzberg 1990).

Die Detergentien DOC, NP40 und TX100 unterscheiden sich aufgrund ihrer chemischen Struktur im Solubilisierungsvermögen. In der Arbeit von Laura L.Mitic (Mitic 2003) wird die Extraktion verschiedener Detergentien auf überexprimiertes Claudin-4 aus Insektenzellen untersucht. Beispielsweise wird Mithilfe des ionischen Detergens DOC rund viermal mehr Claudin-4 solubilisiert, als vom nichtionischen Detergens TX100. Demzufolge steht in der TX100 unlöslichen Fraktion quantitativ mehr Claudin zur Identifizierung zur Verfügung. Diese Arbeit unterstützt die hier vorgestellten Ergebnisse. Während

Claudin-1, -3 und -14 in der TX100 DRM identifiziert werden konnten, konnte nur ein Claudin (Claudin-3) in der DOC DRM gefunden werden.

Die erfolgreiche Auftrennung und Identifizierung von *tight junction* Proteinen auf zweidimensionalen Gelen ist in der Publikation von Yamasaki (Yamasaki 2008) beschrieben. In dieser Arbeit wird aus Mäuseleber eine *junctional fraction* durch Dichtegradientenzentrifugation extrahiert. Es folgt eine Behandlung mit M β CD-haltiger Lösung, sowie mit Guanidin-haltigem Puffer. Die gewonnene *highly enriched junctional integral membrane protein fraction* wird mit 10 % iger NP40 Lösung behandelt, zentrifugiert und die NP40 lösliche Fraktion auf 2DE Gelen aufgetrennt. In 54 massenspektrometrisch analysierten Spots werden 36 *junctional integral membrane proteins (JMP)* identifiziert, von denen sechs Proteine (E-Cadherin, N-Cadherin, Nectin 2, necl 2, RPTP-K, CD81) in Adhärenzverbindungen lokalisiert sind. Aus *tight junction* wurden JAM1, Claudin-1 und Claudin-3, jedoch kein Occludin identifiziert. Ausserdem wurden die desmosomalen Proteine Desmoglein 2 und PERP, sowie das *gap junction membrane channel protein b1* gefunden. Es wurden 17 an JMP peripher assoziierte Proteine identifiziert, sowie sechs Proteine genannt, die bisher noch nicht beschrieben wurden und für die die Lokalisation an Adhärenzverbindungen nachgewiesen wurde. Mehrere Proteine aus unterschiedlichen Zell-Kontakt-Komplexen wurden übereinstimmend mit den Proteinen aus DRM identifiziert. Dies betrifft die *tight junction* Proteine JAM und Claudin-1 und Claudin-3, Desmoglein 2 und N-Cadherin sowie Catenin α 1. Des Weiteren wurde übereinstimmend mit den Ergebnissen aus DOC und TX100 DRM das am Vesikeltransport beteiligte Protein Syntaxin 4A identifiziert.

In der von Vivian W. Tang (Tang 2006) veröffentlichten Arbeit wurden nach Extraktion von T84 Zellen mit 2 % CHAPS und anschließender Inkubation mit Anti Proteinkinase C zeta Antikörpern die an Antikörper gebundenen Proteine mit massenspektrometrischen Methoden analysiert. Eine Analyse von unspezifisch bindenden Proteinen wurde nicht durchgeführt. Da Proteinkinase C zeta an *tight junction* lokalisiert ist und mit Signalmolekülen der *tight junction* interagiert, wurde davon ausgegangen, dass durch diese Vorgehensweise auch *tight junction* Proteine angereichert werden. Nach massenspektrometrischer Bestimmung wurden 912 Proteine identifiziert.

Die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen aus den DRM wird durch die unterschiedlichen Ursprungsorganismen (Mensch – Ratte) und Ursprungsorgane (Darm – Leber) der Zelllinien erschwert. Neun der 912 Proteine aus T84 Zellen wurden übereinstimmend mit identifizierten Proteinen aus DRM gefunden (siehe Tab. 18). Es ist auffällig, dass hierbei

Diskussion

Proteine des Zell-Zell-Kontaktes, nicht nur *tight junction* Proteine, im Vordergrund stehen.

Tab. 18: Aus DRM identifizierte Proteine (DRM ident), die auch in der Arbeit von V.Tang mit proteomischer Analyse von *tight junction* angereicherten Proben gefunden wurden (Tang ident).

Protein	Tang ident		DRM ident		Tx100 DRM	DOC DRM	NP40 DRM
	Spezies	SP Acc-nr.	Spezies	SP Acc-nr.			
Catenin δ -1	Homo sapiens	O60716	Mus musculus	P30999	x		x
α -actinin-4	Homo sapiens	O43707	Mus musculus	P57780	x	x	x
α -1 catenin (α E-catenin)	Homo sapiens	P35221	Homo sapiens	P35221	x	x	
Desmoplakin	Homo sapiens	P15924	Homo sapiens	P15924	x	x	
Desmoglein-2 [Precursor]	Homo sapiens	Q14126	Mus musculus	O55111	x	x	x
Vinculin	Homo sapiens	P18206	Homo sapiens	P18206	x	x	
Integrin α -1	Homo sapiens	P56199	Homo sapiens	P56199		x	x
Actin-binding LIM protein 1	Homo sapiens	O14639	Homo sapiens	O14639	x		
Dipeptidyl peptidase 4	Homo sapiens	P27487	Rattus norvegicus	P14740	x	x	

SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>

Dieser Eindruck setzt sich bei einem weiterführenden Vergleich fort. Einige Proteine gehören zu einer eng umrissenen Proteinfamilie, zu denen Mitglieder in den DRM-Fractionen sowie in der Arbeit von V. Tang identifiziert wurden. Dies gilt z.B. für Claudin-3 (DRM) und Claudin-16 (Tang), ZO-1 (DRM) und ZO-2 (Tang), JAM (DRM) und JAM-B (Tang), Plakophilin 2 (DRM) und Plakophilin 1, 3 (Tang), Connexin 32 (DRM) und Connexin 36 (Tang) sowie Annexin A2 (DRM) und Annexin A1, A5, A6, A11 (Tang). Da in der Arbeit von V. Tang eine große Anzahl an Proteinen mit einer Funktion an Synapsen gefunden wurde, wurde geschlossen, es könnte sich um eine funktionelle Einheit von *tight junction* und Synapsen (*zonapse*) handeln. Inwieweit das Auffinden einer großen Zahl von synaptisch aktiven Proteinen auf Interaktionen mit *tight junction* Proteinen zurückzuführen sind, und nicht auf Wechselwirkungen der Proteinkinase C zeta mit anderen Molekülkomplexen, wurde nicht erläutert. Im Hinblick auf synaptische Aktivität erscheinen zwei Proteine aus DRM erwähnenswert. In DOC und TX100 DRM wurde Syntaxin-4 identifiziert, ein Protein, das bei der Bindung von intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran benötigt wird. Das Protein *LIN7 homolog C* (DRM) liegt in epithelialen Zell-Zell-Kontakten und Synaptosomen angereichert vor, ist an der Ausbildung und Erhaltung der asymmetrischen Verteilung von Kanälen und Rezeptoren in polarisierten Zellen beteiligt und ein dreiteiliger Komplex aus LIN7 (A,B, oder C) mit CASK (bei Tang identifiziert) und APBA1 (nicht identifiziert) könnte für die Verbindung von Exozytose und Zelladhäsion im Gehirn verantwortlich sein (Butz 1998).

Das Ziel dieses Ansatzes war die Identifizierung von Proteinen, die eventuell in bisher unbekannter Weise am *tight junction* Komplex eine Rolle spielen. Proteine, zu denen die Datenlage einen Hinweis auf Interaktionen mit *tight junction* liefert, oder zu denen in üblichen Protein- und Literaturdatenbanken keine Informationen über deren Funktion bzw. Lokalisation verfügbar sind, sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Mehrere Proteine sind im Sinne der Zielstellung Kandidaten für weitere Untersuchungen zur Beteiligung an Aufbau und Funktion von *tight junction*.

Der Proteinname *Cingulin-like protein 1* wird synonym mit *Junction-associated coiled-coil protein* (JACOB) verwendet, und steht für ein Protein, zu dem es seit der ersten Beschreibung als ein den apikalen junctionalen Komplex mit dem Zytoskelett verbindendes Protein (Ohnishi 2004) keine weiteren Informationen gibt.

Dem Protein Calmin wird eine *high level homology* zu α -Actinin, β -Spectrin und Dystrophin zugeschrieben (Ishisaki 2001) und könnte eine Verbindung zu Aktinfilamenten darstellen (Simpson 2008). Calmin ist wahrscheinlich in die Entwicklung und Erhaltung neuronaler Funktionen involviert (Takaishi 2003).

Auch zu dem Protein *PREDICTED: similar to Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2* sind wenige Informationen über dessen mögliche Funktion publiziert. In Hepathocyten wird IQGAP1 im multifunktionalen gerüstbildenden Komplex mit β -Catenin, E-Cadherin und IQGP1 gefunden (Schmidt 2008). IQGAP2 ist erforderlich für die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion in Embryos von *Xenopus laevis* (Yamashiro 2007). Des Weiteren binden IQGAP Calmodulin und vernetzen F-actin (Stockinger 2006).

Das Protein ArgBP2 (*Sorbin and SH3 domain containing 2*) und die schon erwähnten Proteine Vinexin (*Sorbin and SH3 domain containing 3*) und Ponsin (*Sorbin and SH3 domain-containing protein 1*) zählen zur sogenannten SoHo-Familie, die sich durch N-terminale Sorbin-Homologie (SoHo) und drei C-terminale SH3 Domänen auszeichnet. Sie fungieren als zytoskelettale Adaptorproteine, die in die Modulierung von adhäsionsvermittelten Signalen und der Zellmigration involviert sind (Zhang 2006). Insbesondere ArgBP2 wird als Protein beschrieben, das das Gleichgewicht zwischen Adhäsion und Motilität durch Koordination der Funktionen von multiplen Signalwegen am Aktin-Zytoskelett aufrechterhält (Cestra 2005, Taieb 2008). ArgBP2 und Vinexin interagieren mit Flotillin und rekrutieren Signalproteine in *lipid raft* Microdomänen (Haglund 2004; Kimura 2001). Während für Vinexin und ArgBP2 keine Daten zu direkten Interaktionen

Diskussion

mit *tight junction* Proteinen vorliegen, wurde beschrieben, dass eine mögliche Bindung von Nectin zu ZO1 über Afadin, und nicht über Ponsin oder α Catenin geknüpft wird (Yokoyama 2001).

Tab. 19: Ausgewählte, in mindestens zwei DRM (DOC, TX100 bzw. NP40) identifizierte Proteine, für die aufgrund der Datenlage eine Beteiligung am *tight junction* Komplex denkbar ist.

Tx100 DRM	DOC DRM	NP40 DRM	NCBI Acc-nr.	Swissprot Acc-nr.	Proteinname NCBI / Swissprot	Funktion
x		x	gi 62653885	Q6AW69	PREDICTED: similar to junction-associated coiled-coil protein / Junction-associated coiled-coil protein b) =JACOB = Cingulin-like protein 1	Vermutlich in die Verankerung des apikalen junctionalen Komplex (besonders <i>tight junction</i>) zum Zytoskelett involviert (Ohnishi 2004)
X		X	gi 62651197	Q8C5W0	PREDICTED: similar to calmin δ / Calmin a)	Vermutlich in die Entwicklung und Erhaltung neuronaler Funktionen involviert (Takaishi 2003)
X		X	gi 63655455	Q3UQ44	PREDICTED: similar to Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	IQGAP2 ist erforderlich für die Cadherin-vermittelte Zell Zell Adhäsion in Embryos von <i>Xenopus laevis</i> (Yamashiro 2007) IQGAPs binden Calmodulin und vernetzen F-actin (Stockinger 2006)
x	x	x	16758606	O35413	Arg/Abl-interacting protein ArgBP2 / Sorbin and SH3-containing protein 2	kontrolliert das Gleichgewicht zwischen Zell-adhäsion und Motilität, kolokalisiert mit Aktin-Stress-Fibrillen, Zell-Adhäsionskomplexen und im Nucleolus (Cestra 2005)
X	X		gi 13592099	Q08850	syntaxin 4A	t-SNARE (Schlüsselfaktor für die Fusion von Plasmamembranen); involviert beim Andocken von synaptischen Vesikeln an presynaptisch aktive Zonen, Translokation von SLC2A4, vermittelt Internalisation von GLUT4 (Brandie 2008)
X	X		gi 57164107	Q5M949	NIPSNAP-related protein / Nipsnap homolog 3A	Möglicherweise eine Rolle beim vesikulären Transport (NIPSNAP4 liegt an Membranen assoziiert und teilweise in rafts vor) (Buechler 2004)
x	x		gi 19354269	Q9DD20	Mettl7b protein / Methyltransferase-like protein 7B	Möglicherweise Methyltransferaseaktivität; Lokalisation: ER membrane; Periphere Membran, Lipid Tröpfchen, konzentriert im perinucleären Bereich des ER und umgebenden Lipidtröpfchen (Turro 2006)
x	x		gi 187271	Q6NUK7	Lyn B protein	Tyr protein kinase family, SRC subfamily enthält SH2 und SH3 Domäne, LYN in DRM nachgewiesen (Nebi 2002)
x	x		gi 57921071	Q5HZA9	Similar to RIKEN cDNA 1810020E01 / Transmembrane protein 126A	-*
x	x		gi 13384870	Q9D8Y1	hypothetical protein LOC66271 / Transmembrane protein 126A	-*
	x	X	gi 33086486	Q7TP88	Ab1-219	-*
x	X		gi 62652504	Q8BG67	PREDICTED: similar to RIKEN cDNA C920006C10 / Protein EFR3 homolog A	In Plasmamembran lokalisiert (Munemoto 2004)

In der schon erwähnten Arbeit von Vivian W. Tang (Tang 2006) wird eine strukturelle / funktionelle Einheit von *tight junction* und Synapsen postuliert. Demzufolge sind auch Proteine für weitere Untersuchungen zu Interaktionen mit *tight junction* interessant, die

bekanntermaßen eine Rolle im Vesikulären Transport bzw. bei der Informationsübertragung über Synapsen spielen.

Das schon erwähnte Protein Syntaxin-4 kann als Markerprotein für ein basolaterales Plasmamembran Speicherkompartiment nicht mehr polarisierter Epithelzellen genutzt werden (Low 2000). Durch Calziumentzug werden *tight junction* und Adhärenzverbindungen internalisiert und können in frühen Endosomen nachgewiesen werden. Eine Kollokalisation von *tight junction* sowie Adhärenzproteinen mit Syntaxin-4 kann nach rund 60 Minuten in den basolateralen Speicherkompartimenten detektiert werden. Da bei normalen Calziumkonzentrationen wieder ein Einbau in Zell-Zell-Kontakte zu beobachten ist, ist eine Rolle von Syntaxin-4 bei intrazellulären Sortierprozessen von junctionalen Proteinen denkbar (Ivanov 2004).

Bisher sind fünf Publikationen zur NipSnap Familie erschienen. NipSnap 3 (hier wurde *NipSnap homolog 3A* identifiziert) und NipSnap 4 spielen mutmaßlich eine Rolle im vesikulären Verkehr der Zelle. Des Weiteren liegt NipSnap 4 assoziiert an Membranen bzw. lipid raft vor (Buechler 2004). Das Protein NipSnap 1 ist an Gedächtnisprozessen beteiligt und wird bei der erblichen Stoffwechselerkrankung Phenylketonurie neben anderen Transkripten auf mRNA-Ebene reduziert exprimiert (Surendran 2005).

Das Protein *methyltransferase-like protein 7B* liegt innerhalb der Zelle an Endoplasmatischem Reticulum, peripherer Membran und Lipidtröpfchen vor. Es wird synonym als *associated with lipid droplet Protein 1* bezeichnet. Dieser Name rührt von seiner möglichen Funktion als lipidtröpfchenbildendes Protein bei erhöhter Lipidkonzentration in der Zelle her (Turro 2006).

Die zur SRC Familie zählende Proteinkinase LYN B ist z.B. in die Signalübertragung bei Immunreaktionen involviert (Rivera 2008) und in DRM bzw. *lipid raft* lokalisiert (Nebl 2002).

Zu *Transmembrane protein 126A* und Ab1-219 sind trotz intensiver Literaturrecherche keine Informationen zu zellulärer Lokalisation oder Funktion verfügbar. Das Protein *EFR3 homolog A* ist bis dato Gegenstand einer Publikation (Munemoto 2004), in der das Protein als Membranprotein charakterisiert wird, und differentielle mRNA Expression in einem Teil der Medulla oblongata bei Mäusen mit einem Hörschaden beschrieben ist.

4.4 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der differentiellen Expression in Gehirnkapillarendothelzellen nach 24 Stunden Hypoxie beschriebene Methode der Kombination von Rotofor / SDS-PAGE mit anschließender massenspektrometrischer Analyse produzierte Rohdaten, aus denen nach Datenbankrecherche Proteine identifiziert und nach weiterer Bearbeitung quantifiziert wurden. Von den differentiell exprimierten Proteinen konnten, aus softwaretechnischen Gründen, nur solche mit einer erhöhten Expression ermittelt werden. Unter Verwendung einer geeigneten Software sollten die entsprechenden Datensätze nach erniedrigt exprimierten Proteinen durchsucht werden. Wie am Beispiel des Glucosetransporter Typ 1 (GLUT1) gezeigt, ist die erhöhte Expression eines Proteins nicht gleichbedeutend mit seiner erhöhten Aktivität. Die funktionelle Relevanz könnte durch Aktivitätsmessung und nach Untersuchung der subzellulären Lokalisation (z.B. mit Antikörpern durch Immunfluoreszenz) in Gehirnkapillarendothelzellen bewertet werden. Generell erwies sich die Kombination von trägerfreier isoelektrischer Fokussierung / SDS-PAGE mit SILAC als leistungsfähig und kann für andere Fragestellungen angewendet werden.

Bei der Analyse *tight junction* angereicherter Fraktionen wurden mehrere Proteine identifiziert, für die eine Beteiligung oder Interaktionen mit Zell-Zell-Kontakten möglich erscheinen. Nachweise zur zellulären Lokalisation dieser Proteine, im Besonderen zur Kollokalisation mit *tight junction* Proteinen sind für die weitere Bearbeitung von entscheidender Bedeutung.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt eine funktionelle Einheit dar, die zum einen die optimale Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen sicherstellt, andererseits das Gehirn u.a. durch dichte interzelluläre Verbindungen (z.B. *tight junction*) vor potentiell schädlichen Inhaltsstoffen des Blutes schützt. Pathologische Prozesse, wie z.B. Ischämie (Hypoxie), können die Funktionstüchtigkeit der BHS beeinträchtigen und somit eine Schädigung des Hirngewebes begünstigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ansätze aus der Proteomforschung verfolgt. Ein Schwerpunkt war die Untersuchung der differentiellen Proteinexpression in Gehirnkapillarendothelzellen nach 24 Stunden Hypoxie. Die im Rahmen dieser Fragestellung entwickelte Kombination von trägerfreier isoelektrischer Fokussierung (Rotofor / SDS-PAGE) mit *stable isotopic labeling with amino acids in cell culture* (SILAC) ermöglichte die Identifizierung und Quantifizierung der relativen Konzentration von sowohl niedrig exprimierten als auch lipophilen Proteinen. Unter den nach 24 Stunden Hypoxie erhöht exprimiert identifizierten Proteinen sind solche, die in die anaerobe Glycolyse, Redoxprozesse, sowie Proteinbiosynthese und -faltung involviert sind, aber auch Struktur- und Hitzeschockproteine. Einige Proteine (Farnesylpyrophosphatsynthetase, Ribosomenbindendes Protein 1, EMILIN 1, Oligosaccharyltransferase) sind in der Literatur noch nicht im Zusammenhang mit Hypoxie beschrieben.

Zur Untersuchung der molekularen Umgebung von *tight junction* wurde die Cholesterolabhängigkeit von *tight junction* Proteinen mithilfe von Cholesterolentzug durch Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) in normalen Rattencholangiocyten analysiert. Mit Immunfluoreszenz wurde eindeutig eine Cholesterolabhängigkeit der Lokalisation für Occludin, Claudin-1, -3, -4 und -7 in NRC nachgewiesen. Nach Cholesterolentzug mit MβCD wurden an einer Präparation von *membrane rafts* mittels SILAC quantitative Daten für Claudin-4 und -7 erhoben und so ein Hinweis für eine direkte Nachbarschaft von *tight junction* und *membrane raft* erhalten. Zur funktionellen Proteomanalyse der am *tight junction*-Komplex beteiligten Proteine wurden drei Präparationen zur Anreicherung von *tight junction* durchgeführt, die im Wesentlichen die Extraktion detergens-unlöslicher Fraktionen aus Rattenleber darstellen. Die Extrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (eindimensional - SDS-PAGE) und vollständig massenspektrometrisch analysiert. Neben bekannten

Zusammenfassung

tight junction Proteinen wurden auch solche identifiziert, die bisher in der Literatur nicht in Verbindung mit *tight junction* erwähnt wurden, für die aber nach Datenlage eine Beteiligung an diesem Komplex als möglich erscheint.

5.2 abstract

The Blood Brain Barrier (BBB) ensures the optimal maintenance of nutrients in brain and protects it against potentially toxic substances in blood by tight intercellular junctions (e.g., tight junctions). Pathological processes, such as ischemia (hypoxia) can lead to disturbances in the integrity of BBB and promote further impairment of brain.

In this work proteomic methods were used. The first part is aimed at analysing alterations in the protein expression of rat brain capillary endothelial cells cultured under hypoxic conditions for 24 hours. For this purpose, a modified two-dimensional electrophoresis technique was established which combines isoelectric focusing in the liquid phase (Rotofor) and SDS-PAGE with stable isotopic labeling by amino acids in cell culture (SILAC). This procedure enabled identification and quantification of low abundant and lipophilic proteins. In addition to general stress response, functions of proteins found up-regulated after 24 h hypoxia are related to glycolysis, redox activities, protein biosyntheses and –folding or cell structure. Some of the proteins (e.g., farnesyl pyrophosphate synthetase, ribosome binding protein 1, EMILIN 1, oligosaccharyl transferase) were not described in the context of hypoxia in literature so far. Two approaches were applied for studies concerning the molecular environment of tight junction. The determination of cholesterol dependence on localisation of tight junction proteins was accomplished by cholesterol depletion using methyl β cyclodextrin (M β CD) in normal rat cholangiocytes (NRC). The localisation of occludin, claudin-1, -3, -4, and -7 in NRC was found to depend on the presence of cholesterol. Cholesterol depletion by M β CD also enabled SILAC-based mass spectrometric quantification of claudin-4 and -7 in a membrane raft preparation obtained from NRC. Special emphasis was put on the proteomic analysis of tight junctions and proteins associated to the junctional complex. Three tight junction enriching preparations were analysed, basically consisting of detergent resistant membrane fractions from rat liver. The extracts were separated by gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the entity of proteins was identified by mass spectrometry.

6 Literatur

- Aboulaich,N., Vainonen,J.P., Stralfors,P., and Vener,A.V.; Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes; *Biochem. J.*; vol. 383; 2, 237-248, 2004
- Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., und Walter,P.; *Molekularbiologie der Zelle*; Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, 2003
- Anderson,R.G.W. and Jacobson,K.; Cell biology - A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains; *Science*; vol. 296; 5574, 1821-1825, 2002
- Arrate,M.P., Rodriguez,J.M., Tran,T.M., Brock,T.A., and Cunningham,S.A.; Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor; *J. Biol. Chem.* ; vol. 276; 49, 45826-45832, 2001
- Balda,M.S., Gonzalezmariscal,L., Contreras,R.G., Maciassilva,M., Torresmarquez,M.E., Sainz,J.A.G., and Cereijido,M.; Assembly and sealing of tight junctions - possible participation of G-proteins, phospholipase-C, protein-kinase-C and calmodulin; *J. Membr. Biol.*; vol. 122; 3, 193-202, 1991
- Ballabh,P., Braun,A., and Nedergaard,M.; The blood-brain barrier: an overview - Structure, regulation, and clinical implications; *Neurobiol. Dis.*; vol. 16; 1, 1-13, 2004
- Bernacki,J., Dobrowolska,A., Nierwinska,K., and Malecki,A.; Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier; *Pharmacol. Rep.*; vol. 60; 5, 600-622, 2008
- Bier,M.; Recycling isoelectric focusing and isotachopheresis; *Electrophoresis*; vol. 19; 1057-1063, 1998
- Blasig,I.E., Giese,H., Schroeter,M.L., Sporbert,A., Utepbergenov,D.I., Buchwalow,I.B., Neubert,K., Schonfelder,G., Freyer,D., Schimke,I., Siems,W.E., Paul,M., Haseloff,R.F., and Blasig,R.; *NO and oxyradical metabolism in new cell lines of rat brain capillary endothelial cells forming the blood-brain barrier; *Microvasc. Res.*; vol. 62; 2, 114-127, 2001
- Blasig,I.E., Winkler,L., Lassowski,B., Mueller,S.L., Zuleger,N., Krause,E., Krause,G., Gast,K., Kolbe,M., and Piontek,J.; On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins; *Cell. Mol. Life Sci.*; vol. 63; 4, 505-514, 2006
- Bode,H.P., Wang,L.F., Cassio,D., Leite,M.F., St Pierre,M.V., Hirata,K., Okazaki,K., Sears,M.L., Meda,P., Nathanson,M.H., and Dufour,J.F.; Expression and regulation of gap junctions in rat cholangiocytes; *Hepatology*; vol. 36; 3, 631-640, 2002
- Bolton,S.J., Anthony,D.C., and Perry,V.H.; Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo; *Neuroscience*; vol. 86; 4, 1245-1257, 1998
- Boraldi,F., Annovi,G., Carraro,F., Naldini,A., Tiozzo,R., Sommer,P., and Quaglino,D.; Hypoxia influences the cellular cross-talk of human dermal fibroblasts. A proteomic approach; *Biochim. Biophys. Acta*; vol. 1774; 11, 1402-1413, 2007
- Brandie,F.M., Aran,V., Verma,A., McNew,J.A., Bryant,N.J., and Gould,G.W.; Negative regulation of syntaxin4/SNAP-23/VAMP2-mediated membrane fusion by Munc18c in vitro; *PLoS.ONE.*; vol. 3; 12, e4074-2008
- Brown,D.A. and London,E.; Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes?; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; vol. 240; 1, 1-7, 1997

- Buechler,C., Bodzioch,M., Bared,S.M., Siguener,A., Boettcher,A., Lapicka-Bodzioch,K., Aslanidis,C., Duong,C.Q., Grandl,M., Langmann,T., Dembinska-Kiec,A., and Schmitz,G.; Expression pattern and raft association of NIPSNAP3 and NIPSNAP4, highly homologous proteins encoded by genes in close proximity to the ATP-binding cassette transporter A1; *Genomics*; vol. 83; 6, 1116-1124, 2004
- Butz,S., Okamoto,M., and Sudhof,T.C.; A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain; *Cell*; vol. 94; 6, 773-782, 1998
- Cao,P. and Stults,J.T.; Phosphopeptide analysis by on-line immobilized metal-ion affinity chromatography-capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; vol. 853; 1-2, 225-235, 1999
- Cascio,M.; Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels; *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*; vol. 1711; 2, 142-153, 2005
- Causeret,M., Taulet,N., Comunale,F., Favard,C., and Gauthier-Rouviere,C.; N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts; *Mol. Biol. Cell*; vol. 16; 5, 2168-2180, 2005
- Cestra,G., Toomre,D., Chang,S., and De Camilli,P.; The Abl/Arg substrate ArgBP2/nArgBP2 coordinates the function of multiple regulatory mechanisms converging on the actin cytoskeleton; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; vol. 102; 5, 1731-1736, 2005
- Cornford,E.M. and Cornford,M.E.; New systems for delivery of drugs to the brain in neurological disease; *Lancet Neurol.*; vol. 1; 5, 306-315, 2002
- Deduve,C., Berthet,J., and Beaufay,H.; Gradient centrifugation of cell particles - theory and applications; *Prog. Biophys. Mol. Biol.*; vol. 9; 325-8, 1959
- Dejana,E.; Endothelial cell-cell junctions: Happy together; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; vol. 5; 4, 261-270, 2004
- Ehrlich,P.; *Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus: eine farbenanalytische Studie*; Hrsg. Hirschwald, Berlin, Deutschland, 1885
- Elek,G. and Lapis,K.; A path or a new road in laboratory diagnostics? *Biological mass spectrometry: facts and perspectives*; *Pathol. Oncol. Res.*; vol. 12; 3, 178-183, 2006
- Eleuterio,E., Di Giuseppe,F., Sulpizio,M., di,G., V, Rapino,M., Cataldi,A., Di Ilio,C., and Angelucci,S.; Proteome analysis of X-ray irradiated human erythroleukemia cells; *Biochim. Biophys. Acta*; vol. 1784; 4, 611-620, 2008
- Falanga,V., Zhou,L., and Yufit,T.; Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1; *J. Cell Physiol*; vol. 191; 1, 42-50, 2002
- Fanning,A.S., Jameson,B.J., Jesaitis,L.A., and Anderson,J.M.; The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton; *J. Biol. Chem.*; vol. 273; 45, 29745-29753, 1998
- Farkas,E. and Luiten,P.G.M.; Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease; *Prog. Neurobiol.*; vol. 64; 6, 575-611, 2001
- Fenn,J.B., Mann,M., Meng,C.K., Wong,S.F., and Whitehouse,C.M.; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules; *Science*; vol. 246; 4926, 64-71, 1989
- Figeys,D., McBroom,L.D., and Moran,M.F.; Mass spectrometry for the study of protein-protein interactions; *Methods*; vol. 24; 3, 230-239, 2001

Literatur

- Fischer,S., Wobben,M., Marti,H.H., Renz,D., and Schaper,W.; Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1; *Microvasc. Res.*; vol. 63; 1, 70-80, 2002
- Forrest,J.C., Campbell,J.A., Schelling,P., Stehle,T., and Dermody,T.S.; Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1 - Implications for the mechanism of reovirus attachment; *J. Biol. Chem.*; vol. 278; 48, 48434-48444, 2003
- Foster,L.J., de Hoog,C.L., and Mann,M.; Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; vol. 100; 10, 5813-5818, 2003
- Furuse,M., Fujita,K., Hiiragi,T., Fujimoto,K., and Tsukita,S.; Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin; *J. Cell Biol.*; vol. 141; 7, 1539-1550, 1998
- Furuse,M., Sasaki,H., and Tsukita,S.; Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands; *J. Cell Biol.*; vol. 147; 4, 891-903, 1999
- Furuse,M. and Tsukita,S.; Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions; *J. Cell Biol.*; vol. 123; 6, Part 2, 1777-1788, 1993
- Gaudreault,N., Scriven,D.R., Laher,I., and Moore,E.D.; Subcellular characterization of glucose uptake in coronary endothelial cells; *Microvasc. Res.*; vol. 75; 1, 73-82, 2008
- Gebreselassie,D. and Bowen,W.D.; Sigma-2 receptors are specifically localized to lipid rafts in rat liver membranes; *Eur. J. Pharmacol.*; vol. 493; 1-3, 19-28, 2004
- Geng,M., Zhang,X., Bina,M., and Regnier,F.; Proteomics of glycoproteins based on affinity selection of glycopeptides from tryptic digests; *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*; vol. 752; 2, 293-306, 2001
- Gjedde,A.; Modulation of substrate transport to the brain; *Acta Neurol. Scand.*; vol. 67; 1, 3-25, 1983
- Guinzberg,R., Cortes,D., Diaz-Cruz,A., Riveros-Rosas,H., Villalobos-Molina,R., and Pina,E.; Inosine released after hypoxia activates hepatic glucose liberation through A3 adenosine receptors; *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*; vol. 290; 5, E940-E951, 2006
- Gumbiner,B., Lowenkopf,T., and Apatira,D.; Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein-Zo-1; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; vol. 88; 8, 3460-3464, 1991
- Gygi,S.P., Rist,B., Gerber,S.A., Turecek,F., Gelb,M.H., and Aebersold,R.; Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags; *Nat. Biotechnol.*; vol. 17; 10, 994-999, 1999
- Haglund,K., Ivankovic-Dikic,I., Shimokawa,N., Kruh,G.D., and Dikic,I.; Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites; *J. Cell Sci.*; vol. 117; 12, 2557-2568, 2004
- Hamazaki,Y., Itoh,M., Sasaki,H., Furuse,M., and Tsukita,S.; Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule; *J. Biol. Chem.*; vol. 277; 1, 455-461, 2002
- Hancock,J.F.; Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; vol. 7; 6, 456-462, 2006
- Hartinger,J., Stenius,K., Hogemann,D., and Jahn,R.; 16-BAC/SDS-PAGE: A two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins; *Anal. Biochem.*; vol. 240; 1, 126-133, 1996

- Haseloff,R.F., Krause,E., Bigl,M., Mikoteit,K., Stanimirovic,D., and Blasig,I.E.; Differential protein expression in brain capillary endothelial cells induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation; *Proteomics*; vol. 6; 6, 1803-1809, 2006
- Hatzfeld,M.; The armadillo family at structural proteins; *Int. Rev. Cytol.*; 186, 179-224, 1999
- Heerklotz,H.; Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures; *Biophys. J.*; vol. 83; 5, 2693-2701, 2002
- Herman,I.M., Newcomb,P.M., Coughlin,J.E., and Jacobson,S.; Characterization of microvascular cell-cultures from normotensive and hypertensive rat brains - pericyte-endothelial cell-interactions invitro; *Tissue Cell*; vol. 19; 2, 197-206, 1987
- Hertzberg,E.L. and Stevenson,B.R.; Isolation of intercellular junctions; *Cell-cell interactions - A practical approach*; 6, 111-125, IRL Press at Oxford University Press; Oxford, GB, 1990
- Hira,E., Ono,T., Dhar,D.K., El Assal,O.N., Hishikawa,Y., Yamanoi,A., and Nagasue,N.; Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma; *Cancer*; vol. 103; 3, 588-598, 2005
- Hirase,T., Staddon,J.M., Saitou,M., AndoAkatsuka,Y., Itoh,M., Furuse,M., Fujimoto,K., Tsukita,S., and Rubin,L.L.; Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells; *J. Cell Sci.*; vol. 110; 1603-1613, 1997
- Hoffrogge,R., Mikkat,S., Scharf,C., Beyer,S., Christoph,H., Pahnke,J., Mix,E., Berth,M., Uhrmacher,A., Zubrzycki,I.Z., Miljan,E., Volker,U., and Rolfs,A.; 2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM); *Proteomics.*; vol. 6; 6, 1833-1847, 2006
- Hubbard,A.L., Wall,D.A., and Ma,A.; Isolation of rat hepatocyte plasma membranes. 1.Presence of the three major domains; *J. Cell Biol.*; vol. 96; 217-229, 1983
- Huber,O.; Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease; *Cell. Mol. Life Sci.*; vol. 60; 9, 1872-1890, 2003
- Hunter,A.W., Barker,R.J., Zhu,C., and Gourdie,R.G.; Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion; *Mol. Biol. Cell*; vol. 16; 12, 5686-5698, 2005
- Hynes,R.O.; Integrins - Versatility, modulation, and signaling in cell-adhesion; *Cell*; vol. 69; 1, 11-25, 1992
- Imamura,M., Kojima,T., Lan,M., Son,S., Murata,M., Osanai,M., Chiba,H., Hirata,K., and Sawada,N.; Oncostatin M induces upregulation of claudin-2 in rodent hepatocytes coinciding with changes in morphology and function of tight junctions; *Exp. Cell Res.*; vol. 313; 9, 1951-1962, 2007
- Ishisaki,Z., Takaishi,M., Furuta,I., and Huh,N.; Calmin, a protein with calponin homology and transmembrane domains expressed in maturing spermatogenic cells; *Genomics*; vol. 74; 2, 172-179, 2001
- Itoh,M., Furuse,M., Morita,K., Kubota,K., Saitou,M., and Tsukita,S.; Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins; *J. Cell Biol.*; vol. 147; 6, 1351-1363, 1999
- Ivanov,A.I., Nusrat,A., and Parkos,C.A.; Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment; *Mol. Biol. Cell*; vol. 15; 1, 176-188, 2004
- Johnson-Leger,C., Aurrand-Lions,M., and Imhof,B.A.; The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair?; *J. Cell Sci.*; vol. 113; 6, 921-933, 2000

Literatur

- Kamiie,J., Ohtsuki,S., Iwase,R., Ohmine,K., Katsukura,Y., Yanai,K., Sekine,Y., Uchida,Y., Ito,S., and Terasaki,T.; Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria; *Pharm. Res.*; vol. 25; 6, 1469-1483, 2008
- Karas,M. and Hillenkamp,F.; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons; *Anal. Chem.*; vol. 60; 20, 2299-2301, 1988
- Kimura,A., Baumann,C.A., Chiang,S.H., and Saltiel,A.R.; The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; vol. 98; 16, 9098-9103, 2001
- Kinumi,T., Ogawa,Y., Kimata,J., Saito,Y., Yoshida,Y., and Niki,E.; Proteomic characterization of oxidative dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by exposure to oxidized LDL; *Free Radic.Res.*; vol. 39; 12, 1335-1344, 2005
- Klose,J. and Kobalz,U.; Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome; *Electrophoresis*; vol. 16; 6, 1034-1059, 1995
- Kostrewa,D., Brockhaus,M., D'Arcy,A., Dale,G.E., Nelboeck,P., Schmid,G., Mueller,F., Bazzoni,G., Dejana,E., Bartfai,T., Winkler,F.K., and Hennig,M.; X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif; *Embo J.*; vol. 20; 16, 4391-4398, 2001
- Krapfenbauer,K., Fountoulakis,M., and Lubec,G.; A rat brain protein expression map including cytosolic and enriched mitochondrial and microsomal fractions; *Electrophoresis*; vol. 24; 11, 1847-1870, 2003
- Krause,G., Winkler,L., Mueller,S.L., Haseloff,R.F., Piontek,J., and Blasig,I.E.; Structure and function of claudins; *Biochim. Biophys. Acta*; vol. 1778; 3, 631-645, 2008
- Kubota,K., Furuse,M., Sasaki,H., Sonoda,N., Fujita,K., Nagafuchi,A., and Tsukita,S.; Ca²⁺-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions; *Curr. Biol.*; vol. 9; 18, 1035-1038, 1999
- Kuhn,R. and Wagner,H.; Free flow electrophoresis as a method for the purification of enzymes from E. coli cell extract; *Electrophoresis*; vol. 10; 3, 165-172, 1989
- Kusumi,A. and Suzuki,K.; Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions; *Biochim. Biophys. Acta*; vol. 1746; 3, 234-251, 2005
- Laemmli,U.K.; Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4; *Nature*; vol. 227; 5259, 680-&, 1970
- Lamanna,J.C. and Harik,S.I.; Regional comparisons of brain glucose influx; *Brain Res.*; vol. 326; 2, 299-305, 1985
- Lambert,D., O'Neill,C.A., and Padfield,P.J.; Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins; *Biochem. J.*; vol. 387; 553-560, 2005
- Lambert,D., O'Neill,C.A., and Padfield,P.J.; Methyl-beta-cyclodextrin increases permeability of Caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions; *Cell Physiol. Biochem.*; vol. 20; 5, 495-506, 2007
- Leung,C.L., Green,K.J., and Liem,R.K.H.; Plakins: a family of versatile cytolinker proteins; *Trends Cell Biol.*; vol. 12; 1, 37-45, 2002
- Lichtenberg,D., Goni,F.M., and Heerklotz,H.; Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts; *Trends Biochem. Sci.*; vol. 30; 8, 430-436, 2005

- Liu, L., Cash, T.P., Jones, R.G., Keith, B., Thompson, C.B., and Simon, M.C.; Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth; *Mol. Cell*; vol. 21; 4, 521-531, 2006
- Locke, D., Liu, J., and Harris, A.L.; Lipid rafts prepared by different methods contain different connexin channels, but gap junctions are not lipid rafts; *Biochemistry*; vol. 44; 39, 13027-13042, 2005
- Low, S.H., Miura, M., Roche, P.A., Valdez, A.C., Mostov, K.E., and Weimbs, T.; Intracellular redirection of plasma membrane trafficking after loss of epithelial cell polarity; *Mol. Biol. Cell*; vol. 11; 9, 3045-3060, 2000
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.*; vol. 193; 1, 265-275, 1951
- Lutz, K.L. and Siahaan, T.J.; Molecular structure of the apical junction complex and its contribution to the paracellular barrier; *J. Pharm. Sci.*; vol. 86; 9, 977-984, 1997
- Lynch, R.D., Francis, S.A., McCarthy, K.M., Casas, E., Thiele, C., and Schneeberger, E.E.; Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin; *Exp. Cell Res.*; vol. 313; 12, 2597-2610, 2007
- Macdonald, J.L. and Pike, L.J.; A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts; *J Lipid Res.*; vol. 46; 5, 1061-1067, 2005
- Mark, K.S. and Davis, T.P.; Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation; *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; vol. 282; 4, H1485-H1494, 2002
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., and Dejana, E.; Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration; *J. Cell Biol.*; vol. 142; 1, 117-127, 1998
- Miceli, M.C., Moran, M., Chung, C.D., Patel, V.P., Low, T., and Zinnanti, W.; Co-stimulation and counter-stimulation: lipid raft clustering controls TCR signaling and functional outcomes; *Semin. Immunol.*; vol. 13; 2, 115-128, 2001
- Miller, E.J., Li, J., Leng, L., McDonald, C., Atsumi, T., Bucala, R., and Young, L.H.; Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart; *Nature*; vol. 451; 7178, 578-582, 2008
- Miller, G.; Drug targeting - Breaking down barriers; *Science*; vol. 297; 5584, 1116-1118, 2002
- Mirgorodskaya, O.A., Kozmin, Y.P., Titov, M.I., Korner, R., Sonksen, C.P., and Roepstorff, P.; Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; vol. 14; 14, 1226-1232, 2000
- Mitic, L.L., Unger, V.M., and Anderson, J.M.; Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4; *Protein Sci.*; vol. 12; 2, 218-227, 2003
- Mitic, L.L. and Vanitallie, C.M.; Occludin and claudins: transmembrane proteins of the tight junction; *Tight junctions*, 213-230, CRC, Boca Raton, FL, 2001
- Monastyrskaya, K., Tschumi, F., Babiychuk, E.B., Stroka, D., and Draeger, A.; Annexins sense changes in intracellular pH during hypoxia; *Biochem. J.*; vol. 409; 1, 65-75, 2008
- Munemoto, Y., Houtani, T., Kase, M., Sakuma, S., Baba, K., Yamashita, T., and Sugimoto, T.; Mouse homolog of KIAA0143 protein: hearing deficit induces specific changes of expression in auditory brainstem neurons; *Brain Res. Mol. Brain Res.*; vol. 128; 2, 131-140, 2004
- Munro, S.; Lipid rafts: Elusive or illusive?; *Cell*; vol. 115; 4, 377-388, 2003

Literatur

- Nebi, T., Pestonjamas, K.N., Leszyk, J.D., Crowley, J.L., Oh, S.W., and Luna, E.J.; Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes; *J. Biol. Chem.*; vol. 277; 45, 43399-43409, 2002
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.; Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250; *Electrophoresis*; vol. 9; 6, 255-262, 1988
- Neuwelt, E.A.; Mechanisms of disease: The blood-brain barrier; *Neurosurgery*; vol. 54; 1, 131-140, 2004
- Nusrat, A., Parkos, C.A., Verkade, P., Foley, C.S., Liang, T.W., Innis, W.W., Eastburn, K.K., and Madara, J.L.; Tight junctions are membrane microdomains; *J. Cell Sci.*; vol. 113; 10, 1771-1781, 2000
- O'Farrell, P.H.; High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins; *J. Biol. Chem.*; vol. 250; 10, 4007-4021, 1975
- Ohnishi, H., Nakahara, T., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Furuse, M.; JACOP, a novel plaque protein localizing at the apical junctional complex with sequence similarity to cingulin; *J. Biol. Chem.*; vol. 279; 44, 46014-46022, 2004
- Okada, Y., Copeland, B.R., Mori, E., Tung, M.M., Thomas, W.S., and Delzoppo, G.J.; P-Selectin and intercellular-adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion; *Stroke*; vol. 25; 1, 202-211, 1994
- Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., and Brown, W.J.; Large apparent work capability of blood-brain-barrier - study of mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of rat; *Ann. Neurol.*; vol. 1; 5, 409-417, 1977
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M.; Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics; *Mol. Cell Proteomics*; vol. 1; 5, 376-386, 2002
- Paron, I., D'Elia, A., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., D'Aurizio, F., Prescott, A., Damante, G., and Tell, G.; A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells; *Biochem. J.*; vol. 378; Pt 3, 929-937, 2004
- Pasquali, C., Fialka, I., and Huber, L.A.; Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins; *Electrophoresis*; vol. 18; 14, 2573-2581, 1997
- Pieper, R., Gatlin, C.L., Makusky, A.J., Russo, P.S., Schatz, C.R., Miller, S.S., Su, Q., McGrath, A.M., Estock, M.A., Parmar, P.P., Zhao, M., Huang, S.T., Zhou, J., Wang, F., Esquer-Blasco, R., Anderson, N.L., Taylor, J., and Steiner, S.; The human serum proteome: Display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins; *Proteomics*; vol. 3; 7, 1345-1364, 2003
- Pike, L.J.; Lipid rafts: heterogeneity on the high seas; *Biochem. J.*; vol. 378; 281-292, 2004
- Pike, L.J.; Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on lipid rafts and cell function; *J. Lipid Res.*; vol. 47; 7, 1597-1598, 2006
- Plateel, M., Teissier, E., and Cecchelli, R.; Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain; *J. Neurochem.*; vol. 68; 2, 874-877, 1997
- Rahner, C., Mitic, L.L., and Anderson, J.M.; Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut; *Gastroenterology*; vol. 120; 2, 411-422, 2001
- Raina, A.K., Takeda, A., Nunomura, A., Perry, G., and Smith, M.A.; Genetic evidence for oxidative stress in Alzheimer's disease; *Neuroreport*; vol. 10; 6, 1355-1357, 1999

- Rammensee,H.G.; Immunology - protein surgery; Nature; vol. 427; 6971, 203-204, 2004
- Reichert,M., Muller,T., and Hunziker,W.; The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells - Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling; J. Biol. Chem.; vol. 275; 13, 9492-9500, 2000
- Risau,W.; Mechanisms of angiogenesis; Nature; vol. 386; 6626, 671-674, 1997
- Rivera,J. and Olivera,A.; A current understanding of Fc epsilon RI-dependent mast cell activation; Curr. Allergy Asthma Rep.; vol. 8; 1, 14-20, 2008
- Ross,P.L., Huang,Y.N., Marchese,J.N., Williamson,B., Parker,K., Hattan,S., Khainovski,N., Pillai,S., Dey,S., Daniels,S., Purkayastha,S., Juhasz,P., Martin,S., Bartlet-Jones,M., He,F., Jacobson,A., and Pappin,D.J.; Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents; Mol. Cell Proteomics; vol. 3; 12, 1154-1169, 2004
- Rubin,L.L. and Staddon,J.M.; The cell biology of the blood-brain barrier; Annu. Rev. Neurosci.; vol. 22; 11-28, 1999
- Saitou,M., Furuse,M., Sasaki,H., Schulzke,J.D., Fromm,M., Takano,H., Noda,T., and Tsukita,S.; Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands; Mol. Biol. Cell; vol. 11; 12, 4131-4142, 2000
- Sakakibara,A., Furuse,M., Saitou,M., AndoAkatsuka,Y., and Tsukita,S.; Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation; J. Cell Biol.; vol. 137; 6, 1393-1401, 1997
- Salaun,C., James,D.J., and Chamberlain,L.H.; Lipid rafts and the regulation of exocytosis; Traffic; vol. 5; 4, 255-264, 2004
- Schmidt,V.A., Chiariello,C.S., Capilla,E., Miller,F., and Bahou,W.F.; Development of hepatocellular carcinoma in *Iqgap2*-deficient mice is IQGAP1 dependent; Mol. Cell Biol.; vol. 28; 5, 1489-1502, 2008
- Schneeberger,E.E. and Lynch,R.D.; The tight junction: a multifunctional complex; Am. J. Physiol., Cell Physiol.; vol. 286; 6, C1213-C1228, 2004
- Schreibelt,G., Kooij,G., Reijkerkerk,A., van Doorn,R., Gringhuis,S.I., van der,P.S., Weksler,B.B., Romero,I.A., Couraud,P.O., Piontek,J., Blasig,I.E., Dijkstra,C.D., Ronken,E., and de Vries,H.E.; Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling; FASEB J.; vol. 21; 13, 3666-3676, 2007
- Sedlakova,R., Shivers,R.R., and Del Maestro,R.F.; Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit; J. Submicrosc. Cytol. Pathol.; vol. 31; 1, 149-161, 1999
- Shi,Y.Y., Wang,H.C., Yin,Y.H., Sun,W.S., Li,Y., Zhang,C.Q., Wang,Y., Wang,S., and Chen,W.F.; Identification and analysis of tumour-associated antigens in hepatocellular carcinoma; Br. J. Cancer; vol. 92; 5, 929-934, 2005
- Simons,K. and Ikonen,E.; Functional rafts in cell membranes; Nature; vol. 387; 6633, 569-572, 1997
- Simpson,J.G. and Roberts,R.G.; Patterns of evolutionary conservation in the nesprin genes highlight probable functionally important protein domains and isoforms; Biochem. Soc. Trans.; vol. 36; Pt 6, 1359-1367, 2008
- Sobue,K., Yamamoto,N., Yoneda,K., Hodgson,M.E., Yamashiro,K., Tsuruoka,N., Tsuda,T., Katsuya,H., Miura,Y., Asai,K., and Kato,T.; Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors; Neurosci. Res.; vol. 35; 2, 155-164, 1999

Literatur

- Son,D., Kojima,I., Inagi,R., Matsumoto,M., Fujita,T., and Nangaku,M.; Chronic hypoxia aggravates renal injury via suppression of Cu/Zn-SOD: a proteomic analysis; *Am. J. Physiol Renal Physiol*; vol. 294; 1, F62-F72, 2008
- Stevenson,B.R., Siliciano,J.D., Mooseker,M.S., and Goodenough,D.A.; Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia; *J. Cell Biol.*; vol. 103; 755-766, 1986
- Stockinger,W., Zhang,S.C., Trivedi,V., Jarzylo,L.A., Shieh,E.C., Lane,W.S., Castoreno,A.B., and Nohturfft,A.; Differential requirements for actin polymerization, calmodulin, and Ca²⁺ define distinct stages of lysosome/phagosome targeting; *Mol. Biol. Cell*; vol. 17; 4, 1697-1710, 2006
- Stults,J.T. and Arnott,D.; *Proteomics*; 245-289, 2005
- Surendran,S., Tying,S.K., and Matalon,R.; Expression of calpastatin, minopontin, NIPSNAP1, rabaptin-5 and neuronatin in the phenylketonuria (PKU) mouse brain: possible role on cognitive defect seen in PKU; *Neurochem. Int.*; vol. 46; 8, 595-599, 2005
- Syed,S.E.H., Trinnaman,B., Martin,S., Major,S., Hutchinson,J., and Magee,A.I.; Molecular interactions between desmosomal cadherins; *Biochem. J.*; vol. 362; 317-327, 2002
- Taieb,D., Roignot,J., Andre,F., Garcia,S., Masson,B., Pierres,A., Iovanna,J.L., and Soubeyran,P.; ArgBP2-dependent signaling regulates pancreatic cell migration, adhesion, and tumorigenicity; *Cancer Res.*; vol. 68; 12, 4588-4596, 2008
- Takaishi,M., Ishisaki,Z., Yoshida,T., Takata,Y., and Huh,N.H.; Expression of calmin, a novel developmentally regulated brain protein with calponin-homology domains; *Brain Res. Mol. Brain Res.*; vol. 112; 1-2, 146-152, 2003
- Takakuwa,Y., Kokai,Y., Sasaki,K., Chiba,H., Tobioka,H., Mori,M., and Sawada,N.; Bile canalicular barrier function and expression of tight-junctional molecules in rat hepatocytes during common bile duct ligation; *Cell Tissue Res.*; vol. 307; 2, 181-189, 2002
- Tang,V.W.; Proteomic and bioinformatic analysis of epithelial tight junction reveals an unexpected cluster of synaptic molecules; *Biol. Direct.*; vol. 1; 37-2006
- Terpe,K.; Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; vol. 60; 5, 523-533, 2003
- Trayhurn,P., Wang,B., and Wood,I.S.; Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity?; *Br. J. Nutr.*; 1-9, 2008
- Tsukita,S.; Isolation of cell-to-cell adherens junctions from rat liver; *J Cell Biol*; vol. 108; 1, 31-41, 1989
- Turro,S., Ingelmo-Torres,M., Estanyol,J.M., Tebar,F., Fernandez,M.A., Albor,C.V., Gaus,K., Grewal,T., Enrich,C., and Pol,A.; Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets; *Traffic.*; vol. 7; 9, 1254-1269, 2006
- Valcu,C.M. and Schlink,K.; Reduction of proteins during sample preparation and two-dimensional gel electrophoresis of woody plant samples; *Proteomics.*; vol. 6; 5, 1599-1605, 2006
- Vroman,B. and LaRusso,N.F.; Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells; *Lab. Invest.*; vol. 74; 1, 303-313, 1996
- Wilkins,M.R., Sanchez,J.C., Gooley,A.A., Appel,R.D., Humphery-Smith,I., Hochstrasser,D.F., and Williams,K.L.; Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it; *Biotechnol. Genet. Eng Rev.*; vol. 13; 19-50, 1996

- Witt,K.A., Mark,K.S., Hom,S., and Davis,T.P.; Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression; *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; vol. 285; 6, H2820-H2831, 2003
- Wolburg,H. and Lippoldt,A.; Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation; *Vascul. Pharmacol.*; vol. 38; 6, 323-337, 2002
- Wolters,D.A., Washburn,M.P., and Yates,J.R., III; An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics; *Anal. Chem.*; vol. 73; 23, 5683-5690, 2001
- Xie,J., Marusich,M.F., Souda,P., Whitelegge,J., and Capaldi,R.A.; The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11; *FEBS Lett.*; vol. 581; 18, 3545-3549, 2007
- Yamazaki,Y., Okawa,K., Yano,T., Tsukita,S., and Tsukita,S.; Optimized proteomic analysis on gels of cell-cell adhering junctional membrane proteins; *Biochemistry*; vol. 47; 19, 5378-5386, 2008
- Yamashiro,S., Abe,H., and Mabuchi,I.; IQGAP2 is required for the cadherin-mediated cell-to-cell adhesion in *Xenopus laevis* embryos; *Dev. Biol.*; vol. 308; 2, 485-493, 2007
- Yokoyama,S., Tachibana,K., Nakanishi,H., Yamamoto,Y., Irie,K., Mandai,K., Nagafuchi,A., Monden,M., and Takai,Y.; alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin; *Mol. Biol. Cell*; vol. 12; 6, 1595-1609, 2001
- Young,P.P., Modur,V., Teleron,A.A., and Ladenson,J.H.; Enrichment of genes in the aortic intima that are associated with stratified epithelium: implications of underlying biomechanical and barrier properties of the arterial intima; *Circulation*; vol. 111; 18, 2382-2390, 2005
- Yu,A.S.L., McCarthy,K.M., Francis,S.A., McCormack,J.M., Lai,J., Rogers,R.A., Lynch,R.D., and Schneeberger,E.E.; Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells; *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*; vol. 288; 6, C1231-C1241, 2005
- Zhang,M., Liu,J., Cheng,A., Deyoung,S.M., Chen,X., Dold,L.H., and Saltiel,A.R.; CAP interacts with cytoskeletal proteins and regulates adhesion-mediated ERK activation and motility; *EMBO J.*; vol. 25; 22, 5284-5293, 2006

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

¹³ C ₆ Arginin	¹³ C markiertes Arginin
16-BAC	16-Benzyltrimethylhexadecylammoniumchlorid
2DE bzw. IEF/SDS	zweidimensionale Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
Acc-nr.	Zugangsnummer (<i>accession number</i>)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CBB-G-250	Coomassie Brilliant Blau G-250
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan- sulfonat)
Cx	Connexin
DIG	<i>cholesterol enriched detergent insoluble glycolipid raft</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DOC	Natriumdesoxycholat
DRM	detergenz-unlösliche Membranfraktion (<i>detergent resistant membrane fraction</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EMILIN	<i>elastin microfibril interface-located protein</i>
ESI	Electrospray Ionisation
GLUT	Glucose-transportierendes Protein
HAM's F12	Spezielles Nährmedium in der Zellkultur
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
ICAT	<i>isotope-coded affinity tag</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEF/SDS bzw. 2DE	zweidimensionalen Gelelektrophorese
ILK	<i>integrin linked kinase</i>
iTRAQ	<i>isotope-tagging for relative and absolute quantification</i>
JACOB	<i>junction-associated coiled-coil protein</i>
JAM	<i>junction adhesion molecule</i>
JMP	<i>junctional integral membrane proteins</i>
LC	Flüssigchromatographie
Ld	flüssig-ungeordneten Phase
lo	flüssig-geordnete Phase
MAGUK	membranassoziiertes Guanylkinaseähnliches Protein
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MeCN	Acetonitril
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
M α CD	Methyl- β -Cyclodextrin
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP40	Nonidet P 40
NRC	normale Rattencholangiocyten
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDZ	PSD-95/DLG/ZO-1-Domäne

rBCEC4	Gehirnkapillarendothelzellen
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	<i>stable isotopic labeling with amino acids in cell culture</i>
SP	Swissprot
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEER	trans-epithelialer elektrischer Widerstand
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TER	trans-endothelialer Widerstand
TFA	Trifluoressigsäure
Tm	Schmelztemperatur
TOF	time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX100	Triton X 100
XIC	<i>extracted ion current</i>
ZO	Zonula occludentes (Protein)

7.2 Tabellen

Tab. 20: Differentiell exprimierte Proteine aus rBCEC4 Zellen nach 24 h Hypoxie (Hypox) bzw. 24 h Hypoxie und nachfolgender Reoxygenierung für 24 h (Reox). Zu jedem Experiment wurden die quantitativen Daten (Spovolumen) mindestens drei Mal mithilfe des Programmes Phoretix erhoben und aus mindestens zwei verschiedenen 2DE-Gelen bestimmt. Ein Protein wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn sein Spotvolumen um mehr als 50 % zugenommen hat und die Standardabweichung ≤ 25 % beträgt.

Spot Nr.	Protein	SwissProt Acc.-nr.	Spotvolumen-Normoxie 1,0		Position im 2DE Gel pI/kDa (theoretische Werte ^{a)})	MS Sequenzbedeckung [%]
			Hypox	Reox		
1	Pyruvatkinase M2-isoenzym	P11981	3,2	1,7	5,3/69 (6,0/74)	53
2	Pyruvatkinase M2-isoenzym ^{d)}	P11981	3,4	3,0	5,0/53 (5,1/53)	29
3	α -Enolase	P04764	4,3	2,5	5,9/46 (6,2/47)	42
4	Phosphoglyceratkinase	P16617	3,7	2,9	6,6/38 (7,5/44)	57
5	Phosphoglyceratkinase ^{c)}	P16617	5,0	13,8	6,9/38 (7,5/44)	38
6	Fructosebiphosphataldolase A	P05064	3,0	1,6	8,5/38 (8,4/39)	22
7	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase	P16858	5,7	3,5	7,4/33 (8,5/36)	49
8	Lactatdehydrogenase, α -Kette	P04642	2,7	2,0	7,5/30 (8,5/36)	43
9	Phosphoglyceratmutase I	P18669	2,7	1,9	6,3/25 (6,7/29)	54
10	Triosephosphatisomerase	P60174	4,7	^{b)}	6,5/24 (6,5/27)	21 ^{f)}
11	Calreticulin ^{e)}	P19418	7,8	6,2	3,7/66 (4,3/48)	38
12	Calreticulin ^{c) e)}	P18418	1,7	^{b)}	3,8/62 (4,3/48)	16 ^{f)}
13	78 kDa Glucosereguliertes Protein ^{e)}	P07823	1,6	1,9	4,9/70 (5,1/72)	27
14	Proteinindisulfidomerase	P07237	1,7	0,4	4,8/55 (4,8/57)	25
15	Proteinindisulfidomerase A3 ^{e)}	P11598	1,8	^{b)}	5,7/55 (5,9/57)	31
16	Elongationsfaktor 1, α 1	P62630	2,8	1,7	10,5/45 (9,1/50)	24
17	47 kDa Hitzeschockprotein ^{e)}	P29457	2,6	1,7	8,8/41 (8,9/47)	28
18	Aconitase ^{e)}	Q9ER34	2,3	2,6	6,7/76 (7,9/85)	14 ^{f)}
19	Aconitase ^{e)}	Q9ER34	4,3	2,9	6,8/76 (7,9/85)	26
20	47 kDa Hitzeschockprotein ^{e)}	P19226	6,7	12,5	5,3/53 (5,9/61)	31
21	Aspartataminotransferase ^{d) e)}	P00507	7,4	6,8	10,2/36 (9,1/47)	53
22	75 kDa Glucosereguliertes Protein ^{e)}	P48721	^{b)}	2,3	5,3/69 (6,0/74)	17
23	Vimentin ^{c)}	P31000	2,6	2,3	5,0/53 (5,1/53)	40 ^{f)}
24	Vimentin ^{c)}	P31000	4,7	2,2	5,1/53 (5,1/53)	65
25	β Aktin ^{c)}	P60711	1,7	^{b)}	5,1/41 (5,3/42)	46
26	β Aktin ^{c)}	P60711	3,6	6,0	5,5/38 (5,3/42)	37
27	α Aktin	Q61275	1,9	7,1	5,5/39 (5,8/39)	23
28	γ Aktin	P63259	^{b)}	2,6	5,6/39 (5,3/42)	18 ^{f)}
29	γ Aktin ^{d)}	P63259	0,5	^{b)}	5,3/24 (5,3/42)	45
30	Tubulin β 1 Kette ^{d)}	P68371	0,4	1,6	8,1/34 (4,8/50)	47
31	Vimentin ^{d)}	P31000	0,1	0,2	4,5/34 (5,1/53)	27
32	β Aktin ^{d)}	P02570	0,5	^{b)}	5,3/26 (5,3/42)	35
33	Transketolase	P50137	15,0	16,2	6,7/63 (7,2/68)	17 ^{f)}

a)entsprechend zu <http://www.expasy.ch/>

b)unverändert im Gegensatz zu Kontrollbedingungen (Normoxie)

c)möglicherweise posttranslational modifiziert (PTM)

d)möglicherweise Degradationsprodukt

e)Vorläuferprotein (precursor)

f)Identität durch MS/MS bestätigt

Tab. 21: Identifizierte Proteine aus einem zweidimensionalen Gel (IEF/SDS) der DOC unlöslichen Membranfraktion, nach Spotnummern geordnet. In einigen Spots konnten mehrere Proteine identifiziert werden

Spot Nr.	Name NCBI / Name Swissprot *	NCBI Acc-nr.	Swissprot Acc-nr.	Mascot Proteinscore	Peptide ges. / Peptide ident.	Lok
1	fibrinogen B- β -chain	529586	P14480	254	7/5	EX
2	actin β	71620	P60711	217	5/3	ZP
3	arginase 1	8392920	P07824	153	3/3	ZP
	sorbitol dehydrogenase	8394334	P27867	57	2/2	ZP
4	triosephosphate isomerase 1	12621074	P48500	198	5/4	ZP
5	arginase 1	8392920	P07824	76	2/2	ZP
6	glutamate dehydrogenase 1	4885281	P00367	105	2/2	MP
7	peroxiredoxin 1	16923958	Q63716	264	6/6	ZP
8	immunoglobulin α -1 heavy chain constant region	184749	P01876	90	2/2	EX
9	electron transfer flavoprotein α -subunit	204070	P13803	343	7/5	MP
10	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]	730037	Q02253 ^{a)}	74	3/2	MP
11	arginase 1	8392920	P07824	205	8/3	ZP
12	dermcidin precursor	16751921	P81605	124	2/2	EX
	similar to Elongation factor Tu	20864488	Q8BFR5	54	2/1	MP
13	carbamoyl-phosphate synthetase 1	21361331	P07756	118	4/3	MP
14	procollagen, type I, α 2	16758080	P02466 ^{b)}	173	3/3	EX
15	procollagen, type I, α 2	16758080	P02466 ^{b)}	105	2/2	EX
16	procollagen, type I, α 2	16758080	P02466 ^{b)}	112	3/3	EX
17	collagen α 1	2894106	P02454	133	4/3	EX
18	esophagin	21702983	Q9UBC9	56	2/1	ZP
19	ATP synthase β subunit	179279	P06576	122	2/2	MM
20	betaine-homocysteine methyltransferase	13540663	O09171	178	4/3	ZP
21	chain A, rat liver F1-ATPase / ATP synthase subunit α	6729934	P15999	81	2/1	MM
22	chain A, rat liver F1-ATPase / ATP synthase subunit α	6729934	P15999	120	3/3	MM
	arginosuccinate synthetase	25453414	P09034	65	2/2	ZP
	arginase-1 (liver-type arginase)	114146	P07824	52	2/1	ZP
23	arginase 1	8392920	P07824	171	4/3	ZP
24	glutathione peroxidase	2654236	P04041	65	2/2	ZP
25	ATP synthase, H ⁺ transporting, mito. F0 complex, subunit d	9506411	P31399	86	2/1	MM
26	betaine-homocysteine methyltransferase	7709990	O09171	125	3/3	ZP
27	arginosuccinate synthetase	25453414	P09034	158	4/3	ZP
	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	18426866	P13437	61	2/1	MP
28	fumarate hydratase 1	8393358	P14408	79	4/1	MP ZP
29	carbamoyl-phosphate synthetase 1	8393186	P07756	66	2/2	MP
30	carbamoyl-phosphate synthetase 1	8393186	P07756	67	2/2	MP
31	desmoplakin I	2134996	P15924	222	6/4	PM

* nur bei abweichender Namensgebung

Sequenzhomologie zwischen den annotierten Proteinen der Datenbank NCBI mit denen der Datenbank Swissprot bei nicht weiter gekennzeichneten Proteinen $\geq 92\%$; a) Sequenzhomologie 81%; b) Sequenzhomologie 67%

Lok – Lokalisation; PM-Plasmamembran, ZP-Zytoplasma; MM-Mitochondriale Membran, MP-Mitochondriales Plasma, EX-Extrazelluläre Matrix

NCBI Version: 20030509 (1428067 sequences; 458894995 residues), SwissProt: Uniprot/Swissprot 7.03.2006, 211104 Einträge; Uniprot/TrEMBL 7.03.2006, 2638494 Einträge)

Anhang

Tab. 22: Identifizierte Proteine aus einem zweidimensionalen Gel (IEF/SDS) der NP-40 unlöslichen Membranfraktion, nach Spotnummern geordnet.

Spot Nr.	Name NCBI / Name Swissprot	NCBI Acc-nr.	Swissprot Acc-nr.	Score	Peptide ges./ ident.	Lok
1	protease, serine, 15 / Lon	19173766	Q924S5	75	3/1	MM
2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	23956316	Q8K009	357	7/4	ZP
3	snd1-pending protein / staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	13938020	Q78PY7	438	9/6	ZP; N
4	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	111430	P27653	451	9/7	ZP
5	aconitase	13242312	Q9ER34	298	7/5	MP
6	sarcosine dehydrogenase	25742657	Q64380	373	7/7	MP
7	sarcosine dehydrogenase	25742657	Q64380	279	6/6	MP
8	dimethylglycine dehydrogenase	20806145	Q63342	463	12/6	MP
9	dimethylglycine dehydrogenase	20806145	Q63342	354	9/4	MP
10	methylcrotonoyl-CoA carboxylase α chain	12276064	Q99MR8	198	4/3	MP
11	methylcrotonoyl-CoA carboxylase α chain	12276064	Q99MR8	154	3/1	MP
12	transitional endoplasmic reticulum ATPase / valosin-containing protein	400712	Q01853	76	2/1	ZP; N
13	transitional endoplasmic reticulum ATPase / valosin-containing protein	400712	Q01853	541	13/6	ZP; N
14	unnamed protein product / mitochondrial inner membrane protein (mitofilin)	26328849	Q8CAQ8 ^{a)}	331	7/5	MM
15	mitochondrial inner membrane protein (mitofilin)	516764	Q16891	184	4/4	MM
	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	128826	P28331	109	2/2	MM
16	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	25188204	Q8K1R3	123	3/2	MP
17	argininosuccinate synthase	68639	P14568	143	3/2	ZP
18	TNF receptor-associated protein 1	13385998	Q9CQN1	545	11/8	MP
19	TNF receptor-associated protein 1	13385998	Q9CQN1	323	6/5	MP
	junction plakoglobin, desmoplakin-3	130257	P14923	100	3/1	PM
20	propionyl CoA-carboxylase α -subunit	15667251	Q91ZA3	302	7/4	MP
	TNF receptor-associated protein 1	13385998	Q9CQN1	81	2/1	M
	long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	25742739	P18163	70	2/1	MM
21	unnamed protein product / mitochondrial inner membrane protein (mitofilin)	26328849	Q8CAQ8 ^{a)}	157	5/1	MM
22	cytosol aminopeptidase / leucine aminopeptidase	13161142	Q9CPY7	275	5/5	ZP
	ATP synthase α chain liver isoform	114511	P19482	167	3/2	MM
	glutamate dehydrogenase 1	118533	P00366	124	2/2	MP
23	propionyl coenzyme A carboxylase, β polypeptide	8393913	P07633	377	8/3	MP
	H ⁺ -transporting two-sector ATPase α chain	89589	P15999	280	5/5	MM
24	ATP synthase α chain	114523	P15999	1398	47/27	MM
25	protein disulfide-isomerase ER60 precursor	91897	P11598	736	18/1	ER
	Protein disulfide isomerase associated 3	13096984	Q99LF6	552	15/8	EX
26	KIAA0098 protein / T-complex protein 1 subunit epsilon	603955	P48643	165	5/1	ZP
27	KIAA0098 protein / T-complex protein 1 subunit epsilon	603955	P48643	165	5/1	ZP
28	farsla protein	13905140	Q922S1	157	4/3	ZP
	choline dehydrogenase	26986563	Q8BJ64	106	2/2	MP
	HMG CoA synthase	555835	P54869	74	2/2	MP
29	arginase-1 (type I arginase)	114146	P07824	223	6/4	ZP
	sorbitol dehydrogenase	2506157	P27867	213	5/3	ZP
	alcohol dehydrogenase 1 / α polypeptide ADH-like protein	9506375	Q8K571	104	3/1	ZP
30	unnamed protein product / 60 kDa heat shock protein	51452	P63039	378	10/4	MP
	H ⁺ -transporting two-sector ATPase β chain	92350	P10719	107	2/1	MM
31	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase / trifunctional enzyme α subunit	18677763	Q64428	633	16/9	MP
32	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase / trifunctional enzyme α subunit	18677763	Q64428	238 ¹⁾	6/3 ¹⁾	MP
33	BiP protein / 78 kDa glucose-regulated protein precursor / steroidogenesis-activator polypeptide	6470150	P11021	803 ¹⁾	13/10 ¹⁾	ER
34	similar to dnaK-type molecular chaperone hsp72-ps1 / heat shock 70 kDa protein 8	27691910	P63018 ^{a)}	557 ¹⁾	9/7 ¹⁾	ZP; N

35	solute carrier family 25, member 13 / calcium-binding mitochondrial carrier protein aralar 2	7657583	Q9QXX4	444 ¹⁾	9/8 ¹⁾	MM
36	MTHSP75	292059	P38646	613 ¹⁾	13/9 ¹⁾	MP
37	dihydrolipoamide S-succinyltransferase	21313536	Q9D2G2 ^{a)}	272 ¹⁾	7/4 ¹⁾	MP
38	similar to hypothetical protein MGC19039 / aldehyde dehydrogenase 1 family, L2.	27717833	Q8K009 ^{a)}	127	3/2	ZP

*bei abweichender Namensgebung

Sequenzhomologie zwischen den annotierten Proteinen der Datenbank NCBI mit denen der Datenbank Swissprot $\geq 90\%$;

a) Sequenzhomologie $90\% \geq x \geq 80\%$; b) Sequenzhomologie 77%

Score : Mascot Proteinscore ; Peptide ges: Anzahl der Identifizierten Peptide ; Peptide ident. – Anzahl der Peptide mit dem Peptidscore $>$ identity.

Lok – Lokalisation: ZP-Zytoplasma; PM-Plasmamembran, MM-Mitochondriale Membran; MP-Mitochondriales Plasma; ER-Endoplasmatisches Reticulum, N-Nucleus, EX-Extrazelluläre Matrix

NCBI Version: 20030509 (1428067 sequences; 458894995 residues) 1) 20070421 (4872416 sequences; 1684850502 residues)

SwissProt: Uniprot/Swissprot 7.03.2006, 211104 Einträge; Uniprot/TrEMBL 7.03.2006, 2638494 Einträge)

Tab. 23: In DOC DRM, TX100 DRM und NP40 DRM gemeinsam identifizierte Proteine, nach subzellulärer Lokalisation geordnet. Es ist Name und Accessionnummer (Acc-nr.) der Datenbanken NCBI* und SwissProt** (nach Sequenzrecherche [BLAST]) des identifizierten Proteins angegeben. Informationen zu Lokalisation aus SwissProt.

Name NCBI / SP	Acc-nr. NCBI	Acc-nr. SP	Lok
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	17105350	Q64591	MZ
5 nucleotidase	11024643	P21588	ZM
actin ¹⁾	3191	P02576	S
actinin α 4	11230802	P57780	K
α -spectrin 2	31543764	P16086	S
Arg/Abl-interacting protein ArgBP2 / sorbin and SH3-containing protein 2	16758606	O35413	K
ATP synthase α chain, mitochondrial precursor	114523	P15999	MM
ATP synthase γ -subunit	310190	P35435	MM
β -catenin ²⁾	479677	P26233	K
betaine-homocysteine methyltransferase	13540663	O09171	Z
canalicular multispecific organic anion transporter	1405353	Q63120	ZM
carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	8393186	P07756	MZ
carnitine/acylcarnitine carrier protein	1842211	P97521	MM
cell surface glycoprotein OX47 precursor - rat / basigin	111503	Q6GT74	ZM
chain B, crystal structure of a mammalian 2-cys peroxiredoxin, Hbp23 / peroxiredoxin 1	6435548	Q63716	Z
chain C, altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function / arginase 1	3212832	P07824	Z
cytokeratin 8 polypeptide ^{a)}	203734	Q10758	S
D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase	203921	P29147	MZ
elongation factor 1- α ³⁾	2313	P28295	Z
enoyl-coenzyme A, hydratase / 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	59809132	Q5EBD2	P
fibrinogen, β polypeptide	29789106	P14480	EX
fibrinogen, γ polypeptide	61098186	Q68FY3	EX
fibronectin 1	9506703	P04937	EX
γ non-muscle actin	1703	P29751	S
gap junction protein Cx32 - mouse	477928	P08033	K
glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase	56188	P04797	Z
GTP-binding protein Gh / tissue-type transglutaminase	743818	Q9WVJ6	Z
H ⁺ -exporting ATPase polypeptide IV, vacuolar - bovine	89602	P51863	V
HMG CoA synthase	555835	P54869	MZ
hydroxyacyl dehydrogenase, subunit B	19424338	Q60587	MZ
L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, short chain	17105336	Q9WVK7	MZ
membrane-bound aminopeptidase P	13560983	Q99MA2	ZM
mitochondrial carrier homolog 2	9790055	Q791V5	MM
MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2 / MOSC domain-containing protein 2	38511548	O88994	ZM
myosin, heavy polypeptide 9 ^{a)}	6981236	Q62812	S
Na,K-ATPase α -1 subunit	205632	P06685	ZM

Anhang

NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	53850628	Q66HF1	MM
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 α subcomplex subunit 9, mitochondrial [precursor] [fragment]	60688426	Q5BK63	MZ
non muscle caldesmon (L-caldesmon)	227429	Q62736	S
peroxiredoxin	2499472	Q91191	Z
peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	18959236	Q9WVK3	P
porin 31HM / voltage-dependent anion-selective channel protein 1	238427	P21796	ZM
PREDICTED: similar to Cgn protein / cingulin ^{a)}	62643870	P59242	K
PREDICTED: similar to collagen α 1 type VI-precursor ^{b)}	62665833	Q04857	EX
PREDICTED: similar to desmoglein 2 ^{b)}	62664095	O55111	K
PREDICTED: similar to elastin microfibril interfacer 1 ^{b)}	34863280	Q99K41	EX
PREDICTED: similar to heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan) [^{b)}	62649892	Q5VU27	EX
PREDICTED: similar to mitochondrial carrier homolog 2	62645378	Q791V5	MM
PREDICTED: similar to mitochondrial inner membrane protein (mitofilin) ^{a)}	62647466	Q8CAQ8	MM
prohibitin	13937353	P67779	MM
RB13-6 antigen	806379	P97675	ZM
Sec23 protein	1296664	Q15436	Z
solute carrier family 25, member 1 precursor	8394297	P32089	MM
spectrin β 2 ^{a)}	61557085	Q6XD99	S
trifunctional enzyme α subunit, mitochondrial precursor	2494234	Q64428	MZ
ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	51948476	Q68FY0	MZ
unnamed protein product / 2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial precursor	12832971	Q9CQ62	MZ
unnamed protein product / keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8)	52789	P11679	S
unnamed protein product / glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor	56198	P10860	MZ
unnamed protein product / malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	56643	P04636	MZ
unnamed protein product / UDP-glucuronosyltransferase 2B3 precursor	57449	P08542	M
unnamed protein product / uricase	57459	P09118	P
unnamed protein product / 60S acidic ribosomal protein P0 (L10E)	57708	P19945	R
unnamed protein product / 60S ribosomal protein L12.	57680	P23358	R
uricase precursor	207619	P09118	P

*NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>; ** SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>
ohne hochgestellten Buchstaben Sequenzhomologie 90-100%; a) Sequenzhomologie 80-90%; b) Sequenzhomologie 70-80%
Lok - Lokalisation; K - Zellkontakt; ZM - Zellmembran, Z – Zytosol; MM – Mitochondrienmembran; MZ - Mitochondrienmatrix;
S - Zytoskelett; P – Peroxisom; R – Ribosom; M – Microsom; V – Vakuole; E – extrazellulär;
das Protein wurde in der Datenbank aus 1) Physarum polycephalum; 2) Xenopus laevis; 3) Absidia glauca beschrieben.

Tab. 24: In DOC DRM und NP40 DRM gemeinsam identifizierte Proteine. Es ist Name und Accessionnummer (Acc-nr.) der Datenbanken NCBI* und SwissProt** (nach Sequenzrecherche [BLAST]) des identifizierten Proteins angegeben. Informationen zur Lokalisation aus SwissProt.

Name NCBI / SP	Acc-nr. NCBI	Acc-nr. SP	SH	Lok
2-oxoglutarate carrier	23844	Q02978	x	MM
Ab1-219	33086486	Q7TP88	96	nb
alcohol dehydrogenase / ADH-like protein	202727	Q8K571	92	Z
arginosuccinate synthetase	25453414	P09034	97	Z
ATP synthase β subunit	1374715	P10719	96	MM
B-cell receptor associated protein / prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein BAP37)	1673514	Q5XIH7	91	MM
B-cell receptor-associated protein 37 / prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein BAP37)	6671622	O35129	88	MM
calpactin I heavy chain / annexin A2	312253	Q07936	100	K
COII / Cytochrome c oxidase subunit 2	14144	P98049	x	MM
epoxide hydrolase 1, microsomal	6753762	P97869	100	M
integrin α -1 (laminin and collagen receptor) (VLA-1) (CD49a)	2829468	P56199	x	K
lactate dehydrogenase A	8393706	P04642	96	Z
LOC499991 protein / metalloredutase STEAP4	66911074	Q4V8K1	94	G
multifunctional β -oxidation protein 2, peroxisomal - rat / multifunctional protein 2	7514017	P70523	95	P
Na/K ATPase β subunit	54130	P14094	x	ZM
neural-cadherin precursor (N-cadherin) (cadherin-2)	115424	P15116	x	K
pro- α -2(I) collagen	5305687	P02466	67	EX
radixin (ESP10)	299787	P26043	79	ZM
repressor of estrogen receptor activity / prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein BAP37)	32700003	O35129	88	MM
rhodanese / thiosulfate sulfurtransferase	57069	P24329	x	MZ
unnamed protein product / elongation factor 1- α 1	31092	P68104	x	Z
unnamed protein product / cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	12833077	Q9DOM3	77	MZ
unnamed protein product ¹⁾ / Sodium/potassium-transporting ATPase α chain precursor	64400	P05025	x	ZM

*NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>; ** SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>

SH - Sequenzhomologie zwischen NCBI und Swissprot in %, x - Direktverweis von NCBI

Lok - Lokalisation; K - Zellkontakt; ZM - Zellmembran, Z - Zytosol; MM - Mitochondrienmembran; MZ - Mitochondrienmatrix; S - Zytoskelett; P - Peroxisom; R - Ribosom; M - Microsom; V - Vakuole; E - extrazellulär; G - Golgimembran; nb - nicht bekannt

das Protein wurde in der Datenbank aus 1) *Torpedo californica* beschrieben

Anhang

Tab. 25: In DOC DRM und TX100 DRM gemeinsam identifizierte Proteine. Es ist Name und Accessionnummer (Acc-nr.) der Datenbanken NCBI* und SwissProt** (nach Sequenzrecherche [BLAST]) des identifizierten Proteins angegeben. Informationen zu Lokalisation aus SwissProt.

Name NCBI / SP	Acc-nr. NCBI	Acc-nr. SP	SH	Lok
2-4-dienoyl-coenzyme A reductase 2, peroxisomal	25282441	Q9Z2M4	100	P
2-oxoglutarate carrier	11693170	P97700	100	MM
3-2 trans-enoyl-CoA isomerase	57333	P23965	x	MZ
Ab2-132 / glycine N-acyltransferase	33086562	Q7TP56	100	MZ
Ac1873	32264645	Q7TQ70	86	nb
acetyl-coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-coenzym / 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	18426866	P13437	96	MZ
acetyl-coenzyme A dehydrogenase, long-chain	6978431	P15650	100	MZ
actin 5 ¹⁾	67782283	Q4PKE5	100	S
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 / long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	25742739	P18163	96	MM
acyl-coenzyme A dehydrogenase, very long chain	6978435	P45953	95	MM
ADP,ATP carrier protein T2 / similar to solute carrier family 25 member 5 homolog; ADP/ATP translocase 2	423368	Q545A2	93	MM
ADP,ATP translocase / SLC25A5 protein; ADP/ATP translocase 2	339721	Q6NVC0	94	MM
ADP/ATP translocase 1 (adenine nucleotide translocator 1) (ANT 1) (ADP,ATP carrier protein 1)	399011	P02722	x	MM
ADP-ATP translocator ²⁾	15559050	Q95VX4	94	MM
aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2 / fatty aldehyde dehydrogenase	13929028	P30839	94	ER
aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (ALDH class 2) (ALDH1) (ALDH-E2)	3121992	P81178	x	MM
amine oxidase (flavin-containing) / amine oxidase B (MAO-B)	6981180	P19643	94	MM
amine oxidase (flavin-containing) A (monoamine oxidase type A) (MAO-A)	113979	P21396	x	MM
aminopeptidase M / aminopeptidase N (alanyl aminopeptidase)	601865	P15684	93	ZM
amyloid β -peptide binding protein; ERAB / 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	2961553	O70351	100	MZ
annexin A6	13994159	P48037	98	S
apoptosis-inducing factor / programmed cell death protein 8, mitochondrial precursor	21309907	Q9JM53	96	MZ
arginase / arginase-1	178995	P05089	99	Z
arginase 1	8392920	P07824	99	Z
asialoglycoprotein receptor / asialoglycoprotein receptor 1 (hepatic lectin 1)	202988	P02706	90	ZM
ATP dependent RNA helicase ³⁾ / putative ATP-dependent RNA helicase an3	65060	P24346	x	N
ATP synthase α chain liver isoform, mitochondrial precursor	114511	P19482	x	MM
ATP synthase γ chain, mitochondrial	728931	P35435	x	MZ
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b	39645769	P19511	100	MM
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	9506411	P31399	100	MZ
B-36 VDAC=36 kda voltage dependent anion channel / voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (outer mitochondrial membrane protein porin 2)	299036	P81155	99	MM
Ba1-651	33086632	Q7TP27	93	nb
bile acid-coenzyme A: amino acid N-acyltransferase	56789149	Q63276	96	P
butyryl Coenzyme A synthetase 1 / medium-chain acyl-CoA synthetase	16905127	Q91VA0	100	Z
CaBP1 / protein disulfide-isomerase A6 precursor (Calcium-binding protein 1)	488838	Q63081	x	ER
calcium-binding mitochondrial carrier protein aralar1 (mitochondrial aspartat	13124050	O75746		MM
carbaryl phosphate synthetase I	219553	P31327	97	MZ
carbonyl reductase 4	32141040	Q7TS56	94	Z
catalase	6978607	P04762	100	P
CD14 / monocyte differentiation antigen CD14 precursor	1262920	Q63691	94	ZM
chain Q, bovine cytochrome Bc1 complex with stigmatellin bound / cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	71042588	P00125	93	MZ
claudin 3	6753438	Q9Z0G9	76	K
Csa-19 / 60S ribosomal protein L10a	531171	P62907	92	R

Anhang

CTL target antigen / cystathionine γ -lyase	8393215	P18757	97	Z
cysteine-rich protein ⁴¹ / cysteine and glycine-rich protein 2	62714	Q05158	x	N
cytochrome P450 / cytochrome P450 2C11	203695	P08683	91	ER
cytochrome P450 IIA1 (hepatic steroid hydroxylase IIA1) gene	6978739	P11711	91	ER
cytochrome P450 IID protein / cytochrome P450 2D26	57812	P10634	x	ER
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	23463317	Q8VID1	95	P
desmoplakin I	1147813	P15924	89	K
dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	21313536	Q9D2G2	82	MZ
dimethylglycine dehydrogenase	56689	Q63342	x	MZ
dipeptidyl peptidase IV	203974	P14740	97	ZM
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 11 / DnaJ homolog subfamily C member 11	62650076	Q5U458	95	MZ
EFR3 homolog A	62652504	Q8BG67	96	ZM
electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase precursor	34419911	Q6UPE1	100	MM
electron-transfer-flavoprotein, β polypeptide	51948412	Q68FU3	95	MZ
enhancer protein / peroxiredoxin-1 (thioredoxin peroxidase 2)	440306	Q06830	97	Z
fatty acid binding / transport protein / platelet glycoprotein IV (CD36 antigen)	1083660	Q07969	96	ZM
fibrinogen α subunit	790486	P06399		EX
fructose-bisphosphate aldolase B (liver-type aldolase)	113612	P00884	x	Z
γ -fibrinogen	1183937	P02680	x	EX
glutamate oxaloacetate transaminase 2 / aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (transaminase A)	38197424	P00507	95	MZ
glutathione peroxidase I - rat	66313	P04041	99	Z
GTP cyclohydrolase 1	13242245	P22288	100	Z
GTP-binding regulatory protein Gi α -2 chain, fragments	89580	Q7M3G9	100	ZM
H(+)-transporting ATP synthase / ATP synthase α chain heart isoform, mitochondrial precursor	102	P19483	x	MM
hydroxy- δ -5-steroid dehydrogenase, 3 β - and steroid δ -isomerase / 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type III (progesterone reductase)	6981050	P27364	94	ER
hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 4 / peroxisomal multifunctional enzyme type II	13242303	P70540	93	P
hydroxysteroid 11- β dehydrogenase 1	8393570	P16232	99	ER
hypothetical protein LOC293949 / dihydrodipicolinate synthase-like, mitochondrial	34863072	Q9DCU9	95	MZ
isovaleryl coenzyme A dehydrogenase	6981112	P12007	100	MZ
junction adhesion molecule	5457119	Q9Y5B2	92	K
junction plakoglobin (desmoplakin III)	130257	P14923	x	K
lin-7 homolog C	11177888	Q79210	92	ZM
Lyn B protein	187271	Q6NUK7	100	nb
Mettl7b protein / methyltransferase-like protein 7B [precursor]	19354269	Q9DD20	100	ER
mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase / acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial precursor	220655	P17764	89	MZ
mitochondrial aconitase / aconitate hydratase	10637996	Q9ER34	x	MZ
mitochondrial ATP synthase, O subunit	20302061	Q06647	100	MZ
mitochondrial outer membrane protein MOM35 / probable mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog (translocase of outer membrane 40 kDa subunit homolog)	6650562	Q9QYA2	94	MM
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase β 1 subunit	6753138	P14094	91	ZM
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 β subcomplex, 10, 22kDa	73587329	Q3ZC99	90	MM
NADH dehydrogenase / NADH-ubiquinone oxidoreductase 18 kDa subunit, mitochondrial precursor	226	Q02375	x	MM
NADH dehydrogenase 1 α subcomplex 10-like protein	32996721	Q80WE0	96	MM
NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) 24K chain precursor / NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit, mitochondrial precursor	92528	P19234	99	MZ
NIPSNAP-related protein / Nipsnap homolog 3A	57164107	Q5M949	100	Z
non-metastatic cells 3, protein expressed in / nucleoside diphosphate kinase	16758266	Q99NI1	100	nb
nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8	47027434	Q5DRK1	100	ZM
peptidylprolyl isomerase B, 20.3K / cyclophilin B	2143900	P24368	93	ER
peroxiredoxin 3 / PRx III	11968132	Q9Z0V6	100	MZ
P-glycoprotein sister / bile salt export pump (ATP-binding cassette subfamily B member 11)	3273484	O70127	98	ZM

Anhang

PREDICTED: catenin, α 1	55624840	P35221	95	K
PREDICTED: similar to α 3 type VI collagen isoform 1 precursor / collagen α 3(VI) [precursor] [fragment]	62655388	Q9Z0I9	81	EX
PREDICTED: similar to CG6432-PA / acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial [precursor]	62652166	Q5REB8	88	MZ
PREDICTED: similar to citrin / calcium-binding mitochondrial carrier protein aralar2 (mitochondrial aspartate glutamate carrier 2) (solute carrier family 25 member 13)(citrin)	62646841	Q9QXX4	98	MM
PREDICTED: similar to coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain / coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial [precursor]	62646993	Q9CRB9	85	MZ
PREDICTED: similar to glutaryl-coenzyme A dehydrogenase / glutaryl-coenzyme A dehydrogenase	62665009	Q6P8N6	93	MZ
PREDICTED: similar to grp75 / stress-70 protein, mitochondrial precursor (75 kDa glucose-regulated protein)	62664205	P48721	94	MZ
PREDICTED: similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 β sub-complex 8 / NADH-ubiquinone oxidoreductase ASH1 subunit, mitochondrial precursor	62642368	Q9D6J5	93	MM
PREDICTED: similar to SLC25A5 protein / SLC25A5 protein, ADP/ATP translocase 2	51460683	Q6NVC0	91	MM
PREDICTED: similar to solute carrier family 25, member 5	62652442	Q545A2	85	MM
PREDICTED: similar to vinculin (metavinculin) / vinculin (metavinculin)	62661011	P18206	87	ZM
PREDICTED: similar to ZO-1 / tight junction protein ZO-1	62640685	P39447	85	K
procollagen, type IV, α 2 / collagen α -2 (IV) chain precursor	36031080	P08122	70	EX
protein disulfide isomerase associated 5	14318713	Q921X9	92	ER
putative progesterone binding protein / membrane associated progesterone receptor component 1	3127857	P70580	x	M
Radixin	6677699	Q3U111	79	ZM
retinol dehydrogenase type I / retinol dehydrogenase 3	841197	P50169	99	M
rieske Fe-S protein precursor / ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit, mitochondrial precursor (liver regeneration-related protein LRRGT00195)	206681	P20788	94	MM
sarcosine dehydrogenase	25742657	Q64380	99	MZ
SLC25A4 protein / SLC25A4 protein, ADP/ATP translocase 1	73587359	Q3ZC05	92	MM
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide) / calcium-binding mitochondrial carrier protein aralar2 (citrin)	7657583	Q9QXX4	100	MM
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, glutamate), member 22 / mitochondrial glutamate carrier 1	21311845	Q9D6M3	91	MM
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier) / phosphate carrier protein, mitochondrial precursor (PTP) (solute carrier family 25 member 3)	19526818	Q8VEM8	94	MM
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter / mitochondrial dicarboxylate carrier (solute carrier family 25, member 10)	19173788	O89035	100	MM
solute carrier organic anion transporter family, member 1a4	18777755	O35913	96	ZM
succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	18426858	Q920L2	97	MM
syntaxin 4A (placental)	13592099	Q08850	100	ZM
tight junction (zonula occludens) protein ZO-1	192938	Q07157	90	K
transglutaminase 2, C polypeptide	42476287	Q6P6R6	98	Z
transmembrane protein 126A / transmembrane protein 126A	13384870	Q9D8Y1	100	nb
transmembrane protein 126A	57921071	Q5HZA9	100	ZM
trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase / acyl-coenzyme A oxidase 2, peroxisomal	1684747	P97562	x	P
tumor rejection antigen gp96 / Endoplasmic precursor (94 kDa glucose-regulated protein)	6755863	P08113	89	ER
ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor / cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	418146	P32551	x	MM
unnamed protein product / lamin-A/C (70 kDa lamin)	34228	P02545	x	N
unnamed protein product / neural-cadherin precursor (N-cadherin)	34999	P19022	x	K
unnamed protein product / 60 kDa heat shock protein, mitochondrial [precursor]	51452	P63039	99	MZ
unnamed protein product / DnaJ homolog subfamily C member 11	26343261	Q5U458	96	MZ
unnamed protein product / ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial precursor	56662	P00481	x	MZ
vdac1-prov protein ³⁾	28302268	Q7ZWZ0	100	ZM

voltage dependent anion channel / voltage-dependent anion-selective channel protein 3	4558732	Q9R1Z0	100	MM
voltage-dependent anion channel 2	13786202	P81155	100	MM
voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1)	10720404	Q60932	x	MM

*NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>; ** SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>

SH - Sequenzhomologie zwischen NCBI und Swissprot in %, x - Direktverweis von NCBI

Lok - Lokalisation; K - Zellkontakt; ZM - Zellmembran, Z - Zytosol; MM - Mitochondrienmembran; MZ - Mitochondrienmatrix; S - Zytoskelett; P - Peroxisom; R - Ribosom; M - Microsom; E - extrazellulär; nb - nicht bekannt, ER - Endoplasmatisches Retikulum; N - Nucleus

das Protein wurde in der Datenbank aus 1) *Aedes aegypti*; 2) *Ethmostigmus rubripes*; 3) *Xenopus laevis*; 4) *Coturnix japonica* beschrieben

Tab. 26: In NP40 DRM und TX100 DRM gemeinsam identifizierte Proteine, nach subzellulärer Lokalisation geordnet. Es ist Name und Accessionnummer (Acc-nr.) der Datenbanken NCBI* und SwissProt** (nach Sequenzrecherche [BLAST]) des identifizierten Proteins angegeben. Informationen zu Lokalisation aus SwissProt.

Name NCBI / SP	Acc-nr. NCBI	Acc-nr. SP	SH	Lok
(R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase / D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor	177198	Q02338	96	MZ
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	37748456	Q64591	99	MZ
actin capping protein β subunit, isoform 2 / F-actin capping protein β subunit isoforms 1 and 2	468204	P14315	100	S
actin related protein 2/3 complex, subunit 2	23621467	Q3UA52	100	S
actin, cytoplasmic 1 (β -actin) (OICA1)	21263373	P79818	x	S
actin-binding double-zinc-finger protein / actin-binding LIM protein 1 (limatin)	2337952	Q14639	93	S
β -actin ¹⁾	33526989	Q7SZL6	100	S
brain β 3 spectrin / spectrin β chain, brain 2	3452553	Q9QWN8	92	S
capping protein (actin filament) muscle Z-line, α 2 / F-actin capping protein α -2 subunit	38322760	Q5DQJ3	95	S
capping protein, β 3 isoform / F-actin capping protein β subunit	1838956	P79136	x	S
catenin (cadherin-associated protein), α 1, 102kDa	55742755	Q5U302	95	K
c-Cbl associated protein CAP / sorbin and SH3 domain-containing protein 1 (ponsin) (c-Cbl-associated protein)	21745353	Q62417	95	ZM
CCT δ , δ subunit of the chaperonin containing TCP-1 (CCT) / T-complex protein 1 subunit δ	695625	P42932	x	Z
chaperonin containing TCP1, subunit 2 (β)	54400730	Q5XIM9	98	Z
chaperonin subunit 6a (ζ)	6753324	Q3TI05	95	Z
Cyp4a14 protein / Cytochrome P450 4A2 precursor	71051108	P20816	100	ER
cytochrome b(5)	209245	P00173	100	M
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	51948390	Q6AYS8	95	EX
Dsp predicted protein/ Dsp protein (fragment)	67678070	Q4QQR7	86	K
ferroxidase precursor / ceruloplasmin precursor	92233	P13635	99	EX
Hsd17b12 protein / estradiol 17- β -dehydrogenase 12	38494210	Q6P7R8	100	ER
hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 9 / oxidative 17 β hydroxysteroid dehydrogenase type 6	27545384	O54753	96	M
integrin linked kinase	6754342	O55222	100	K
IP3 receptor isoform 2	13022060	Q6W3E4	95	ER
junction plakoglobin	41529837	Q6P0K8	93	K
KIAA0115 / dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	473947	Q5VWA5	92	ER
kidney aminopeptidase M / aminopeptidase N	13591914	P15684	94	ZM
lactamase, β / serine β -lactamase-like protein LACTB	34864295	Q9EP89	84	MM
leucine rich repeat containing 59	19527026	Q922Q8	64	M
liver regeneration-related protein LRRG07	33187771	Q7TNW9	100	nb
myosin I myr 4 / myosin-VIIb	628012	Q99MZ6	74	S
myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle isoform 1	20137006	Q3UHU4	87	S
myosin-I, Myr 1b (alternatively spliced)	423916	Q05096	93	S
NADH-cytochrome b-5 reductase	203697	P20070	90	ER
p120 / catenin δ -1(cadherin-associated Src substrate)	53545	P30999	x	K

Anhang

plakoglobin / junction plakoglobin / desmoplakin III / γ catenin	1497985	P70565	93	K
plakophilin 2	21312960	Q9CQ73	96	K
plectin 1	40849886	Q6S3A5	79	K
plectin 1	13540714	P30427	80	K
plectin 1 isoform 1	41322904	Q6S394	78	K
plectin 2	40849888	Q6S3A4	79	K
plectin 9/ Plectin 1	40849902	Q6S3A5	79	K
PREDICTED: Bcl2-associated athanogene 3 (predicted) / Bcl2-associated athanogene 3 (predicted)	62641368	Q5U2U8	83	nb
PREDICTED: desmoplakin	63641940	P15924	83	K
PREDICTED: desmoplakin	55625836	P15924	86	K
PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S25 / 40S ribosomal protein S25	20846986	Q6Q311	57	R
PREDICTED: similar to acyl-coenzyme A dehydrogenase family, member 11 / acyl-CoA dehydrogenase family member 11	62654212	Q80XL6	91	nb
PREDICTED: similar to calmin δ / calmin	62651197	Q8C5W0	83	ZM
PREDICTED: similar to desmoplakin isoform II / DSP variant protein (fragment)	62663429	Q4LE79	84	K
PREDICTED: similar to epithelial protein lost in neoplasm (mEPLIN) / 7 LIM domain and actin-binding protein 1	62653066	Q9ERG0	83	S
PREDICTED: similar to junction-associated coiled-coil protein/ cingulin-like protein; junction-associated coiled-coil protein	62653885	Q6AW69	77	K
PREDICTED: similar to myosin-VIIb / myosin Id (myosin heavy chain myr 4)	62664168	Q63357	98	S
PREDICTED: similar to Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2 / Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2 homolog (fragment)	63655455	Q3UQ44	97	nb
PREDICTED: similar to talin 2 / talin-2 ²⁾	50752817	Q9Y4G6	83	K
ribosomal protein L7 / 60S ribosomal protein L7	206736	P05426	94	R
ribosomal protein S3, cytosolic / 40S ribosomal protein S3	70850	P62909	99	R
ribosomal protein S3a / 40S ribosomal protein S3a (V-fos transformation effector protein)	8394221	P49242	96	R
ribosomal protein S6	6601470	Q9PTD6	92	R
short-chain dehydrogenase/reductase 9 / 17- β hydroxysteroid dehydrogenase 13 precursor	57527356	Q5M875	100	EX
sorbin and SH3 domain containing 3	54114997	Q5XIL4	98	nb
spectrin β 2 isoform 2	7106421	Q9QWJ7	95	S
talin / talin-1	227256	P26039	91	K
talin / talin-1	4235275	Q9Y490	90	K
unnamed protein product / 40S ribosomal protein S2 (S4) (LLRep3 protein)	34392	P15880	x	R
unnamed protein product / actin-like protein 3	12835802	Q99JY9	99	Z
unnamed protein product / similar to mus musculus chaperonin subunit 2 (β)	7670405	Q9JJD8	97	Z
unnamed protein product / T-complex protein 1 subunit τ	12846632	P42932	97	Z
urate oxidase / uricase	56971244	P09118	100	P
vacuolar proton ATPase / vacuolar ATP synthase subunit E	313014	P36543	x	V

*NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>; ** SP - SwissProt - <http://www.expasy.org/sprot/>

SH - Sequenzhomologie zwischen NCBI und Swissprot in %, x - Direktverweis von NCBI

Lok - Lokalisation; K - Zellkontakt; ZM - Zellmembran, Z - Zytosol; MM - Mitochondrienmembran; MZ - Mitochondrienmatrix; S - Zytoskelett; P - Peroxisom; R - Ribosom; M - Microsom; E - extrazellulär; ER - Endoplasmatisches Retikulum; nb - nicht bekannt,

das Protein wurde in der Datenbank aus 1) *Monopterus albus*; 2) *Gallus gallus* beschrieben

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig, und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Hanau, den

Kerstin Sticha