

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Analysenwaage Typ 2604	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Auswertesoftware Delta 2D	Decodon Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Auswertesoftware Image Quant	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Chromatographiesäule C18 PepMap 100	Dionex, Sunnyvale, USA
„Clean Gel“ Paper Wicks	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Dalt Gelkassette	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
20 cm x 25 cm x 1,5 mm	
Drystrip-Kit	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammer für 24 Gele	Eigenkonstruktion
Eppendorf-Multipette mit Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
0,5 ml, 2,5 ml, 5,0 ml, 12,5 ml	
Eppendorf-Pipette mit Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
einstellbar 10µl, 100µl, 1000µl	
EPS 3500 XL-Spannungsgerät	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Equilibrierkammer	Eigenkonstruktion
EZQ Protein Quantitation Kit	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Färbearatur mit Färbekassetten	Eigenkonstruktion
Färbeschalen	Tupperware, Frankfurt am Main, Deutschland
FLA-3000 Laserscanner	FUJIFILM Photo Film Europe GmbH
Glas-Glas-Homogenisator	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Glas-Teflon-Homogenisator	Braun Biotech Int., Melsungen, Deutschland
Guillotine	Harvards, London, GB
Homogenisationsmotor	IKA, Staufen i.Breisgau, Deutschland
Horizontalschüttler SM 30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Inkubations-Ofen	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
IPG-Drystrips pH 4-7 und pH 6-11	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
IPG-Phor	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
IPG-Tray	Eigenkonstruktion
IsoDalt Electrophoresis System	Hoefer Pharmacia, San Francisco, USA
Gelgießstand	

Isomatten für Gelgießstand	Hoefer Pharmacia, San Francisco, USA
Magnetrührer Combimag RCH	IKH, Staufen i. Breisgau, Deutschland
Messing Platte	
Mikropräparationspinzetten	Moria-Dugast S.A., Paris, France
Micro-T-Piece	Upchurch, Oak Harbour, USA
Multiphor-II-Kammer	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Multitemp (Kältegerät)	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Proteomics Analyser 4700	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
pH-Meter 761	Knick Messgeräte, Berlin, Deutschland
Pasteur-Pipette	Brand, Gießen, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plexiglasplatten 20 cm x cm	Hoefer Pharmacia, San Francisco, USA
Protean Cell II Xi mit Gießstand und Glasplatten	Bio Rad, München, Deutschland
Reaktionsgefäße 2ml, 1,5ml, 0,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rehydrierungs-Tray	Eigenkonstruktion
Schwenkbecherrotor SW 41 Ti	Beckman Instruments, Palto Alto, California, USA
Software 4000 Series Explorer 3.6	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Software GPS Explorer 3.5	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Statistiksoftware SPSS	SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, USA
Tisch-Zentrifuge (Microfuge R)	Beckman Instruments, Palto Alto, California, USA
Transferpipette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trennfolien PP 20 cm x cm	Eigenkonstruktion
Ultimate System (nano-LC)	Dionex, Sunnyvale, USA
Ultraschallwasserbad	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Ultrazentrifuge L8-60M	Beckman Instruments, Palto Alto, California, USA
Ultrazentrifugenröhrchen 14ml, 38ml	Beckman Instruments, Palto Alto, California, USA
Universalpumpe	Eheim, Deizisau, Deutschland
UV-Tisch TFL 20 M	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vakuum-Konzentrator Speed Vac	Savant, München, Deutschland
Wirbelmixer VF 2	IKA, Staufen i. Breisgau, Deutschland
ZipTip _µ -C18	Millipore, Schwalbach, Germany

3.1.1 Eigenkonstruktionen

Folgende Apparaturen wurden in unserem Labor von Herrn Dr. Murat Eravci entwickelt: Ein „Rehydrierungs-Tray“ für 24 IPG-Streifen mit einer Länge von 18 cm (Abbildung 1A); ein weiterer Tray („IPG-Tray“) für die gleichzeitige Durchführung der isoelektrischen Fokussierung (IEF) von 24 IPG-Streifen in einer Multiphor-II-Kammer (Abbildung 1B und C); Kammern für die gleichzeitige Equilibrierung von 24 IPG-Streifen (Abbildung 1D), passend für das „IPG-Tray“; eine Elektrophoresekammer ausgestattet mit einer Platin beschichteten Titaniumelektrode, mit welcher 24 Gele parallel in der zweiten Dimension prozessiert werden können (Abbildung 1E); und eine Kammer („Färbekammer“) mit Edelstahlkassetten für die gleichzeitige Fixierung, Färbung und Entfärbung von 24 2D-Gelen (Abbildung 1F und G).

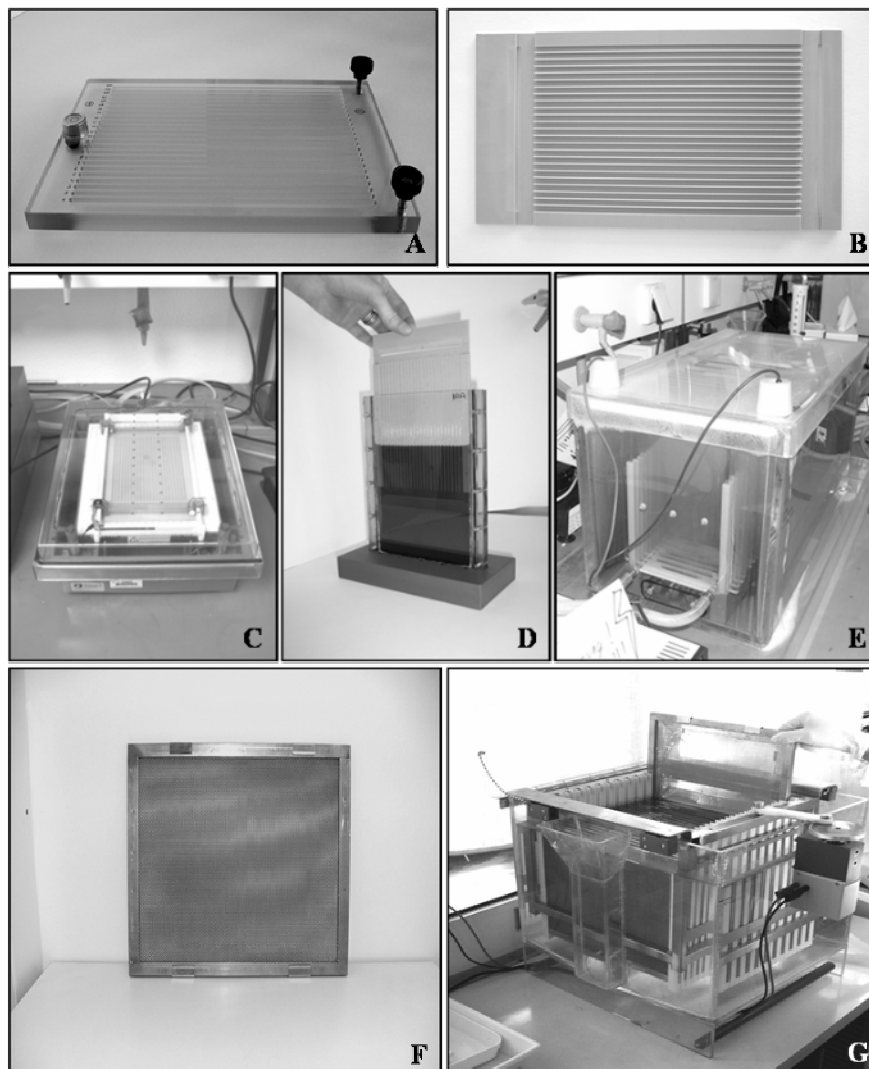


Abbildung 1: Von Herrn Dr. Eravci entwickelte Apparaturen: A) Rehydrierungs-Tray, B) IEF-Tray, C) IEF-Tray in der Multiphor-II-Kammer, D) IEF-Tray in der Equilibrierkammer, E) Elektrophoresekammer, F) Edelstahlkassette für die Färbeapparatur, G) Färbeapparatur

3.2 Chemikalien und Reagenzien

2 β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylalmino]- Propansulfat (CHAPS)	Fluka, Buchs, Schweiz
α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Aceton	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Acetonitril (ACN)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung 40% 37,5:1	Serva, Heidelberg, Deutschland
AG 501 X8 (D) Resin	BioRad, München, Deutschland
Agarose	BRL Life Technologies, USA
Ameisensäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Amidosulfobetain-14 (ASB-14)	Calbiochem, Läfelfingen, Deutschland
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bathophenanthrolindisulfonsäure Dinatriumsalz	Serva, Heidelberg, Deutschland
Benzonase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Calbiochem, Läfelfingen, Deutschland
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBB)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Drystrip Cover-Fluid (Mineralöl)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Eisen(II)sulfat	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Essigsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol MEK-vergällt (99%)	Fluka, Buchs, Schweiz
EZQ Protein Quantitation Kit	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Glycerol	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Glycin	Serva, Heidelberg, Deutschland

HPLC-Wasser	Fluka, Buchs, Schweiz
Iodacetamid (IAA)	Fluka, Buchs, Schweiz
IPG-Puffer pH 4-7 und pH 6-11	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Isopropanol (99%)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumpentachloroäquoruthenat (III)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Lutensol GD 70 (Lut GD 70)	Hoechst, Frankfurt a. Main, Deutschland
Magnesiumchlorid (Mg ₂ Cl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol (99%)	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Octyl-β-D-glucopyranosid (OGP)	Calbiochem, Löffelfingen, Deutschland
Pefabloc SC (Proteaseinhibitorcocktail)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Pharmalyte pH 3-10	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Phosphorsäure (85%)	Fluka, Buchs, Schweiz
Pyronin Y	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (37%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Sypro Ruby	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
TGS-Elektrophorese-Tank-Puffer (10 x Tris-Glycin-SDS-Puffer)	BioRad, München, Deutschland
Thiourea	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tributylphosphin (TBP)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka, Buchs, Schweiz
Triton X 100	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Trizma Base	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Trockeneis (CO ₂)	Eis-Czaby, Berlin, Deutschland
Trypsin	Promega, Mannheim, Germany

Urea	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Zwittergent 3-16 (ZW 3-16)	Calbiochem, Löffelfingen, Deutschland

3.3 Standardmethoden

Das Methodenspektrum der hier vorgelegten Untersuchung ist relativ umfangreich. Es umfasst die Präparation der Hirnareale der Ratte, die subzelluläre Fraktionierung der Hirnareale, die Extraktion und Solubilisierung von Proteinen aus Homogenaten bzw. Subfraktionen, ihre Auftrennung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D bzw. 2D), ihre Quantifizierung durch eine geeignete Software, sowie ihre Identifizierung durch verschiedene massenspektrometrische Methoden. Bei der subzellulären Fraktionierung war mir Herr Dr. Oliver Brödel behilflich, die massenspektrometrischen Analysen wurden von ihm durchgeführt. An der Durchführung einiger 1D-Experimente war Frau Stephanie Weist beteiligt. Die Entwicklung der oben dargestellten neuen Apparaturen sowie die Herstellung des Rutheniumfarbstoffes erfolgte durch Herrn Dr. Murat Eravci.

3.3.1 Haltung der Tiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von ca. 250 - 300 g wurden jeweils zu viert in einem Käfig bei einer Temperatur von 20°C und einem simulierten 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Den Versuchstieren standen Futter und Wasser ad libidum zur Verfügung.

3.3.2 Hirnpräparation

Die Versuchstiere wurden ohne Betäubung dekapiert. Die Präparation des Gehirns in insgesamt elf Hirnareale wurde nach der von Glowinski und Iversen (1966) beschriebenen Methode durchgeführt (Glowinski and Iversen 1966). Details zu dieser Methodik sind in früheren Publikationen meiner Arbeitsgruppe enthalten (Pinna et al. 2003).

Alle Hirnareale wurden nach der Präparation sofort auf Trockeneis (CO₂) tiefgefroren. Die einzelnen Areale wurden nachfolgend in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße transferiert und bei -80°C gelagert.

3.3.3 Subzelluläre Fraktionierung – Präparation der Synaptosomen

Die Methodik der subzellulären Fraktionierung wurde von Herrn Dr. Oliver Brödel für die spezifischen Fragestellungen meiner Arbeitsgruppe entwickelt (Broedel et al. 2003; Pinna et al. 2003). Sie beruht auf dem Prinzip der "Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation". Bei dieser Methode werden die unterschiedlichen Zellbestandteile aufgrund ihrer verschiedenen Größe und Dichte durch mehrere Zentrifugationsschritte mit jeweils unterschiedlichen Sucrose-Dichtegradienten voneinander getrennt und anschließend isoliert. Für die hier beschriebene Fraktionierungsmethodik wurden die Methoden von Lovtrup-Rein und McEwen (1966) mit jener von Dodd et al. (1981) kombiniert und in verschiedenen Einzelschritten modifiziert (Lovtrup-Rein and McEwen 1966; Dodd et al. 1981). In den hier durchgeführten Experimenten wurde ausschließlich mit Synaptosomen gearbeitet, die Fraktionen Nuclei, Mitochondrien, Myelin und Microsomen wurden nicht verwandt.

Die Reinheit und die morphologische Qualität der subzellulären Fraktionen wurde sowohl elektronenmikroskopisch, als auch durch Bestimmung von „fraktionsspezifischen biochemischen Markern“ überprüft. Alle Fraktionen zeigten einen hohen Reinheitsgrad mit nur gering gradigen Kontaminationen aus den jeweils anderen Fraktionen (die elektronenmikroskopischen Bilder, sowie die Ergebnisse der „Markerbestimmungen“ wurden bei Brödel et al. (2003) ausführlich dargestellt).

Für die Isolation der Synaptosomen wurde tiefgefrorenes Gehirngewebe in einem Verhältnis von 1:10 in eiskalter 0,32 M Sucroselösung mit einem motorbetriebenen Glas-Teflon-Homogenisator (Wandabstand 0,2 mm) zerkleinert. Das so erhaltene Homogenat wurde in einer L8-60M Ultrazentrifuge der Firma Beckman Instruments für 15 min bei 850 x g zentrifugiert und der Überstand (SN1) und das Pellet (P1) voneinander getrennt. Das Pellet P1 wurde in einem nächsten Schritt in 2 ml eiskalter 0,32 M Sucrose resuspendiert und noch einmal für 10 min bei 600 x g zentrifugiert. Der so erhaltenen Überstand wurde mit dem Überstand SN1 vereinigt, mit 0,32 M Sucrose aufgefüllt, mit 1,2 M Sucrose unterschichtet und bei 187000 x g für 30 min zentrifugiert. Die dabei entstehende Interphase wurde separiert, wiederum mit 0,32 M Sucrose aufgefüllt, mit 0,85 M Sucrose unterschichtet und nochmals bei 187000 x g für 15 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthielt die synaptosomale Fraktion (Synaptosomen).

3.3.4 Extraktion und Solubilisierung von Proteinen aus Gehirngewebe

3.3.4.1 Extraktion und Solubilisierung von Proteinen aus Gehirnarealen und Synaptosomen ohne vorherige Anreicherung von Membranproteinen

Die Extraktion und Solubilisierung von Proteinen aus ganzen Gehirnarealen oder Synaptosomen des frontalen Kortex erfolgte mit Hilfe von chaotropen Substanzen (Urea und Thiourea) und Detergenzien (z.B. CHAPS) (Rabilloud 1998).

Das tiefgefrorene Gehirngewebe wurde im fünffachen Volumen des Gewebegewichtes homogenisiert. Proteine aus Synaptosomen des frontalen Kortex wurden in 400 μ l Solubilisierungslösung pro mg Protein extrahiert. Nach Zugabe von Solubilisierungslösung (9 M Urea, 2,5 M Thiourea, 5% CHAPS, 0,5 % Pharmalyte; Resin gefiltert), 150 U/Ansatz Benzonase zum Zerstören enthaltener DNA und 0,1% Pefabloc SC Proteaseinhibitor wurde das Gewebe bzw. die Synaptosomen in einen Glas-Glas-Homogenisator überführt und durch zehn Hübe, unterbrochen durch Eiskühlung, aufgeschlossen. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde die Lösung in Eppendorfgefäße überführt. Eine nachfolgende fünfmalige 30 s Ultraschall- und 10 s Vortexbehandlung sollte die Solubilisierung unterstützen. Wurden die Proteine nachfolgend im pH-Bereich 4-7 aufgetrennt, erfolgte die Zerstörung der Disulfidbrücken im Anschluss an die Ultraschall- und Vortexbehandlung durch eine Inkubation mit 25 μ l/ml Tributylphosphin (TBP) für 60 min bei Raumtemperatur. Um ein Zurückfallen der freien Cytteinreste zu verhindern, müssen diese durch Carboxymethylierung (Acetylierung) mit Iodacetamid geschützt werden. Dieses erfolgte durch eine Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 30 μ l/ml 0,5 M Iodacetamidlösung (Herbert et al. 1998). Da die Proteinproben bei der Auftrennung im pH-Bereich 6-11 nach der von Hoving et al. (2002) beschriebenen Methode (s.u.) erfolgte, war der Einsatz von TBP nicht möglich (Hoving et al. 2002). In diesem Fall wurde der Solubilisierungslösung (s.o.) vor der Homogenisierung 12,5 mM DTT zugesetzt und auf eine gesonderte Behandlung zum Reduzieren und Acetylieren der Cysteinreste nach der Ultraschall- und Vortexbehandlung verzichtet. Unlösliche Zellbestandteile wurden (für die Auftrennung im pH-Bereich 4-7 und 6-11) durch eine einstündige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 20940 x g in einer Beckman-Zentrifuge sedimentiert und Lipide als Overlay aus der Proteinlösung entfernt (Lipidschicht). Eine Zentrifugation mit 100000 x g ergab im Vergleich zu 20940 x g weder eine veränderte Proteinmenge des Pellets noch quantitativ oder qualitativ veränderte Spotmuster auf den 2D-Gelen (Daten nicht gezeigt). Der resultierende Überstand (SN) wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Das Pellet wurde verworfen (Abbildung 2).

Die Extraktion der Membranproteine aus den „7M Urea-“ und „Na₂CO₃-gestrippten“ Fraktionen (s.u.), welche für die Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese verwendet wurden, erfolgte auf dieselbe Weise.

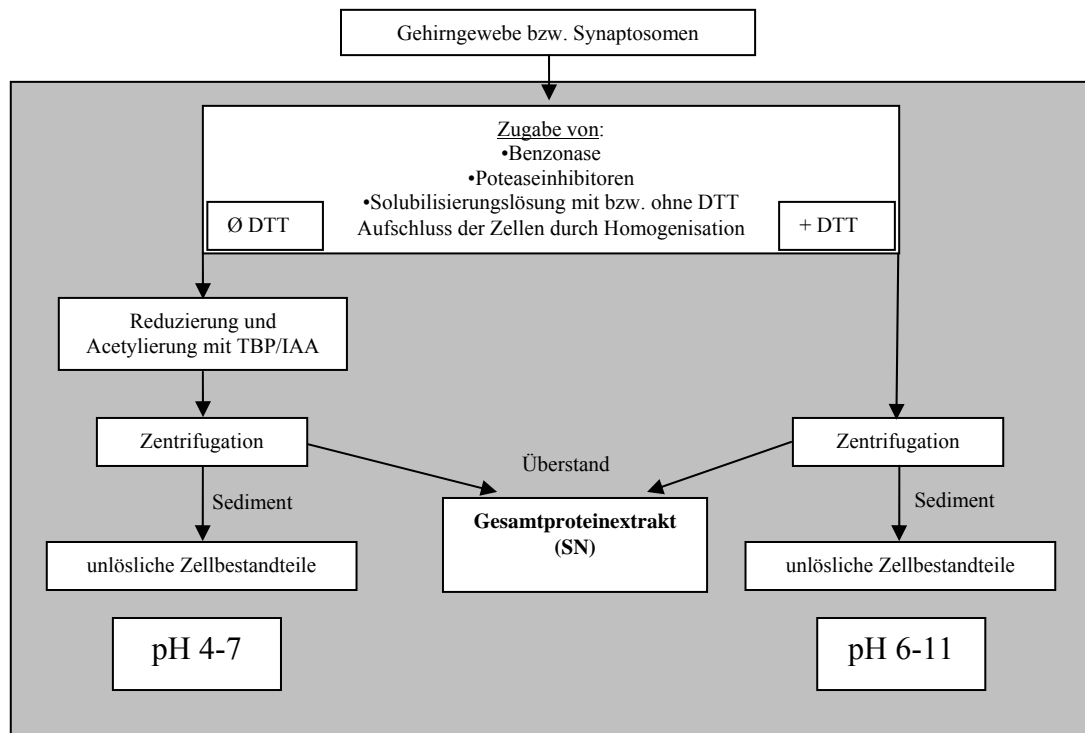


Abbildung 2: Flussdiagramm der Extraktion und Solubilisierung der Gesamtproteine SN für eine Auftrennung im pH-Bereich 4-7 und 6-11

3.3.4.2 Anreicherung von Membranproteinen durch „7 M Urea-Stripping“

Bei der Behandlung synaptosomaler Fraktionen des frontalen Kortex mit 7 M Urea („7 M Urea-Stripping“) wurden 500 µl 7 M Urea-Puffer pro mg enthaltenem Protein eingesetzt. Nach Zugabe von 7 M Urea-Lösung (Resin gefiltert), 150 U/Ansatz Benzonase zum Zerstören enthaltener DNA und RNA und 0,1% Pefabloc SC Proteaseinhibitor wurde die Subfraktion in einem Glas-Glas-Homogenisator durch zehn Hübe, unterbrochen durch Eiskühlung, aufgeschlossen. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde die Lösung in Eppendorfgefäße überführt. Nach fünfmaliger 30 s Ultraschall- und 10 s Vortexbehandlung erfolgte eine einstündige Zentrifugation in einer Beckman-Zentrifuge bei Raumtemperatur und 20940 x g. Der Überstand (SN 1A) wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde nochmals wie oben beschrieben behandelt, zentrifugiert und der Überstand (SN 1B) abgenommen und ebenfalls verworfen. Wurde das membranangereicherte Pellet nicht sofort weiterverarbeitet (Extraktion der Proteine und wie unter 3.3.4.1 beschrieben), erfolgte die Lagerung bei -80°C.

3.3.4.3 Anreicherung von Membranproteinen durch „Na₂CO₃-Stripping“ (Fujiki et al. 1982)

Bei der Behandlung der Synaptosomen des frontalen Kortex mit Natriumcarbonatlösung („Na₂CO₃-Stripping“) wurden 500 µl 100 mM Natriumcarbonatlösung pH 11,5 pro mg enthaltenem Protein eingesetzt. Nach Zugabe der Natriumcarbonatlösung wurde die Subfraktion in einem Glas-Glas-Homogenisator durch zehn Hübe, unterbrochen durch Eiskühlung, aufgeschlossen. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde die Lösung in Eppendorfgefäße überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 30 min Zentrifugation in der Beckman-Zentrifuge bei 4°C und 20940 x g. Der Überstand (SN 1A) wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde nochmals wie oben beschrieben behandelt und zentrifugiert und der Überstand (SN 1B) abgenommen und ebenfalls verworfen. Wurden für die Versuche kleinere Aliquots benötigt (z. B. für 1D-Versuche) wurde die Lösung vor der zweiten Zentrifugation für den SN 1B in die gewünschten Aliquots aufgeteilt und die Aliquots anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Wurde das membranangereicherte Pellet nicht sofort weiterverarbeitet (Extraktion nach der in 3.3.4.1 beschriebenen Vorgehensweise), so erfolgte die Lagerung bei -80°C

3.3.5 Proteinbestimmung

Da die für die Proteinextraktion verwendeten Lösungen zum Teil hohe Konzentrationen an Chaotropen (Urea bzw. Thiourea) und starken Detergentien enthielten, die mit den Proteinbestimmungsmethoden von Bradford (Bradford 1979) oder Lowry (Lowry et al. 1951) nicht kompatibel waren, erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem EZQ™-Protein Quantitation Kit der Firma Molecular Probes. Die dabei verwendete Methode basiert auf der Anfärbung von Proteinen mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Die Durchführung erfolgte nach Herstelleranweisung. Die entstehende Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Laserscanners (Fujifilm FLA-3000) visualisiert, mittels der Software Image Quant der Firma Amersham Biosciences eingelesen und mit MS Excel ausgewertet. Dabei wurden die unbekanntenen Proben gegen eine Ovalbumin-Standardkurve gemessen und der Proteingehalt so quantifiziert.

3.3.6 Durchführung der zweidimensionalen (2D) -Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese besteht aus den folgenden Einzelschritten: 1) Isoelektrische Fokussierung (IEF), 2) Equilibrierung und 3) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

3.3.6.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die isoelektrische Fokussierung der Proteine in der ersten Dimension der 2D-PAGE wurden kommerziell erhältliche IPG-Drystrips mit einer Länge von 18 cm und linearen pH-Gradienten (pH 4-7 und pH 6-11) verwendet. Die IPG-Streifen lagen in dehydrierter Form vor und mussten vor der IEF zunächst rehydriert werden.

3.3.6.1.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) im pH-Bereich 4-7

Die isoelektrische Fokussierung der Proteine im pH-Bereich 4-7 erfolgte nach der von Görg et al. (1988) beschriebenen Methode der immobilisierten pH-Gradienten (IPG) (Görg et al. 1988). Das Rehydrierungsvolumen betrug immer 340µl. Für die in-Gel-Rehydrierung setzte sich die Lösung für die Rehydrierung der Streifen aus entsprechender Menge Proteinlösung, Rehydrierungspuffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 5% CHAPS, 10 mM DTT, 0,4% Pharmalyte, 0,5% Triton X 100, 0,025% Bromphenolblau; Resin gefiltert) und 2% IPG-Puffer pH 4-7 zusammen.

Für die Rehydrierung wurden die IPG-Streifen mit der Gelseite nach oben in das Rehydrierungs-Tray (Eigenkonstruktion s.o.) gelegt, die vorbereitete Rehydrierungslösung möglichst gleichmäßig aufpipettiert und mit mindestens 1 ml Drystrip Cover Fluid überschichtet, um ein Austrocknen der Proben während der Rehydrierungsdauer zu verhindern. Die Rehydrierung erfolgte bei Raumtemperatur (RT) über Nacht. Die rehydrierten IPG-Drystrips wurden dann in das IEF-Tray (Eigenkonstruktion s.o.) überführt, mit HPLC-Wasser getränkte „Clean Gel“ Paper Wicks aufgelegt und die Elektroden aufgesetzt. Die Fokussierung der eingequollenen Proteine erfolgte nach in Tabelle 1 beschriebenem Programm mit ~ 67 kWh im Multiphor II-System bei konstant 15°C (Multitemp).

Tabelle.1: IEF-Programm für die Fokussierung von Proteinen im pH-Bereich 4-7

Spannung [V]	Zeit [h]	Einstellung
100	0:01	Gradient
100	1:00	/
200	1:00	Gradient
350	1:00	Gradient
500	1:00	Gradient
1000	1:00	Gradient
3500	1:30	Gradient
3500	17:29	/
~67 kVh	24:00	

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die IPG-Streifen kurz unter deionisiertem Wasser gespült um überschüssiges Öl zu entfernen und dann entweder sofort in der zweiten Dimension weiter verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.3.6.1.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF) im pH-Bereich 6-11

Die Fokussierung der Proteine im pH-Bereich 6-11 erfolgte nach der von Hoving et al. 2002 beschriebenen Methode (Hoving et al. 2002). Das Rehydrierungsvolumen betrug immer 340µl. Die Rehydrierung bei der Cup-loading-Methode erfolgte ohne Zugabe der Proteinprobe durch folgende Rehydrierungslösung: 7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 2,5% DTT, 10% Isopropanol, 5% Glycerol, 0,025% Bromphenolblau (Resin gefiltert) und 2% IPG-Puffer pH 6-11.

Für die Rehydrierung wurden die IPG-Streifen mit der Gelseite nach oben in das Rehydrierungs-Tray (Eigenkonstruktion s.o.) gelegt, die vorbereitete Rehydrierungslösung möglichst gleichmäßig aufpipettiert und mit mindestens 1 ml Drystrip Cover-Fluid überschichtet, um ein Austrocknen der Proben während der Rehydrierungsdauer zu verhindern. Die Rehydrierung erfolgte bei Raumtemperatur (RT) über Nacht.

Nach der Rehydrierung wurden die Streifen im Aligner des Drystrip-Kits platziert, ein „Clean Gel“ Paper Wick mit HPLC-Wasser befeuchtet und das andere mit 8 ml DTT-Lösung (7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 3,5% DTT, 10% Isopropanol, 5% Glycerol, 0,025% Bromphenolblau (Resin gefiltert) und 2% IPG-Puffer pH 6-11) getränkt. Die Elektroden und Cup-Halter mit den Cups wurden aufgesetzt, alles mit Cover-Fluid überschichtet, die Proteinproben in die Cups

pipettiert und die Proteine mit dem in Tabelle 2 beschriebenen Programm mit ~ 34 kVh im Multiphor II-System bei konstant 15°C (Multitemp) fokussiert.

Tabelle.2: IEF-Programm für die Fokussierung von Proteinen im pH-Bereich 4-7

Spannung [V]	Zeit [h]	Einstellung
300	0:01	Gradient
300	3:00	/
1400	6:00	Gradient
1400	10:00	/
3500	3:00	Gradient
3500	2:00	/
~34 kVh	24:01	

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die IPG-Streifen kurz unter deionisiertem Wasser gespült um überschüssiges Öl zu entfernen und dann entweder sofort in der zweiten Dimension weiter verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.3.6.2 Equilibrierung

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Proteine in den IPG-Streifen für die anschließende Elektrophorese in SDS-haltiger Equilibrierlösung (6 M Urea, 250 mM Tris/HCl pH 6,8, 30% Glycerol, 1% SDS) mit SDS beladen. Waren die IPG-Streifen eingefroren, so wurden diese 1 h zuvor aus der Kühlung genommen und anschließend equilibriert. Die Equilibrierung erfolgte unter leichtem Schwenken in zwei Schritten a 15 min in einer eigens für die „IEF-Trays“ entwickelten Equilibrierkammer (s.o.). Um sicher zu gehen, dass alle Disulfidbrücken zerstört sind, wurde trotz Reduktionsschritt mit Tributylphosphin (TBP) bzw. DTT (je nach pH-Bereich der verwendeten IPG-Strips s.o.) bei der Extraktion der Proteine im ersten Equilibrierschritt nochmals 1% DTT zugegeben (Equilibrierlösung 1). Im zweiten Equilibrierschritt wurden die freigewordenen Cysteinreste der Disulfidbrücken durch 9% Iodacetamid carboxymethyliert (acetyliert), um ein Zurückfallen der Cysteinreste zu verhindern (Equilibrierlösung 2). Um elektroendoosmotische Effekte zu verhindern und einen besseren Übergang der Proteine von der ersten in die zweite Dimension zu erreichen, enthielt der Equilibrierpuffer Glycerol (Görg et al. 2000).

3.3.6.3 SDS-Polyacralamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese besteht aus einer SDS-Polyacralamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli et al. (1970) ohne Sammelgel (Laemmli 1970). Die in dieser Arbeit verwendeten Gele hatten eine Konzentration von 13% T und 6% C. Nach der Equilibrierung der IPG-Streifen wurden diese in den Tankpuffer der Elektrophoresekammer getaucht um überschüssige Equilibrierlösung zu entfernen. Anschließend wurden sie luftblasenfrei auf die Oberkante des Polyacrylamidgels aufgelegt und mit Hilfe einer mit 0,025% Bromphenolblau versetzten 0,5% Agarosegellösung in 1,5 M TrisHCl-Lösung pH 6,8 fixiert. Die 20 cm x 24 cm großen und 1,5 mm dicken Polyacrylamidgele wurden im Hoefer Dalt Multiple Gel Caster (Amersham) gegossen. In diesem Gelstand ist es möglich jeweils 12 Polyacrylamidgele in einem Ansatz zu gießen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Eigenkonstruktion s.o.) bei konstant bei 8°C (Multitemp). Der TGS-Elektrophorese-Tankpuffer setzte sich aus 0,3% Trisma Base, 1,5% Glycin und 0,1% SDS zusammen. Um einen besseren Übergang der Proteine aus der ersten in die zweite Dimension zu erreichen, wurde zunächst für eine Stunde ein Strom von 21 mA/Gel angelegt. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 117 mA/Gel für etwa 25 h. Die Elektrophorese wurde gestoppt wenn die Bromphenolblau-Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte.

3.3.7 Durchführung der eindimensionalen (1D)-Gelelektrophorese

Bei der Darstellung von transmembranen Proteinen (TMP) auf Polyacrylamidgelen stellte sich die Frage, ob ein Erhitzen der Proteinproben mit SDS-haltiger Lösung einen Vorteil bringen könnte. Aus diesem Grund wurde auf die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE) nach Laemmli (1970) zurückgegriffen (Laemmli 1970).

Die zu analysierenden Proben wurden mindestens in einem Verhältnis von 1:8 in 1D-Ladepuffer (2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 62,5 M Tris-/HCl pH 6,8, 0,025% Bromphenolblau) aufgenommen und fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einer PROTEAN II Cell Xi (Bio Rad). Gele der Größe 18 cm x 18 cm und 1,5 mm Dicke mit 20 Probenaschen wurden mit dem dazugehörigen Gießstand für jeweils zwei Gele in einem Ansatz gegossen. Das Sammelgel bestand aus 4% T und 6% C und das Trenngel aus 12% T und 6%. Vor dem Auftrag der Proben in die Probenaschen wurden diese mit TGS-Elektrophorese-Tankpuffer (BioRad) gespült. Pro Tasche wurden maximal 40 μ l Bromphenolblau gefärbte Probe aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei Raumtemperatur und 50mA über Nacht bis die Bromphenolblau-Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte.

3.3.8 Färbung der Polyacrylamidgele

3.3.8.1 Herstellung des Fluoreszenzfarbstoffes und Färbung der Spotmuster

Der in dieser Arbeit verwendete Ruthenium-Fluoreszenzfarbstoff wurde nach der von Rabilloud et al. 2001 veröffentlichten Methode durch Herrn Dr. Murat Eravci hergestellt (Rabilloud et al. 2001).

Die Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe dieses selbst hergestellten fluoreszierenden Rutheniumfarbstoffes in einer 40 l fassenden, eigens konstruierten Färbeapparatur mit Färbekassetten (s.o.) für 24 Gele fixiert und gefärbt. Die Fixierung erfolgte über Nacht in 10% Essigsäure und 40% Ethanol. Daran anschließend erfolgte ein 24 stündiger Färbeschritt mit 15 µM Ruthenium-Farbstoff in 10% Essigsäure und 40% Ethanol. Zur Reduzierung des Backgrounds wurden die Gele nochmals über Nacht in 20% Ethanol entfärbt.

Bei einer geringeren Anzahl von Gelen (z.B. 1D-Gele) wurden diese, nach gleichem Protokoll, in einem Volumen von 400 ml einzeln in Plastikschaalen (Tupperware) fixiert und gefärbt. IPG-Streifen wurden nach Herstelleranweisung mit Sypro Ruby gefärbt.

3.3.8.2 Coomassie (CBB)-Färbung von präparativen Polyacrylamidgelen für massenspektrometrische Untersuchungen

Für die massenspektrometrische Untersuchung von Proteinproben wurden präparative Polyacrylamidgele mit Coomassie (CBB) nach der von Neuhoff et al. (1988) beschriebenen Methode gefärbt (Neuhoff et al. 1988).

3.3.9 Visualisierung und Auswertung von fluoreszenzgefärbten Polyacrylamidgelen

Die Visualisierung und Auswertung der Spotmuster besteht aus dem Scannen der Gele und dem Bearbeiten der Spotmuster mit Hilfe einer geeigneten Software.

Die fluoreszenzgefärbten Polyacrylamidgele und IPG-Streifen wurden mit dem Fluoscanner FLA-3000 bei einer Wellenlänge von 473 nm, einer Sensitivität von 100 und einer Auflösung von 16 Bits per Pixel eingescannt. Die quantitative Auswertung der Intensitäten erfolgte mittels der Software Delta 2D der Firma Decodon.

Bei der Auswertung mit dieser Software werden zunächst die Spots jedes Einzelgels mit jenen eines zu definierenden Referenzgels „gewarped“, das heißt manuell miteinander verbunden. Anschließend wird aus allen Gelen ein so genanntes „Fusionsgel“ erstellt. Dieses muss manuell editiert werden, d.h. zahlreiche artifizielle Spots (z.B. an den Gelrändern) eliminiert und

eventuelle Fehler beim matchen korrigiert werden. Anschließend wird das Spotmuster des Fusionsgels auf alle einzelnen Gele übertragen. Es ist sinnvoll, die einzelnen Gele nochmals im Hinblick auf die Frage zu kontrollieren, ob auf jedem Gel alle Spots mit jenen des Fusionsgels gut gematcht sind. Nach Abschluss dieser Arbeiten können die Spotintensitäten ermittelt werden.

3.3.10 Statistische Auswertungen

Die aus der Gelauswertung generierten Daten wurden mit Hilfe der Software SPSS ausgewertet. Die Ergebnisse werden in der Form von Mittelwerten \pm Standardabweichungen (SD = standard deviation) angegeben. Mögliche Abweichungen von der Normalverteilung wurden mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests analysiert. Statistische Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurden mit Hilfe des Student t-Test für unabhängige Variablen (two tailed) durchgeführt. Zum Vergleich werden bei den wichtigsten Experimenten die Ergebnisse des Mann-Whitney U-Tests ebenfalls angegeben. Pearson's Korrelationskoeffizienten wurden zwischen allen Spots jeweils verschiedener Gele berechnet. Der Variationskoeffizient (CV = coefficient of variation) wurde wie folgt berechnet: Der Mittelwert der Standardabweichungen berechnet über alle Spots wird angegeben als Prozentsatz des Mittelwertes aller Spotintensitäten. Wenn also z.B. der Mittelwert \pm SD aller Spots einer experimentellen Gruppe 20 ± 5 beträgt, dann ist der daraus resultierende Variationskoeffizient 25%. P-Werte von $< 0,05$ gelten als signifikant.

3.3.11 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

Alle massenspektrometrischen Bestimmungen wurden von Herrn Dr. Oliver Brödel an den Massenspektrometern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Peter Jungblut im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie durchgeführt. Auf eine detaillierte Darstellung der Methode wird hier aus Platzgründen verzichtet, da diese in den Publikationen der genannten Arbeitsgruppe enthalten ist (Thiede et al. 2005; Schmidt et al. 2006; Zimny-Arndt et al. 2007).

3.3.11.1 In-Gel-Verdau der Proteine

Der Verdau der 1,5 mm Spots erfolgte nach der von Thiede et al. (2005) beschriebenen Methode mit geringen Abwandlungen (Thiede et al. 2005). Zunächst wurden die Gelstücke zwei Mal in 100 μ l 200 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) in 50% Acetonitril (ACN) für 30 min und im Anschluß noch einmal mit 100 μ l 50 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) in 5% Acetonitril (ACN) ebenfalls für 30 min gewaschen. Die Spots werden dann mit 25 μ l ACN dehydriert und für 30

min bei Raumtemperatur getrocknet. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C mit 80 ng Trypsin in 20 µl 50 mM ABC in 5% ACN bei pH 7,8. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µl 80% ACN, 1% Trifluoressigsäure (TCA) gestoppt. Nach 20 min Schütteln wurden die Überstände abgenommen. Die Gelstücke wurden nochmals mit 20 µl ACN für zehn Minuten geschrumpft, die Überstände gesammelt, vereinigt und in der Speedvac getrocknet. Diese getrockneten Überstände enthielten die zu analysierenden Peptide.

3.3.11.2 Identifizierung der Proteine durch MALDI-MS, MALDI-MS/MS

Für die Proteinidentifikation mit Hilfe des Peptide Mass Fingerprint (PMF) und MALDI MS/MS wurden die Peptide in 1,3 µl 33%ACN, 0,1% TFA gelöst und 0,5 µl der Lösung wurden, vor Auftrag auf das MALDI-Stahl-Target, mit 0,5µl 0.5% α-Cyano-4-Hydroxymizimtsäure (umkristallisiert und bei -20°C gelagert), 50% ACN, 0,3% TFA gemischt. Im 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) wurde zunächst MS-Spektrum für die Identifizierung mittels PMF generiert (Zimny-Arndt et al. 2007). Anschließend wurden die Peptide der drei intensivsten Peaks im TOF/TOF-Mode fragmentiert, um die Identifizierung durch Sequenzinformationen aus den MS/MS-Spektren zu bestätigen. Die Auswertung der Spektren und die Proteinidentifikation erfolgten wie bei Schmidt et al. (2006) beschrieben mit folgenden Abweichungen: Filterbedingungen: mass range: 800-4000 Da (MS); peak density: up to 50 peaks per 200 Da (MS/MS); minimal signal to noise ratio: 10 (MS), 5 (MS/MS). Die Datenbanksuche erfolgte gegen Säugetiereinträge der NCBI-Datenbank mit Hilfe des MASCOT 1.9 Such-Algorithmus (Peptidtoleranz 30 ppm, MS/MS-Toleranz 0,3 Da und eine fehlende Schnittstelle erlaubt)(Schmidt et al. 2006).

3.3.11.3 Identifizierung der Proteine durch LC/MALDI-MS/MS

Die getrockneten und aufgereinigten Peptide wurden chromatographisch mittels Nano-LC aufgereinigt, getrennt und während des Eluierens mit Matrix (0,5% α-Cyano-4-Hydroxymizimtsäure) versetzt. Pro Probe wurden 312 Fraktionen auf eine 4700 Probenplatte aufgetragen. MALDI-MS/MS Spektren wurden mit Hilfe des MALDI-TOF/TOF Instruments 4700 Proteomics Analyzers (Applied Biosystems) generiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem GPS-Explorer 3.5 unter zur Hilfenahme von MASCOT 1.9 gegen die UniProt Database ohne Eingrenzung der Spezies. Weitere von Schmidt et al. (2006) abweichende Bedingungen waren: 100 ppm precursor mass tolerance und 0.3 Da für Fragmente. Die Identifikation erfolgte wie bei Schmidt et al. (2006) beschrieben (Schmidt et al. 2006).

3.4 Einzelne Experimente

3.4.1 Experimente zur verbesserten Darstellung transmembraner Proteine (TMP) aus den Synaptosomen des frontalen Kortex

Bei allen folgenden Untersuchungen wurden jeweils vier Gele pro individuellem Experiment angefertigt. Die Experimente 3.4.1.1 bis 3.4.1.3 wurden zusätzlich in einer weiteren, unabhängigen Untersuchung überprüft.

3.4.1.1 Darstellung im pH-Bereich 4-7 und 6-11 – ohne vorherige Anreicherung von Membranproteinen

Die Darstellung der Proteine aus den Synaptosomen des frontalen Kortex erfolgte in den pH-Bereichen 4-7 und 6-11. Im ersten Teil dieses Versuchs wurden die Proteine aus Synaptosomen nach der in 3.3.4.1 beschriebenen Vorgehensweise für die Auftrennung im pH 4-7 extrahiert, die Proteinmenge bestimmt (s. 3.3.5) und 200 μg nach der in 3.3.6.1.1 für den pH-Bereich 4-7 beschriebenen Methode aufgetrennt. Färbung und Visualisierung erfolgte wie unter 3.3.8 und 3.3.9 beschrieben.

Im zweiten Teil des Versuchs wurden die Proteine aus den Synaptosomen des frontalen Kortex nach der in 3.3.4.1 für den pH-Bereich 6-11 beschriebenen Methode extrahiert, die Proteinmenge bestimmt (s. 3.3.5) und 200 μg im pH-Bereich 6-11 nach der dafür in 3.3.6.1.2 beschriebenen Methode aufgetrennt. Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff und Visualisierung erfolgte wie unter 3.3.8 und 3.3.9 beschrieben.

Zur Durchführung massenspektrometrischer Untersuchungen wurde ein weiteres Gel mit 600 μg Protein beladen, im pH-Bereich 4-7 aufgetrennt und das resultierende 2D-Gel mit Coomassie (CBB) gefärbt (s. 3.3.8.2). Aus diesem Gel wurden 420 Spots gestochen und mittels MALDI-MS/MS identifiziert (s. 3.3.11).

3.4.1.2 Darstellung im pH-Bereich 4-7 und 6-11 – nach Anreicherung von Membranproteinen durch „7 M Urea-Stripping“

In diesem Experiment wurden hydrophile Proteine durch eine Waschung mit 7 M Urea-Lösung (7 M Urea-Stripping) abgetrennt. Die Behandlung der Synaptosomen des frontalen Kortex mit 7 M Urea-Lösung erfolgte nach der in 3.3.4.2 beschriebenen Methode. Die Proteine im resultierenden Pellet wurde nach der in 3.3.4.1 für pH 4-7 oder 6-11 beschriebenen Methode extrahiert. Nach der Proteinbestimmung (s. 3.3.5) wurden jeweils 200 μg Protein mittels 2D-Gelelektrophorese im pH-Bereich 4-7 und 6-11 nach der in Abschnitt 3.3.6 beschriebenen

Methode aufgetrennt. Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff und Visualisierung erfolgte wie unter 3.3.8 und 3.3.9 beschrieben.

Aus einem mit 500 µg beladenen, mit CBB gefärbten präparativen Gel im pH-Bereich 6-11 wurden 72 Spots ausgestochen und mittels MALDI-MS/MS identifiziert (s. 3.3.11).

Zusätzlich wurden die Effekte der folgenden Detergenzien auf die Darstellung von TMP untersucht: Octyl-β-D-glucopyranosid (**OGP**), Dodecyl-β-D-maltosid (**DDM**), Lutensol GD 70 (**Lut GD 70**), Zwittergent 3-16 (**ZW 3-16**), Amidosulfobetain-14 (**ASB-14**). Dafür wurden die Proteine aus dem mit 7M Urea gewaschenen Pellet mit den oben genannten Detergenzien in einer Konzentration von 4% nach Standardverfahren extrahiert (s. 3.3.4.1) und jeweils 200 µg im pH-Bereich von 6-11 aufgetrennt. Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff und Visualisierung erfolgte wie unter 3.3.8 und 3.3.9 beschrieben.

3.4.1.3 Darstellung im pH-Bereich 4-7 und 6-11 – nach Anreicherung von Membranproteinen durch „Na₂CO₃-Stripping“

Die von Fujikii (Fujiki et al. 1982) beschriebene Methode der Natriumcarbonatwaschung („Na₂CO₃-Stripping“) beruht auf dem Prinzip, dass sich sowohl die löslichen und membranassoziierten Proteine als auch die intakten Membranen eine negative Ladung annehmen und sich damit abstoßen (Rabilloud 1999). Die Proteine können dann durch Zentrifugation von den intakten Membranen getrennt werden.

Für die Analyse von „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex mittels 2D-Gelelektrophorese wurden diese nach der in Abschnitt 3.3.4.3 beschriebenen Methode behandelt und die Überstände (SN 1A und SN 1B) verworfen, um die löslichen Proteine abzutrennen. Aus dem verbleibenden Pellet wurden die Membranproteine, je nach folgender Auftrennung (pH 4-7 oder pH 6-11) mit Solubilisierungslösung extrahiert (s. 3.3.4.1), die Proteinmenge bestimmt (s. 3.3.5) und zunächst 200 µg Protein nach Standardprotokoll im pH-Bereich 4-7 und 6-11 aufgetrennt, mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und visualisiert (s. 3.3.6, 3.3.8- 3.3.9).

In einem weiteren Versuch wurden dann nochmals 700 µg Protein mittels *in-Gel-Rehydrierung* im pH-Bereich 6-11 aufgetragen und getrennt. Dafür wurden Synaptosomen wie oben beschrieben behandelt, die Membranproteine gewonnen und die Proteinmenge bestimmt (s.o.). Duplikate von je 700 µg Protein wurden durch *in-Gel-Rehydrierung* (s. 3.3.6.1.1) in IPG-Streifen mit einem pH-Bereich 6-11 eingegeben und nach der in 3.3.6.1.1 für pH 4-7 beschriebenen Methode aufgetrennt. Es wurden die Bedingungen für die Fokussierung im pH-Bereich 4-7 gewählt, da die Proteine per *in-Gel-Rehydrierung* in die Streifen eingebracht wurden.

Zusätzlich wurde jeweils ein IPG-Streifen vor und einer nach der zweiten Dimension mit Sypro Ruby nach Herstelleranweisung gefärbt und eingescannt.

Aus dem stark gefärbten horizontalen Streifen am oberen Gelrand des mit 700 µg Protein beladenen Gels im pH-Bereich 6-11 wurden an zwei verschiedenen Stellen (Abbildung 6B Position 1 und 2) Bereiche ausgestochen und durch LC-MS/MS identifiziert (s. 3.3.11)

3.4.1.4 Darstellung von „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen mittels 1D-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Die Methodik der 2D-Gelelektrophorese unterscheidet sich von jener der 1D-Gelelektrophorese unter anderem dadurch, dass die Proteine bei der 1D-Gelelektrophorese durch eine fünf minütige Inkubation bei 95°C denaturiert und mit SDS beladen werden, mit dem Ziel, Proteinoligomere zu trennen. Während des Equilibrierungsschrittes der 2D-Gelelektrophorese kann nicht erhitzt werden, da sonst Urea zu Isocyanat zerfällt und dieses unerwünschte Modifikationen, wie z.B. Carbamylierungen an den Proteinen verursachen kann (Righetti 2006).

In dem hier beschriebenen Versuch wurden Homogenat (wie unter 3.3.4.1 beschrieben hergestellt), eine Synaptosomenfraktion und eine „Na₂CO₃-gestrippte“ synaptosomale Fraktion des frontalen Kortex mit der entsprechenden Menge 1D-Lade-Puffer versetzt und 10 µg und 30 µg Protein in 40 µl aufgetragen (s. 3.3.7). Das Homogenat und die nicht „gestrippte“ synaptosomale Fraktion des frontalen Kortex wurden zu Vergleichszwecken ausgewählt. Die elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung der Proteine aus den drei verschiedenen Proben mit Fluoreszenzfarbstoff erfolgte nach der in 3.3.7 bis 3.3.9 beschriebenen Verfahrensweise.

3.4.1.4.1 Effekte von Inkubationstemperatur und -zeit auf die Darstellung der Proteine

Der Einfluss der Inkubationstemperatur und -zeit auf die Proteine aus „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex wurden in diesem Experiment ermittelt. Dazu wurden diese mit der entsprechenden Menge 1D-Lade-Puffer versetzt (s. 3.3.7) und je vier Aliquot bei 4°C, Raumtemperatur, 60°C und 100°C inkubiert. Pro Temperatur wurden Inkubationszeiten von 5 min, 1 h, 6 h und 24 h getestet. Nach der Inkubation wurden 10 µg Protein in 40 µl Probe auf ein 1D-Gele geladen. Die elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung der Proteine aus den drei verschiedenen Proben mit Fluoreszenzfarbstoff erfolgte nach der in 3.3.7 bis 3.3.9 beschriebenen Verfahrensweise.

3.4.1.4.2 Effekte von Trifluoressigsäure (TFA) auf die Darstellung der Proteine

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Aggregate aus hydrophoben Proteinen mit Trifluoressigsäure (TFA) aufgelöst werden können (Hennessey and Scarborough 1989). Daher wurde hier der Versuch unternommen, Proteinaggregate (s.u.) mit Hilfe von TFA aufzulösen.

Hierfür wurden zunächst „Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen des frontalen Kortex nach der in 3.3.4.3 beschriebenen Methode gewonnen. Für die TFA-Behandlung wurden pro 10 µg Protein 100 µl 100% TFA eingesetzt, je ein Pellet darin resuspendiert und eine Stunde, vier Stunden bzw. 22 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die TFA wurde im Anschluss durch Verdampfen unter einem Stickstoffstrom entfernt. Bei einem weiteren Versuch wurde TFA vor dem Auftrag auf das Gel nicht vollständig entfernt sondern gleich mit 1D-Ladepuffer versetzt und aufgetrennt. Die nach der Entfernung der TFA resultierenden Pellets und ein Kontrollpellet („Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen des frontalen Kortex), ohne TFA Behandlung, wurden in der entsprechenden Menge 1D-Ladepuffer gelöst und 10 µg Protein in 40 µl Lösung auf ein 1D-Gele geladen. Elektrophorese, Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff und Visualisierung erfolgten wie unter 3.3.7 bis 3.3.9 beschrieben.

3.4.1.4.3 Extraktion der Proteine mit organischen Lösungsmitteln

Zunächst wurde getestet, ob bzw. in wie weit die folgenden Lösungsmittel in einer Konzentration von 50% bzw. 100% die Proteine aus „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex extrahierten: Methanol, Ethanol, Isopropanol, Aceton, Acetonitril, Dimethylsulfoxid (DMSO).

Sieben Synaptosomen des frontalen Kortex wurden, wie in 3.3.4.3 beschrieben, mit Natriumcarbonat „gestrippt“, vor der letzten Zentrifugation in 13 Aliquots à 500 µl (ca. 500 µg) aufgeteilt und zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und verworfen. Zwölf Pellets wurden in je 85 µl eisgekühltem Lösungsmittel zunächst für 2 min gevortext und dann unter bis zu fünfmaliger Wiederholung von Ultraschall- und Vortexbehandlung (30 s und 10 s) gelöst. Es erfolgte eine einstündige Zentrifugation bei 20940 x g und 4°C in einer Tischzentrifuge. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände abpipettiert, von jeder Probe ein Aliquot von 5 µl für die Proteinbestimmung abgenommen, in der Speed-Vac getrocknet und für die Proteinbestimmung (s. 3.3.5) in 30 µl 1D-Lade-Puffer aufgenommen.

Da die 100%igen Lösungen - mit Ausnahme des DMSO - nur sehr wenig Protein extrahierten, wurden mit diesen Proben keine elektrophoretische Auftrennung vorgenommen (s. Tabelle 4). Von allen anderen Proben wurde 10µg Protein mit Glycerol und Bromphenolblau versetzt und

auf ein 1D-Gel aufgetragen. Um einen negativen Einfluss der Lösungsmittel auf die 1D-Gelelektrophorese auszuschließen wurden zusätzlich 10 µg der Überstände aus der Extraktion mit 50% Ethanol und 100% DMSO getrocknet in 40 µl 1D-Ladepuffer aufgenommen und auf ein 1D-Gel aufgetragen. Zur Kontrolle wurden zudem 10 µg Protein von „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex ohne Lösungsmittelbehandlung aufgetragen. Die Auftrennung und Visualisierung mit Fluoreszenzfarbstoff erfolgte wie unter 3.3.7 bis 3.3.9 beschrieben.

3.4.1.5 Extraktion und Auftrennung der Proteine mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Das folgende Experiment wurden auf der Basis der von Navarre et al. (2002) etablierten Methodik zur Extraktion von Membranproteinen durch das kationische Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) durchgeführt (Navarre et al. 2002). Proteine aus Homogenat und „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex wurden mit Hilfe der CTAB-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (CTAB-PAGE) aufgetrennt.

Dazu wurde je ein frontaler Kortex in 500 µl CTAB-Ladepuffer (2% CTAB, 10% Glycerol, 2% β-Mercaptoethanol, 0,025% Pyronin Y) und 50 µl Pefabloc SC und je einer in 500 µl CTAB-Ladepuffer mit 3 M Urea und 50 µl Pefabloc SC in einem Glas-Glas-Homogenisator mit 10 Strokes homogenisiert, mit fünf Mal 30 s Ultraschall und 10 s Vortex behandelt und für 1 h bei Raumtemperatur und 20940 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Für die Proteinproben aus „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen wurde eine Fraktion nach dem „Stripping“ in 250 µl CTAB-Ladepuffer und eine zweite Fraktion in 250 µl CTAB-Ladepuffer mit 3 M Urea resuspendiert und mit fünf Mal 30 s Ultraschall und 10 s Vortex behandelt. Die Proteinbestimmung erfolgte wie unter 3.3.5 beschrieben. Je 10 µg und 30 µg Protein in 40 µl Volumen wurden auf ein Gel (Sammelgel 8% T, 6% C pH 4,1: 0,1% CTAB, 4 mM Ascorbinsäure; 125 mM KH₂PO₄, pH 4,1 (H₃PO₄), 0,0125 mM FeSO₄, 0,0025% H₂O₂ und Trenngel 12% T, 6% C pH 2,1: 0,1% CTAB, 4 mM Ascorbinsäure; 75 mM KH₂PO₄, pH 4,1 (H₃PO₄), 0,0125 mM FeSO₄, 0,0025% H₂O₂) aufgetragen und bei 50 mA über Nacht auf der Protean Cell II Xi aufgetrennt, bis die Markerfront (Pyronin Y) den unteren Gelrand erreicht hatte. Der Elektrophorese-Tankpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 0,1% CTAB, 150 mM Glycin, 50 mM Phosphorsäure. Die Visualisierung erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoff (s. 3.3.8 und 3.3.9).

3.4.2 Quantitative Untersuchungen

Gegenstand dieser Experimente war einerseits die Identifizierung von Ursachen für Intergelvarianzen und andererseits die Durchführung von so genannten „Power-Studien“. Mit Hilfe einer „Power-Analyse“ wird untersucht, welcher Prozentsatz aller Proteinspots zwischen zwei Gruppen als signifikant verändert erkannt wird, wenn definierte Proteinmengen auf die Gele der verschiedenen Gruppen geladen werden (z.B. 200 µg und 300 µg je Gruppe, also ein 50%iger Unterschied). Für die Power-Analyse muss außerdem die Gruppengröße definiert und die detaillierte Methodik genau beschrieben werden. Insgesamt wurden folgende zwölf Experimente durchgeführt:

- 1) Quantitativer Vergleich von sechs Gelen, auf welche 200 µg aufgetragen wurden mit sechs Gelen, die mit 250 µg Protein aus Mittelhirnhomogenaten beladen wurden. Alle zwölf Proben wurden in einem IEF-Durchgang analysiert.
- 2) Wie 1), allerdings wurden beide Gruppen in zwei verschiedenen IEF-Durchgängen fokussiert.
- 3) Zwei Gruppen von je acht Gelen wurden mit je 200 µg Protein aus gepooltem Mittelhirnhomogenat beladen. Die Proteine der ersten Gruppe wurden auf IPG-Streifen geladen, welche vom Hersteller mit durchgehenden Seriennummern versehen waren. Die Proteine der anderen Gruppe wurden auf IPG-Streifen geladen, bei denen die Seriennummern unterbrochen waren, die also vermutlich von verschiedenen „Mastergelen“ stammten. Als „Mastergel“ werden Gele bezeichnet aus denen die einzelnen IPG-Streifen geschnitten werden. Aus einem „Mastergel“ lassen sich etwa 50 IPG-Streifen schneiden.
- 4) Eine Gruppe von zwölf Gelen wurde mit 200 µg, eine weitere mit 250 µg Protein aus 24 individuellen Mittelhirnen beladen. Die beiden Gruppen wurden in einem Durchgang der isoelektrischen Fokussierung untersucht.
- 5) Zwei Gruppen zu je sechs Gelen wurden mit je 200 µg Protein aus einem „Pool“ des limbischen Vorderhirns beladen. Die Rehydrierung erfolgte bei der einen Gruppe auf „konventionelle Weise“, das heißt mit der Gelseite nach unten. Die andere Gruppe wurde mit der Gelseite nach oben rehydriert.
- 6) Zwei weitere Gruppen zu je sechs Gelen wurden mit jeweils 200 µg Protein beladen. Das Gewebe stammte aus einem „Pool“ des Kortex. Die Färbung der einen Gruppe erfolgte für jedes Gel individuell in „Tupperschalen“, die andere Gruppe wurde gemeinsam in einer neu konstruierten Färbeapparatur (s.o.) gefärbt.
- 7) Zwölf Gele wurden mit je 200 µg Protein beladen und mit zwölf Gelen verglichen, auf welche 250 µg Protein aufgetragen wurde. Das Protein stammte aus 24 individuellen Mittelhirnhomogenaten.

- 8) In diesem Experiment wurden aus 32 individuellen Mittelhirnhomogenaten 16 „Poole“ aus je zwei Mittelhirnen hergestellt. Anschließend wurden acht Gele, auf denen 200 µg Protein aufgetragen wurden, mit weiteren acht Gelen, die mit 250 µg Protein beladen wurden, verglichen.
- 9) In dieser Gruppe wurden 32 individuelle Septi zu acht „Poolen“, bestehend aus je *vier* Septi, zusammengefasst. Anschließend wurden vier Gele mit jeweils 200 µg und vier weitere Gele mit 250 µg beladen. Dieser Versuch wurde wiederholt, allerdings mit dem Unterschied, dass jeweils vier Gele, von denen jedes mit den Proteinen aus *fünf* „gepoolten“ Septi beladen waren, miteinander verglichen wurden.
- 10) Jeweils zwölf Gele wurden mit entweder 500 µg Protein oder 625 µg Protein aus individuellen Mittelhirnen beladen.
- 11) Jeweils zwölf Gele wurden mit je 800 µg bzw. 1000 µg Protein aus individuellen Mittelhirnen beladen.
- 12) In dieser Gruppe wurden je acht Gele miteinander verglichen. Die Gelgruppen hatten einen Unterschied in der Proteinladungsmenge von 50%. Auf die Gele der ersten Gruppe wurden 200 µg Protein aus jeweils zwei individuellen, „gepoolten“ Mittelhirnen aufgetragen, auf die acht Gele der zweiten Gruppe jeweils 300 µg, ebenfalls aus einem „Pool“ von jeweils zwei Mittelhirnen.
- Die Extraktion (s. 3.3.4), Proteinbestimmung (s. 3.3.5), Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese (s. 3.3.6), Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff (s. 3.3.8) Visualisierung und Auswertung der Spotmuster (s. 3.3.9) und statistische Auswertung (s. 3.3.10) erfolgte wie oben beschrieben.