

4. Ergebnisse

Zu allen in dieser Arbeit gezeigten, mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbten und eingescannten Gelbildern ist zu bemerken, dass diese „invertiert“ dargestellt sind. Auf Grund des fluoreszierenden Farbstoffes sind die Proteine auf den Originalgelen eigentlich hell gefärbt. Zur besseren Visualisierung und Auswertung empfiehlt sich allerdings die Darstellung der Proteine als dunkle Spots.

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

4.1.1 Experimente im pH-Bereich 4-7

4.1.1.1 Darstellung synaptosomaler Proteine ohne Anreicherung transmembraner Proteine (TMP)

Das Gelbild von 200 µg Protein aus der synaptosomalen Fraktion eines frontalen Kortex, aufgetrennt im pH-Bereich 4-7, ist in Abbildung 3A dargestellt. Das Gelbild zeigt ein gut aufgetrenntes Spotmuster mit zahlreichen gut fokussierten Proteinspots.

Aus einem mit 600 µg Protein beladenen und mit CBB gefärbten Gel im pH Bereich 4-7 wurden 416 Proteinspots ausgestochen und durch MALDI-MS analysiert. 292 Proteine konnten eindeutig identifiziert werden, d.h. 70%. Von diesen 292 Proteinen hatte nur ein Protein eine transmembrane Domäne (Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase, Gpd 2 protein). Alle anderen Proteine waren löslich oder membrangebunden. Die Namen aller identifizierten Proteine werden an dieser Stelle nicht aufgelistet, da die hier beschriebenen Experimente ausschließlich darauf abzielen, transmembrane Proteine darzustellen (eine Liste mit allen Namen und detaillierten Identifizierungskriterien dieser Proteine ist von mir erhältlich).

4.1.1.2 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „7 M Urea-Stripping“

Die Auftrennung von 200 µg Protein aus der „7 M Urea-gestrippten“ Synaptosomenfraktion eines frontalen Kortex in zahlreiche gut fokussierte Proteinspots ist in Abbildung 3B zu sehen. Das auf diesem Bild gezeigte Spotmuster sieht dem in Abbildung 3A sehr ähnlich. Es ergeben sich daher keine Hinweise darauf, dass die Membrananreicherungen durch „7 M Urea-Stripping“ zu einem quantitativ veränderten Spotmuster, d.h. zu einer vermehrten Darstellung von TMP geführt hat. Daher wurde dieses Gel nicht massenspektrometrisch analysiert.

4.1.1.3 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „Na₂CO₃- Stripping“

Dargestellt in Abbildung 3C ist das Gelbild von 200 µg Protein der „Na₂CO₃-gestrippten“ synaptosomalen Fraktion eines frontalen Kortex. Im Gegensatz zu den Abbildungen 3A und 3B sind weniger Proteinspots zu sehen. Auffällig ist, dass zahlreiche Spots „perlenketten-artig“ angeordnet sind. Dies könnte ein Hinweis auf chemische Modifikationen der Proteine durch das „Na₂CO₃-Stripping“ sein. Auch auf diesem Gel gibt es keinen Hinweis darauf, dass die Waschung mit Na₂CO₃ zu einer verstärkten Anreicherung von Proteinen führt, welche auf denen in Abbildung 3A und 3B gezeigten Gelen nicht zu entdecken waren. Aus diesem Grund wurde dieses Gel nicht massenspektrometrisch untersucht.

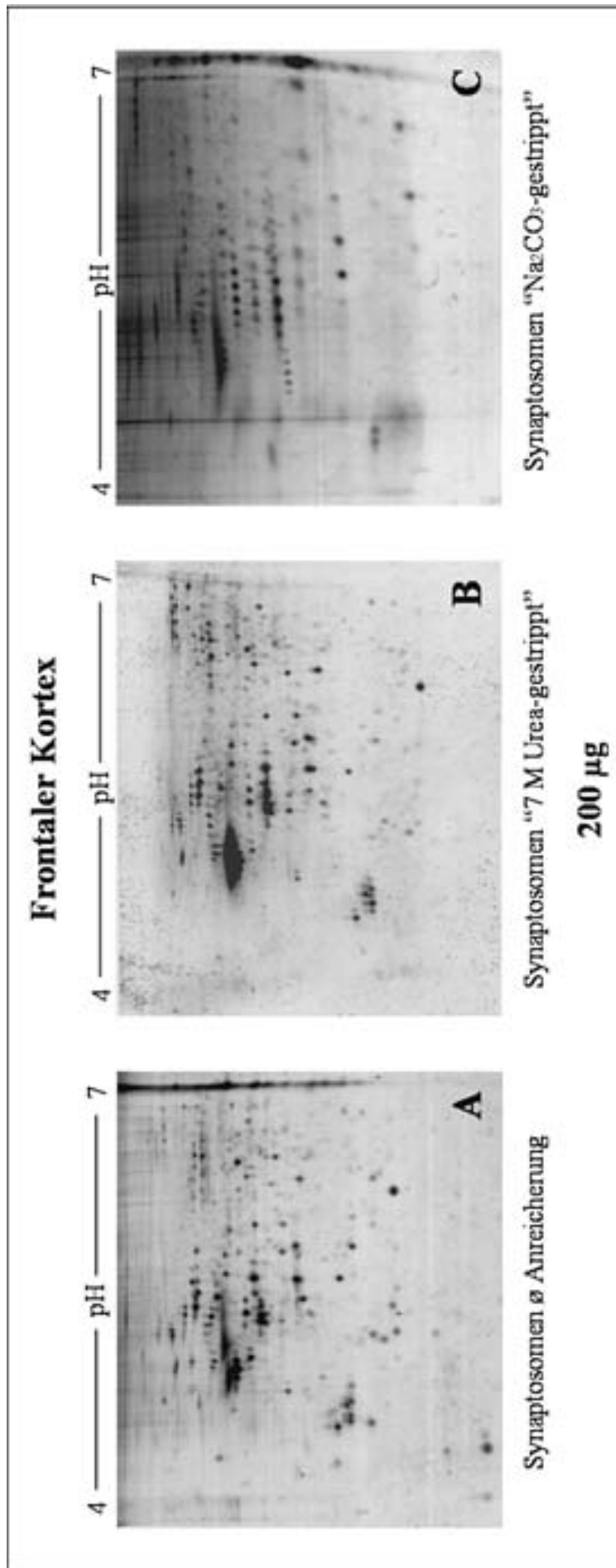


Abbildung 3: Spotmuster auf 2D-Gelen: Auftrennung von jeweils 200 µg Protein in einem pH-Bereich von 4-7 aus A) Synaptosomen des frontalen Kortex ohne vorherige Anreicherung von Membranproteinen, B) „7 M Urea-gestrippten“ und C) „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex.

4.1.2 Experimente im pH-Bereich 6-11

4.1.2.1 Darstellung synaptosomaler Proteine ohne Anreicherung transmembraner Proteine (TMP)

Um die Auftrennung der synaptosomalen Proteine des frontalen Kortex auch im pH-Bereich 6-11 zu analysieren, wurden diese extrahiert und in diesem Bereich aufgetrennt. Das Gelbild dieser Auftrennung ist in Abbildung 5A dargestellt. Es sind viele gut fokussierte Proteinspots zu erkennen. Da in dem entsprechenden Gelbild im pH-Bereich 4-7 nur ein TMP identifiziert werden konnte, wurde bei diesem Versuch auf die massenspektrometrische Identifizierung der Spots im pH-Bereich 6-11 verzichtet.

4.1.2.2 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „7 M Urea-Stripping“

Das aus der Auftrennung von 200 µg Protein aus der „7 M Urea-gestrippten“ synaptosomalen Fraktion des frontalen Kortex im pH-Bereich 6-11 stammende Gelbild ist in Abbildung 5B gezeigt. Der saure Gelbereich zeigt dabei gut fokussierte Proteine. Zum basischen Bereich hin sind vertikale Streifen sichtbar, die auf eine mangelnde Fokussierung hinweisen.

Das Spotmuster des in Abbildung 5B gezeigten Gels unterscheidet sich in einigen Bereichen deutlich von dem in Abbildung 5A dargestellten Gel. Diese Unterschiede könnten sowohl durch schlechtere Fokussierung als auch durch die Darstellung anderer Proteine bedingt sein. Deshalb erschien es sinnvoll, dieses Gel (Abbildung 5B) massenspektrometrisch zu analysieren.

Aus einem mit 500 µg Protein beladenen und mit CBB gefärbten Gel im pH Bereich 6-11 wurden 72 Proteinspots ausgestochen und durch MALDI-MS/MS analysiert. 59 Proteine konnten eindeutig identifiziert werden, d.h. 82%. Von diesen 59 Proteinen hatte nur ein Protein eine transmembrane Domäne (Endoplasmatic reticulum protein 29). Die Namen aller identifizierten Proteine werden an dieser Stelle nicht aufgelistet, da die hier beschriebenen Experimente ausschließlich darauf abzielen, transmembrane Proteine darzustellen (eine Liste mit allen Namen und detaillierten Identifizierungskriterien dieser Proteine ist von mir erhältlich).

4.1.2.2.1 Extraktion mit verschiedenen Detergenzien

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Extraktion mit verschiedenen Detergenzien an Stelle von CHAPS das Spotmuster modifizieren, d.h. zur Darstellung einer höheren Zahl von TMP führen kann. Die in Abbildung 4 zusammengestellten Gelbilder zeigen die Ergebnisse der Extraktion und Auftrennung im pH-Bereich 6-11 von „7M Urea-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex. Dabei ergeben die mit CHAPS extrahierten Proteine das beste Gelbild. Zu sehen sind viele, nur in einem Teilbereich nicht optimal fokussierte Proteinspots. Dieses Gelbild erscheint im Vergleich mit den Gelbildern der anderen Detergenzien trotz gleicher Auflademengen am kräftigsten und am besten fokussiert. Auch die mit OGP extrahierten Proteine zeigen gut fokussierte Spots, allerdings weniger als auf den mit CHAPS extrahierten Gelen. Die anderen vier Detergenzien führten zu qualitativ deutlich schlechteren Spotmustern, insbesondere auf Grund schlechter bis sehr schlechter Fokussierung. Aus diesem Grunde wurden die folgenden Experimente weiterhin mit CHAPS durchgeführt.

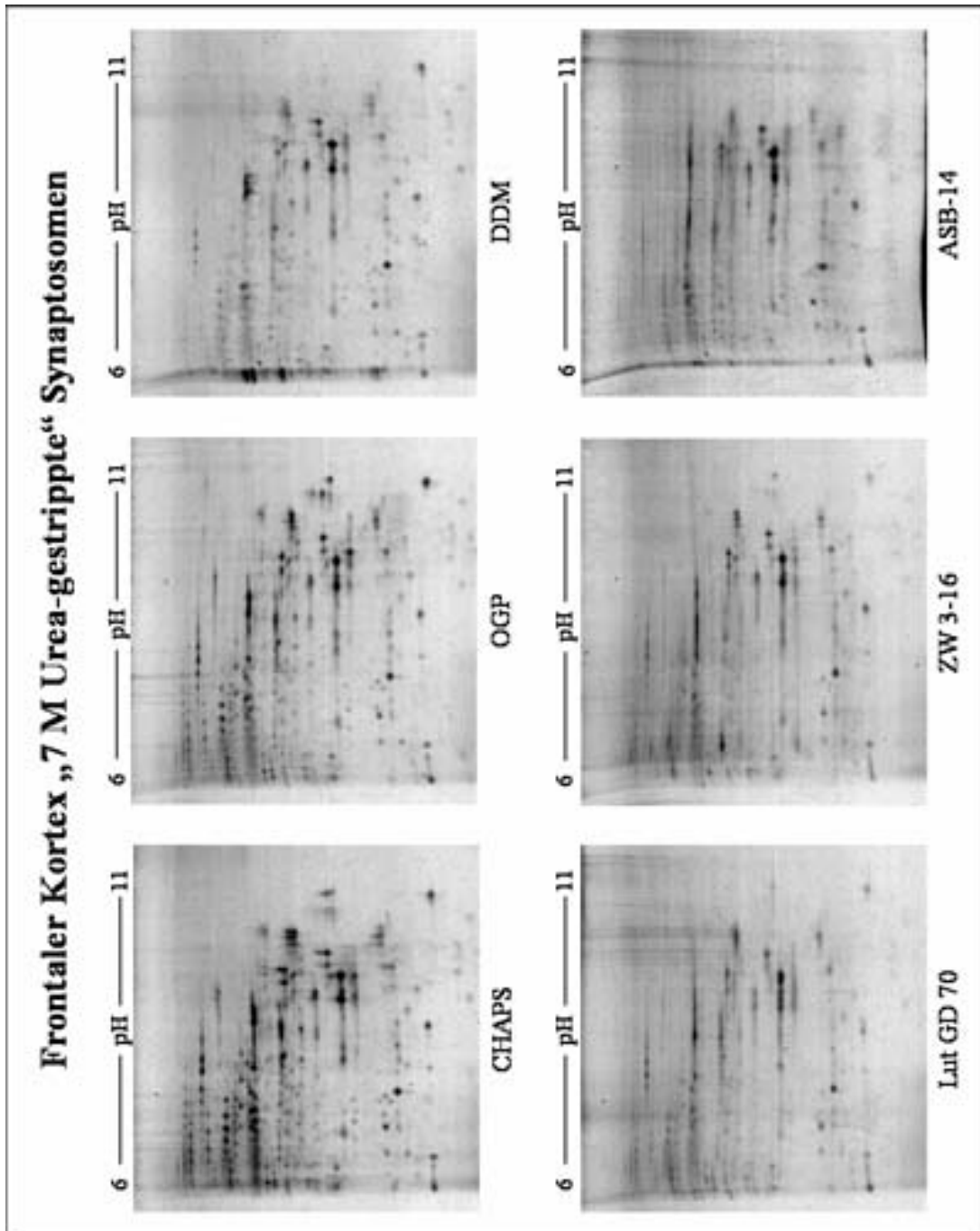


Abbildung 4: Spotmuster auf 2D-Gelen: Auftrennung von 200 µg Protein aus den „7 M Urea-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex in einem pH-Bereich von 6-11. Die Extraktion der Proteine erfolgte mit den folgenden Detergenzien: 3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamino]-Propanosulfat (**CHAPS**), Octyl-β-D-glucopyranosid (**OGP**), Dodecyl-β-D-maltosid (**DDM**), Lutensol GD 70 (**Lut GD 70**), Zwittergent 3-16 (**ZW 3-16**), Amidosulfobetain-14 (**ASB-14**).

4.1.2.3 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „Na₂CO₃-Stripping“

Auch die aus „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex extrahierten Proteine wurden im pH-Bereich 6-11 aufgetrennt. Das Gelbild ist in Abbildung 5C dargestellt. Zu sehen sind wenige, aber gut fokussierte Proteinspots an atypischer Stelle. Deutlich sichtbar ist eine vertikale, dunkle Proteinfärbung auf Höhe der Proteinaufladestelle (Cup-loading).

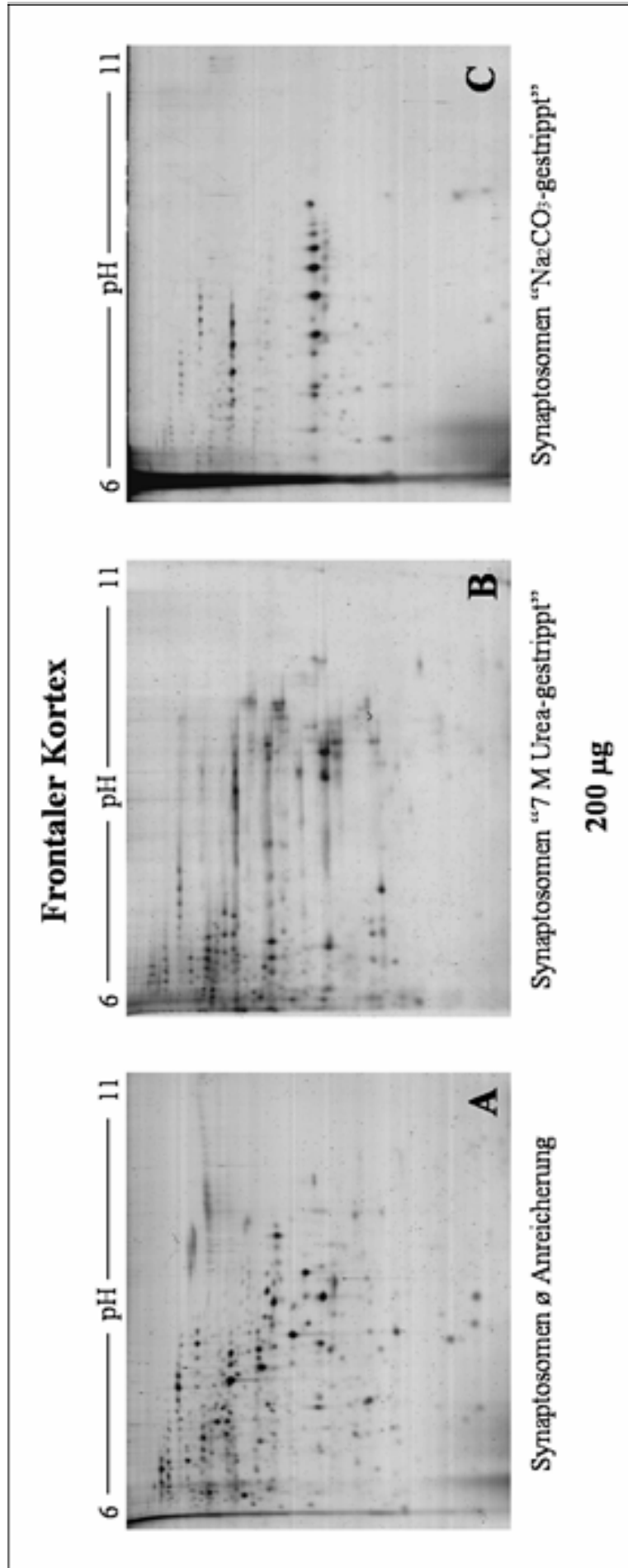


Abbildung 5: Spotmuster auf 2D-Gelen: Auftrennung von jeweils 200 µg Protein im pH-Bereich 6-11 aus A) Synaptosomen des frontalen Kortex ohne vorherige Anreicherung von Membranproteinen, B) „7 M Urea-gestrippten“ und C) „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex.

4.1.2.3.1 Darstellung synaptosomaler Proteine nach „Na₂CO₃-Stripping“ - *in-Gel-Rehydrierung*

Die Auftrennung der nach „Na₂CO₃-Stripping“ extrahierten Proteine aus den Synaptosomen des frontalen Kortex im pH-Bereich 6-11 ist in Abbildung 5C abgebildet. Der deutliche vertikale Streifen könnte ebenso wie die geringe Spotanzahl durch Präzipitation von Membranproteinen an der Aufladestelle verursacht sein. Daher wurde dieser Versuch unter Anwendung von *in-Gel-Rehydrierung* an Stelle von *Cup-loading* wiederholt. Das dabei entstandene Gelbild ist in Abbildung 6A gezeigt.

Bei diesem Experiment ist kein Spotmuster auf den Gelen zu sehen. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit einer Proteinladungsmenge von 700 µg wiederholt (Abbildung 6B). Auf dem entsprechenden Gel wurde eine sehr stark gefärbte Geloberkante festgestellt.

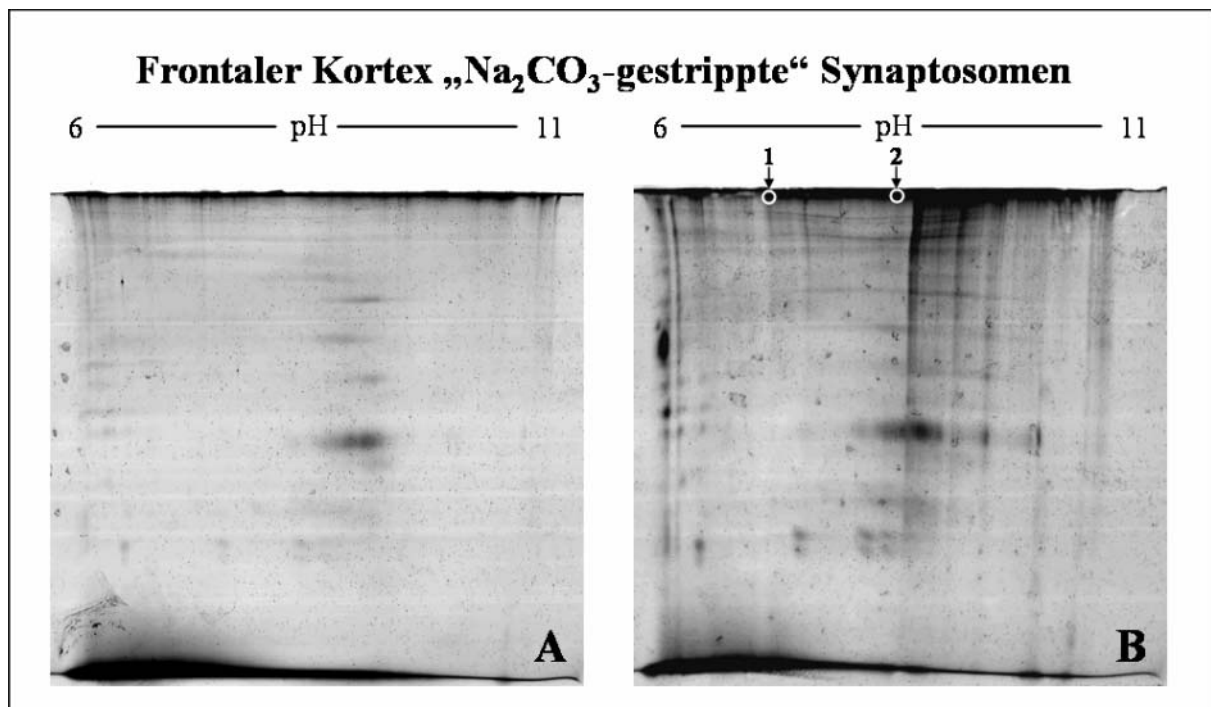


Abbildung 6: Spotmuster auf 2D-Gelen: Auftrennung von A) 200 µg und B) 700 µg Protein aus den „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex im pH-Bereich 6-11 mittels *in-Gel-Rehydrierung*. Die Positionen 1 und 2 markieren die Stellen, an denen „Spots“ für eine LC-MS/MS-Untersuchung entnommen wurden.

In diesem Experiment wurde zusätzlich überprüft, ob die fehlende Spotvisualisierung auf den 2D-Gelen durch einen mangelnden Transfer der Proteine von der ersten in die zweite Dimension verursacht worden sein könnte. In Abbildung 7 sind die mit Sypro Ruby gefärbten IPG-Streifen der ersten Dimension nach der isoelektrischen Fokussierung (Abbildung 7A oben) und nach dem Übergang der Proteine in die zweite Dimension abgebildet (Abbildung 7A unten). Nach der IEF

ist eine diffuse Proteinfärbung sichtbar, die an manchen Stellen heller und an anderen Stellen dunkler ist. Es ist jedoch keine Fokussierung in Form gefärbter Proteinbanden zu erkennen. Nach dem Übergang der Proteine in die zweite Dimension konnte auf den IPG-Streifen nur noch eine sehr schwache diffuse Proteinfärbung sichtbar gemacht werden. Zum Vergleich wird ein mit 200 µg Protein aus Homogenat des frontalen Kortex (ohne Membrananreicherung) beladener IPG-Streifen nach der isoelektrischen Fokussierung (Abbildung 7B oben) sowie nach dem Übergang der Proteine in die zweite Dimension (Abbildung 7B unten) dargestellt. Nach der isoelektrischen Fokussierung sind klar abgegrenzte und deutlich gefärbte Proteinbanden sichtbar (Abbildung 7B oben). Nach dem Übergang der Proteine in die zweite Dimension war eine kaum noch wahrnehmbare diffuse Proteinfärbung auf dem IPG-Streifen sichtbar (Abbildung 7B unten).

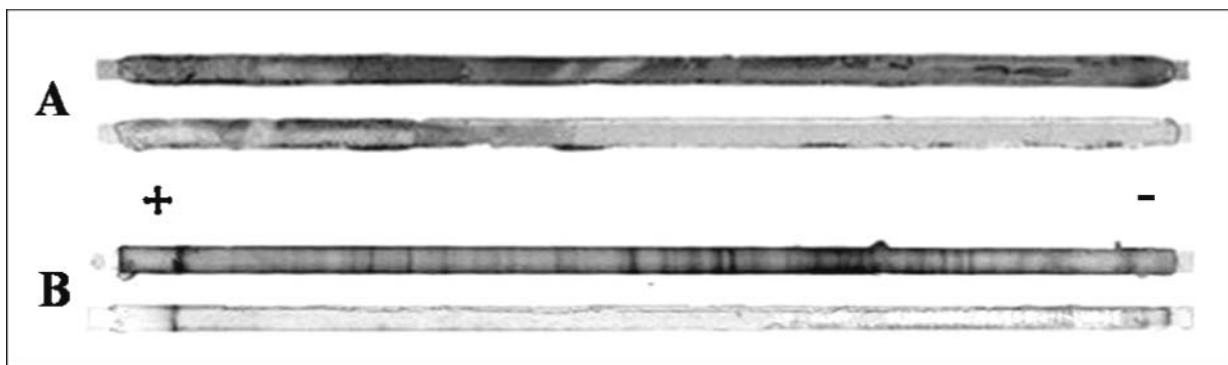


Abbildung 7: Bandenmuster auf IPG-Streifen: A) Fokussierung von 700 µg Protein aus „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex und B) Homogenat des frontalen Kortex (zum Vergleich). Jeweils oben sind die IPG-Streifen nach der IEF und unten die IPG-Streifen nach der zweiten Dimension abgebildet.

Aus dem stark gefärbten, horizontalen Streifen an der Geloberkante des in Abbildung 6B dargestellten Gelbildes wurden in zwei Bereichen „Spots“ ausgeschnitten (Abbildung 6B Position 1 und 2) und durch LC-MS/MS analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt: 34 Proteine konnten in *beiden* Bereichen eindeutig identifiziert werden. Davon besaßen 29 mindestens eine transmembrane Domäne. Es konnten sogar zwei Proteine mit 12 transmembranen Domänen nachgewiesen werden. Von den identifizierten Proteinen konnten hingegen nur drei Proteine, von denen nur eines sechs transmembrane Domänen aufwies, ausschließlich in Position 1 (Abbildung 6B) und ein Protein ohne transmembrane Domänen ausschließlich in Position 2 (Abbildung 6B) identifiziert werden. Ein Vergleich der isoelektrischen Punkte (*pI*) der identifizierten Proteine mit den Positionen der gestochenen Bereiche ergab keine Übereinstimmung (s. Tabelle 3). Dies weist ebenso wie die mangelnde Fokussierung der IEF-Streifen (Abbildung 7A) und der schwarz gefärbte Bereich an der

Geloberkante (Abbildung 6) daraufhin, dass diese Proteine in der ersten Dimension nicht fokussiert sind.

Tabelle 3: LC-MS/MS Identifikationen von zwei "Spotbereichen" ausgestochen aus der stark angefärbten Geloberkante des in Abbildung 6B gezeigten Gels

Tabelle 3a: In Position 1 und 2 identifizierte Proteine (s. Abbildung 6B)

Accession Number	Protein	TMH ¹	MW (Da)	pI	Best Ion Score	No. of Peptides
Q63633	Solute carrier family 12, member 5	12	123483	5.9	100	4
Q02563	Synaptic vesicle protein 2a	12	82652	5.4	68	2
P24942	Excitatory amino acid transporter 1	10	59584	8.5	188	4
P06685	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor	10	112982	5.3	179	22
P23562	Band 3 anion transport protein	10	103107	5.3	79	2
P31596	Excitatory amino acid transporter 2	9	62066	6.3	155	5
Q9JI66	Electrogenic sodium bicarbonate co-transporter 1	9	121266	6.4	76	7
P48768	Sodium/calcium exchanger 2 precursor	9	100459	5.0	52	2
P06686	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-2 chain precursor	8	112145	5.4	179	22
P06687	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-3 chain	8	111620	5.3	179	17
P11507	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	8	114694	5.2	72	4
P11506	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	8	132503	5.7	100	11
P11505	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	7	138632	5.7	120	3
O35921	Excitatory amino acid transporter 4	7	60676	9.2	59	3
P25286	Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	6	96265	6.0	94	10
P29994	Inositol 1.4.5-trisphosphate receptor type 1	6	313065	5.7	88	7
Q05962	ADP/ATP translocase 1	4	32837	9.8	115	11
P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	4	31128	5.2	106	2
P19493	Glutamate receptor 4 precursor	4	100567	8.0	68	2
Q62876	Synaptogyrin-1	4	25636	4.5	57	2
Q63226	Glutamate receptor delta-2 subunit precursor	3	113187	5.7	61	2
Q09073	ADP/ATP translocase 2	2	32779	9.7	96	9
P16036	Phosphate carrier protein. mitochondrial precursor	2	39419	9.4	86	4
Q9JHY2	Sideroflexin-3	2	35411	9.8	53	2
P97685	Neurofascin precursor	2	137918	5.8	49	2
P11951	Cytochrome c oxidase polypeptide VIc-2	1	8318	10.1	79	3
P61265	Syntaxin-1B2	1	33224	5.3	116	5
P07340	Sodium/potassium-transporting ATPase beta-1 chain	1	35179	8.8	102	3
P10888	Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1. mitochondrial precursor	1	19502	9.5	78	3
P05708	Hexokinase-1	0	102342	6.3	113	6
P19511	ATP synthase B chain. mitochondrial precursor	0	28850	9.4	85	5
P60881	Synaptosomal-associated protein 25	0	23300	4.7	84	2
P97700	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	0	34091	9.9	71	3
Q8BH59	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	0	74523	8.4	68	2

¹TMH: Anzahl der transmembranen Helices (transmembrane Domänen)

Tabelle 3b: Ausschließlich in Position 1 identifizierte Proteine (s. Abbildung 6B)

Accession Number	Protein	TMH ¹	MW (Da)	pI	Best Ion Score	No. of Peptides
Q64568	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	6	138471	5,7	79	4
P68370	Tubulin alpha-1 chain	0	50104	4,9	91	3
Q9R1Z0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	0	30778	8,9	54	2

¹TMH: Anzahl der transmembranen Helices (transmembrane Domänen)

Tabelle3c: Ausschließlich in Position 2 identifizierte Proteine (s. Abbildung 6B)

Accession Number	Protein	TMH ¹	MW (Da)	pI	Best Ion Score	No. of Peptides
Q6P9V9	Tubulin alpha-2 chain	0	50120	4,9	95	4

¹TMH: Anzahl der transmembranen Helices (transmembrane Domänen)

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

Die schwarz gefärbte Oberkante auf dem in Abbildung 6B abgebildeten Gel könnte hypothetisch dadurch erklärt werden, dass hochmolekulare Oligomere während der methodischen Prozedur der 2D-Gelelektrophorese nicht aufgespalten werden und im oberen Teil des 2D-Gels „hängen bleiben“. Dies erscheint insbesondere deshalb möglich, weil das Proteingemisch während der Equilibrierung bzw. der Beladung mit SDS nicht – wie bei der 1D-Gelelektrophorese – auf 95°C erhitzt werden kann. Diese Möglichkeit wurde daher mit Hilfe der 1D-Gelelektrophorese überprüft.

Abbildung 8 zeigt auf der rechten Seite das Bandenmuster von Proteinen, die aus „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex extrahiert wurden. Nach der Inkubation der Proteine in 1D-Ladepuffer für fünf Minuten bei 95°C und Auftrag von 10 µg bzw. 30 µg Protein sind nur relativ wenige, meist unscharfe Banden zu erkennen. Eine massive Anfärbung zeigt sich jedoch am oberen Rand des Gels, bei 30 µg Proteinauftrag deutlicher ausgeprägt als bei 10 µg. Zum Vergleich wurden auch Proteine aus Homogenaten des frontalen Kortex, sowie jene von nicht mit Na₂CO₃ behandelten Synaptosomen in der 1D-Gelelektrophorese untersucht. Abbildung 8 zeigt deutlich, dass die Zahl der Banden und ihre Schärfe zunimmt, je geringer der „Membrangehalt“ der Probe ist: Bereits bei synaptosomalen Proteinen (Abbildung 8 Mitte) sind deutlichere Banden sichtbar als nach „Na₂CO₃-Stripping“. Der obere Gelrand ist dagegen

weniger angefärbt. Beim Auftrag von Homogenatsproteinen erhöht sich die Zahl und Schärfe der Banden nochmals, am oberen Gelrand ist keine massive Anfärbung erkennbar.

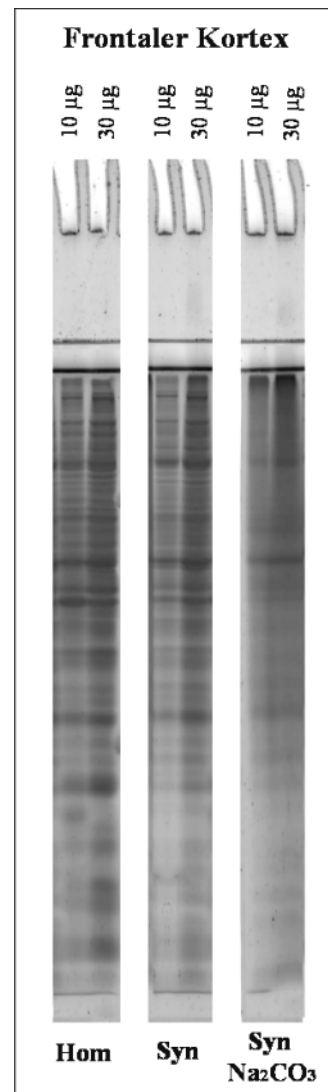


Abbildung 8: Bandenmuster auf 1D-Gelen: Homogenat (links), Synaptosomen (Mitte) und „Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen (rechts) des frontalen Kortex. Die jeweils linke Spur wurde mit 10 µg und die jeweils rechte Spur mit 30 µg Protein beladen.

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

Abbildung 9 zeigt die Effekte von SDS bei verschiedenen Inkubationstemperaturen und Inkubationszeiten auf die Visualisierung der Membranproteine von „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomenfraktionen des frontalen Kortex auf 1D-Gelen in der Übersicht. Deutlich sichtbar ist, dass unter allen experimentellen Bedingungen die größten und am stärksten angefärbten Proteinbanden am oberen Rand der Trenngele zu finden sind. Auf allen Gelen sind dem gegenüber nur wenige, deutlich schwächer gefärbte Proteinbanden zu erkennen. Dieser Versuch zeigt, dass die stark angefärbten Proteinbanden am oberen Gelrand weder durch höhere Inkubationstemperaturen, noch durch längere Inkubationszeiten „aufgelöst“ werden können.

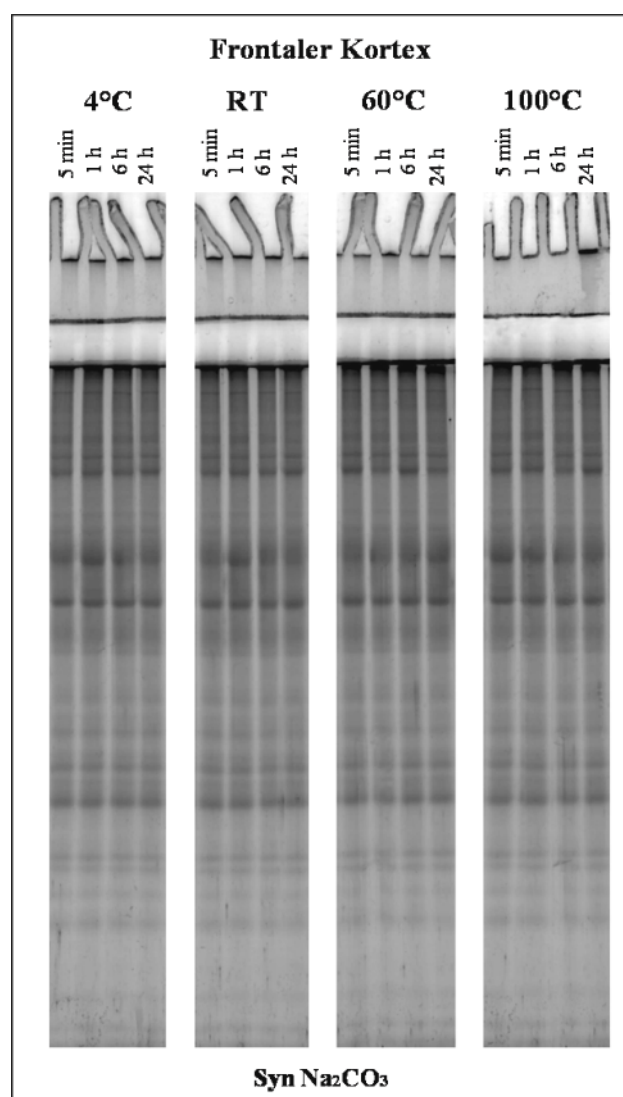


Abbildung 9: Bandenmuster auf 1D-Gelen: „Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen des frontalen Kortex. Inkubation in 1D-Ladepuffer für 5 min, 1 h, 4 h bzw. 24 h bei 4°C, Raumtemperatur (RT), 60°C bzw. 100°C. Pro Spur wurden 10 µg Protein aufgeladen.

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

Hennessey und Scarborough beschrieben 1989, dass Proteinaggregate aus hydrophoben Proteinen mittels TFA aufgelöst werden können (Hennessey and Scarborough 1989). Die rechte Seite der Abbildung 10 zeigt das Ergebnis des Versuchs die Proteinaggregate mit Hilfe von TFA aufzulösen. Dabei wurden zudem verschiedene Inkubationszeiten getestet.

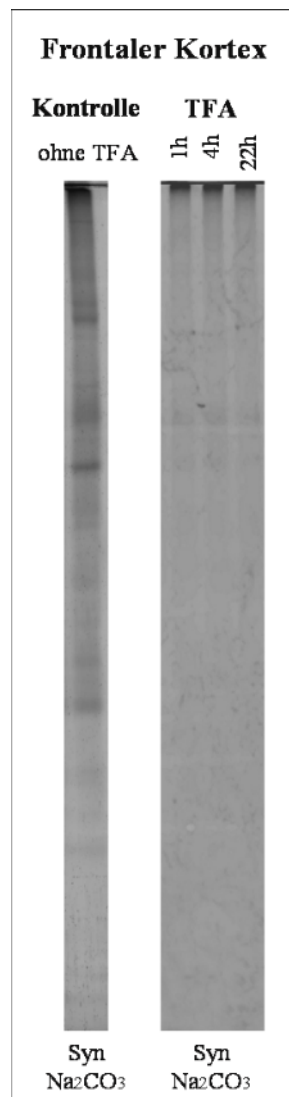


Abbildung 10: Bandenmuster auf 1D-Gelen: „Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen des frontalen Kortex ohne TFA-Behandlung (links) und mit TFA-Behandlung für 1 h, 4 h und 22 h (rechts). Pro Spur wurden 10 µg Protein aufgeladen.

Zu sehen ist, dass unterschiedliche Inkubationszeiten bei der Behandlung von „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex mit TFA nicht zu einer verbesserten Visualisierung von Membranproteinen auf 1D-Gelen führen. Es sind nur vereinzelte, sehr schwach gefärbte Banden vorhanden. Zu dem ist die dunkle Anfärbung am Oberrand des Gels

deutlich zu erkennen. Zum Vergleich wurden mit „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen ohne TFA-Behandlung aufgetragen (Abbildung 10 links). Das sich ergebende Bild zeigt mehr und stärker gefärbte Banden als bei den mit TFA behandelten Extrakten. Die bei weitem massivste Proteinfärbung ist jedoch auch bei diesen Proben an der oberen Gelkante zu erkennen. In einem weiteren, hier nur kurz erwähnten Versuch, verblieb vor der Zugabe des 1D-Ladepuffers TFA in der Probe. Auch in diesem Fall ergab sich ein geringes Bandenbild mit einer massiven Anfärbung an der Geloberkante (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.1.3.3 Extraktion der Proteine mit organischen Lösungsmitteln

Einige Arbeitsgruppen versuchten, Membranproteine durch organische Lösungsmittel zu extrahieren und anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese aufzutrennen (z.B. Molloy et al. 1999; Seigneurin-Berny et al. 1999; Ferro et al. 2002; Klein et al. 2005). Die Extraktion mit Lösungsmitteln könnte eine Aggregation der Membranproteine während der Extraktion verhindern. Um zunächst herauszufinden, welches Lösungsmittel in welcher Konzentration für die Proteinextraktion am besten geeignet ist, wurden verschiedene Lösungsmittel ausgewählt, in einer Konzentration von 50% und 100% für die Extraktion der Proteine aus „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex eingesetzt und durch eine Proteinbestimmung die Extraktionseffizienz bestimmt.

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung der Überstände aus der Extraktion mit 50% und 100% Lösungsmitteln sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass mit Ausnahme von DMSO, bei allen anderen Extraktionen mit 100% Lösungsmittel weniger Protein gewonnen wurde, als bei der Extraktion mit 50% Lösungsmittel. Die Extraktion mit 100% DMSO zeigte eine höhere Effizienz als mit 50% DMSO. Aus diesem Grund wurden nur die mit 50% Lösungsmittel extrahierten Proteinproben der verschiedenen Lösungsmittel auf 1D-Gele aufgetragen. Einzig von DMSO wurden sowohl das Extrakt aus der Behandlung mit 50% DMSO, als auch das Extrakt aus der Behandlung mit 100% DMSO verwendet. Die Kontrollprobe für die 1D-Gelelektrophorese, die unbehandelt blieb und nach dem „Na₂CO₃-Stripping“ direkt in 1D-Lade-Puffer aufgenommen wurde, ergab eine Protein-Konzentration von $1148 \pm 34 \mu\text{g}$ pro Synaptosomenfraktion eines frontalen Kortex. Die Ergebnisse zeigten daher, dass die organischen Lösungsmittel selbst im günstigsten Fall nur etwas mehr als die Hälfte der im Membranpellet enthaltenen Proteine extrahieren konnten.

Tabelle 4: Ergebnisse der Proteinbestimmung der getrockneten Überstände aus der Extraktion von „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen aus dem frontalen Kortex mit verschiedenen Lösungsmitteln in 1D-Lade-Puffer mit dem EZQ Protein Quantation Kit

Lösungsmittel	Lösungsmittelkonzentration	Protein pro „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen eines frontalen Kortex [µg]
Ohne Lösungsmittel	/	1148,0 ± 34,0
Methanol	50%	745,1 ± 45,2
	100%	40,8 ± 3,6
Ethanol	50%	766,2 ± 75,4
	100%	5,6 ± 4,7
Isopropanol	50%	654,5 ± 68,3
	100%	6,6 ± 3,9
Aceton	50%	461,3 ± 91,1
	100%	11,2 ± 6,0
Acetonitril	50%	739,0 ± 47,1
	100%	2,2 ± 0,5
DMSO	50%	576,4 ± 86,5
	100%	754,7 ± 66,83

Die Gelbilder in Abbildung 11 stellen eine Zusammenstellung der Ergebnisse dieses Versuchs dar. Die mit Lösungsmitteln extrahierten Proteine, zeigen auf den Gelen bei allen Ansätzen eine dunkle Färbung am oberen Gelrand des Trenngels. Im Vergleich zum Bandenmuster von nicht mit Lösungsmitteln behandelten „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen (Abbildung 11 links) sind die sich ergebenden Banden leicht unscharf und es zeigen sich weniger Banden. Zwischen den einzelnen Proben sind keine markanten Unterschiede zu erkennen. Die Überstände aus der Extraktion mit 50% Ethanol und mit 100% DMSO, die getrocknet und anschließend in 1D-Ladepuffer aufgenommen wurden, weisen ebenfalls ausschließlich stark ausgeprägte Banden an der Oberkante des Trenngels auf. Es sind ebenfalls kaum Banden sichtbar.

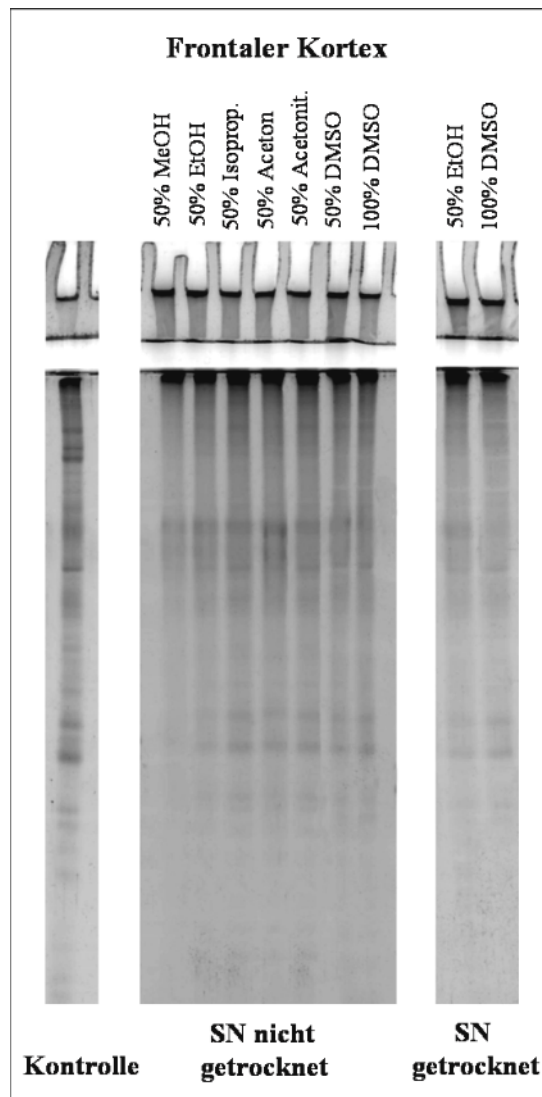


Abbildung 11: Bandenmuster auf 1D-Gelen: „Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen des frontalen Kortex ohne Lösungsmittelextraktion (links) und mit Extraktion durch 50% Methanol (**MeOH**), 50% Ethanol (**EtOH**), 50% Isopropanol (**Isoprop.**), 50% **Aceton**, 50% Acetonitril (**Acetonit.**), 50% und 100% Dimethylsulfoxid (**DMSO**) (Mitte). Zudem die Extraktion mit 50% Ethanol (**EtOH**) und 100% Dimethylsulfoxid (**DMSO**), bei der das Lösungsmittel vor Auftrag auf das Gel durch Trocknen entfernt wurde. Pro Spur wurden 10 µg Protein aufgeladen.

4.1.4 Extraktion und Auftrennung der Proteine mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse des Versuchs beschrieben, die Proteinansammlung am oberen Gelrand mit Hilfe des kationischen Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zu lösen.

Die in Abbildung 12 dargestellten Gelbilder zeigen die Auftrennung von Homogenat und „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen des frontalen Kortex mittels CTAB-PAGE. Dabei wurde bei der Extraktion der Proteine zum einen CTAB-Ladepuffer ohne Urea (Abbildung 12 links)

und zum anderen CTAB-Ladepuffer mit 3 M Urea (Abbildung 12 rechts) verwandt. In beiden Fällen ist die Bandenbildung beim Homogenat geringgradig besser, als bei den Proteinen aus der Membrananreicherung. Bei der Extraktion ohne Urea ist, wie auch in den vorangegangenen Versuchen, ein deutlich schwarz gefärbter Proteinbalken an der Oberkante des Trenngels sichtbar. Bei dem gleich behandelten Homogenat ist dieser Effekt weniger ausgeprägt. Bei Zugabe von 3 M Urea zum CTAB-Ladepuffer ist die Schwarzfärbung deutlich verringert. Insgesamt scheint bei diesem Versuch mehr Protein in die Gele zu wandern und weniger am oberen Rand „hängen zu bleiben“ als bei den mit SDS extrahierten Proben. Allerdings ist die Bandenbildung sowohl beim Homogenat als auch bei den aus „Na₂CO₃-gestrippten“ Synaptosomen extrahierten Proteinen unscharf.



Abbildung 12: Bandenmuster auf CTAB-Gelen: Linke Seite: Jeweils 10 µg und 30 µg Protein aus Homogenat (links) und „Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen (rechts) des frontalen Kortex ohne Urea im CTAB-Ladepuffer (links) und rechte Seite jeweils 10 µg und 30 µg Protein aus Homogenat (links) und „Na₂CO₃-gestrippte“ Synaptosomen (rechts) aus dem frontalen Kortex mit Urea im CTAB-Ladepuffer.

4.2 Experimente zur Erhöhung der Validität quantitativer Gruppenvergleiche

Die Überprüfung der Spotintensitäten der verschiedenen Gruppen auf Normalverteilung mit Hilfe der Kolmogorow-Smirnow Tests zeigte keine relevanten Abweichungen von der Normalverteilung. So fand sich z.B. bei der Anwendung dieses Tests auf die Daten der 200 µg Gruppe von Experiment 8 (Tabelle 8) nur ein Spot mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Zwei weitere Spots hatten Signifikanzniveaus von $p < 0,01$ und bei nur 15 Spots waren die p-Werte $< 0,03$. In der Vergleichsgruppe, in welcher 250 µg Protein aufgetragen wurde, zeigt keiner der Spots einen p-Wert von $< 0,05$. Entsprechende Daten wurden auch bei der Analyse der anderen experimentellen Gruppen gefunden (Ergebnisse nicht gezeigt). Auf Grund dieser Ergebnisse konnten die Gruppenvergleiche mit Hilfe des t-Tests durchgeführt werden. Als ergänzende Information werden bei einigen Experimenten die Ergebnisse des Mann-Whitney U-Tests ebenfalls angegeben, da dieser Test auch bei nicht normal verteilten Stichproben zuverlässige Ergebnisse liefert.

Die Ergebnisse aller zwölf in der Methodik (s. 3.4.2) beschriebenen experimentellen Gruppen sind in den Tabellen 5-10 dargestellt. Die Hauptfragestellung dieser Experimente lautete: Wie viel Proteinspots lassen sich zwischen zwei Gelgruppen signifikant unterscheiden, wenn die Gele der einen Gruppe mit 200 µg und die Gele der anderen Gruppe mit 250 µg Protein beladen werden? Oder, in anderen Worten: wie zuverlässig kann die jeweils angewandte 2D-Gelelektrophorese-Methodik 25%ige Unterschiede in der Proteinladungsmenge feststellen?

Die in Tabelle 5 gezeigten Ergebnisse der Experimente 1-2 wurden mit „herkömmlichen Standardmethoden“ durchgeführt. Das heißt, es wurden kommerziell erhältliche Apparaturen und nicht die in meiner Arbeitsgruppe speziell gefertigten Apparate (s. 3.1.1) benutzt. Weiterhin wurde die gesamte methodische Prozedur nach „herkömmlichen Methoden“ durchgeführt, das heißt, die in Tabelle 6 aufgeführten methodischen Verbesserungen wurden hier noch nicht angewandt. Die Ergebnisse von Experiment 1 (Tabelle 5) zeigen, dass nur 130 (23,8%) von 546 gematchten Spots sich signifikant zwischen zwei Gelgruppen unterschieden, auf welche jeweils 200 µg bzw. 250 µg Protein geladen wurden. Dieses unbefriedigende Ergebnis könnte dadurch verursacht sein, dass sowohl die mit 200 µg, als auch mit 250 µg beladenen IPG-Streifen im selben Durchgang der isoelektrischen Fokussierung platziert waren und, dass deshalb die unterschiedlichen Proteinmengen die Qualität der Fokussierung beeinflusst haben könnten. In Experiment 2 (Tabelle 5) wurde deshalb das obige Experiment wiederholt, allerdings wurden die beiden Gruppen (200 µg vs. 250 µg Protein) in zwei verschiedenen IEF-Läufen prozessiert. In diesem Experiment konnten 54,4% der Spots zwischen den beiden Gruppen signifikant unterschieden werden. Besonders bedenklich ist allerdings die Tatsache, dass in Experiment 1 58

Spots und in Experiment 2 67 Spots aus der 250 µg-Gruppe signifikant *weniger* signalintensiv waren als in der mit 200 µg beladenen Gruppe.

Für die Experimente 1 und 2 wurden Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen den Spotintensitäten jedes einzelnen Gels und jeweils aller anderen Gelen berechnet, und zwar unabhängig für die 200 µg- und 250 µg-Gruppe. Aus Tabelle 5 geht hervor, dass die Korrelationskoeffizienten zwischen 0,948 und 0,990 bei Experiment 1 und zwischen 0,930 und 0,998 bei Experiment 2 liegen. Diese Korrelationskoeffizienten erscheinen sehr hoch und spiegeln daher nicht die oben beschriebenen, unzureichenden Ergebnisse wider.

Auf Grund dieser unbefriedigenden Ergebnisse wurden neue Geräte konstruiert (s. 3.1.1) mit denen 24 Gele während der ganzen methodischen Prozedur parallel bearbeitet werden können. Das Ziel dabei war, die Intergelvarianzen zu verringern. Außerdem wurde versucht, weitere Varianzquellen während der Herstellung der 2D-Gele zu erkennen und nach Möglichkeit zu beseitigen.

Im Experiment 3 (Tabelle 6) wurden jeweils 200 µg Protein aus „gepoolten“ Mittelhirnhomogenaten auf je acht Gelen miteinander verglichen. In der einen Gruppe wurden vom Hersteller lückenlos durchnummerierte IPG-Streifen verwandt. In der anderen Gruppe waren die Nummern auf den IPG-Streifen nicht fortlaufend, sondern wiesen Lücken auf, die zwischen 10 und 100 fehlenden Nummern schwankten. Das bedeutet, dass die Streifen zwar aus demselben „Lot“ aber von verschiedenen „Mastergelen“ stammen. In der Praxis heißt dies, dass die zwölf IPG-Streifen in jener Originalpackung keine fortlaufenden Nummern enthielten. Aus Tabelle 6 geht hervor, dass der Variationskoeffizient (CV) bei dem Experiment mit fortlaufenden Seriennummern $13,4\% \pm 10,4\%$ beträgt, jener mit lückenhaften Seriennummern jedoch $22,7\% \pm 18,6\%$.

In Experiment 4 (Tabelle 6) wurden wiederum 200 µg bzw. 250 µg Protein auf jeweils zwölf Gele pro Gruppe aufgetragen. Alle Proben wurden in *einem* IEF-Lauf prozessiert. Im Unterschied zu Experiment 1 (Tabelle 5) wurden jedoch die in Tabelle 6 beschriebenen methodischen Verbesserungen in diesem Experiment berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigen, dass nach wie vor nur 32,2% der Spots in einer mit 250 µg beladenen Gelgruppe signifikant höher waren, als bei den mit 200 µg beladenen Gelen. Besonders bedenklich ist auch hier wieder, dass 71 Spots in der 250 µg-Gruppe *erniedrigt* waren.

In Experiment 5 (Tabelle 6) wurden zwei Gelgruppen angefertigt, bestehend aus je sechs Gelen mit einer Lademenge von 200 µg Protein. In der einen Gruppe erfolgte die Rehydrierung in „konventioneller Weise“, d.h. mit der Geloberfläche nach unten. In der zweiten Gruppe wurde die Rehydrierung mit den Gelseiten nach oben durchgeführt. Tabelle 6 zeigt, dass die CV's bei

Rehydrierung mit der Gelseite nach oben deutlich besser, als bei der Gelseite nach unten ausfallen ($10,1\% \pm 8,9\%$ vs. $17,0\% \pm 17,8\%$).

In Experiment 6 (Tabelle 6) wurden wiederum zwei Mal sechs Gele, welche je mit $200 \mu\text{g}$ Protein beladen waren, miteinander verglichen. Die Färbung der einen Gruppe erfolgte individuell in sechs „Tupperschalen“. Die andere Gruppe wurde in einer in meiner Arbeitsgruppe konstruierten Färbeapparatur gemeinsam gefärbt (s. Abbildung 1). Die gemeinsame Färbung der Gele resultierte in deutlich geringeren CV's ($11,9\% \pm 9,7\%$) verglichen mit der Färbung in individuellen „Tupperschalen“ ($16,4\% \pm 14,2\%$).

In den folgenden Experimenten wurde nun überprüft, ob bei gemeinsamer Prozessierung aller Gele in den selbst konstruierten Apparaturen einerseits, und der Berücksichtigung der in Tabelle 6 dargestellten methodischen Verbesserungen andererseits, Unterschiede von 25% in der Proteinladungsmenge zwischen zwei verschiedenen Gelgruppen besser erkannt werden können.

In Experiment 7 (Tabelle 7) wurden wiederum zwei Mal zwölf Gele miteinander verglichen, eine Gruppe mit $200 \mu\text{g}$, die andere Gruppe mit $250 \mu\text{g}$ Protein beladen. Die Berechnungen mittels t-Test ergaben, dass 77,5% der Spots in der $250 \mu\text{g}$ -Gruppe signifikant höher waren, als in der $200 \mu\text{g}$ -Gruppe. Signifikant erniedrigte Spotintensitäten in der $250 \mu\text{g}$ -Gruppe wurden nicht mehr gefunden. Tabelle 7 zeigt die entsprechenden Ergebnisse der Vergleiche von zehn versus zehn, acht versus acht und sechs versus sechs Gelen (es wurden jeweils die letzten zwei, vier oder sechs Zahlenreihen, entsprechend den jeweils letzten zwei, vier oder sechs Gelen nicht in die Berechnung mit einbezogen). Aus der Tabelle geht hervor, dass die Zahl der korrekt als erhöht identifizierten Spots in der $250 \mu\text{g}$ -Gruppe um so mehr abnimmt, je kleiner die Stichprobe wird.

Da der Vergleich von zwölf versus zwölf Gelen arbeitstechnisch sehr aufwändig ist, wurde in Experiment 8 und 9 (Tabelle 8) getestet, ob der Vergleich von einer geringeren Zahl von Gelen zu befriedigenden Ergebnissen führt, wenn mit „Pools“ gearbeitet wird. In Experiment 8 wurden jeweils acht Gele miteinander verglichen, die eine Gruppe wieder mit $200 \mu\text{g}$, die andere mit $250 \mu\text{g}$ beladen. Die Proteine dieser 16 Gele stammten allerdings aus 32 individuellen Mittelhirnen, das heißt pro Gel wurden die Proteine aus zwei „gepoolten“ Hirnarealen aufgetragen. Bei diesem Design konnten 80,0% der Spots in der $250 \mu\text{g}$ -Gruppe als signifikant erhöht identifiziert werden. Beim Vergleich von sechs versus sechs Gelen (weggelassen der letzten beiden Zahlenreihen) konnten mittels t-Test 83,5% der Spots korrekt identifiziert werden. Ein Blick auf die Tabellen 7 und 8 zeigt auch, dass sich die mittels t-Test errechneten Ergebnisse von denen des mit dem Mann-Whitney U-Test kalkulierten Ergebnisse kaum unterscheiden. In der Mehrzahl der Fälle

ergibt der Mann-Whitney U-Test einen leicht geringeren Prozentsatz an signifikant veränderten Spots.

In einem weiteren „Pool-Experiment“ (Experiment 9, Tabelle 8) wurden die Proteine von jeweils vier (Experiment 9a) oder fünf Tieren (Experiment 9b) gepoolt. Verglichen wurden dann jeweils vier mit vier Gelen. Die Ergebnisse zeigen, dass ein „poolen“ von mehr als zwei Tieren bei gleichzeitiger Reduktion der Anzahl der verglichenen Gele zu schlechteren Ergebnissen führt: Nur 43,4% bzw. 60,0% der Spotintensitäten wurden in den jeweils 250 µg-Gruppen als signifikant erhöht identifiziert.

Die Experimente 10 und 11 (Tabelle 9) untersuchten die Zuverlässigkeit der Quantifizierung bei Auftrag höherer Proteinmengen. In Experiment 10 wurden jeweils zwölf mit 500 µg beladene Gele mit zwölf mit 625 µg beladenen Gelen verglichen. In Experiment 11 wurden pro Gruppe 800 µg bzw. 1000 µg geladen. Aus Tabelle 9 geht hervor, dass in der 625 µg-Gruppe 90,8% der Spots als signifikant erhöht gekennzeichnet wurden. In der 1000 µg-Gruppe (Experiment 11) waren es jedoch nur noch 53,0%.

In Experiment 12 wurde untersucht, wie zuverlässig sich die Spotintensitäten statistisch unterscheiden lassen, wenn zwei Gruppen von Gelen verglichen werden, deren Proteinladung sich um 50% unterscheidet. Die Ergebnisse von Experiment 12 (Tabelle 10) zeigen, dass beim Vergleich von zwei Gelgruppen, auf welchen jeweils 200 µg bzw. 300 µg Protein aufgeladen wurden, 97,2% der Proteine in der 300 µg-Gruppe signifikant erhöht waren. Dieses Ergebnis wurde beim Vergleich von acht versus acht Gelen und jeweils zwei „gepoolten“ Hirnarealen pro Gel erzielt. Der Vergleich von sechs versus sechs Gelen bzw. vier versus vier Gelen (weglassen der letzten zwei bzw. vier Zahlenreihen) führte zu etwas schlechteren Ergebnissen, jedoch konnten beim Vergleich von vier versus vier Gelen immer noch 94,1% der Spots signifikant voneinander unterschieden werden.

Abbildung 13 zeigt die Gelbilder aus Mittelhirnhomogenaten (A und B) und aus Homogenaten des limbischen Vorderhirns (C und D). Dabei wurden A und C jeweils mit „konventionellen Methoden“, das heißt die in Tabelle 6 beschriebenen Verbesserungen wurden nicht berücksichtigt, hergestellt. Bei der Herstellung der in B und D gezeigten Gele wurden alle methodischen Verbesserungen berücksichtigt. Die vier Gele stammen von individuellen Tieren.

Die Abbildung 13 zeigt, dass auch jene Gele, welche mit einer für die Quantifizierung unzureichenden Methodik erstellt wurden (A und C), sich „mit bloßem Auge“ nur geringfügig von den in B und D dargestellten Gelen unterscheiden.

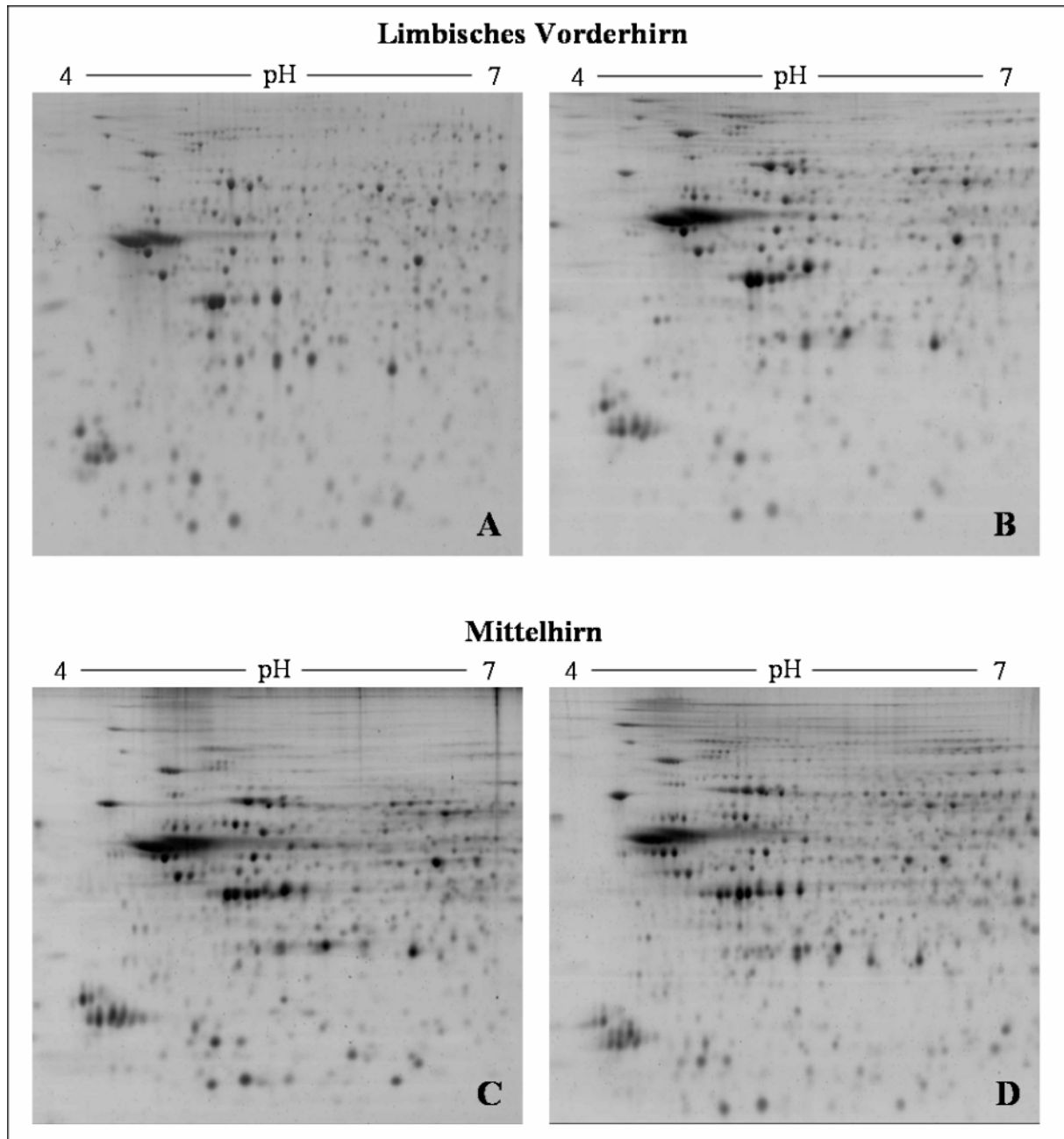


Abbildung 13: Spotmuster auf 2D-Gelen: 200 μ g Protein aus Mittelhirnhomogenaten (A und B) und aus Homogenaten des limbischen Vorderhirns (C und D) im pH-Bereich 4-7. Die Gele A und C wurden ohne methodische Verbesserungen hergestellt, B und D mit methodischen Verbesserungen.

Tabelle 5: Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 25%igen Unterschied in der Proteinladungsmenge (200 µg vs. 250 µg)
-Experimente vor methodischen Verbesserungen

Experiment	verglichene Gele	gematchte Spots	p < 0,05 (t-Test)		Variationskoeffizienten (%)	Korrelationskoeffizienten ² (Streuung)	Hirntareal
			Spotanzahl	Prozent (%)			
1	6 vs. 6 (in einem IEF-Lauf)	546	130	23.8	200µg: 32.5 ± 25.3	0.948 - 0.990	12 individuelle Mittelhirne
					(72↑, 58↓)		
2	6 vs. 6 (in verschiedenen IEF-Läufen)	724	394	54.4	200µg: 32.0 ± 42.6	0.930 - 0.998	12 individuelle limbische Vorderhirne
					(327↑, 67↓)		

¹ Der Variationskoeffizient ist der Mittelwert der Standardabweichung berechnet über alle Spots, angegeben als Prozentsatz des Mittelwertes aller Spotintensitäten

² Pearson's Korrelationskoeffizienten wurden zwischen allen Spots jeweils verschiedener Gele berechnet

Tabelle 6: Faktoren, welche die Intergelvarianz verschlechtern

Experiment	veränderte Variable	Proteinlademenge (μg)	verglichene Gele	gematchte Spots	p < 0.05 (t-Test)		Variationskoeffizient ¹ (%)	Hirnareal	Beitrag zur Varianz
					Spotanzahl	Prozent (%)			
3	IPG-Streifen von einem vs. verschiedenen Mastergelen	200	8 vs. 8	813	n.b.	n.b.	ein Mastergel: 13.4 \pm 10.4 verschiedene Mastergele: 22.7 \pm 18.6	Mittelhirn, "Pool"	mindestens 9%
4	verschiedene Proteinlademenge in einem IEF-Lauf	200 250	12 12	568 568	183 (112 \uparrow 71 \downarrow)	32.2	200 μg : 30.4 \pm 22.8 250 μg : 35.5 \pm 26.5	24 individuelle Mittelhirne	
5	Rehydrierung: Gelseite oben vs. Gelseite unten	200	6 vs. 6	799	n.b.	n.b.	Gelseite oben: 10.1 \pm 8.9 Gelseite unten: 17.0 \pm 17.8	limbisches Vorderhirn, "Pool"	7%
6	Färbung: Färbeapparatur für 24 Gele vs. Einzelfärbung in "Tupperschalen"	200	6 vs. 6	1057	n.b.	n.b.	Apparatur: 11.9 \pm 9.7 "Tupperschalen": 16.4 \pm 14.2	Kortex "Pool"	5%

¹ Der Variationskoeffizient ist der Mittelwert der Standardabweichung berechnet über alle Spots, angegeben als Prozentsatz des Mittelwertes aller Spotintensitäten
n.b. nicht berechnet

Tabelle 7: Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 25%igen Unterschied in der Proteinladungsmenge (200 µg vs. 250 µg)
- Experimente nach methodischen Verbesserungen

Experiment	verglichene Gele	gematchte Spots	p < 0.05		Variationskoeffizient ¹ (%)	Himareal
			t-Test	Spotanzahl		
7	12 vs. 12	683	529 (77.5%)	495 (72.9%)	200µg: 16.7 ± 4.7	24 individuelle Mittelhirne
					250µg: 19.9 ± 4.6	
	10 vs. 10 (letzte beiden Ergebnisreihen ausgelassen)	683	450 (66.3%)	428 (62.7%)	200µg: 15.8 ± 4.7	
					250µg: 15.0 ± 4.8	
	8 vs. 8 (letzte vier Ergebnisreihen ausgelassen)	683	379 (55.8%)	368 (53.9%)	200µg: 15.4 ± 5.1	
					250µg: 14.6 ± 5.0	
	6 vs. 6 (letzte sechs Ergebnisreihen ausgelassen)	683	300 (44.2%)	273 (40.2%)	200µg: 14.5 ± 5.3	
					250µg: 14.1 ± 5.1	

¹ Der Variationskoeffizient ist der Mittelwert der Standardabweichung berechnet über alle Spots, angegeben als Prozentsatz des Mittelwertes aller Spotintensitäten

Tabelle 8: Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 25%igen Unterschied in der Proteinladungsmenge (200 µg vs. 250 µg)
 - Experimente mit „gepooltem“ Gewebe nach methodischen Verbesserungen

Experiment	vergliche Gele	„gepoolte“ Tiere	gematchte Spots	p < 0.05		Variationskoeffizienten ¹ (%)	Hirnareal
				t-Test	Spotanzahl Mann-Whitney U		
8	8 vs. 8	2	505	404 (80.0%)	428 (84.7%)	200µg: 12.4 ± 11.3 250µg: 10.0 ± 10.0	32 individuelle Mittelhirne
				422 (83.5%)	408 (80.8%)	200µg: 12.1 ± 11.1 250µg: 9.5 ± 9.2	
9	4 vs. 4	4	482	209 (43.4%)	207 (42.9%)	200µg: 16.7 ± 17.8 250µg: 15.6 ± 19.0	32 individuelle Septi
				289 (60.0%)	293 (60.8%)	200µg: 15.3 ± 14.7 250µg: 15.3 ± 18.1	

¹ Der Variationskoeffizient ist der Mittelwert der Standardabweichung berechnet über alle Spots, angegeben als Prozentsatz des Mittelwertes aller Spotintensitäten

Tabelle 9: Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 25%igen Unterschied in der Proteinladungsmenge
- Experimente mit höheren Proteinladungsmengen

Experiment	Proteinlade- menge (μg)	verglichene Gele	gemachte Spots	p < 0,05 (t-Test)		Variationskoeffizient ¹ (%)	Hirnareal
				Spotanzahl	Prozent (%)		
7 (zum Vergleich)	200	12	683	529	77.5	200 μg : 16.7 \pm 4.7 250 μg : 15.9 \pm 4.6	
	250	12					
10	500	12	795	722	90.8	500 μg : 14.2 \pm 11.6 625 μg : 14.2 \pm 14.9	die selben 24 individuellen Mittelhirne für alle Experimente
	625	12					
11	800	12	725	384	53.0	800 μg : 27.1 \pm 18.2 1000 μg : 29.1 \pm 20.7	
	1000	12					

¹ Der Variationskoeffizient ist der Mittelwert der Standardabweichung berechnet über alle Spots, angegeben als Prozentsatz des Mittelwertes aller Spotintensitäten

Tabelle 10: Vergleich zweier experimenteller Gruppen mit einem 50% Unterschied in der Proteinladungsmenge (200 µg vs. 300 µg)
 – Experimente nach methodischen Verbesserungen

Experiment	verglichene Gele	"gepoolte" Tiere	gematchte Spots	p < 0.05 (t-Test)		Variationskoeffizient ¹		Hirnareal
				Spotanzahl	Prozent (%)	Spotanzahl	Prozent (%)	
12	8 vs. 8	2	505	493	97.2%	200µg:	12.4 ± 11.1	32 individuelle Mittelhirne
						300µg:	12.9 ± 15.6	
	6 vs. 6	2	505	485	96.0%	200µg:	12.1 ± 11.1	
						300µg:	12.8 ± 17.0	
	4 vs. 4	2	505	475	94.1%	200µg:	12.6 ± 10.3	
						300µg:	13.0 ± 15.5	

¹ Der Variationskoeffizient ist der Mittelwert der Standardabweichung berechnet über alle Spots, angegeben als Prozentsatz des Mittelwertes aller Spotintensitäten