

6. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Dissertation bearbeitet folgende zwei Problembereiche der Methodik der 2D-Gelelektrophorese:

a) Darstellung transmembraner Proteine (TMP): Ziel dieses Projektes war es, möglichst viele TMP aus Synaptosomen des Rattenkortex auf 2D-Gelen darzustellen. Zur Anreicherung hydrophober Proteine wurden die Synaptosomen zusätzlich mit 7 M Urea oder mit Na₂CO₃ gewaschen. Die Proteinextrakte wurden auf 2D-Gele mit den pH-Bereichen 4-7 und 6-11 geladen. Von den 492 durch MALDI-MS/MS identifizierten Proteinen besaßen nur zwei jeweils eine transmembrane Domäne. Weitere Experimente zur Abklärung des Verbleibs der TMP zeigten, dass diese Proteine in der Geloberkante des 2D-Gels „stecken geblieben“ waren: dort konnten durch LC-MS/MS 34 nicht fokussierte TMP mit bis zu 12 transmembranen Helices identifiziert werden. Dieser Befund weist darauf hin, dass die TMP – vermutlich aufgrund „hydrophober Wechselwirkungen“ - nach Extraktion und Denaturierung hochmolekulare Aggregate bilden. Diese Aggregate quellen in die IPG-Streifen der 1. Dimension ein, fokussieren dort aber nicht. Sie werden dann auf das 2D-Gel transferiert, wo sie jedoch aufgrund ihrer Größe an der Geloberkante „hängen bleiben“. Zusätzliche Experimente mit der Methodik der 1D-Gelelektrophorese zeigten, dass sich diese Aggregate weder durch Erhitzen noch durch Vorbehandlung mit organischen Lösungen, Säuren oder kationischen Detergenzien auflösen lassen.

b) Quantitative Vergleichbarkeit: Ziel des zweiten Teils dieser Dissertation war es, herauszufinden, welcher Prozentsatz an Proteinspots zwischen zwei Gruppen von 2D-Gelen im pH-Bereich 4-7 signifikant unterschieden werden können, wenn diese mit verschiedenen Proteinmengen beladen sind („Power-Analyse“). Anfängliche Experimente mit zwei Gelgruppen von je sechs Gelen, beladen mit jeweils 200 µg bzw. 250 µg, zeigten unzureichende Ergebnisse: Von den 546 gematchten Spots zeigten nur 130 Spots (23,8%) eine signifikante Veränderung ($p < 0,05$) in der Spotintensität. Davon waren 72 Spots aus der 250µg-Gruppe signifikant erhöht, 58 Spots dieser Gruppe waren jedoch signifikant *niedriger* als in der 200µg-Gruppe. Die Konstruktion neuer Apparaturen zur gleichzeitigen Verarbeitung von 24 Gelen während aller Einzelschritte der Prozedur der 2D-Gelelektrophorese sowie die Eliminierung verschiedener, für die hohen Intergelvarianzen verantwortlichen Faktoren verbesserten die Ergebnisse erheblich. Es gelang, signifikante Unterschiede in den Spotintensitäten bei 77%-90% aller gematchten Spots nachzuweisen, wenn Gelgruppen mit einem Unterschied in der Proteinlademenge von 25% verglichen wurden. Bei 50%igen Unterschieden in der Proteinlademenge konnten über 90% der gemachten Spots signifikant unterschieden werden. Damit ist es erstmals möglich, mit der Methodik der 2D-Gelelektrophorese Unterschiede der Intensitäten von Proteinspots zwischen zwei Stichproben von nur 25% zuverlässig statistisch zu erfassen.