

5. Diskussion und Ausblick

5.1 Experimente zur verbesserten Darstellung transmembraner Proteine (TMP)

Wie in der Einleitung dargestellt ist es bisher in der auf 2D-Gelelektrophorese basierenden Proteomforschung nicht gelungen, hydrophobe, transmembrane Proteine (TMP) in ausreichender Weise auf 2D-Gelen sichtbar zu machen. Andererseits besitzen gerade im Zentralnervensystem eine Vielzahl der für die neuronale Erregungsausbreitung relevante Proteine transmembrane Domänen: Alle Neurotransmitterrezeptoren und -Transporter, Ionenkanäle, die physiologisch sehr bedeutsame Na^+K^+ -ATPase, sowie zahlreiche Enzyme.

Die Ursachen für die mangelhafte Visualisierung von TMP auf 2D-Gelen sind bis heute nicht genau bekannt. Molloy et al. (1998) führen mehrere mögliche Gründe für das vollständige Fehlen der TMP auf 2D-Gelen an: Z.B. das Problem, diese Proteine während der Extraktion in Lösung zu halten oder mögliche Präzipitation der Proteine während der ersten Dimension (IEF) (Molloy et al. 1998). In ihrer Übersichtsarbeit nennen Görg et al. (2004) folgende Gründe für die mangelnde Visualisierung von TMP: a) ihre schlechte Löslichkeit und die damit verbundene Tendenz zu Aggregationen und Präzipitationen in wässrigen Lösungen, b) der isoelektrische Punkt vieler TMP liegt im basischen Bereich und gerade da ist die Fokussierung der Proteine oft mangelhaft, c) viele TMP sind gering exprimiert und können daher mit Hilfe der gängigen Färbemethoden wegen Überlagerungen durch höher abundante Proteine nicht sichtbar gemacht werden. Die Autoren vermuten, dass die Membranproteine zwar auf die IPG-Streifen aufgetragen werden können und dort auch fokussieren, dass sie jedoch an ihrem isoelektrischen Punkt präzipitieren und nicht in die zweite Dimension übergeführt werden können (Görg et al. 2004). Eine entsprechende Hypothese hat auch Rabilloud (1999) formuliert: “The problem is, however, more severe for hydrophobic proteins when IPG is used. In this case a strong absorption of the isoelectric protein to the IPG matrix seems to occur which is not reversed by incubation the IPG gel in the SDS solution. The result is severe quantitative losses, which seem to increase with the hydrophobicity of the protein in the amount loaded” (Rabilloud 1999). In einer weiteren Übersichtsarbeit vermuten Santoni et al. (2000), dass sowohl die schlechte Löslichkeit dieser Proteine, als auch ihre Präzipitation während der ersten Dimension für die mangelhafte Visualisierung auf 2D-Gelen verantwortlich sein könnten (Santoni et al. 2000). Mir sind jedoch keine Arbeiten bekannt, welche die oben genannten Hypothesen experimentell verifiziert haben.

In dieser Dissertation wurde die Frage untersucht, ob transmembrane, synaptosomale Proteine auf 2D-Gelelektrophoren zu visualisieren sind bzw. - wenn dies nicht der Fall ist - an welcher Stelle der methodischen Prozedur sie verbleiben. Es wurden nacheinander a) aus Homogenaten hergestellte Synaptosomen, b) mit „7 M Urea-gestrippte“ Synaptosomen und c) mit „Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen des frontalen Kortex untersucht. Die Experimente wurden im sauren (pH 4-7) und im basischen Bereich (pH 6-11) durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse der Proteinspots aus Gelen aller drei soeben erwähnten Membranfraktionen zeigt, dass nur eine sehr geringe Zahl (n=2) Proteine mit transmembranen Domänen identifiziert werden konnten. Auffällig waren insbesondere die Gele, auf welchen Proteine aus mit „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen im basischen Bereich (pH 6-11) nach der von Hoving et al. (2002) beschriebenen Methode aufgetrennt wurden: Es sind nur sehr wenig fokussierte Proteine auf den Gelen zu sehen, aber ein deutlich sichtbarer vertikaler, stark angefärbter Streifen auf Höhe der Proteinaufladestelle (Abbildung 5C). Werden die Proteine mit Hilfe der *in-Gel-Rehydrierung* aufgetrennt, dann erscheint ein horizontaler, unfokussierter, stark gefärbter Streifen am oberen Rand des Gels (s. Abbildung 6B). Bei diesem Experiment wurden auch die IPG-Streifen mit Sypro Ruby gefärbt, und zwar sowohl nach der isoelektrischen Fokussierung als auch nach der Durchführung der zweiten Dimension. Die Anfärbung der IPG-Streifen nach Durchführung der zweiten Dimension zeigte nur noch eine ganz schwache und diffuse Proteinfärbung, d.h. der Großteil der Proteine war in die zweite Dimension übergetreten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Membranproteine in der ersten Dimension nicht fokussieren, sondern als „unfokussiertes Gemisch“ in die zweite Dimension übertreten, dort jedoch in ihrer großen Mehrheit am oberen Gelrand „hängen bleiben“.

Zur weiteren Abklärung dieser Hypothese wurden zwei Proteinspots aus der massiven „horizontalen Anfärbung“ (Abbildung 6B, Position 1 und 2) am oberen Gelrand des durch *in-Gel-Rehydrierung* hergestellten Gels ausgestochen und durch LC-MS/MS identifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass insgesamt 34 Proteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten an *beiden* Positionen (1 und 2) gleichzeitig identifiziert werden konnten. Dies weist darauf hin, dass diese Proteine nicht an ihrem isoelektrischen Punkt fokussiert sind. Die hohe Anzahl an transmembranen Proteinen mit bis zu 12 transmembranen Domänen zeigt deutlich, dass diese Proteine während des Procederes der 2D-Gelelektrophorese zwar in die IPG-Streifen der ersten Dimension aufgenommen werden, aber dort nicht fokussieren und anschließend am oberen Rand der 2D-Gele „hängen bleiben“. Dieser Effekt wurde meines Wissens zum ersten Mal beobachtet. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die Membranproteine einerseits durch die Fraktionierung in Synaptosomen und deren „Stripping“ mit Na₂CO₃ sehr stark angereichert

waren, andererseits wurden hohe Proteinlademengen verwandt (700 µg) und schließlich wurden bei diesem Experiment Gele im pH-Bereich 6-11 verwandt. Da die Mehrzahl der Membranproteine im basischen Bereich zu erwarten sind (Schwartz et al. 2001), ist die horizontale „Schwarzfärbung“ am Geloberrand auch eher im basischen als im sauren Bereich zu erwarten. Es ist so auch erklärlich, warum z.B. auf Gelen im sauren Bereich (pH 4-7), auf welche 200 µg eines Homogenats oder einer nicht vorgereinigten Membranfraktion aufgetragen wurden, diese stark angefärbte horizontale Anreicherung am oberen Gelrand bisher nicht sichtbar geworden ist.

Die wichtigste Erkenntnis aus dieser Arbeit bezüglich der Proteomanalyse von transmembranen Proteinen besteht daher darin, dass - im Gegensatz zu den bisher vorherrschenden Hypothesen - diese hydrophoben Proteine in der ersten Dimension nicht fokussieren, und dass das unfokussierte Proteingemisch anschließend zwar in die zweite Dimension übertragen wird, dort allerdings am oberen Gelrand „hängen bleibt“.

Diese Ergebnisse führten zu der Frage, warum hydrophobe Proteine in der ersten Dimension nicht fokussieren. Eine Möglichkeit besteht darin, dass unter den beschriebenen Extraktionsbedingungen die zahlreich vorhandenen Oligomere nicht in Monomere getrennt werden und daher auf Grund ihrer Größe nicht in das 12%ige SDS-Acrylamidgel einwandern können. Eine große Anzahl hydrophober, transmembraner Proteine liegt im Zentralnervensystem in Oligomerform vor. Dieses trifft z.B. auf die abundantesten Transmitterrezeptoren, wie den GABA- und den Glutamat-Rezeptor, ebenso zu wie für die Na⁺K⁺-ATPase. Die Ursache für diese ungenügende Spaltung der Oligomere könnte darin bestehen, dass in der Equilibrierungsphase die Proteine zwar mit SDS beladen werden, allerdings ohne die in der 1D-Gelelektrophorese übliche Erhitzung auf 95°C. Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben, dass die Spaltung von Oligomeren in Monomere und deren Darstellung in gut abgegrenzte Banden auf 1D-Gelen oft ohne vorheriges Erhitzen auf 95°C nicht befriedigend zu erreichen ist (z.B. Braun and Madison 2000). In der hier beschriebenen Methode ist zwar die denaturierende Substanz Urea in der Extraktionslösung enthalten, jedoch kann selbst Urea die Oligomerbildung nicht in allen Fällen verhindern. So beschrieben z.B. Thompson et al. (2002), dass die Dimere des P0-Glycoproteins, eines integralen Proteins, auch durch 8 M Urea, SDS und β-Mercaptoethanol nicht getrennt werden konnten. Die Autoren ziehen den folgenden Schluss: „A number of physical and chemical methods that were used to disrupt oligomers, including temperature, pH, detergents and denaturants seemed only to increase the amounts relative to the monomer. Based on the treatments used here the underlying forces stabilising the oligomeres could be non-disulfide covalent interactions or strong hydrophobic interactions“ (Thompson et al. 2002). In

diesem Zusammenhang diskutierten mehrere Arbeitsgruppen in den letzten Jahren den Begriff der so genannten "kinetic stability". Dieser Begriff wird für Proteine verwandt, deren native Struktur, in diesem Fall ihre Oligomerstruktur, nur schwer und langsam zu denaturieren ist (z.B. Meier and Dimroth 2002; Manning and Colòn 2004). Aus diesen Arbeiten lassen sich zahlreiche Beispiele dafür anführen, dass bestimmte „kinetisch stabile“, hydrophobe, oligomere Proteine auch durch Kochen bei 95°C bzw. 100°C nicht befriedigend in Monomere getrennt werden können. Meier und Dimroth (2002) zeigten dies am Beispiel der F1F0-ATP-Synthase. Allerdings überwiegen in der Literatur die Berichte darüber, dass die Oligomerformen extrahierter Proteine in der Regel durch Kochen mit SDS dissoziieren. So beschrieben z.B. Monier et al. (1996), dass das Oligomer des integralen Membranproteins VIP21-Caveolinin erst nach Kochen in SDS in seine Monomere gespalten werden konnte (Monier et al. 1996). In der Arbeit von Gendreau et al. (2004) wird am Beispiel des oligomeren Glutamat-Transporters demonstriert, dass die Erhitzung der Probe auf 56°C zu besserer Oligomerspaltung führt, als bei 22°C (Gendreau et al. 2004). In der Arbeit von Heinz et al. (2003) wird beschrieben, dass das transmembrane, tetramere Protein Porin erst bei Temperaturen zwischen 92°C und 112°C in Monomere dissoziiert (Heinz et al. 2003).

Das Problem könnte nun im Zusammenhang mit der 2D-Gelelektrophorese darin bestehen, dass die SDS enthaltende Equilibrierlösung nicht stark erhitzt werden kann, da dann Isocyanate aus Urea entstehen, durch die eine Carbamylierung der Protein an primären Aminosäuregruppen verursacht würde. Die Frage, ob Membranproteine nach starkem Erhitzen ein anderes Bandenmuster aufweisen als ohne vorheriges „Kochen“ bei 95°C, kann mit Hilfe der 1D-Gelelektrophorese untersucht werden. In meiner Arbeit wurde daher mittels der 1D-Gelelektrophorese getestet, ob angereicherte Membranproteine im 1D-Gellauf nach starkem Erhitzen zu einer anderen Bandenbildung führen, als ohne vorheriges Erhitzen. Abbildung 8 zeigt die Proteinbanden von Homogenaten, Synaptosomen und mit Na₂CO₃ gewaschenen Synaptosomen auf 1D-Gelen. Es ist klar ersichtlich, dass die aus Homogenaten extrahierten Proteine in zahlreiche, relativ gut abgegrenzte Banden aufgetrennt werden. Die aus den Synaptosomen extrahierten Proteine führen ebenfalls zu zahlreichen, gut abgegrenzten Banden. Allerdings ist bei der höheren Proteinauflademenge von 30 µg bereits am oberen Rand des Trenngels eine Schwarzfärbung sichtbar, die bei den Homogenaten nicht auftrat. Die Proteine der mit Na₂CO₃ gewaschenen Synaptosomen zeigen auf dem 1D-Gel kein reguläres Bandenmuster mehr. Stattdessen ist – insbesondere nach Auftrag von 30 µg Protein – eine massive Schwarzfärbung am oberen Rand des Trenngels zu erkennen. Dieser Bereich „schmiert“ in das Trenngel hinein, ohne dass abgegrenzte Banden sichtbar werden.

Dieser Versuch zeigt daher, dass sich die angereicherte synaptosomale Membranfraktionen in der 1D-Gelelektrophorese genauso verhalten, wie in der 2D-Gelelektrophorese: Die Proteine wandern nicht in regulärer Weise in die Gele um dort gut abgegrenzte Spots bzw. Banden zu bilden. In beiden Techniken bleiben die stark angereicherten Membranproteine am oberen Rand der jeweiligen Gele „hängen“. Auch das fünf minütige Erhitzen des Proteingemisches bei 95°C führt nicht zu besserer Bandenbildung (Abbildung 8). Abbildung 9 zeigte, dass weder die Inkubationstemperatur noch die Inkubationszeit irgendeinen Effekt auf das beschriebene, irreguläre Bandenmuster hat. Würde die Schwarzfärbung am oberen Gelrand aus nicht gespaltenen Oligomeren bestehen, so wäre zu erwarten, dass sich diese nach längerem Erhitzen in Monomere spalten und dann als gut abgegrenzte Banden auf den Gelen sichtbar werden. Dies ist offenbar nicht der Fall. Daher erscheint es nicht wahrscheinlich, dass die horizontalen Schwarzfärbungen am oberen Rand der 2D-Gele aus großen, oligomeren Proteinkomplexen bestehen.

Alternativ kann diskutiert werden, dass TMP nach Extraktion und Denaturierung in wässriger Lösung über *hydrophobe Wechselwirkungen* Aggregate bilden, die ebenfalls auf Grund ihrer Größe nicht in 1D- bzw. 2D-Gele einwandern können. Eine Reihe von Arbeitsgruppen haben in der Tat beschrieben, dass transmembrane Glycoproteine auch durch SDS nicht befriedigend denaturiert werden, sondern unlösliche Aggregate bilden. Einige Autoren stellten die Hypothese auf, dass erst diese starke Denaturierung der transmembranen Proteine dazu führt, dass sich freigelegte Sekundärstrukturen (z.B. α -Helices oder β -Barrels) durch hydrophobe Interaktionen zusammenlagern und stabile Aggregate bilden (Rauh et al. 1986; Meier and Dimroth 2002; Gendreau et al. 2004). Hennessey und Scarborough beschrieben 1989 das Problem der Aggregation integraler Membranproteine und zeigten, dass diese Aggregate mit Trifluoressigsäure (TFA) aufgelöst werden können (Hennessey and Scarborough 1989). Später zeigten Sagné et al. (1996), dass der Monoamintransporter, ein transmembranes Glycoprotein, nach Kochen in SDS-Extraktionslösung am oberen Rand des 1D- Trenngels „stecken bleibt“ (Sagné et al. 1996). Die Autoren versuchten, diese Aggregate durch Urea, Ameisensäure, sowie einer Reihe von Detergenzien zu lösen, jedoch ohne Erfolg. Es gelang ihnen dann aber, die Aggregate durch Vorbehandlung der Proben mit 100% TFA zu spalten. Die TFA wurde bei diesem Experiment vor der Probenaufnahme in den 1D-Lade-Puffer entfernt. Diese Spaltung von Aggregaten hydrophober Proteine durch TFA wurde von mehreren weiteren Autoren beschrieben (z.B. Cramer et al. 1980; Llinás et al. 1980; Grayson and Sequeira 1990; de Vocht et al. 1998). Die genannten Arbeitsgruppen verwandten in der Regel 100% TFA, da bei geringeren

TFA-Konzentrationen, sowie auch bei hohen Temperaturen Glycosid-Reste von Proteinen abgespalten und das Protein im weiteren Verlauf in mehrere Einzelpeptide zerlegt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, die Aggregatbildung der hydrophoben Proteine durch Vorbehandlung mit TFA zu verhindern, bzw. bereits entstandene Aggregate aufzulösen. Die Abbildung 10 zeigt, dass die Vorbehandlung mit TFA die angefärbten Aggregatkomplexe am oberen Trenngelrand offenbar nicht gespalten hat, und zwar unabhängig davon, ob sie TFA vor der Probenaufnahme im 1D-Ladepuffer entfernt wurde oder ob es in diesem Puffer noch enthalten war (Daten nicht gezeigt). Die Diskrepanz zwischen meinen Befunden und den oben zitierten Studien besteht darin, dass letztere immer einzelne, bereits vorgereinigte Proteine untersuchten, während in der vorliegenden Arbeit ein aus einer Membran extrahiertes Proteingemisch analysiert wurde. Es ist daher möglich, dass die hydrophoben Wechselwirkungen und die daraus folgende Aggregatbildung umso stärker ausgeprägt und umso schwerer aufzulösen sind, je komplexer das Gemisch aus hydrophoben Proteinen ist.

Eine weitere hypothetische Möglichkeit, die Aggregation hydrophober Proteine in wässriger Lösung zu verhindern ist deren Extraktion in organischen Lösungsmitteln. Die Extraktion von Membranproteinen z.B. durch Methanol oder Chloroform mit anschließender Visualisierung auf 1D-Gelen wurde verschiedentlich durchgeführt (z.B. Molloy et al. 1999; Seigneurin-Berny et al. 1999; Ferro et al. 2002; Klein et al. 2005). Keines der von Molloy et al. (1999) identifizierten Proteine hatte jedoch transmembrane Domänen. Auch in der Arbeit von Klein et al. (2005) waren TMP auf den 2D-Gelen unterrepräsentiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch versucht, angereicherte Membranproteine durch organische Lösungsmittel zu extrahieren und in Lösung zu halten. Aus der Abbildung 11 geht jedoch hervor, dass auch organische Lösungsmittel nicht zu einer Auflösung der am oberen Rand der Trenngele gefärbten Proteinaggregate führen. Auf den 1D-Gelen selbst sind nur wenige und sehr schwach gefärbte, unscharfe Banden erkennbar. Diese Ergebnisse waren unabhängig davon, ob ein geringer Anteil von organischem Lösungsmittel im Probenpuffer zurückblieb, oder ob das Lösungsmittel zuerst getrocknet und die Probe dann in 1D-Lade-Puffer resuspendiert wurde. Ein Grund für das auch bei Extraktion in organischen Lösungsmitteln beobachtete Gelbild könnte darin zu suchen sein, dass der Probenpuffer letztlich nur 12,5% an organischem Lösungsmittel enthielt, es sich dementsprechend hauptsächlich wiederum um eine wässrige Lösung handelte, in welcher die hydrophoben Proteine aggregierten. Mit Ausnahme des DMSO konnten jedoch keine 100%igen, sondern nur 50%ige Lösungsmittel zur Extraktion verwandt werden, da durch 100%ige Lösungen nur sehr wenig Protein extrahiert wurde. Da andererseits das verwendete

Gelsystem für hydrophile Substanzen ausgelegt ist, musste der Anteil der unpolaren, organischen Lösungsmittel im 1D-Ladepuffer gering gehalten werden, da dieser sonst von den Gelen nicht aufgenommen würde.

Eine weitere hypothetische Möglichkeit zur Spaltung der Aggregate hydrophober Proteine geht von der Überlegung aus, dass ein großer Teil der TMP durch Glycosylierung negativ geladen ist. Es stellt sich daher die Frage, ob das ebenfalls negativ geladene SDS tatsächlich in ausreichendem Maße gerade an diese Proteine bindet und deren Aggregation verhindert. Verschiedene Arbeitsgruppen haben Membranproteine mit dem kationischen Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) extrahiert und auf 1D-Gelen dargestellt (Akin et al. 1985; Akins et al. 1992; Navarre et al. 2002; Buxbaum 2003). Nach Extraktion mit CTAB konnten insbesondere auch zahlreiche synaptosomale Proteine auf Gelen aufgetrennt und dargestellt werden (Übersichten bei Cole and Hart 2001; Martin 2002). Buxbaum (2003) identifizierte z.B. Membran-Glycoproteine nach Extraktion durch CTAB auf 1D-Gelen (Buxbaum 2003). Pritchard et al. berichteten 1985, dass Oberflächenglycoproteine von Nematoden nur durch CTAB, nicht jedoch durch andere Detergenztypen extrahiert werden konnten (Pritchard et al. 1985). Aus diesem Grunde wurde in meiner Arbeit versucht, die Proteine aus angereicherten Membranen mittels des kationischen Detergenz CTAB zu extrahieren und auf 1D-Gelen darzustellen. Die Ergebnisse (dargestellt in Abbildung 12) zeigen in der Tat, dass auch durch Na_2CO_3 gewaschene Synaptosomen, also stark angereicherte Membranproteine, weniger Aggregatbildung am oberen Gelrand und dafür vermehrt über das 1D-Gel verteilte Banden zeigen. Die Spaltung der Aggregate am oberen Gelrand und die daraus resultierende bessere Bandenbildung war insbesondere dann sichtbar, wenn zusätzlich zum CTAB im CTAB-Ladepuffer Urea enthalten war. Dies könnte hypothetisch dadurch erklärt werden, dass CTAB - im Gegensatz zum SDS - selbst nur eine relativ schwache denaturierende Wirkung besitzt und Urea an dieser Stelle „unterstützend“ eingreift. Allerdings war die Bandenbildung der Proteine nach Extraktion mit CTAB relativ unscharf und verwaschen.

Diese Befunde zeigen, dass stark hydrophobe Proteine nach Extraktion durch kationische Detergenzien offenbar besser löslich bleiben und weniger zu Aggregatbildung neigen, als in stark anionischen (SDS) oder zwitterionischen Detergenzien (CHAPS). In Bezug auf die 2D-Gelelektrophorese stellt sich hier allerdings das Problem, dass Proteine, die durch negative oder positiv geladene Detergenzien „umhüllt“ und in Lösung gehalten werden, in der ersten Dimension nicht fokussiert werden können, da ihre Eigenladung aufgehoben ist.

Die Hypothese, dass TMP nach Denaturierung über hydrophobe Interaktionen Aggregate bilden, wird durch die Tatsache gestützt, dass bei der nicht denaturierenden „Blue native

Elektrophorese“ (siehe Einleitung) eine Reihe von TPM auch auf 2D-Gelen visualisiert werden können. Das Problem besteht hier allerdings umgekehrt darin, dass durch die hier eingesetzten, relativ „milden“ Detergenzien (z.B. Digitonin), nur ein geringer Anteil der Membranproteine extrahiert wird und der Großteil der hydrophoben Proteine in den Membranresten verbleibt.

Zusammenfassend wurde in meiner Arbeit gefunden, dass die aus angereicherten, synaptosomalen Membranen extrahierten hydrophoben Proteine höchst wahrscheinlich in wässrigen Medien lösliche, hoch molekulare Aggregate bilden. Diese Proteinaggregate quellen bei der in-Gel-Rehydrierung in die IPG-Streifen ein, fokussieren in der ersten Dimension aber nicht regulär und werden anschließend als „Proteingemisch“ auf die zweite Dimension übertragen. Dort bleiben sie am oberen Gelrand „stecken“ und werden als deutliche Schwarzfärbung sichtbar. Derselbe Effekt konnte auch auf der 1D-PAGE nachgewiesen werden. Zahlreiche experimentelle Ansätze zur Auflösung der Proteinaggregate durch Erhitzen, längeres Inkubieren, TFA und organische Lösungsmittel führten nicht zu einer besseren Löslichkeit bzw. Darstellung der hydrophoben Proteine auf den Gelen. Einzig die Extraktion mit dem kationischen Detergenz CTAB scheint die TMP besser zu lösen und die Aggregatbildung zum Teil zu verhindern. Kationische Detergenzien sind jedoch nicht mit der Technik der 2D-Gelelektrophorese zu vereinbaren.

Ausgehend von den hier dargestellten Befunden könnte eine Darstellung transmembraner Proteine auf 2D-Gelen nur unter folgenden zwei Voraussetzungen erfolgreich sein: Erstens müssten neue Detergenzien gefunden werden, deren Affinität zu den hydrophoben Anteilen transmembraner Proteine größer ist, als die hydrophoben Interaktionen der Einzelproteine untereinander und die so eine Aggregatbildung verhindern können. Und zweitens müssten derartige Detergenzien mit der Technik der isoelektrischen Fokussierung vereinbar sein, das heißt sie müssen entweder ungeladen oder zwitterionisch sein. Abschließend sollte nochmals hervorgehoben werden, dass alle hier beschriebenen Experimente an aus Rattenhirnen gewonnenen Synaptosomen durchgeführt wurden. Meine Ergebnisse schließen daher keinesfalls aus, dass transmembrane Proteine aus weniger komplex aufgebauten Strukturen (z.B. Zellkulturen, Hefe etc.) in höherer Anzahl auf 2D-Gelen sichtbar gemacht werden können. In der Tat wurde dies z.B. für die Hefe von Pedersen et al. (2003) beschrieben (Pedersen et al. 2003).

5.2 Quantitative Gruppenvergleiche des durch 2D-Gelelektrophorese dargestellten Proteoms

Die Experimente 1 und 2 wurden mit „konventioneller Methodik“ durchgeführt, das heißt mit einer Technik, welche gegenwärtig vermutlich in den meisten Laboratorien angewandt wird. Nur 23,8% bzw. 54,4% der Spots von zwei Gruppen mit je 200 µg bzw. 250 µg Proteinladung konnten signifikant voneinander unterschieden werden. Äußerst bedenklich ist insbesondere die Tatsache, dass die Spotintensitäten von 58 bzw. 67 Spots in der 250 µg-Gruppe signifikant *geringer* waren, als in der 200 µg-Gruppe. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Quantifizierung mit „konventionellen“ 2D-Gelelektrophorese-Techniken nicht nur keine zuverlässige Unterscheidung von Gelgruppen mit geringgradigem Unterschied der aufgetragenen Proteinmengen (z.B. 25%) ermöglicht, sondern sogar zu falschen Ergebnissen führen kann. Bei einem etwa 25%igen Unterschied der Proteinlademengen zwischen zwei Gruppen können Unterschiede als signifikant angezeigt werden, die das Gegenteil der biologischen Wirklichkeit darstellen. Als erste relevante Schlussfolgerung aus den genannten Ergebnissen ergibt sich daher die Notwendigkeit, dass jedes mit der Technik der 2D-Gelelektrophorese arbeitende Labor eigene „Power-Analysen“ durchführen sollte, bevor Experimente zur quantitativen Unterscheidung der Spotintensitäten zwischen zwei Gruppen durchgeführt bzw. publiziert werden. Auf die Notwendigkeit solcher „Power-Analysen“ wird gerade in letzter Zeit vermehrt hingewiesen, z.B. von den Herausgebern wichtiger, auf das Gebiet „Proteomics“ spezialisierter Zeitschriften (z.B. Wilkins et al. 2006). Mir ist jedoch keine Publikation bekannt, in welcher die „statistische Power“ irgendeiner der in der Proteomforschung angewandten Methoden publiziert wurde.

In mehreren Veröffentlichungen wurde die Replizierbarkeit der Gele durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten zwischen allen Spots zweier Gele untersucht (z.B. Blomberg et al. 1995; Challapalli et al. 2004). Ich berechnete daher Pearson's Korrelationskoeffizienten für die Experimente 1 und 2. Bei diesen Berechnungen wurden die Spots jedes einzelnen Gels mit jedem anderen verglichen. Die Berechnungen wurden getrennt für die 200 µg- und die 250 µg-Gruppe durchgeführt. Aus der Tabelle 5 geht hervor, dass sich die Koeffizienten in Experiment 1 zwischen 0,948 und 0,990 und in Experiment 2 zwischen 0,930 und 0,998 bewegen. Diese Ergebnisse zeigen also sehr hohe Korrelationskoeffizienten selbst bei solchen Experimenten, deren Gel zu Gel Variabilität ungenügend ist. Als Schlussfolgerung lässt sich festhalten, dass die Berechnung von Korrelationskoeffizienten nicht geeignet ist, um die Zwischengelvarianz oder die Zuverlässigkeit statistischer Gruppenvergleiche vorherzusagen.

Auf Grund dieser enttäuschenden Ergebnisse wurde versucht, mögliche Varianzquellen während der Prozedur der Gelanfertigung zu identifizieren. Aus der Grundlagenforschung ist gut bekannt, dass eine der größten Varianzquellen laborchemischer Untersuchungen darin besteht, dass einzelne Proben nicht in allen methodischen Schritten zusammen - bzw. gleich behandelt wurden, sondern in unterschiedlichen „Ansätzen“ analysiert wurden. Aus diesem Grund konstruierte Herr Dr. Murat Eravci eine Reihe von neuen Apparaturen, welche die gleichzeitige Behandlung von bis zu 24 Gelen während der ganzen methodischen Prozedur gestattet (s. Abbildung 1). Dieses ermöglicht den Vergleich auch größerer Gruppen, z.B. von zwei Gruppen mit einer Stichprobengröße von jeweils zwölf. Der Vergleich mit den durch „konventionelle Methodik“ prozessierten Gele zeigte, dass sich die Variationskoeffizienten (CV) deutlich verbesserten, wenn z.B. alle Gele in einer Färbeapparatur gefärbt wurden, im Vergleich zur Einzelfärbung in „Tupperschalen“ (Tabelle 6). Weiterhin wurde nach Varianzquellen geforscht, die - unabhängig von den Apparaturen - die Replizierbarkeit der Gele beeinträchtigen könnten. Wir fanden, dass die Art der Rehydrierung sowie in ganz besonderem Maße die Nummerierungen der IPG-Streifen in beträchtlichem Ausmaße zur Varianz beitrugen. Die isoelektrische Fokussierung (erste Dimension) ist wahrscheinlich das „sensitivste“, also stör anfälligste Glied in der Kette der methodischen Einzelschritte. Dementsprechend ist es nicht erstaunlich, dass IPG-Streifen, die nicht aus demselben „Mastergel“ stammen, zu größeren Zwischengelvarianzen führen, als bei der Benutzung fortlaufend nummerierter Streifen aus demselben „Mastergel“. Es wäre daher sinnvoll, wenn alle Hersteller dieser IPG-Streifen diese auch mit Nummern versehen würden, was bis heute nicht immer der Fall ist. Wie stör anfällig die erste Dimension ist, geht auch daraus hervor, dass die Variationskoeffizienten und die „statistische Power“ in den Experimenten 1 und 4, in welchen die mit 200 µg und die mit 250 µg beladenen Gelgruppen in einer einzigen IEF prozessiert wurden, außerordentlich unbefriedigend ausfielen. Selbst bei Anwendung aller erarbeiteten methodischen Verbesserungen, dem Experiment 4, lagen die CV's zwischen 30% und 35% und nur 112 der 586 Spots waren signifikant erhöht, allerdings ebenfalls 71 Spots in der 250 µg-Gruppe signifikant *erniedrigt*. Dies zeigt, dass selbst ein relativ geringfügiger Unterschied in der Proteinladungsmenge von 25% die IEF offenbar massiv „stört“ und zu unzuverlässigen Ergebnissen führen kann.

Die Arbeit mit den neu produzierten Apparaturen unter Anwendung aller methodischer Verbesserungen ermöglichte es dann, zwischen 77,5% (Experiment 7, Tabelle 7) und 90,8% (Experiment 10, Tabelle 9) aller Spots auf Gelen mit einem 25%igen Unterschied in den Proteinladungsmenge zwischen zwei Gelgruppen signifikant zu unterscheiden. Die Ergebnisse des Experiments, in welchem jeweils zwei Areale „gepoolt“ und sechs versus sechs Gele verglichen

wurden (Experiment 8, Tabelle 8) sind qualitativ gleichwertig mit jenen, bei denen zwölf Einzelareale miteinander verglichen wurden (Experiment 7, Tabelle 7). Das Zusammenfassen von mehr als zwei Tieren (z.B. vier bzw. fünf Tiere in Experiment 9 a/b, Tabelle 8) bei gleichzeitiger Reduktion der Anzahl der verglichenen Gele auf jeweils vier führte zu qualitativ schlechteren Ergebnissen: Nur 43,4% bzw. 60,0% der Spots in der 250 µg-Gruppe wurden als signifikant erhöht klassifiziert.

Untersucht wurde in meiner Arbeit auch die Frage, bei welcher Proteinauflademenge die beste Kombination aus hoher Spotanzahl und optimaler Zuverlässigkeit bei quantitativen Gruppenvergleichen zu erreichen ist. Die Ergebnisse (Experiment 10 und 11, Tabelle 9) zeigten, dass bei einer Proteinlademenge von 500 µg bzw. 625 µg einerseits mehr Spots „gematcht“ wurden, als beim Vergleichsexperiment, bei welchem 200 µg bzw. 250 µg Protein auf je 12 Gele zweier Vergleichsgruppen aufgetragen wurde (Experiment 7, Tabelle 7). In der Gruppe mit den höheren Proteinlademengen (500 µg/625 µg) konnten außerdem 90,8% aller Spots zwischen den beiden Gruppen als signifikant unterschiedlich klassifiziert werden, bei den 200 µg/250 µg-Gruppen waren es nur 77,5%. Bei Auftrag einer noch höheren Proteinmenge, nämlich 800 µg bzw. 1000 µg auf je zwölf Gele zweier Vergleichsgruppen werden die Ergebnisse allerdings wieder schlechter: Nur 53,0% der Spots unterschieden sich signifikant zwischen beiden Gruppen. Der Grund dafür dürfte in der bei sehr hoher Beladungsmenge zunehmenden Anzahl von Spotüberlappungen liegen. Dadurch wird die Abgrenzung der Spots voneinander und damit das korrekte „matchen“ der Spots zwischen den verschiedenen Gelen erschwert, was wiederum hohe CV's und dadurch einen niedrigen Prozentsatz an signifikant veränderten Spots zwischen den beiden Vergleichsgruppen nach sich zieht.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Daten, dass bei quantitativen Gruppenvergleichen die besten Ergebnisse zu erzielen sind, wenn ca. 500 µg - 600 µg Protein auf jeweils sechs Gelen pro Gruppe aufgetragen werden und pro Gel wiederum zwei individuelle Gewebe „gepools“ werden. Die Ergebnisse eines weiteren Experiments (Tabelle 10) zeigten schließlich, dass bei einer 50%igen Differenz der Proteinlademengen zwischen zwei Gruppen mehr als 90% aller Spots korrekt als signifikant unterschiedlich klassifiziert werden konnten.

Die Konstruktion neuer Apparaturen für die gleichzeitige Prozessierung von 24 Gelen bringt demnach zwei Vorteile: Erstens wird dadurch der Arbeitsaufwand deutlich reduziert. Und zweitens erlauben die für 24 Gele ausgelegten Apparaturen die gleichzeitige Untersuchung von entweder zwei Gruppen zu je zwölf Gelen oder - vier Gruppen zu je sechs Gelen. Dies könnte z.B. bei Untersuchungen von post-mortem Gewebe bei verschiedenen Erkrankungen vorteilhaft sein. Es wäre z.B. möglich, das Proteom des bei der Alzheimerschen Krankheit betroffenen

Hirngewebes in drei Stadien mit jeweils verschiedenen Schweregraden, also verschiedener Progredienz der Erkrankung, zu analysieren und dies mit den Geweben aus „Kontrollgehirnen“ zu vergleichen. Auch bei der Aufklärung unbekannter Wirkungs- und Nebenwirkungsmechanismen verschiedenster Pharmaka ist die Analyse von mehr als zwei Gruppen in vielen Fällen sinnvoll: So könnte man z.B. im Tierversuch die Effekte von drei chemisch unterschiedlichen antidepressiven, antikonvulsiven oder neuroleptischen Medikamenten etc. mit jeweils einer unbehandelten Kontrollgruppe vergleichen. Jene Proteinspots, welche von allen drei Vertretern einer Medikamentengruppe gleichgerichtet verändert werden, stellen höchstwahrscheinlich relevante Wirkungen oder Nebenwirkungen dar. Im Hinblick auf gelbasierte, quantitative Proteomanalysen wird immer häufiger die DIGE-Technik bevorzugt, da bei dieser Methodik die Proben von zwei Stichproben auf einem gemeinsamen Gel analysiert werden können (s. Einleitung). Die auf einem Gel dargestellten Signalunterschiede zwischen einem Spot aus zwei Stichproben („Ratio“) variiert jedoch beträchtlich von Gel zu Gel (z.B. Karp et al. 2004). Karp und Lilley berechneten 2005, dass vier DIGE-Gelreplikate notwendig sind, um einen 100%igen Unterschied in den Proteinlademengen bei 80% aller Spots zu detektieren. Und nicht weniger als 18 Gele wären notwendig, um eine 25%ige Differenz in der Proteinmenge bei 80% aller Spots zu detektieren (Karp and Lilley 2005). Nach Durchführung aller oben beschriebenen methodischen Vorarbeiten genügen in dem in dieser Arbeit dargestellten Design zwei Mal sechs, also zwölf mit konventionellem Rutheniumfarbstoff gefärbte Gele, um dasselbe Ergebnis zu erreichen. Im Moment ist daher die Färbung mit fluoreszierendem Farbstoff bei quantitativen Vergleichsuntersuchungen nicht nur viel kostengünstiger, sondern auch weniger arbeitsintensiv als die DIGE-Technik. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass sich bei Anwendung der in dieser Arbeit beschriebenen methodischen Verbesserungen auch die Intergelvarianz der DIGE-„Ratios“ und damit die Zahl der notwendigen Replikatgele verringern ließe.

Die in dieser Arbeit dargestellten Analysen und die daraus abgeleiteten technischen Verbesserungen mögen einen gewissen Fortschritt im Bereich der gelbasierten, quantitativen Proteomanalyse darstellen. Es muss jedoch betont werden, dass eine Reihe weiterer, sehr relevanter Probleme noch auf ihre Lösung warten: Erstens können durch die 2D-Gelelektrophorese-Technologie wichtige „Proteinklassen“ in nur sehr eingeschränkter Form analysiert werden, z.B. hydrophobe, transmembrane Proteine (s. Einleitung und Diskussion) oder auch sehr niedrig abundante Proteine (z.B. Gygi et al. 2000; Übersicht bei Görg et al. 2004). Zweitens wurden hier nur Experimente beschrieben, die den pH-Bereich von 4-7 untersuchten. Die Proteomanalyse gelingt jedoch in diesem Bereich deutlich besser, als im basischen Bereich

(z.B. pH 6-11) oder auf Gelen mit „engen pH-Bereichen“ (z.B. pH 4,5-5,5). Für diese letzteren Gradienten müssen die besten Bedingungen für optimale Spotauftrennung und Darstellung noch individuell erarbeitet werden, z.B. durch variieren der Extraktionsbedingungen oder durch Testen der optimalen Fokussierungsbedingungen für die Proteine auf den jeweiligen pH-Bereichen (z.B. Wahl der Kilovoltstundenzahl in der Fokussierung und Wahl eines geeigneten Fokussierprogramms). Drittens rückt in letzter Zeit in der Literatur immer mehr in den Vordergrund, dass ein Spot auf einem 2D-Gel mehrere, gelegentlich sogar viele unterschiedliche Proteine beinhalten kann (z.B. Campostrini et al. 2005; Zhu et al. 2005). Gygi et al. (2000) fanden viele Beispiele für das Vorhandensein mehrerer Proteine in einem Spot, sogar auf IPG-Gelen mit einem engen pH-Bereich von nur einer pH-Größenordnung (Gygi et al. 2000). Dies kann zu Problemen bei der massenspektrometrischen Identifizierung führen, da nicht immer eindeutig geklärt werden kann, welches Protein in einem Spot, dessen Intensitäten bei einer Gruppe signifikant gegenüber der anderen erhöht ist, enthalten ist. Dieses Problem könnte theoretisch dadurch gelöst werden, dass mit Rutheniumfarbstoff gefärbte, zwischen zwei Gruppen signifikant unterschiedliche Spots ausgestochen, einzeln verdaut und anschließend, mit verschiedenen Isotopen markiert, zusammen durch LC-MS/MS identifiziert und quantifiziert werden. Falls z.B. der Spot mit der niedrigsten Intensität einer Gruppe und der mit der höchsten Intensität der zweiten Gruppe kombiniert werden, so müsste es theoretisch möglich sein, durch die beschriebene Methode zu erkennen, welches Protein in dem betreffenden Spot quantitativ verändert ist und welches nicht. Eine weitere Möglichkeit bestände z.B. darin, die Proben der beiden zu vergleichenden Gruppen in jeweils zwei „Poole“ zusammenzufassen, diese vor der Gelelektrophorese mit verschiedenen Isotopen zu markieren, zu kombinieren, dann auf einem 2D-Gel darzustellen und mit Rutheniumfarbstoff zu färben. Die auf den ausschließlich mit Rutheniumfarbstoff gefärbten Gelgruppen quantitativ signifikant veränderten Spots könnten dann auf dem „gepoolten“, isotopengelabelten Gel ausgestochen und wiederum mit LC-MS/MS analysiert werden. Dieses Verfahren ist jedoch nur dann möglich, wenn die Markierung mit Isotopen das Spotmuster nicht verändert, d.h. die mit Rutheniumfarbstoff gefärbten Spots genau den mit Isotopen markierten Spots zugeordnet werden können. Die Methodik, durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinspots anschließend massenspektrometrisch zu identifizieren wurde inzwischen von mehreren Arbeitsgruppen dargestellt (z. B. Smolka et al. 2002; Schmidt et al. 2005). Mir ist jedoch keine Arbeit bekannt, welche eine der beiden gerade beschriebenen Vorgehensweisen getestet hätte.

Zusammenfassend muss daher gesagt werden, dass trotz aller methodischer Fortschritte die gelbasierte quantitative Proteomanalyse immer noch eine Reihe ernster Probleme aufweist, von

denen einige möglicherweise durch Kombination mit massenspektrometrischen Methoden gelöst werden können. Die vorliegende Arbeit könnte für die biomedizinische Proteomforschung in sofern von Relevanz sein, als sie – nach meiner Kenntnis erstmals – eine Möglichkeit aufzeigt, quantitative Unterschiede von bis zu 25% mit hoher Zuverlässigkeit zu detektieren. Dieses ist möglicherweise z.B. bei Proteomuntersuchungen von Patienten mit degenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimerschen Erkrankung, der Parkinsonschen Erkrankung oder auch von Krebserkrankungen von Bedeutung. Das Gewebe dieser durch fortschreitenden, nekrotischen Zelluntergang charakterisierten Erkrankungen sollte sinnvollerweise nicht erst dann untersucht werden, wenn ein großer Teil von Zellen oder Zellbestandteilen bereits abgestorben und dementsprechend ein größerer Anteil an Proteinen „sekundär“ verändert ist. Im Hinblick auf das bessere Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen erscheint es zielführender, das betreffende Gewebe in möglichst frühem Stadium zu untersuchen, in welchem noch gering ausgeprägte, weitgehend krankheitsspezifische Proteine als quantitativ verändert identifiziert werden können. Auch bei pharmakologischen Untersuchungen können Vervielfachungen in der Proteinexpression nach Medikamentenapplikation in vielen Fällen eher toxische Nebenwirkungen darstellen, als zur Klärung von unbekanntem Wirkungsmechanismen der betreffenden Pharmaka beitragen. Und auch physiologische Prozesse, wie z.B. Lernen oder Altern können höchst wahrscheinlich um so besser verstanden werden, je sensitiver Änderungen in der Expression der daran beteiligten Proteine gemessen werden können.