

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
Direktor: Prof. Dr. Dr. Karl-Jürgen Wolf

Experimente zur Optimierung der Methodik der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doctor rerum medicarum
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Sandra Michaela Fuxius
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Andreas Baumgartner

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Schlüter

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 16. Oktober 2007

Ergebnisse!
Sie fragen mich, warum ich so viele
Ergebnisse habe?
Ich weiß tausend Dinge, die nicht funktionieren.

Thomas Alva Edison

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Fachbegriffe	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Protein und Proteomforschung – Allgemeines	1
1.2 Methoden der Proteomforschung	3
1.2.1 Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese	3
1.2.2 Eindimensionale (1D)-Gelelektrophorese	4
1.2.3 Massenspektrometrische Methoden zur Proteomanalyse („Shot-Gun“)	4
1.3 Probleme der 2D-Gelelektrophorese	5
1.3.1 Darstellung transmembraner Proteine (TMP)	5
1.3.2 Quantitativer Vergleich verschiedener Stichproben	11
1.3.2.1 Quantitativer, statistischer Vergleich der Proteine zweier Stichproben durch 2D-Gelelektrophorese	11
1.3.2.2 Quantitative Analyse mittels 2D-„Difference-gel-electrophoresis“ (DIGE)	13
1.3.2.3 Quantifizierung durch massenspektrometrische Methoden („Shot-Gun“)	13
2. Fragestellung	16

3. Material und Methoden	17
3.1 Materialien	17
3.1.1 Eigenkonstruktionen	19
3.2 Chemikalien und Reagenzien	20
3.3 Standardmethoden	22
3.3.1 Haltung der Tiere	22
3.3.2 Hirnpräparation	22
3.3.3 Subzelluläre Fraktionierung - Präparation der Synaptosomen	23
3.3.4 Extraktion und Solubilisierung von Proteinen aus Gehirngewebe	24
3.3.4.1 Extraktion und Solubilisierung von Proteinen ohne vorherige Anreicherung von Membranproteinen	24
3.3.4.2 Anreicherung von Membranproteinen durch „7 M Urea-Stripping“	25
3.3.4.3 Anreicherung von Membranproteinen durch „Na ₂ CO ₃ -Stripping“	26
3.3.5 Proteinbestimmung	26
3.3.6 Durchführung der zweidimensionalen (2D)-Gelelektrophorese	27
3.3.6.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	27
3.3.6.1.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) im pH-Bereich 4-7	27
3.3.6.1.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF) im pH-Bereich 6-11	28
3.3.6.2 Equilibrierung	29
3.3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
3.3.7 Durchführung der eindimensionalen (1D)-Gelelektrophorese	30
3.3.8 Färbung der Polyacrylamidgele	31
3.3.8.1 Herstellung des Fluoreszenzfarbstoffes und Färbung der Spotmuster	31
3.3.8.2 Coomassie (CCB)-Färbung von präparativen Polyacrylamidgelen für massenspektrometrische Untersuchungen	31

3.3.9	Visualisierung und Auswertung von fluoreszenzgefärbten Polyacrylamidgelen	31
3.3.10	Statistische Auswertungen	32
3.3.11	Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen	32
3.3.11.1	In-Gel-Verdau der Proteine	32
3.3.11.2	Identifizierung der Proteine durch MALDI-MS, MALDI-MS/MS	33
3.3.11.3	Identifizierung der Proteine durch LC/MALDI-MS/MS	33
3.4	Einzelne Experimente	34
3.4.1	Experimente zur verbesserten Darstellung transmembraner Proteine (TMP) aus den Synaptosomen des frontalen Kortex..	34
3.4.1.1	Darstellung im pH-Bereich 4-7 und 6-11 – <i>ohne</i> vorherige Anreicherung von Membranproteinen	34
3.4.1.2	Darstellung im pH-Bereich 4-7 und 6-11 – nach Anreicherung von Membranproteinen durch „7 M Urea-Stripping“	34
3.4.1.3	Darstellung im pH-Bereich 4-7 und 6-11 – nach Anreicherung von Membranproteinen durch „Na ₂ CO ₃ -Stripping	35
3.4.1.4	Darstellung von „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen mittels 1D-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	36
3.4.1.4.1	Effekte von Inkubationstemperatur und -zeit auf die Darstellung der Proteine	36
3.4.1.4.2	Effekte von Trifluoressigsäure (TFA) auf die Darstellung der Proteine	37
3.4.1.4.3	Extraktion der Proteine mit organischen Lösungsmitteln	37
3.4.1.5	Extraktion und Auftrennung der Proteine mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	38
3.4.2	Quantitative Untersuchungen	39

4. Ergebnisse	41
4.1 Experimente zur verbesserten Darstellung transmembraner Proteine (TMP) aus den Synaptosomen des frontalen Kortex	41
4.1.1 Experimente pH-Bereich 4-7	41
4.1.1.1 Darstellung synaptosomaler Proteine ohne Anreicherung transmembraner Proteine (TMP)	41
4.1.1.2 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „7 M Urea-Stripping“	42
4.1.1.3 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „Na ₂ CO ₃ -Stripping“	42
4.1.2 Experimente im pH-Bereich 6-11	44
4.1.2.1 Darstellung synaptosomaler Proteine ohne Anreicherung transmembraner Proteine (TMP)	44
4.1.2.2 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „7 M Urea-Stripping“	44
4.1.2.2.1 Extraktion mit verschiedenen Detergenzien	45
4.1.2.3 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „Na ₂ CO ₃ -Stripping“	47
4.1.2.3.1 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „Na ₂ CO ₃ -Stripping“ – <i>in-Gel-Rehydrierung</i>	49
4.1.3 Darstellung von „Na ₂ CO ₃ - gestrippten“ Synaptosomen mittels 1D-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	52
4.1.3.1 Effekte von Inkubationstemperatur und -zeit auf die Darstellung der Proteine	54
4.1.3.2 Effekte von Trifluoressigsäure (TFA) auf die Darstellung der Proteine	55
4.1.3.3 Extraktion der Proteine mit organischen Lösungsmitteln	56
4.1.4 Extraktion und Auftrennung der Proteine mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	58
4.2 Experimente zur Erhöhung der Validität quantitativer Gruppenvergleiche	60

5. Diskussion und Ausblick	71
5.1 Experiment zur verbesserten Darstellung transmembraner Proteine (TMP)	71
5.2 Quantitative Gruppenvergleiche des durch 2D-Gelelektrophorese dargestellten Proteoms	79
6. Zusammenfassung	85
7. Literaturverzeichnis	86

Erklärung

Lebenslauf

Publikationsliste

Danksagung

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
ASB-14	Amidosulfobetain-14
CBB	Coommassie Brilliant Blue
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamino]-Propansulfat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CV	Variationskoeffizient
DDM	Dodecylmaltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
g	Gramm
h	Stunde(n)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobiline pH-Gradienten
l	Liter
LC	Liquid Chromatography
Lut GD 70	Lutensol GD 70
M	Mol pro Liter
m	milli
m	Meter
MALDI	Matrix-assisted laser/desorbtion ionisation
MEK	Methylethylketon
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
OGP	Octyl-β-D-glucoopyranosid
P	Pellet
p	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMF	Peptide Mass Fingerprint
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SN	Überstand
TBP	Tributylphosphin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

TFA	Trifluoressigsäure
TGS	Tris-Glycin-SDS
TMH	transmembrane Helices (transmembrane Domänen)
TMP	transmembrane Proteine
TOF	Time of Flight
U	Unit
UV	Ultraviolett
x g	x Erdbeschleunigung
ZW 3-10	Zwittergent 3-10

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	In Eigenkonstruktion entwickelte Apparaturen	19
Abb. 2	Flussdiagramm der Extraktion und Solubilisierung der Gesamtproteine SN für eine Auftrennung im pH-Bereich 4-7 und 6-11	25
Abb. 3:	2D-Gelbilder der Auftrennung von Synaptosomen des frontalen Kortex ohne vorherige Anreicherung von Membranproteinen, nach „7 M Urea-Stripping“ und „Na ₂ CO ₃ -Stripping“ im pH-Bereich 4-7	43
Abb. 4:	2D-Gelbilder von „7 M Urea-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex im pH-Bereich 6-11 extrahiert mit verschiedenen Detergenzien	46
Abb. 5:	2D-Gelbilder der Auftrennung von Synaptosomen des frontalen Kortex ohne vorherige Anreicherung von Membranproteinen, nach „7 M Urea-Stripping“ und „Na ₂ CO ₃ -Stripping“ im pH-Bereich 6-11	48
Abb. 6:	2D-Gelbilder von Gelgruppen, welche mit 200 µg bzw. 700 µg Protein aus den „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen im pH-Bereich 6-11 (<i>in-Gel-Rehydrierung</i>) beladen wurden	49
Abb. 7:	IPG-Streifen der Fokussierung von 700 µg Protein aus „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen und 700 µg Homogenat des frontalen Kortex	50
Abb. 8:	1D-Gelbilder von Homogenat, Synaptosomen und „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex	53
Abb. 9:	1D-Gelbild von Homogenat, Synaptosomen und „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex nach Inkubation in 1D-Ladepuffer für 5 min, 1 h, 4 h bzw. 24 h bei 4°C, Raumtemperatur (RT), 60°C bzw. 100°C	54
Abb. 10:	1D-Gelbilder von „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex mit und ohne TFA-Behandlung für 1 h, 4 h und 22 h	55
Abb. 11:	1D-Gelbilder von „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex mit und ohne Lösungsmittlextraktion in verschiedenen Lösungsmitteln	58
Abb. 12	CTAB-1D-Gelbilder von Homogenat und „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex mit und ohne Urea im CTAB-Ladepuffer	59
Abb. 13:	2D-Gelbilder von Mittelhirnhomogenaten und Homogenaten des limbischen Vorderhirns, vor und nach den methodischen Verbesserungen hergestellt	64

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	IEF-Programm für die Fokussierung von Proteinen im pH-Bereich 4-7	28
Tab. 2:	IEF-Programm für die Fokussierung von Proteinen im pH-Bereich 4-7	29
Tab. 3:	LC-MS/MS Identifikationen von zwei "Spotbereichen", ausgestochen aus der stark angefärbten Geloberkante des in Abbildung 7B gezeigten Gels	51
Tab. 4:	Ergebnisse der Proteinbestimmung der Extraktion von „Na ₂ CO ₃ -gestrippten“ Synaptosomen aus dem frontalen Kortex mit verschiedenen Lösungsmitteln	57
Tab. 5:	Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 25% Unterschied in der Proteinladungsmenge (200 µg vs. 250 µg)- Experimente vor methodischen Verbesserungen	65
Tab. 6:	Analyse der Faktoren, welche die Intergelvarianz verschlechtern	66
Tab. 7:	Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 25%igen Unterschied in der Proteinladungsmenge (200 µg vs. 250 µg) - Experimente nach methodischen Verbesserungen	67
Tab. 8:	Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 25%igen Unterschied in der Proteinladungsmenge (200 µg vs. 250 µg) - Experimente mit „gepooltem“ Gewebe nach methodischen Verbesserungen	68
Tab. 9:	Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 25%igen Unterschied in der Proteinladungsmenge - Experimente mit höheren Proteinladungsmengen	69
Tab. 10:	Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 50%igen Unterschied in der Proteinladungsmenge – Experimente nach methodischen Verbesserungen	70