

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps- Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Differentielle Proteinexpression in Nierenepithelzellen unter
hypoosmolaren Kulturbedingungen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von Franziska Wenzel

aus Halle/Saale

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 22.02.2007

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. R.M. Nüsing

Koreferent: Prof. Dr. J. Hoyer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hereditäre Tubulopathien mit Diuretika-ähnlichem Salzverlust	1
1.1.1	Furosemid-Typ	3
1.1.1.1	Ursachen	3
1.1.1.2	Therapiemöglichkeiten	5
1.1.1.3	Prognose	6
1.1.2	Überleitung zum Modell	6
1.2	Proteobiologie	7
1.2.1	Proteomanalyse und Subtraktive Proteomforschung	8
2	Fragestellung	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Isolation und Zellkultur von m-TAL Zellen	10
3.1.1	Isolation von m-TAL Zellen	10
3.1.2	Pflege von m-TAL Zellen	11
3.1.3	Splitten von m-TAL Zellen aus 6 Well-Platten	11
3.1.4	Zellaufarbeitung/Proteinextraktion	12
3.2	Herstellung Lysis-Puffer (PI)	12
3.3	Proteinbestimmung nach Bradford	13
3.4	Herstellung Rehydratisierungspuffer (PII)	14
3.5	Erste Dimension-Isoelektrische Fokussierung (IEF)	15
3.5.1	Durchführung	16
3.6	Zweite Dimension-SDS Elektrophorese	17
3.6.1	Durchführung	17
3.6.2	Visualisierung	19
3.6.3	Analyse der Gele	22
3.6.4	Identifizierung der Proteinspots	24
3.6.5	Massenspektrometrie	24
3.6.6	Molekulargewichtbestimmung mit MALDI	26
3.6.7	Proteindatenbanken	27
3.7	Western Blotting	27
3.7.1	Herstellung von Trenn- und Sammelgelen	27
3.7.2	Probenvorbereitung	28
3.7.3	Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese	29

3.7.4	Elektrophoretischer Proteintransfer	29
3.7.5	Immunochemische Detektion	30
3.8	Materialien und Geräte	31
3.8.1	Chemikalien	31
3.8.2	Geräte	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Nachweis der Proteinexpression bei Hypoosmolarer Lösung	34
4.1.1	Densitometrische Auswertung	37
4.1.2	Intensitätszunahme Vimentin und Cytokeratin 8	39
4.2	Analysen durch MALDI	40
4.2.1	Proteinsequenz Vimentin-(Cricetulus griseus)	41
4.2.2	Proteinsequenz Cytokeratin 8-(Bos Taurus)	44
4.3	Nachweis von Vimentin und Cytokeratin 8 im Western Blot	46
5	Diskussion	48
5.1	Ergebnisse Massenspektrometrie	48
5.1.1	Vimentin	48
5.1.2	Cytokeratin 8	49
5.2	Auswertung Western Blot	50
5.2.1	Vimentin	50
5.2.2	Cytokeratin 8	51
5.3	Vorkommen & Funktion Vimentin und Cytokeratin 8	51
5.3.1	Vimentin	51
5.3.2	Cytokeratin 8	53
5.4	Bedeutung der Studie und Ausblick	54
6	Quellenangaben	59
7	Anhang	65

1 Einleitung

1.1 Hereditäre Tubulopathien mit Diuretika-ähnlichem Salzverlust

Der menschliche Organismus ist bestrebt sein Volumen und die Osmolarität des Extrazellulärraums konstant zu halten, da viele Mechanismen vom Wasser- und Elektrolythaushalt abhängig sind. Bei Veränderungen drohen der Verlust des natürlichen Gleichgewichtes und ein Ausfall wichtiger Funktionen.

Durch neue molekulargenetische und pharmakologische Studien wurde nachgewiesen, dass es sich bei Entgleisungen des Elektrolyt- und Wasserhaushalts um Erkrankungen des tubulären Ionentransports handelt.

In den 60iger Jahren berichtete Bartter über 2 Patienten mit kongenitalem renalen Salzverlust, normotensiver Hyperreninämie, Hyperaldosteronismus und hypokalämischer Alkalose. Wenige Jahre später beschrieb Gitelman ein Krankheitsbild mit den zusätzlichen Merkmalen einer Hypomagnesiämie und Hypokalziurie. Im weiteren Verlauf beschäftigten sich besonders pädiatrische Arbeitsgruppen mit den Varianten des Bartter-Syndroms und den pränatalen Manifestationen.

1998 beschrieben Köckerling, Konrad und Seyberth eine klinische Einteilung eines Krankheitsbildes, das mit angeborenem renalen Salzverlust assoziiert ist. In Abbildung 1 wird verdeutlicht, dass diese Erkrankung biochemische und pharmakologische Merkmale einer Langzeitbehandlung mit Schleifendiuretika, Thiaziden- oder kaliumsparenden Diuretika aufweist [Köckerling, Konrad, Seybert et. al., 1998].

Mit Hilfe der Molekulargenetik ließen sich verschiedene epitheliale Transportdefekte als primäre Ursache für eine Salzverlust-Tubulopathie identifizieren. Durch die Entdeckung des jeweiligen defekten Transportproteins, in Abbildung 1 und 2 dargestellt, erhielt diese relativ seltene Erkrankung (Inzidenz etwa 1:50.000) spezielle molekularbiologische Bezeichnungen. Unter diesem Aspekt nahm man eine, wie in Abbildung 1 gezeigte Einteilung der Salzverlust-Tubulopathien in einen Furosemid-Typ, einen Thiazid-Typ und einen Amilorid-Typ vor [Köckerling, Konrad, Seybert et. al., 1998].

Abb.1

Einteilung der hereditären Salzverlust-Tubulopathien		
Klassifizierung	Synonyme	Transportdefekt
Furosemid-Typ (FSLT)	Hyperkalziurisches Bartter-Syndrom Antenatales Bartter-Syndrom Hyper-Prostaglandin-E-Syndrom	NKCC2 oder ROMK
Thiazid-Typ (TSLT)	Gitelman-Syndrom Hypokalziurisches Bartter-Syndrom Familiäre hypokaliämische Hypomagnesiämie	NCCT
Amilorid-Typ (ASLT)	Pseudohypoaldosteronismus Typ 1	ENaC
Sammelbegriffe	Bartter-Syndrom Idiopathische hyperkaliurische Hypokaliämie Klassisches Bartter-Syndrom	

Köckerling, Konrad, Seybert et. al. (Deutsches Ärzteblatt 1995, Heft 30)

Abb.2 Klinische und biochemische Merkmale der hereditären Salzverlust-Tubulopathien

	Furosemid-Typ		Thiazid-Typ	Amilorid-Typ
Transportdefekt	NKCC2	ROMK	NCCT	ENaC
Polyhydramnion	+	+	-	+
Polyurie	+	+	(+)	+
Saluresis	↑	↑	(↑)	↑
Urin-Osmolalität	< 300	< 300	500-800	ca. 300
Kalziuresis	↑	↑	↓	(↑)
Nephrokalzinose	+	+	-	(+)
PGE ₂ /PGE-M	↑	↑	(↑)	↑
Renin/Aldosteron	↑	↑	(↑)	↑
Serum-Na ⁺	(↓)	(↓)	↔	↓
Serum-Cl ⁻	↓	↓	↓	(↓)
Serum-Mg ⁺⁺	(↓)	(↓)	↓	↔
Serum-K ⁺	↓	(↓)	↓	↑
Base Excess	+	(+)	+	-

Köckerling, Konrad, Seybert et. al. (Deutsches Ärzteblatt 1995, Heft 30)

1.1.1 Furosemid-Typ

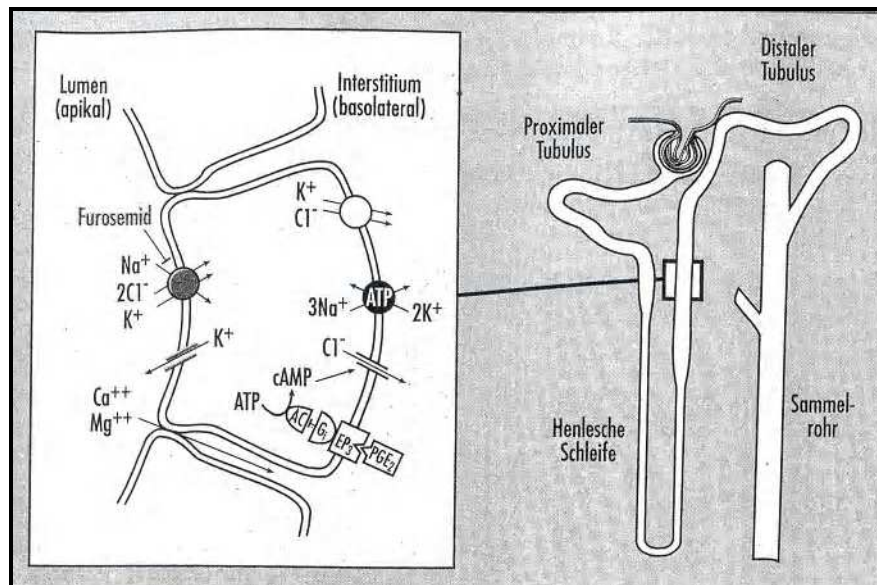
Der Furosemid-Typ (FSLT: Furosemide-like salt-losing tubulopathy), auch antenatales Bartter-Syndrom/Hyperprostaglandin-E₂-Syndrom genannt, ist ein schweres Krankheitsbild mit bereits pränatalen Manifestationen. Bedingt durch die fetale Polyurie kommt es gegen Ende des zweiten Schwangerschaftstrimenons zur Ausbildung eines Polyhydramnions und damit zur Frühgeburtslichkeit. Postpartal zeigt sich aufgrund der zunehmenden Einschränkung des Konzentrations- und Verdünnungsvermögens der Niere ein exzessiver renaler Kochsalzverlust mit Iso- oder Hypostenurie und einer massiven Polyurie. Es tritt eine hyponatriämische Dehydratation auf, die differentialdiagnostisch auch eine Salzverlust-Tubulopathie vom Amilorid-Typ (Pseudohypoaldosteronismus) vermuten lässt. Jedoch findet sich im weiteren Verlauf regelmäßig eine Hyperkaliurie mit unterschiedlich stark ausgeprägter hypokalämischer Alkalose [Jeck, Konrad, Seybert et. al., 2001]. Für die FSLT ist weiterhin eine Hyperkalziurie charakteristisch, diese kann schon innerhalb der ersten Lebenswochen zur Nephrokalzinose führen. Polyurie und Salzverluste korrelieren mit einer massiv erhöhten renalen Ausscheidung von Prostaglandinen (besonders PGE₂), die wiederum mit einer normotensiven Hyperreninämie und einem sekundären Hyperaldosteronismus assoziiert sind. Die gesteigerte Ausscheidung ist für die Namensgebung der Krankheit „Hyperprostaglandin-E₂-Syndrom“ verantwortlich. Es wird vermutet, dass klinische Symptome wie Fieber, Erbrechen, sekretorische Diarrhoe, Osteopenie und Wachstumsretardierungen durch PGE₂ vermittelt werden [Köckerling, Konrad, Seybert et. al., 1998].

1.1.1.1 Ursachen

Primäre Ursache für die FSLT ist eine defekte Chloridresorption im Bereich des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife. In Abbildung 3 wird der zelluläre Mechanismus veranschaulicht. Die Na-K-ATPasen der basolateralen Membran erzeugen einen steilen elektrochemischen Gradienten für Natrium, von extra- nach intrazellulär. Durch diesen Gradienten angetrieben, befördert der Furosemid-sensitive Cotransporter in der apikalen Membran ein Natrium- zusammen mit einem Kaliumion und zwei Chloridionen vom Tubuluslumen in die Zelle. Um die Funktion des Na-K-2Cl-Cotransporters zu gewährleisten, bedarf es der Rückführung von Kalium in das tubuläre Lumen, durch spezifische K-Kanäle der ROMK-Typen.

Durch cAMP-abhängige basolaterale Cl⁻-Kanäle, verlässt Chlorid die Zelle basolateral und wird somit im Nettoeffekt resorbiert. Durch die Chloridresorption wird über dem Epithel eine elektrische Spannung aufgebaut, die als Antrieb für die parazelluläre Resorption von Kalzium und Magnesium durch das Kationen-selektive Schlussleistennetz dient. Defekte der erläuterten Transportkomponenten führen zum Erliegen der elektrogenen Chloridresorption und somit zum klinischen Bild einer Furosemid-ähnlichen Tubulopathie mit Salurese, Polyurie, Hyperkalziurie und Hypermagnesiurie, sowie einem Verlust der renalen Konzentrationsfähigkeit. Patienten mit FSLT zeigen Mutationen im Na-K-2Cl-Cotransporter (NKCC2-Gen auf Chromosom 15q15-21) oder im renalen K-Kanal ROMK (KCNJ1-Gen auf Chromosom 11q24-25). Neben dem primären tubulären Transportdefekt ist auch die sekundär erhöhte Prostaglandin E₂-Synthese (PGE₂) von Bedeutung [Jeck, Konrad, Seybert et. al., 2001]. Man vermutet, dass aufgrund der gestörten Elektrolytresorption im TALH-Segment (Thick Ascending Limb of Henle) ein renaler Salzverlust, die Reduktion der glomerulären Filtrationsrate und des renalen Blutfluss resultiert. Um die Nierenfunktion aufrecht zu erhalten, wird das vasodilatorische PGE₂ freigesetzt. Durch tubuloglomeruläres Feedback wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert und durch die obligate Hyperreninämie wird der arterielle Hypotonus verhindert. Der sekundäre Hyperaldosteronismus vermindert den renalen Natriumverlust und ist für die folgende Hypokaliämie verantwortlich. An der Henle-Schleife stimuliert PGE₂ die zelluläre cAMP-Konzentration und bewirkt eine zusätzliche Hemmung der basolateralen Chloridresorption. Am Sammelrohr inhibiert PGE₂ die Natriumresorption und antagonisiert den ADH-abhängigen Wassertransport. Dieser PGE₂-Effekt führt zu einer weiteren Senkung der tubulären Konzentrationsfähigkeit mit hypostenurischer Polyurie [Köckerling, Konrad, Seybert et. al., 1998].

Abb.3 Mechanismus der Furosemid-sensitiven Elektrolyt-Reabsorption in der Henleschen Schleife



Köckerling, Konrad, Seyberth et. al. (Deutsches Ärzteblatt 1995, Heft 30)

1.1.1.2 Therapiemöglichkeiten

Nach [Köckerling, Konrad, Seybert et. al., 1998] lassen sich durch Suppression der sekundär erhöhten PGE₂-Synthese mit Cyclooxygenase (COX)-Inhibitoren sehr gute Therapieerfolge erzielen. Mit Hilfe der pränatalen Indomethacintherapie wurde eine Reduktion des Polyhydramnions, sowie eine Senkung der Frühgeburten beobachtet [Köckerling, Konrad, Seybert et. al., 1998]. Zusätzlich steht postpartal die sofortige Substitution von Flüssigkeit und Elektrolyten im Vordergrund. Bei der Therapie mit einem COX-Inhibitor wird empfohlen einschleichend zu beginnen und engmaschig zu kontrollieren. Bei sehr unreifen Frühgeborenen ergab sich aufgrund der geringen therapeutischen Breite von Indomethacin, ein erhöhtes Risiko für ein akutes Nierenversagen und intestinale Komplikationen. Ein optimales perinatales Management mit Vermeidung von Dehydrationszuständen und Elektrolytentgleisungen trägt nicht nur zum besseren Gedeihen der Kinder bei, sondern führt auch zu einem verminderten Auftreten einer Nephrokalzinose.

1.1.1.3 Prognose

Die Prognose der FSLT hängt stark vom Grad der Frühgeburtlichkeit und der Optimierung des perinatalen Managements ab. Sowohl die postpartale Entgleisung des Salz- und Wasserhaushalts, als auch allgemeine Probleme der extremen Frühgeburt sind Ursachen für psychomotorische Retardierung einiger FSLT-Patienten. Zusätzlich zeigen einige Jugendliche und junge Erwachsene eine chronische progrediente Niereninsuffizienz.

Unklar ist, ob diese durch die Langzeitbehandlung mit COX-Inhibitoren oder primär durch die Grunderkrankung verursacht wird [Köckerling, Konrad, Seyberth et. al., 1998].

1.1.2 Überleitung zum Versuchsmodell

Die hereditären Tubulopathien mit Diuretika-ähnlichem Salzverlust sind durch eine intrazelluläre Hypoosmolarität gekennzeichnet. Mit Hilfe eines Zellkulturmodells sollte durch entsprechende extrazelluläre Bedingungen dieser Zustand experimentell simuliert werden. Daher wurden Nierenzellen des Schweins mit einer hypoosmolaren Lösung über einen definierten Zeitraum inkubiert und die daraus resultierenden Veränderungen untersucht. Die Proteobiologie wurde eingesetzt um eventuelle Modifikationen aufzuzeigen und beteiligte Proteine identifizieren zu können.

1.2 Proteobiologie

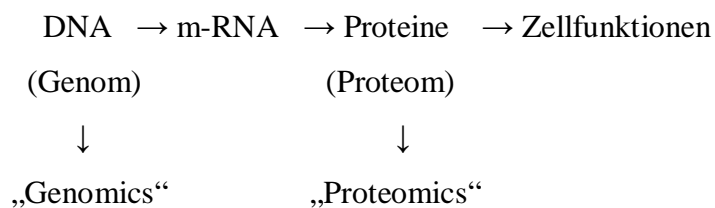
Die Proteobiologie (Proteomics) ist ein Wissenschaftszweig, der sich mit der globalen Analyse von zellulären Proteinen (Proteom), deren Struktur, Funktionen und Wechselwirkungen befasst. Proteinveränderungen sollen bei der Entstehung von Krankheiten und Fehlbildungen erkannt werden [Brockhaus- Die Enzyklopädie, 1999]. Bei der internationalen Elektrophorese-Tagung in Siena/Italien 1994 wurde der Begriff „Proteomics“ erstmalig erwähnt [Kahn et. al., 1995].

Analog zum Genom, welches die Gesamtheit der kodierenden Gene darstellt, bezeichnet man die Gesamtheit bzw. Zusammensetzung der Proteine einer Zelle, eines Organs oder eines Organismus, als Proteom [Wilkins et. al., 1997]. Die Entwicklungen in der Proteobiologie haben dazu beigetragen, dass die Proteinchemie einen höheren Stellenwert eingenommen hat. Spätestens seit die Sequenzierung der menschlichen Gene abgeschlossen wurde, erkannte man, dass mit der Gensequenzierung nicht alle Fragen, beispielsweise zur Funktion einzelner Gene und möglicher Relevanz beim Krankheitsgeschehen, beantwortet werden können. Somit erlangte die Proteobiologie in der Postgenomära an Bedeutung [Pandy und Mann, 2000; Eisenberg et. al., 2000]. Der Grundstein der klassischen Proteomanalyse wurde 1975 mit der Kombination von isoelektrischer Fokussierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gelegt [Klose, 1975, O'Farrell, 1975]. Es entstand die Zweidimensionale Elektrophorese.

Die folgenden Jahre waren geprägt von Weiterentwicklung und Verbesserung der Methode. Mit Veränderungen der Geldicke, Gelgröße, dem Ampholytengemisch sowie den Färbemethoden erreichte man höhere Auflösungen, sensitivere Detektion und eine bessere Reproduzierbarkeit. In den späten 80iger Jahren gab es für die Proteomforschung einen zusätzlichen Aufschwung. Mit der Entwicklung der Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) [Karas und Hillenkamp, 1988; Tanaka et. al., 1988] und der Electrospray-Ionisation (ESI) [Fenn, et. al., 1989], wurden Biomoleküle zum ersten Mal massenspektrometrisch analysiert ohne dabei zerstört zu werden. Die MALDI und ESI-Techniken sind die einzigen für Biomoleküle verträglichen Ionisierungsformen. Im Laufe der Zeit wurden diese Methoden weiterentwickelt und die Geräte zunehmend sensitiver. Üblicherweise kombiniert man in der Proteomanalyse die 2-D Elektrophorese mit der Massenspektrometrie.

1.2.1 Proteomanalyse und Subtraktive Proteomforschung

Gene sind die Erbinformation der Lebewesen und bleiben das ganze Leben lang unverändert, es sei denn, die DNS wird durch äußere Einflüsse, wie Strahlung, Chemikalien usw. mutiert. Die Proteine stellen dabei translatierte Genprodukte dar, die als dynamische Komponenten der Zellen anzusehen sind. Da nicht immer ein einzelnes Gen ein Protein kodiert, sondern ein Gen auch mehrere Proteine bzw. auch mehrere Gene unterschiedliche Proteine kodieren können, fällt es schwer nur aus der Geninformation eine Aussage über den Zustand der Proteine zu treffen.



Die physiologischen Vorgänge und die phänotypischen Veränderungen der Lebewesen sind zwar durch die Umwelt beeinflussbar, jedoch haben sie keinen Einfluss auf die Genkodierung. Dies wird von Proteinen organisiert und umgesetzt. Eine zusätzliche Variabilität und Vielfalt bieten die co- bzw. posttranslationalen Modifikationen der Proteine, wie zum Beispiel Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen oder Verknüpfungen mit Kohlehydraten und Lipiden. Darüber hinaus kann sich ein Proteom durch äußere Einflüsse verändern. Solche Einflüsse können Temperaturschwankungen, Stress oder auch Medikation sein. Die Analyse von Proteomen verschiedener Einflüsse kann Aufschlüsse über wichtige Mechanismen geben. Neben der kompletten Analyse bestimmter Proteome, ist die subtraktive Proteomanalyse ein wichtiger Bestandteil der Proteobiologie. Dabei werden Unterschiede von mindestens zwei verschiedenen Proteomzuständen untersucht. Man kann somit z.B. gesunde Zellen mit kranken Zellen, verschiedener Stämme eines Organismus oder auch Zellen in unterschiedlichen Zellstadien vergleichen. Die Differenzen der Proteinmuster der 2-DE Gele sind durch Intensitäts- oder Positionsveränderungen erkennbar. Die als Spot dargestellten Proteine sind entweder an den Veränderungen beteiligt oder durch diese entstanden. Die Suche nach solchen Proteinen, auch Targetproteine genannt, kann bei einigen Krankheiten für die Diagnosestellung, die Therapieoptionen oder die Prognose von großer Bedeutung sein.

2 Fragestellung

Die Salzverlust-Tubulopathien mit hypokalämischer Alkalose, Hyperreninismus und Hyperaldosteronismus lassen sich in den Furosemid-, den Thiazid- und Amilorid-Typ einteilen. Diese schweren Krankheitsbilder manifestieren sich teilweise bereits pränatal und werden durch spezifische epitheliale Ionentransportdefekte hervorgerufen.

Als primäre Ursache für die Tubulopathie des Furosemid-Typs (FSLT) kann eine gestörte Chloridresorption im Bereich des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife verantwortlich gemacht werden.

Meine Arbeit simulierte diesen Zustand am Zellmodell. Unter extrazellulären hypoosmolaren Kulturbedingungen wurden Veränderungen auf Proteinebene in Nierenepithelzellen untersucht. Ziel der Experimente war es, durch die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese in Kombination mit sehr empfindlichen massenspektrometrischen Verfahren komplexe Protein-Gemische zu trennen und anschließend zu analysieren. In Anlehnung an das antenatale Bartter-Syndrom/Hyperprostaglandin-E₂-Syndrom, wurden die entstandenen Proteinmodifikationen aufgedeckt, identifiziert und diese Veränderungen in Beziehung zu den ablaufenden Zellreaktionen gebracht. Gleichzeitig wurde versucht die Proteobiologie der Niere mittels 2-Dimensionaler Elektrophorese zu etablieren und weiterzuentwickeln. Durch die Proteinanalyse sollte ein Einblick in die Zellphysiologie gegeben werden, um die pathophysiologischen Prozesse besser verstehen zu können. Durch den Vergleich von krankem und gesundem Gewebe sollen Krankheitsverläufe verstanden und biologische Marker wissenschaftlich basiert definiert werden. Somit könnte durch ein schnelleres Erkennen und Behandeln der Erkrankung der Verlauf günstig beeinflusst werden.

3 Material und Methoden

3.1 Isolation und Zellkultur von m-TAL Zellen

3.1.1 Isolation von m-TAL Zellen

Für die PBS-Gebrauchslösung wurden folgende Chemikalien angesetzt und mit MilliQ-H₂O 1:10 verdünnt. (MilliQ-H₂O: Wasser, welches aus einer MilliQ- Reinstwasseranlage (Firma Millipore) gewonnenen wurde.)

- PBS-Gebrauchslösung:	81 mM Na ₂ HPO ₄	11,50 g
	1,36 M Na Cl	79,48 g
	14 mM KH ₂ PO ₄	1,90 g
	26 mM KCl	1,94 g
	ad 1 l MilliQ-H ₂ O	

- **Collagen-A:** Stammlösung 1mg/ml wurde als Gebrauchslösung 1:100 mit PBS verdünnt.

- **Collagenase-B-Lsg.:** Von 10%iger Stammlösung wurden 16 µl in 8 ml PBS gelöst.

- **BSA-Lsg. 2%** (Bovine-Serum-Albumin): 160 mg BSA in 8 ml PBS gelöst.

- **Wachstumsmedium:** DMEM HAM`S/F 12 (+ 20% FCS + Penicillin/Streptomycin 5ml)

Die Gewebeplatten mit 6 Vertiefungen wurden jeweils mit 200 µl Collagen-A beschichtet und über Nacht im Brutschrank belassen. Vor Präparationsbeginn wurde die Collagen-A-Lösung abgesaugt und die Platten getrocknet. Die Aufarbeitung der Niere begann mit dem Ablösen der umschließenden Kapsel. Die Niere wurde sodann in Längsrichtung zerteilt und die Innenschicht des äußeren Marks dargestellt. Die erhaltenen Gewebestücke wurden zerkleinert und in Probengefäße überführt. 2 ml Collagenase-B-Lösung wurden dazu pipettiert und dieses Gemisch zehnminütig im Wasserbad bei 37°C begast. Durch das Enzym Collagenase-B und das Carbongas sollte die Verdauung und die Auftrennung des Gewebes beschleunigt werden. Nach 10 min wurden zu der Probe 2 ml der Albuminlösung gegeben und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe wurde der Überstand abgenommen und in einem zweiten Röhrchen gesammelt. Das Pellet resuspendierte man und gab die Zellsuspension in die schon vorbereiteten Gewebeplatten und fügte 2 ml Wachstumsmedium pro Vertiefung hinzu. Als Wachstumsmedium wurde DMEM HAM`S/ F 12 verwendet.

3.1.2 Pflege von m-TAL Zellen

Nach 3 Tagen wurden die m-TAL Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Pro Vertiefung gab man 2 ml Wachstumsmedium auf die Zellen und inkubierte sie im Brutschrank. In den nächsten 3-4 Tagen erfolgte die tägliche optische Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop. Dabei wurden Formveränderungen, Wachstumsgeschwindigkeiten aber auch mögliche Bakterienbesiedlung oder andere Verunreinigungen beurteilt.

3.1.3 Splitten von m-TAL Zellen aus Gewebeplatten

Die Zellen wurden nach 3-4 Tagen aus dem Brutschrank entnommen und mit PBS-Waschpuffer gewaschen. Dann wurde jede der 6 Vertiefungen der Gewebeplatten mit 1ml Trypsin/ EDTA, welches 1:10 in PBS gelöst wurde, befüllt und für 10-15 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen nach Beschaffenheit und Dichte unter dem Mikroskop begutachtet. 1 ml des Wachstumsmediums wurde in jede Vertiefung pipettiert und die Zellen abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Probengefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 3 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Pro 15 ml Gewebeplatte wurden nun jeweils 1,5 ml der Zellsuspension und jeweils 15 ml Medium aufgetragen. Diese 15 ml Gewebeplatten inkubierte man erneut 2-3 Tage im Brutschrank bis sie einen dichten Zellrasen ausgebildet hatten. Die Platten wurden mit 15 ml PBS gewaschen. In die Gewebeprobenschalen wurden jeweils 15 ml Kontroll-Lösung oder 15 ml der hypoosmolaren Lösung gegeben, um dann für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert zu werden. Danach wurden diese Zellen erneut gewaschen und mit einem Gummischaber vorsichtig von der Oberfläche der Schale gelöst. Die erhaltenen Zellen wurden in ein 2 ml Probengefäße überführt und zentrifugiert. Das Abtragen der Zellen wiederholte man solange, bis der Zellrasen von der 15 ml Gewebeprobenschale gelöst wurde. Die Kontroll- und hypoosmolare Lösung wurden in folgenden Konzentrationen in einem 50 ml Probengefäß angesetzt, dabei erfolgte eine zufällige Gruppeneinteilung der Zellen.

- **Kontroll-Lsg.:** **Medium 22,3 ml + MilliQ-H₂O 27,7 ml +
0,9% NaCl 0,75 ml**
- **Hypoosmolare-Lsg.:** **Medium 22,8 ml + MilliQ-H₂O 27,7 ml +
0,5% NaCl 0,25 ml**

Bei Substanzen, die in wässriger Lösung dissoziieren, wie z.B. Salze entsprechen 1 mol NaCl/1→2 osm/l, da NaCl in die osmotisch wirksamen Ionen Na und Cl dissoziiert. Die Kontrollgruppe wurde mit einer isotonischen Lösung (entsprechend 0,3 mosm/l) behandelt. Dies entsprach einer 0,9%-igen NaCl-Lösung. Da bei Herstellung der hypoosmolaren Lösung nur die zugesetzte NaCl-Menge geändert wurde, konnten zur Abschätzung der Osmolarität alle weiteren gelösten Bestandteile als konstant betrachtet werden. Somit ergab sich für die hypoosmolare Lösung eine Konzentration von 0,5% NaCl. Dies entspricht einer 0,2 osm/l Lösung.

3.1.4 Zellaufarbeitung/ Proteinextraktion

Als Zielkonzentration an Gesamtprotein wurde ca. 5 µg/µl angenommen. In ein 1,5 ml Probengefäß wurden 15 mg Dithiothreitol (DTT) vorgelegt und mit Lysis-Puffer (PI) gelöst. Um die Zellen zu resuspendieren wurde 0,9 I.E. Endonuclease (SIGMA E-8263)/ µl Lysis-Puffer direkt auf das Zellpellet pipettiert. Die Zellsuspension überführte man in einen gekühlten Potter, homogenisierte und zentrifugierte diese Lösung. Nach Abnahme des Überstandes konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.2 Herstellung Lysis-Puffer (PI)

- **Lysis-Puffer (PI):** 8 M Urea
4 % CHAPS
5 mM Pefabloc
10 mM Tris Base (Trishydroxymethylaminomethane)

In ein 50 ml Probengefäß wurden 12,01 g der Urea eingewogen und mit MilliQ-H₂O auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Nachdem sich der Harnstoff bei einem Temperaturmaximum von 37°C komplett gelöst hatte, wurde 1 g Mischbettionenaustauscher „AG 501-X8 Resin“ der Firma BIO-RAD hinzugegeben und diese Lösung 15 min lang auf dem Schüttler belassen.

In ein weiteres 50 ml Probengefäß wog man folgende Chemikalien ein, um sie dann in der 8 M Harnstoff-Lösung ad 20 ml zu lösen:

- 0,80 g CHAPS
- 23,95 mg Pefabloc
- 24,20 mg Tris Base (Trishydroxymethylaminomethane)

Nachdem sich CHAPS, Tris Base und Pefabloc in der 8 M Urea-Lösung vollständig löste, wurde die Lösung steril filtriert (Millex-GS 0,22 µm Filter Unit). Der Lysis-Puffer (PI) wurde anschließend in 1,5 ml Probengefäß aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Vor jedem Gebrauch musste zu den 1,5 ml Lysis-Puffer 15 mg Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt (1 % DTT) werden.

3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Herstellung der Albuminstandard-Lösungen 10-50 µg/ml wurden wie unten angeführt eine Albuminlösung 2 mg/ml und MilliQ-H₂O miteinander gemischt:

Albuminlösung+MilliQ-H₂O=Albuminstandard-Lösung

5 µl+95 µl=10 µg/ml

10 µl+90 µl=20 µg/ml

15 µl+85 µl=30 µg/ml

20 µl+80 µl=40 µg/ml

25 µl+75 µl=50 µg/ml

Für die Proteinbestimmungen wurden die Albuminstandard-Verdünnungen 10-50 µg/ml verwendet. Das Zellysate verdünnte man mit MilliQ-H₂O, so dass die vermuteten Konzentrationen in einem Bereich von 30-80 µg/ml lagen. Im gleichen Verhältnis verdünnte man den Lysis-Puffer. Als Doppelbestimmung pipettierte man von der Albuminstandard-Verdünnung 10-50 µg/ml je 160 µl in jeweils 2 Vertiefungen einer Microtiterplatte. Als Leerwert für die Proben-Verdünnungsreihe wurden dabei in 2 Vertiefungen je 160 µl der Lysis-Puffer-Verdünnung pipettiert.

Es folgten 3 Doppelbestimmungen der Proben-Verdünnung:

80 µl Proben-Verdünnung+80 µl Lysis-Puffer-Verdünnung

120 µl Proben-Verdünnung+40 µl Lysis-Puffer-Verdünnung

160 µl Proben-Verdünnung

Dann wurden jeweils 40 µl „BIO-RAD Protein Assay“ hinzugegeben, so dass alle Vertiefungen der Microtiterplatte komplett durchgefärbt waren und keine Luftblasen enthielten. Die optische Dichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Anhand der erhaltenen Daten war es möglich eine Eichgerade zu berechnen, Trendlinien zu legen und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben zu ermitteln.

3.4 Herstellung Rehydratisierungspuffer (PII)

- Rehydratisierungspuffer (PII): 8 M Urea
2 M Thiourea
4% CHAPS
5 mM Pefabloc
10 mM Tris Base
0,8% Pharmalyte 3-10
10 µg/ml Bromphenolblau

In ein 50 ml Probengefäß wurden 12,01 g Urea und 3,04 g Thiourea eingewogen und mit MilliQ-H₂O auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Nachdem sich Urea und Thiourea komplett gelöst hatten, wurde 1 g Mischbett-Ionenaustauscher „AG 501-X8 Resin,, der Firma BIO-RAD hinzugegeben und alles 15 min auf dem Schüttler geschwenkt. Der Ionenaustauscher sollte sich am Boden absetzen.

In ein weiteres Probengefäß wurden folgende Substanzen eingewogen und in die zuvor hergestellte Urea/Thiourea Lösung überführt:

CHAPS	→ 0,80 g
Pefabloc	→23,95 mg
Tris Base	→24,20 mg

CHAPS, Tris Base und Pefabloc wurden in dem Urea/Thioureagemisch gelöst, zusätzlich fügte man folgende Chemikalien hinzu:

Pharmalyte	→Pharmalyte 3-10 (36%) 444,4 µl
Bromphenolblau	→Bromphenolblau (1%) 20,0 µl

Der Rehydratisierungs-Puffer (PII) wurde anschließend steril filtriert (Millex-GS 0,22 µm Filter Unit), zu 1,5 ml aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch musste zu den 1,5 ml Aliquoten 15 mg Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt werden (1% DTT).

3.5 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Isoelektrische Fokussierung ist ein elektrophoretisches Verfahren, das auf dem Prinzip basiert, Proteine nach ihrem Isoelektrischen Punkt (pI) aufzutrennen. Proteine, Enzyme und Peptide sind Amphotere, das bedeutet sie können nach außen hin positiv und negativ geladen sein, abhängig von dem pH-Wert ihrer Umgebung. Die Nettoladung eines Proteins ist sowohl die Summe aller negativen und positiven Ladungen an den Aminosäureseitengruppen, als auch der Amino- und Carboxylenden. Der Isoelektrische Punkt ist der spezielle pH-Wert, an dem die Nettoladung des Proteins Null ist.

3.5.1 Durchführung

Entsprechend der Proteinkonzentration und der aufzutragenden Proteinmenge, wurden die nötigen Volumina der Probe und des Rehydratisierungspuffers (PII) berechnet.

- $400 \mu\text{g}/\text{Proteinkonzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Volumen der Probe in } \mu\text{l}$
- $450 \mu\text{l} - \text{Volumen der Probe in } \mu\text{l} = \text{Volumen des Rehydratisierungspuffer PII in } \mu\text{l}$

Den Lysis-Puffer (PI) versetzte man mit DTT (1%), wobei 15 mg DTT pro 1,5 ml Probengefäß verwendet wurde. Die 24 cm langen Streifenhalter wurden auf der gesäuberten Arbeitsfläche aufgereiht und das zuvor berechnete Proben- und Rehydratisierungspuffer (PII)-Volumen gleichmäßig in die Streifenhalter hineinpipettiert. Es wurde beachtet, dass keine Lösung über den Rand trat, da sonst die Ergebnisse nur eingeschränkt reproduzierbar gewesen wären und zusätzlich Urea-Kristalle hätten entstehen können, welche die Isoelektrische Fokussierung gestört hätten. Die IPG-Streifen mit einem pH-Gradient von 4-7, wurden vom sauren Ende ausgehend, entsprechend der spitzen Seite des Streifens, von der Schutzfolie befreit. Die IPG-Streifen wurden mit der Gelseite nach unten vorsichtig in das zuvor einpipettierte Rehydratisierungsprobengemisch gelegt, dabei fügte man die spitze Seite des IPG-Streifens in den dafür vorgesehenen spitzen Teil des Streifenhalters. Der Gelstreifen wurde dann komplett mit 3 ml Mineralöl bedeckt und in die IPG-Apparatur eingesetzt. Die Gele wurden mit einer Laufdauer von etwa 18 Stunden rehydratisiert. Das Mineralöl wurde im Anschluss abgegossen und die Elektrodenfilterstreifen zwischen die Elektroden und das Gel gelegt. Bei diesem Vorgang wurden die ausgetretenen Elektrolyte im Filterstreifen gesammelt, um eine bessere Proteindarstellung in der 2. Dimension zu erhalten. Anschließend wurde das Gel im Streifenhalter erneut mit 3 ml Mineralöl überschichtet und für die Isoelektrische Fokussierung bei entsprechender Programmeinstellung über Nacht belassen. Waren die Gele fokussiert, konnten diese sofort equilibriert werden, um sie für die Zweite Dimension vorzubereiten.

3.6 Zweite Dimension–SDS-Elektrophorese

Sowohl der Nativzustand von Proteinen, als auch die aus mehreren Untereinheiten bestehende Tertiär- und Quartärstruktur, ist bedingt durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfidbrücken. Für die SDS-Elektrophorese müssen die Proteine aus ihrem Nativzustand in anionische SDS-Proteinmizellen überführt werden.

Durch die SDS-Elektrophorese wird es möglich Polypeptide nach ihrem Molekulargewicht in horizontaler Ebene aufzutrennen. Das dafür nötige SDS (sodium dodecyl sulfate) wird zum einen dem Equilibrierungspuffer zugesetzt, zum anderen ist es Bestandteil der Polyacrylamid Ettan DALT Fertiggele. Durch die Elektrophorese trennt man Proteine nach unterschiedlichen Molekulargewichten auf.

- **Dithiothreitol (DTT):** Durch das Hinzufügen von DTT in den Equilibrierungspuffer erreicht man eine vollständige Streckung der Polypeptide und ermöglicht die Auftrennung nach dem Molekulargewicht.
- **Iodoacetamid:** Durch die Alkylierung mit Jodacetamid wird ein verbesserter und dauerhafter Schutz der Thiol-(SH-)Gruppen der Proben erreicht, ihre Reoxidation wird während der Elektrophorese verhindert und man erkennt schärfere Banden in der Zweiten Dimension.
- **Urea:** Gemeinsam mit Glycerol, erhöht es die Viskosität des Puffers und reduziert die Effekte der Elektroendosmose.
- **Glycerol:** Verbessert den Transfer der Proteine von der Ersten zur Zweiten Dimension.
- **Bromphenol-Blau:** Zeigt den Verlauf der 2-D Elektrophorese.

3.6.1 Durchführung

- Equilibrierungspuffer:	6 M Urea	→90,125 g
	Glycerol (30%)	→75,000 g
	SDS (2%)	→ 5,0 g
	50 mM Tris Base	→ 1,5 g

Der pH-Wert wurde auf 8,8 eingestellt und mit MilliQ-H₂O ad 25 ml aufgefüllt.

Die EttanDalt II-Kammer wurde mit MilliQ-H₂O aufgefüllt. 75 ml des Anodenpufferkonzentrates der Firma Amersham Bioscience wurden in die Kammer gegossen und mit MilliQ-H₂O bis zur untersten Markierung (ca. 7 l) aufgefüllt. Die Platzhalter wurden eingesetzt (12 – Anzahl der Gele – 1 = Anzahl der Platzhalter). Für die Herstellung des Kathodenpuffers wurden 125 ml Kathodenpufferkonzentrat der Firma Amersham Bioscience in ein 1 l Standzylinder mit MilliQ-H₂O gelöst. Nachdem alle Gelkassetten und der letzte Platzhalter in die Anodenkammer eingesetzt wurden, fügte man erneut 125 ml Kathodenpufferkonzentrat hinzu. Der zuvor angesetzte Kathodenpuffer wurde in die Kathodenkammer gegossen und mit MilliQ-H₂O aufgefüllt. Zur Herstellung der Equilibrierungspuffer I + II wurden pro vorhandenem Gel 10 ml Equilibrierungspuffer I mit 0,5% DTT (zur Denaturierung) und 10 ml Equilibrierungspuffer II mit 4,5% Iodacetamid (zur Alkylierung) angesetzt, sodann gab man pro Gelstreifen 50 µl einer 0,25%igen Bromphenolblau-Lösung hinzu. Die IPG-Streifen wurden mit 10 ml Equilibrierungspuffer I für ca. 15-30 min auf dem Schüttler geschwenkt und dann in den Equilibrierungspuffer II überführt. Sie wurden erneut 15-30 min auf dem Schüttler belassen, dabei lagen sie vollständig im Puffer, um das Austrocknen der Gelstreifen zu verhindern. Da Iodacetamid zu den kanzerogenen Chemikalien zählt, wurde mit dem Equilibrierungspuffer besonders vorsichtig gearbeitet. Während die IPG-Streifen noch equilibriert wurden, legte man die Ettan DALT II-Fertiggele in die Kassetten ein. Auf dem Gel pipettierte man vertikal 1 ml Gelpuffer (Ettan Buffer Kit) entlang der rechten Kante und horizontal 1 ml von der rechten Kante zu Mitte hin. Die Ettan DALT-II-24 cm Fertiggele wurden mit der Gelseite auf die Glasplatte der Kassette aufgelegt. Dabei platzierte man die Anodenseite des Gels auf der Anode und die Kathodenseite entsprechend auf der Kathode. Nachdem die Gelkassetten mit der Öffnung nach unten zwischengelagert wurden, pipettierte man auf die obere Gelkante 200 µl Gelpuffer, um ein Austrocknen der Gelkante zu verhindern. Gleichzeitig wurde die Sealing-Solution (Agarose mit Bromphenolblau) vorbereitet. Nach 15-30 min wurden die IPG-Streifen aus dem Equilibrierungspuffer II entnommen. Man tauchte sie sowohl in MilliQ-H₂O, als auch in den vorbereiteten Kathodenpuffer, um sie dann vorsichtig mit der Gelseite nach oben und der sauren Anodenseite (spitzes Ende) nach links auf die überstehende Kante der Glasplatte zu legen. Auf die EttanDALT Gele wurden nun die IPG-Streifen aufgetragen und durch die Sealing-Solution die Zwischenräume beider Gelseiten verschlossen. Etwa 1 ml der Sealing-Solution verteilte man über das Gel, dabei wurde versucht alle Luftblasen zwischen EttanDALT Gel und IPG-Gel zu entfernen.

Es folgte das Einsetzen der Gelkassetten in die EttanDALT Kammer, zusätzlich wurde der vorbereitete Kathodenpuffer in die obere Kammer gegossen. Das entsprechende Programm wurde eingestellt, mit einem Leistungsverlauf der SDS-PAGE, einer konstanten Leistung, einer Temperatur von 25°C und 3 Watt pro Gel für die ersten 30 min (T1) bzw. 20 Watt pro Gel für die folgende Zeit (T2). Der Verlauf des Gels wurde durch die Bromphenolblaufront angezeigt, um ein Laufende besser abschätzen zu können. Die Spannungsverläufe zu Beginn (T1), nach einer halben Stunde (T2), während des Durchlaufs (T3) und am Ende (T4) wurden dokumentiert. Nach Beenden des elektrophoretischen Durchlaufs überführte man die Gele direkt in die Färbewanne bzw. in eine zuvor hergestellte Fixierlösung. Die Kammer wurde wie oben beschrieben, erneut mit MilliQ-H₂O gespült.

3.6.2 Visualisierung

Die Silberfärbung ist eine Proteinfärbemethode, die es ermöglicht auch bei niedrigen Proteinmengen (<1 ng) eine sehr sensitive Darstellung der Proteine zu erhalten. Um bei diesem mehrstufigen Färbeprozess Resultate mit hoher Qualität zu erhalten, bedarf es äußerst reinen Reagenzien und dem Einhalten der Färbezeiten. Durch das automatische Färben mit der Färbewanne (Hofer Automated-Gel-Stainer), wird ein großer Teil dieser Variablen konstant gehalten. Sie erlaubt eine genaue Zeitkontrolle und die Einheitlichkeit der Färbungen. Die Silberfärbung setzte sich aus folgenden Schritten zusammen. Das Durchspülen mit MilliQ-H₂O erfolgte dabei als Zwischenschritt:

- **1 Fixierung:** Bei diesem Vorgang wurde das Gel mit Essigsäure behandelt, um die Unlöslichkeit der Makromoleküle im Gel zu erhalten und ihr Herausdiffundieren aus dem Gel zu verhindern. Substanzen wie Puffer, Ionen, Denaturantien oder auch Carrier Ampholyte, die das Färbeergebnis stören könnten, wurden herausgewaschen.
- **2 Sensitisierung:** Man verwendete zum einen Reagenzien, die chemische Modifikationen der Proteine bewirken können und zum anderen solche, die eine Reduktion der Silberionen beschleunigen und somit die Sensitivität erhöhen. Werden Sensitierungs-Reagenzien im Übermaß angewendet, resultiert eine zu starke Färbung des Hintergrundes, so dass die Gele nach diesem Schritt mit MilliQ-H₂O gespült wurden.

• **3 Silber-Imprägnierung:** Dazu wurde das Gel mit Silbernitrat behandelt, wobei die leicht sauren Bedingungen die Silberionen vor der Reduzierung zu Metallsilber schützen. Das Gel wurde anschließend kurz gewaschen, um den hohen Silbergehalt von der Geloberfläche zu entfernen.

• **4 Entwicklung:** Die Entwicklerlösung enthielt Formaldehyd, das Silberionen zu Metallsilber reduziert. Dieser Vorgang sollte nur in hohen pH-Bereichen erfolgen, daher wurde mit Natriumcarbonat alkalisiert.

• **5 Stoppen und Präservation:** Die Stopp-Lösung schützte vor weiterer Reduktion der Silberionen. Das Präservations-Reagenz enthielt Glycerol, was dem Gel Geschmeidigkeit gab und es während des Trocknungsprozesses nicht auseinander brechen ließ.

Folgende Chemikalien wurden angesetzt:

• **1 Fixierung**

Essigsäure	100 ml
Ethanol p.a.	400 ml
MilliQ-H ₂ O ad	1000 ml

• **2 Sensitisierung**

Natriumthiosulfat	3,138 g
Natriumacetat	68,000 g
Ethanol p.a.	300 ml
MilliQ-H ₂ O ad	1000 ml

• **3 Silber-Imprägnierung**

Silbernitrat	1,0 g
MilliQ-H ₂ O ad	400 ml

• **4 Entwicklung**

Natriumcarbonat	25,0 g
Formaldehyd	2 ml
MilliQ-H ₂ O ad	1000 ml

• 5 Stopp-Reagenz

Glycin **5,0 g**
MilliQ-H₂O ad 1000 ml

Silberfärbung

Stufe	Färbung	Volumen	Zeit
1	Fixierung	250 ml	über Nacht
2	Fixierung	250 ml	15 min
3	Fixierung	250 ml	15 min
4	Sensitisation	250 ml	30 min
5	Waschen	250 ml	08 min
6	Waschen	250 ml	08 min
7	Waschen	250 ml	08 min
8	Waschen	250 ml	08 min
9	Waschen	250 ml	08 min
10	Silber	250 ml	30 min
11	Waschen	250 ml	01 min
12	Waschen	250 ml	01 min
13	Entwicklung	250 ml	2-4 min
14	Stoppen	250 ml	40 min
15	Waschen	250 ml	05 min
16	Waschen	250 ml	05 min
17	Waschen	250 ml	05 min

3.6.3 Analyse der Gele

Mit Hilfe des Bearbeitungsprogramms PDQuest für die 2-D Elektrophorese der Firma BIO-RAD wurden die Gele zur Digitalisierung eingescannt. Die Analyse der 2-D Gele umfasste folgende Arbeitsschritte:

1. Scannen
2. Kalibrieren
3. Spot-Detektion
4. Matching & Editieren
5. Daten Analyse
6. Bilden der Datenbasis
7. Ergebnisbericht
8. Exportieren

Die Gele wurden mit einem GS-700 Densitometer der Firma BIO RAD eingescannt. Die Daten der Kalibrierung verwendete man, um die durchschnittliche optische Dichte des individuellen Segmentes, mit der durchschnittlichen Desintegration pro Minute (DPM), von jedem einzelnen Segment zu vergleichen. Diese Daten wurden dann in einer Kalibrierungskurve vereinigt. Das Gel wurde mit dem Teilprogramm „Image“ bearbeitet und dann in eine passende Form geschnitten (Define Crop Area). Diese Maße ließen sich jeweils auf andere Gele übertragen, damit die Gele miteinander verglichen werden konnten. Diese Form wurde gesichert (Save Crop Setting) und ein Standardgel ausgewählt. Mit dem „Spot Detection Wizard“ Teilprogramm legte man, ausgehend vom Standardgel, den feinsten, den größten Spot und eine Fläche für die Hintergrundberechnung fest. Voraussetzung dafür war die Vergleichbarkeit aller zu vergleichenden Gele. Sie sollten aus einer Versuchsreihe stammen und auch makroskopisch die gleiche Färbeintensität und Färbeart aufweisen. Mit Hilfe des Bearbeitungsprogramms wurden z.B. Artefakte, wie vertikale/horizontale Streifen ausgeglichen und der Gaussion-Model-During Test durchlaufen. Es folgte das Angleichen der ausgewählten Gele und die Detektion der Proteinspots. Die Gele wurden in Gruppen als Matchset zusammengefasst, um qualitative/quantitative Aussagen treffen zu können und Proteine eines Gels mit Proteinen eines anderen Gels innerhalb eines Matchsets zu vergleichen. Zusätzlich war es möglich gleichwertige Gele als neue Mitglieder in ein Set aufzunehmen, zu bearbeiten oder auch wieder zu entfernen. Ein Mitglied dieses Matchsets wurde als Grundlage für ein Standardgel verwendet.

Ähnlich einer Kopie kombinierte und vereinigte dieser Standard alle Proteine des Matchsets in einem Bild. Die Auswahlkriterien für ein Standardgel sind vielfältig, so waren die hohe Proteinzahl und deren gute Qualität in diesem Gel relevant. Im Allgemeinen wird empfohlen ein Kontrollgel zu verwenden. Das Bearbeiten der Gele wurde sodann im gebildeten Matchset vereinfacht, da alle enthaltenen Gele in den jeweiligen Teilansichten dargestellt wurden. Somit bot sich die Möglichkeit, die gesuchten Proteine untereinander und auf einem Blick zu vergleichen. Mit der Funktion „Edit Spot Tools“ ließen sich die gewünschten Proteine markieren, so dass der Bearbeiter, die vom „PDQuest“ Programm vorgegebenen Proteine noch einmal visuell und manuell überprüfen konnte. Waren einige Proteine in allen Gelen vorzufinden, wurden diese als Landmarken (Match Tools) gesetzt, um ein Angleichen und eine genauere Orientierung zu erreichen. Mit dem Arbeitsschritt „Match all gels“ wurden sämtliche Mitglieder dieses Sets in einem Schritt angeglichen. Proteine, die vom Programm erkannt wurden und sich in den einzelnen Gelen wiederholten, wurden mit einem Buchstaben belegt, so konnte jederzeit die exakte Zuordnung überprüft werden. Es schloss sich das Zusammenfügen der einzelnen Gele in die durch das Experiment festgelegten Hauptgruppen (Kontroll- und hypoosmolare Gruppe) an. Dieses wurde mit dem Unterpunkt „Replicate Groups“ und „Create Group“ ermöglicht. Bei dem Vergleich von 2-D Gelen einer Hauptgruppe in einem Matchset, kann es aber auch zu Variationen in der Proteinintensität kommen. Diese Unterschiede können viele Ursachen haben, wie z.B. Fehler während der Probenpräparation, Pipettierungenauigkeiten aber auch inkonstante Färbezeiten. Um diese Fehler auszugleichen, wurden die Gele „normalisiert“. Sämtliche Daten und Informationen der Proteine wurden in ein Format verpackt (Databasing Spots), damit die Sets unter verschiedenen Gesichtspunkten wie Quantität, Qualität oder auch der Statistik analysiert werden konnten [BIO-RAD, 2-D Elektrophoresis for Proteomics]. Mit dem „Analysis Set“ Dialogfenster wählte man die zu vergleichenden Gele aus, z.B. A- Kontrollgruppe und B- Hypoosmolare Gruppe. Es folgte die Festlegung welche Proteine der Gruppen A/ B vermehrt (Increased) oder vermindert (Decreased) dargestellt wurden. In meinem Experiment behandelte man m-TAL Zellen mit einer Kontroll- und einer hypoosmolaren Lösung. Dabei wurden Proteinveränderungen bezüglich einer Expression aber auch einer möglichen Suppression vermutet. Um diese Veränderungen auch optisch darzustellen und genauere Informationen über die Proteinquantität jedes einzelnen Gels im Matchset zu erhalten, wurden im Teilprogramm „Reports“ alle Gele auf einer Übersichtsseite in Graphen (Histogramme) aufgeschlüsselt. Somit konnten Proteinveränderungen dargestellt werden. Das Programm ergab sowohl eine Auflistung über die supprimierten aber auch über die exprimierten

Proteine, die durch jeweilige Nummerierungen gekennzeichnet waren. Die Histogrammgraphen verwendete man, um einen schnelleren Vergleich und eine Übersicht der Proteinquantitäten jedes einzelnen Mitgliedes eines Matchsets zu gewährleisten. Als zusätzliche Option bot die PDQuest Software die Darstellungsform des „Scatter Plots“. Diese Graphen verdeutlichten die Beziehung bzw. Verwandtschaft von zwei Gelen. Jedes „gematchte“ Protein fand sich als Punkt auf einer Skala wieder. War die Quantität eines Proteins in beiden Gelen identisch, so lag sein Punkt auf der Gerade mit einer Neigung von 1.00 (45° line). Zusätzlich wurden Angaben über die Anzahl aller gematchten Proteine in beiden Gelen und dem Korrelations-Koeffizienten gemacht. Dieser ist ein Maß für die quantitative Gleichheit zweier Gele. Ein Zahlenwert von 1.00 spricht für einen großen Zusammenhang bezüglich ihrer Gleichheit, ein kleinerer Wert (Bsp. 0.40) gibt an, dass beide Gele weniger gleich sind. Um Angaben über Proteinfamilie und Proteinzusammensetzung zu erhalten, wurden die Matchsetdaten mit zusätzlichen Programmen, wie z.B. Photoshop bearbeitet und für die Analyse exportiert. In dieser Arbeit wurden die zu bestimmenden 2-D Gele von mir zur weiteren Bearbeitung der Protagen AG Dortmund zugeschickt. Die ausgewählten Proteine wurden mit einem Spot-Cutter aus den Gelen geschnitten. Für die Identifizierung müssen die in den Gelstücken enthaltenen Proteine verdaut und anschließend aus dem Gel extrahiert werden, um dann massenspektrometrisch bestimmt zu werden.

3.6.4. Identifizierung der Proteinspots

In dieser Arbeit wurden die als differentiell exprimiert eingestuft Proteinspots durch die Firma Protagen AG (Dortmund) identifiziert. Hierzu wurden die entsprechenden 2-D Gele der Protagen AG zugeschickt. Die ausgewählten Proteine wurden mit einem Spot-Cutter aus den Gelen geschnitten, tryptisch verdaut und anschließend aus dem Gel extrahiert, gemäß einer Standardprozedur der Protagen AG. Anschließend wurden die Peptidgrößen massenspektrometrisch (siehe 3.6.5. und 3.6.6.) bestimmt und hierüber die Peptidsequenz nach Datenbankabgleich identifiziert.

3.6.5. Massenspektrometrie

Ende der 80iger Jahre wurden zwei Ionisierungstechniken entwickelt, mit denen der Einsatz von massenspektrometrischen Verfahren für Biomoleküle ermöglicht wurde. 1988 wurde die „matrix-assisted laser desorption/ionisation“ (MALDI) Methode bekannt [Karas und

Hillenkamp, 1988]. Im selben Jahr wurde von John B. Fenn die Methode der „electrospray-ionisation“ (ESI) entwickelt [Fenn et. al., 1989]. Dabei handelt es sich um ein Ionisationsverfahren, bei dem die Erzeugung von Ionen unter Atmosphärendruck stattfindet. Sowohl diese Ionisierungstechnik, als auch die Modifizierung der Probenpräparation und spezieller Software, trugen zur weiteren Entwicklung bei. Massenspektrometer detektieren Ionen im gasförmigen Zustand. Somit werden Biomoleküle wie Proteine oder Peptide in einen gasförmigen Zustand gebracht [Bioanalytik, F.Lottspeich und H.Zorbas].

Bei der MALDI- Methode werden kleine Mengen an Proben oder Analysaten mit einer verhältnismäßig großen Menge an Matrixmolekülen in saurer Lösung vermischt. Als Matrix werden Verbindungen verwendet, die in der Lage sind Lichtenergie zu absorbieren.

Für die Messung wird ein Teil der Lösung auf Metallträger pipettiert. Nach Verflüchtigung des Lösungsmittels kristallisiert die Matrix mit den Analytmolekülen aus. Wird solch ein Kristall nun mit einem Laser bestrahlt, nehmen die Matrixmoleküle die Energie des Lasers auf und geben diese Energie an den Analyten weiter. Dieser Transfer bewirkt die Desorption und eine gleichzeitige Ionisation der Analytmoleküle, so dass einfach protonierte Ionen entstehen. Als Laserquelle wird zumeist ein Stickstoff-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm verwendet [Karas und Hillenkamp, 1988, Mann et. al., 2001]. Neben der Ionisation der Analyten ist die Massenanalyse ein wichtiger Bestandteil der Massenspektrometrie. Bislang wurden drei verschiedene Techniken entwickelt. Eine Methode beruht auf dem Prinzip der Massentrennung nach der Flugzeit (time-of-flight, TOF-MS). Bei den anderen Methoden erfolgt die Trennung durch ein mit Metallstäben erzeugtes elektrisches Quadrupolfeld (quadrupole MS) oder durch selektive Ausstoßung von Ionen aus einem Feld, das eine dreidimensionale Falle darstellt (ion trap MS). Mit der Messung einer Probe, die z.B. aus einem Proteingemisch besteht, können mit einem dieser Massenanalysatoren die Massen der Peptide aus der Probe ermittelt werden [Frauenhofer ITEM, Jahresbericht 2003]. Werden zwei Massenanalysatoren hintereinander geschaltet, kann man eine gezielte Sequenzierung der Peptide erreichen. Dieses Verfahren wird dann als Tandem MS bezeichnet. Es kann sowohl mit zwei gleichen, als auch mit zwei unterschiedlichen Analysatoren hintereinander geschaltet durchgeführt werden. Bevorzugt werden Verknüpfungen von MALDI mit einem TOF-Analysator und ESI mit dem Quadrupol oder dem Ion Trap Analysator. Ein TOF-Analysator trennt im Hochvakuum die Ionen in einem Flugrohr. Die desorbierten positiv geladenen Ionen werden zunächst durch eine Gegenelektrode angezogen und bewirken eine Beschleunigung der Ionen, bevor sie in das Flugrohr eintreten. Alle Ionen nehmen die gleiche kinetische Energie auf, bewegen sich aber wegen ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht

mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Somit treffen auf den Detektor zuerst kleine Ionen und zum Schluß die großen Ionen. Es existieren Geräte mit einfachem linearem Flugweg oder mit endständigen Reflektoren, welche die Ionen in eine andere Richtung lenken. Auf diese Weise wird der Flugweg verlängert und die Genauigkeit der Detektion verbessert [F.Lottspeich und H.Zorbas, Bioanalytik].

3.6.6. Molekulargewichtbestimmung mit MALDI

Die aus 2-DE Gelen zu analysierenden Proteine müssen entweder enzymatisch oder chemisch in Peptide gespalten werden (In-Gel-Verdau), damit es möglich wird, die Peptide aus der Gelmatrix zu extrahieren. Es entsteht ein Gemisch aus unterschiedlich langen Peptiden [Frauenhofer ITEM, Jahresbericht 2003]. Wird ein Protein mit einem bestimmten Enzym fragmentiert, erhält man mit dem Einsatz desselben Enzyms auch immer wieder die gleichen Fragmente. Ein solches Fragmentgemisch ist daher mit einem charakteristischen Fingerabdruck vergleichbar. Somit wird zur Identifizierung eines Proteins zuerst ein „peptide mass fingerprint“ (PMF) aufgenommen. Für die Proteinspaltung werden verschiedene Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Lys-C oder Asp-N verwendet. Diese Enzyme haben die Eigenschaft nur nach oder vor bestimmten Aminosäuren zu spalten. Trypsin spaltet zum Beispiel nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Das Enzym Asp-N spaltet die Peptidbindung vor Aspartaten. Eine chemische Fragmentierung kann durch Cyanbromid (CNBr) erreicht werden. CNBr spaltet Proteine nach der Aminosäure Methionin. Durch diese Enzymeigenschaft kann man ein Polypeptid immer wieder in dieselben Fragmente teilen. Nach der Fragmentierung werden die Peptide in Lösung gebracht und dieses Gemisch wird in eine für die Massenspektrometrie kompatible Lösung gebracht. Ohne weitere Fraktionierung erfolgt die Vermessung, so dass man ein Massenspektrum erhält, welches für dieses Protein einen charakteristischen Peptidmassen-Fingerabdruck liefert [Bio Spektrum, 2005].

Diese Spektren werden kalibriert und alle Peaks markiert. Die so erhaltene Peptidmassentabelle kann in verschiedene Suchprogramme eingegeben und über Proteindatenbanken identifiziert werden. Für meine Arbeit wurden die zuvor mittels Elektrophorese aufgetrennten Proteine mit PDQuest-Bearbeitungsprogramm erfasst, massenspektrometrisch bestimmt und durch die Protagen AG Dortmund analysiert. Es erfolgte die Bestimmung des individuellen Molekulargewichtes der einzelnen Proteine und deren Isoelektrischer Punkt (pI) [F.Lottspeich und H.Zorbas, Bioanalytik].

3.6.7. Proteindatenbanken

In Proteinsequenzdatenbanken werden alle Proteinsequenzen gesammelt, die zuvor auf DNS (Desoxyribonukleinsäure) Ebene untersucht wurden. Zwei dieser öffentlich und frei zugänglichen Datenbanken sind die NCBI- (National Center for Biotechnology Information) und die SwissProt-Datenbank. Sie beinhalten verschiedene Informationen über die eingetragenen Proteine, beispielsweise wie die Proteinsequenz, den Gennamen, den Genort und falls bekannt die Funktion. Bisher konnten Gene von unterschiedlichen Organismen analysiert werden. Jedoch sollte man beachten, dass die Sequenzierungen nicht immer fehlerfrei verlaufen. So spielt die Reinheit des Templates, die Qualität des Elektrophoresegels, die Sensitivität der Detektion und das Lesen des Gels eine entscheidende Rolle für die Richtigkeit der Sequenz. Wenn eine Wissenschaftlergruppe ein Gen oder ein Protein sequenziert, werden die aktuellen Daten in die Datenbank eingetragen. Diese Datenbanken können durchsucht und abgefragt werden. Eingegebene Sequenzen können mit allen Sequenzen der Datenbank verglichen werden und alle Proteine, die dabei das gleiche Sequenzstück beinhalten, werden angegeben. Bei PMF- Ergebnissen erhält man, nach dem Prinzip der höchsten Wahrscheinlichkeit, eine Liste von Massen, die einigen Peptiden des Proteins nach Trypsinspaltung entsprechen [F.Lottspeich und H.Zorbas, Bioanalytik].

3.7 Western Blotting

Um elektrophoretisch aufgetrennte immobilisierte Proteine mit spezifischen Antikörpern oder auch Enzymsubstraten direkt auf einer Membran nachzuweisen, verwendete man das Western Blotting.

3.7.1 Herstellung von Trenn- und Sammelgelen

Gelrezept für die Herstellung eines 12,5% Gels:

	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid-Lösung	4,16 ml	0,67 ml
Tris-SDS pH 8,8	2,50 ml	-
Tris-SDS pH 6,8	-	1,25 ml
10% SDS-Lösung	100 µl	50 µl
MilliQ-H ₂ O	3,17 ml	3 ml

APS 10%	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	4 µl
Endvolumen	10 ml	5 ml

- Tris-SDS, pH 8,8: 0,75 M Tris-HCl 118,2 g
2,0 g SDS
ad 1 l MilliQ-H₂O, pH 8,8 einstellen

- Tris-SDS, pH 6,8: 0,25 M Tris-HCl 39,4 g
2,0 g SDS
ad 1 l MilliQ-H₂O, pH 6,8 einstellen

- 10% APS: 1 g Ammoniumpersulfat mit MilliQ-H₂O ad 10 ml

Es wurde ein 12,5 %-iges SDS-Gel verwendet, um die Proteine mit hohem Molekulargewicht (>40-50 kD) zu erfassen. Die Komponenten des Trenngels wurden zusammenpipettiert und mit einer Mikrotiter-Spritze luftblasenfrei in die Gelkammer gefüllt. Um eine glatte Trennfläche zwischen den Gelen zu erhalten und eine Polymerisationshemmung durch Luftsauerstoff zu verhindern, wurde die Trenngel-Lösung mit 1 ml 100% Ethanol überschichtet. Das Sammelgel wurde nach Abhärtung des Trenngels ebenfalls langsam in die Gelkammer gespritzt. Dann konnte der Probenkamm eingefügt werden. Der Polymerisationsvorgang betrug etwa 30 bis 60 min.

3.7.2 Probenvorbereitung

Die Proteinlösung (je 20 µg) sowie das Markerprotein werden 1:1 mit dem Lysepuffer gemischt und 5 min bei 95°C im Thermoblock erhitzt und dann abzentrifugiert.

- Lysepuffer: 50 ml Tris-SDS, pH auf 6,8 einstellen
4g SDS
20 ml Glycerol
10 ml 2- Mercaptoethanol
500 µl Bromphenolblau
100 ml MilliQ-H₂O

3.7.3 Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese

Das Gel-Glas-Sandwich wurde in einer vertikalen Flachgelapparatur eingespannt, der Probenkamm entfernt und die beiden Pufferkammern mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Mit einer Mikrotiter-Spritze wurden 20 µg Proteinprobe bzw. Markerproteine (Amersham) in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten Bedingungen, bei 120 V benötigte die Auftrennung ca. 110 min. Die Trennung war beendet sobald die Lauffront den untersten Rand der Flachgelapparatur erreicht hatte.

3.7.4 Elektrophoretischer Proteintransfer

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenn- vom Sammelgel gelöst und fünfminütig im Kathodenpuffer inkubiert. Das Filterpapier und die Membranen wurden zugeschnitten. Die Transfereinheit wurde wie unten dargestellt, zwischen horizontalen Plattenelektroden aufgebaut, ohne dabei Luftblasen einzuschließen.

Kathode (oben)

3 Filter getränkt mit Kathodenpuffer

SDS-PAGE Gel

Transfermembran (mit Anodenpuffer II befeuchtet)

2 Filter getränkt mit Anodenpuffer II

2 Filter getränkt mit Anodenpuffer I

Anode (unten)

- **Kathodenpuffer:** Tris-HCl 3,94 g, Norleucin 5,24 g ad 1 l MilliQ-H₂O, pH 9,4 einstellen
- **Anodenpuffer II:** Tris-HCl 3,94 g, ad 1 l MilliQ-H₂O, pH 10,4 einstellen
- **Anodenpuffer I:** Tris-HCl 42,28 g, ad 1 l MilliQ-H₂O, pH 10,4 einstellen
- **Entfärberlösung:** 300 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l MilliQ-H₂O
- **Färbelösung:** 500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 1 Tbl. Phast Gel Blue R (Coomassie Blue R-350), ad 1 l MilliQ-H₂O

Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke (200 mA). Bei Raumtemperatur dauerte dieser etwa 60 min. Anschließend wurde das Gel fünfzehnminütig in der Färbelösung inkubiert und dann mit Entfärberlösung gewaschen.

Zur Markierung der Position der Referenzproteine wurde die Membran für etwa 3 min in 10 % Ponceau-S-Lösung (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) inkubiert, in MilliQ-H₂O gespült und die Markerproteine gekennzeichnet. Die Membranen lagerten über Nacht in Blockmilch: 5 % Magermilchpulver und 0,02% NaN₃ in PBS bei 4°C.

3.7.5 Immunochemische Detektion

Nachdem die Membranen 2x5 min in TTBS gewaschen wurden, inkubierte man sie für 30 min in 5% Magermilchpulver/ TBS (1 ml Serum+19 ml TBS). Die Membranen ruhten dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur in der Antikörperlösung I. Es schloss sich erneut ein Waschvorgang mit TTBS für 3x5 min an. In der Antikörperlösung II wurden die Membranen für 45 min bei Raumtemperatur belassen, um hinterher erneut 3x20 min mit TTBS gewaschen zu werden. In diesem Experiment wurden der Anti-Vimentin-/ Anti-Cytokeratin- Antikörper 1:500 und der Zweitantikörper Anti-Maus 1:5.000 verwendet. Sodann wurden die Membranen in der ECL-PLUS Detektionslösung (Amersham) zehnminütig inkubiert und in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt. Da die Belichtungszeiten sehr unterschiedlich sein können, müssen diese individuell ausgetestet werden.

- **TTBS:** Tween Tris Buffered Saline: 0,05% Tween+TBS (250 µl auf 500 ml)
- **TBS:** Tris-HCl 15,76 g + NaCl 8,77g ad 1 l MilliQ-H₂O, pH 7,5 einstellen

3.8 Materialien und Geräte

3.8.1 Chemikalien

Sigma	0.9 I.E. Endonuclease E-8263
	Dithiothreitol D-9779
	Jodoacetamide J-1149
	Sodium-Thiosulfat S-6672
	Urea U-6504
	CHAPS C-5849
	Tris-Base (Trishydroxymethylaminomethane $C_4H_4NO_3$) T-1503
	Tris-HCL T-3253
	SDS-Lauryl Sulfate (Sodium dodecyl sulfate) L-4509
	Sucrose (Saccharose) S-9378
	TEMED T-9281
	Acrylamid-Lsg. A-3699
	TBS (20 mM Tris, pH 7,3; 150 mM NaCl)
	TTBS (0,05% Tween+TBS)
	Ponceau- Lösung 10%
Riedel de Haën	Essigsäure min. 99,8% Analytic Reagent 33209
	Ethanol absolut für Analyse 32205
	Natriumcarbonat 31432
	Formaldehyd 37 Gew.% 15512
Merck	Silbernitrat 1.01510.0050
	Pefabloc (Pefabloc-SC(4-(2-Aminoethylbenzolsulfonyl-Flourid-hydrochloride) 1.24839
Roth	Natriumacetat Art. 6773.1
	Glycin Art. 3908.2
Amersham Bioscience	Ettan TM DALT Buffer Kit 17-6002-50
	100x Anode-Buffer 75 ml
	10x Cathode-Buffer 2x125 ml

Gel-Buffer 60 ml
Sealing-Solution 12x1 ml (Agarose+Bromphenol Blau)
Immobiline TM Dry Strip, pH 4-7, 24 cm
17-6002-46
Ettan TM DALT Gel 12.5 17-6002-50
ECL + Plus Western Blotting Detection System
RPN 2132

Pharmacia Biotech Pharmalyte 3-10 for IEF 17-0456-01
Dry Strip Cover Fluid Plus One (Mineralöl)

BIO RAD BIO RAD Protein Assay
2-Mercaptoethanol 161-0710

Uptima Interchim BSA-Standard for Protein Assay 2 mg/ ml

DAKO Cytokeratin Mouse Klon MNF 116 Code MO821

Medium (DMEMHAM'S F12)+Glutamin, Penicillin/ Streptomycin, FCF (Fetal calf serum)

3.8.2 Geräte

Amersham Bioscience Immobiline TM Dry Strip, pH 4-7, 24 cm
17-6002-46
Ettan TM DALT Gel 12.5 17-6002-36

Amersham Pharmacia IEF Electrode Strip (100 St.) 18-1004-40

Biotech Power Supply and Control Unit, Separation Unit
3025-609-0
Ettan Dalt II System 3025609-0
Hofer Automated Gel Stainer 3025607-0
IPG-phor 3023930-0
Glass Plates for Hofer Vertical Stab Gels SE 262P-5

HOEFER	Mighty Slim SX 250 Power Supply Dual Gel Caster Mighty Smal SE 245
BIO RAD	Imaging Densitometer GS-700
Varifuge	Zentrifuge 3.ORS
Heraus Instruments	Biofuge Fresco 3018547-0 Biofuge 28 RS Brutschrank Arbeitsbench Tiefkühlschrank -80°C
Liebherr Glasline	Kühlschrank -36°C Kühlschrank -20°C
Sartorius Research	Analysenwaage
Leica	Mikroskop MPS 32
Kobe Laborbedarf	Millipore Anlage Wasserbad
Greiner Labortechnik	Multiwell Zellkultur Platten
MWG Biotech	ELISA Reader
Weiteres	Skalpelle, Pinzetten, Rasiermesser + Klingen Pipetten, Pipettus, Glaspipetten, Stopfen Petrieschalen für Zellkultur, Falcontubes Potter, Vortex, Zellabschaber, Absaugpumpe Eppendorfcups

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der Proteinexpression bei Hypoosmolarer Lösung

In meiner Arbeit wurden Epithelzellen des m-TAL-Abschnitts der Nephronen Zellen aus Schweinenieren gewonnen, unter Kontroll- und hypoosmolaren Bedingungen kultiviert und aufgearbeitet. Es wurden SDS-Gele jeweils mit 400 µg Gesamtprotein beladen und durch die Silberfärbung visualisiert. Mit dem PDQuest-Bearbeitungsprogramm wurde der paarweise Vergleich der aufgetrennten Proteine durchgeführt. Abweichungen zwischen den Proteinmustern der Kontroll- und der behandelten Gruppe wurden optisch erfasst. Durch das Bearbeitungsprogramm und die Analyse durch die Protagen AG Dortmund, wurde das individuelle Molekulargewicht der einzelnen Proteine und deren Isoelektrische Punkt (pI) bestimmt. Mit Hilfe dieser Daten erfolgte, wie in Abbildung 4 und 5 gezeigt, die Proteinidentifizierung. Besonders die Proteine Vimentin (Protein 1 mit 44,5 kDa; pI 4,7) und Cytokeratin 8 (Protein 2 mit 42,4 kDa; pI 5,1) zeigten unter der Behandlung mit hypoosmolarer Lösung eine Intensitätsveränderung angegeben in ppm: parts per million (ODxFläche).

Abb.4 Protein 1- Vimentin Identifizierung des Proteins- Vimentin mit Peptide-Mass-Fingerprint (Protagen AG)

Protein Properties			
Mw - seq.	44.5 kDa	pI - seq.	4.7
Mw - gel	75.0 kDa	pI - gel	5.0
Sequence coverage	226 / 380 aa (59.5 %)		

Alias Proteins			
Proteins with identical sequence:			
Accession	Source DB	Reference	Name
gi 860908	emb	CAA60679	vimentin <i>Cricetulus griseus</i>

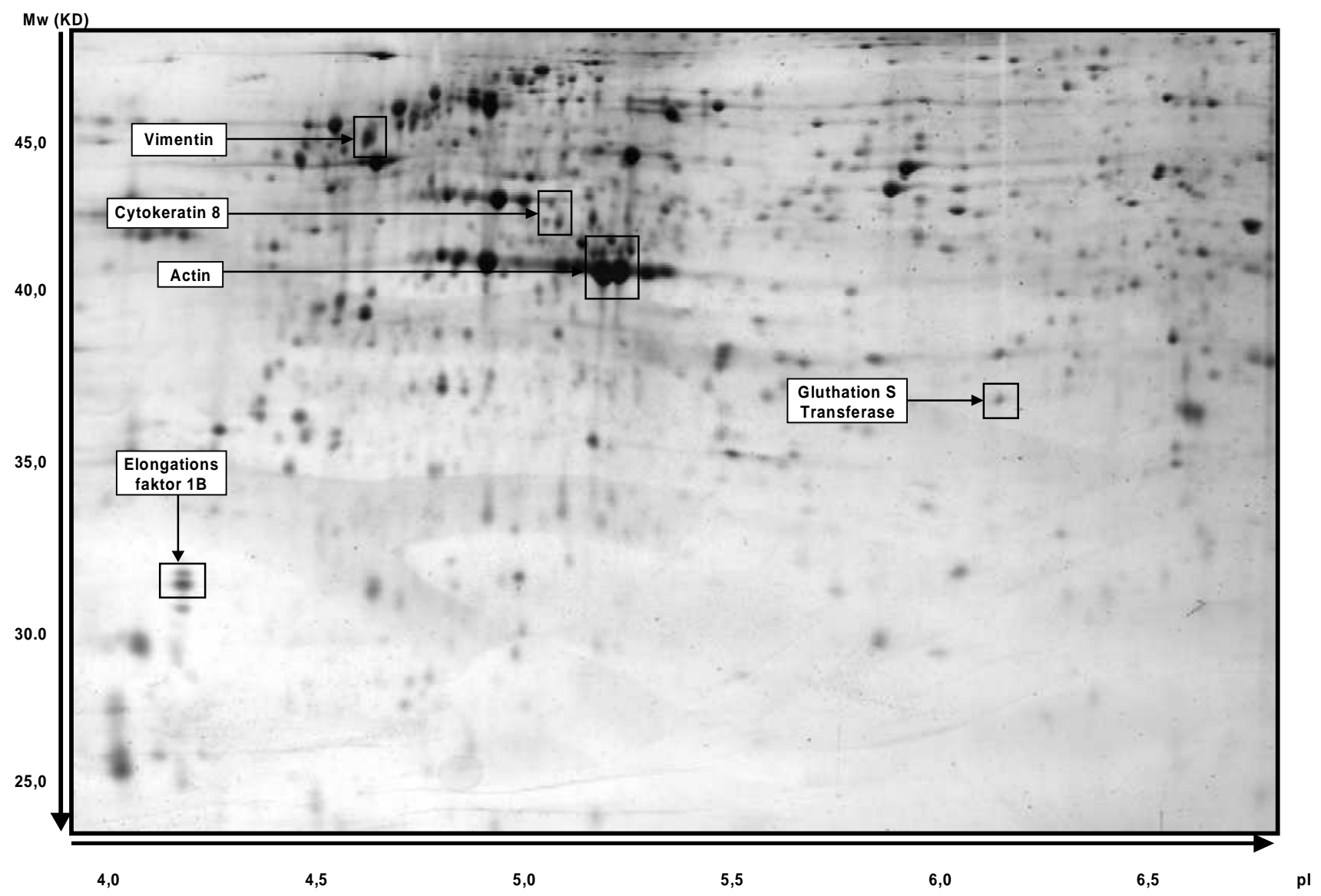
Abb.5 Protein 2- Cytokeratin 8 Identifizierung des Proteins- Cytokeratin 8 mit Peptide-Mass-Fingerprint (Protagen AG)

Protein Properties			
Mw - seq.	42.4 kDa	pI - seq.	5.1
Mw - gel	70.0 kDa	pI - gel	5.2
Sequence coverage	191 / 370 aa (51.6 %)		

Alias Proteins			
Proteins with identical sequence:			
Accession	Source DB	Reference	Name
g 125109	sp	P05786	K2C8_BOVIN Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8) (Cytokeratin A)
g 163245	gb	AAA30598	type II cytotkeratin A (no.8)
g 481	emb	CAA31370	cytotkeratin 8 (370 AA) Bos taurus
g 89631	pir	A25004	A25004 keratin, 53K type II cytoskeletal - bovine (fragment)

Wie in Abbildung 5 verdeutlicht, wurden durch die Proteinanalyse der Protagen AG Dortmund verschiedene Proteine mit identischen Sequenzen gefunden, die jedoch alle dem Cytokeratin des Rindes zugeordnet werden konnten. Die oben genannten Proteinveränderungen sind in der Abbildung 6 dargestellt. Auf diesem Originalgel der behandelten Gruppe, finden sich verschiedene Proteine, die zum einen vermehrt exprimiert wurden, zum anderen finden sich Proteine, wie Actin (42 MW, 5,2 pI), Elongationsfaktor (32 MW, 4,3 pI), Gluthation S Transferase (25 MW, 5,5 pI), die als Markerproteine dienen.

2-D Page Hypoosmolare Lösung Abb. 6



4.1.1 Densitometrische Auswertung

Zum Vergleich der jeweiligen Proteinquantitäten wurden durch das PDQuest Bearbeitungsprogramm Histogrammgraphen erstellt. Im Diagramm der Abbildung 7 ist die durchschnittliche Quantität von 6 Probenpaaren (6 Kontroll- und 6 mit hypoosmolarer Lösung behandelte Gruppen) aufgezeigt, dabei ist der quantitative Unterschied beider Gruppen ersichtlich. Verglichen mit der Kontrollgruppe fand sich in der behandelten Gruppe eine Zunahme der Proteinintensität um das 12fache von 630 ppm auf 7800 ppm. Diese deutlichen Intensitätsunterschiede der Proteine wurden nicht bei jedem Protein in der behandelten Gruppe vorgefunden. Im Allgemeinen zeigten die behandelten Zellen keine ausgeprägten Modifikationen des Proteoms, obwohl vermutet wurde, dass zahlreiche Proteine in ihrer Expression beeinflusst wurden.

Abb.7 Vergleich der durchschnittlichen Proteinquantität von je 6 Probenpaaren

(6 Kontroll- und 6 mit hypoosmolarer Lösung behandelte Gruppen) Im Unterschied zur Kontrollgruppe fand sich in der behandelten Gruppe eine Zunahme der Proteinintensität um das 12fache von 630 ppm auf 7800 ppm.

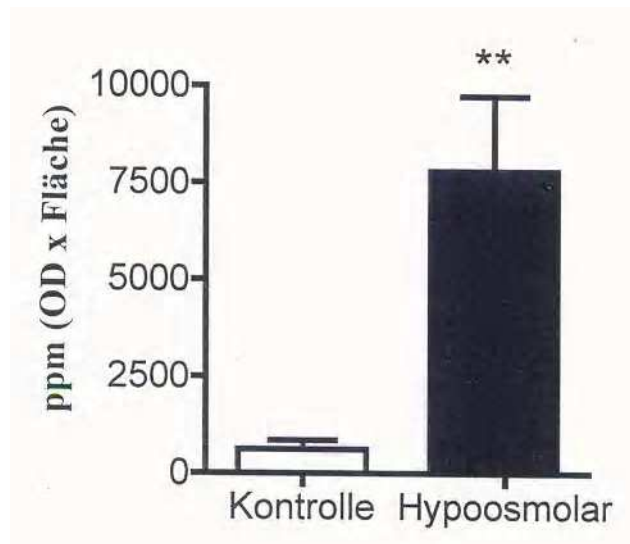


Abb.8 Vergleich der durchschnittlichen Proteinquantität von je 5 Probenpaaren

(5 Kontroll- und 5 mit hypoosmolarer Lösung behandelte Gruppen) Im Unterschied zur Kontrollgruppe fand sich in der behandelten Gruppe eine Zunahme der Proteinintensität um das Doppelte von 905 ppm auf 2.051 ppm.

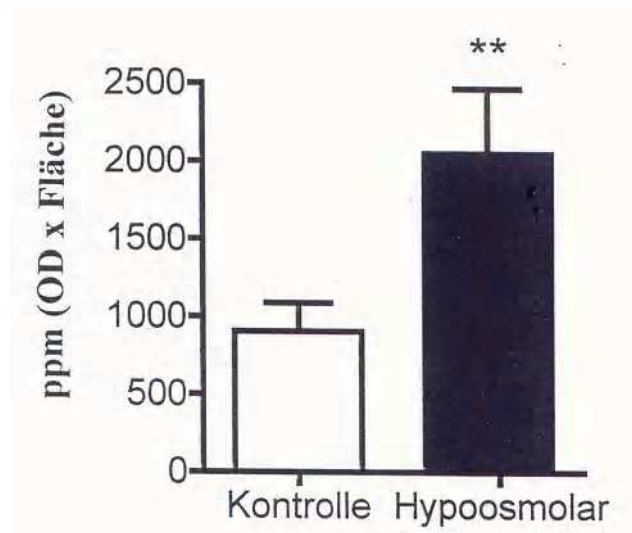


Abbildung 8 fasst die durchschnittliche Quantität des Cytokeratin 8 von 5 Probenpaaren (5 Kontroll- und 5 mit hypoosmolarer Lösung behandelte Gruppen) zusammen.

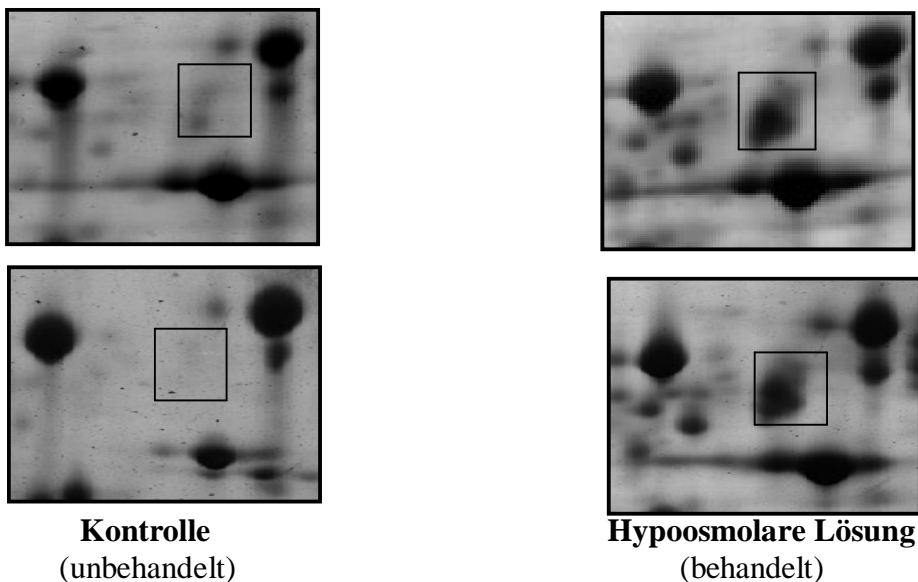
Wie dem Diagramm zu entnehmen ist, kommt es zur Quantitätssteigerung in der behandelten Probe. Die Werte der Kontroll- und der behandelten Gruppe des CK 8 zeigen im Vergleich zu denen des Vimentins, weniger auffällige Differenzen. Es ergaben sich Durchschnittswerte der Kontrollgruppe von 905 ppm und Werte von 2.051 ppm in der behandelten Gruppe. Im Vergleich Kontroll- mit behandelter Gruppe kann eine Verdopplung der Proteinintensität aufgezeigt werden. Weshalb diese deutlichen Unterschiede bezüglich der Proteinexpression zwischen Vimentin (12fache Zunahme) und Cytokeratin 8 (Verdopplung) festzustellen sind, ist noch ungeklärt. Zu erkennen ist, dass die Proteine Vimentin und Cytokeratin 8 auch in der Kontrollgruppe vorzufinden waren, jedoch durch die Behandlung mit hypoosmolarer Lösung vermehrt exprimiert wurden. Somit wird angenommen, dass die hypoosmolare Lösung zur Modifikation in der Proteinexpression führte. Die beiden vergrößerten Ausschnitte in Abbildung 9 und 10 zeigen vier Detailansichten aus Originalgelen und sollen diese Modifikationen verdeutlichen. Die mit Rahmen versehenen Proteine verdeutlichen die Proteinexpression der behandelten Gruppe, im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Beide Proteine wurden durch den jeweiligen Peptide-Mass-Fingerprint mit MALDI-TOF-MS: „Matrix-Assisted-Laser- Desorption/ Ionisation“ und durch die Massentrennung nach der Flugzeit

(Time of Flight) analysiert und als die Proteine Vimentin (Protein 1) und Cytokeratin 8 (Protein 2) identifiziert. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Intermediäre Filamente, die wesentliche Bestandteile des Zytoskeletts sind [Geisler et. al., 1983].

Diese Ergebnisse sind durch ein zweites Verfahren, dem Antikörpernachweis von Vimentin und Cytokeratin 8 durch Western Blot, bestätigt wurden. Das Protein Vimentin, das nur in mesenchymalen Zellen nach der Geburt gebildet wird, zeigt ein erneutes Auftreten in epithelialen Zellen in vivo unter pathologisch veränderten Konditionen und in vitro angelegten Primärkulturen [Bachmann et. al., 1983]. Eine Expression von Vimentin ergibt sich immer dann, wenn epitheliale Zellen ihre räumliche Organisation verloren haben und ihre mitotische Aktivität gesteigert ist, beispielsweise während Reparationsvorgängen nach Nierenzellschädigungen [Runembert et. al., 2001]. Das Cytokeratin 8 stellt eine Komponente von Desmosomen dar, die als Zellverbindungen die Stabilität und Erhalt der Zellen, sowohl bei mechanischen als auch osmotischen Stresseinflüssen sichern sollen [Mark Xu et. al., 2001]. Die Ergebnisse des Experimentes lassen sich durch den studentischen t-Test als signifikant bezeichnen. Eine Signifikanz der Änderung in der Vimentinexpression zeigt sich mit einem p-Wert von 0.0043 und die der Cytokeratin 8-Expression durch einen Wert von 0.0022.

4.1.2 Intensitätszunahme bei Vimentin und Cytokeratin 8

Abb.9



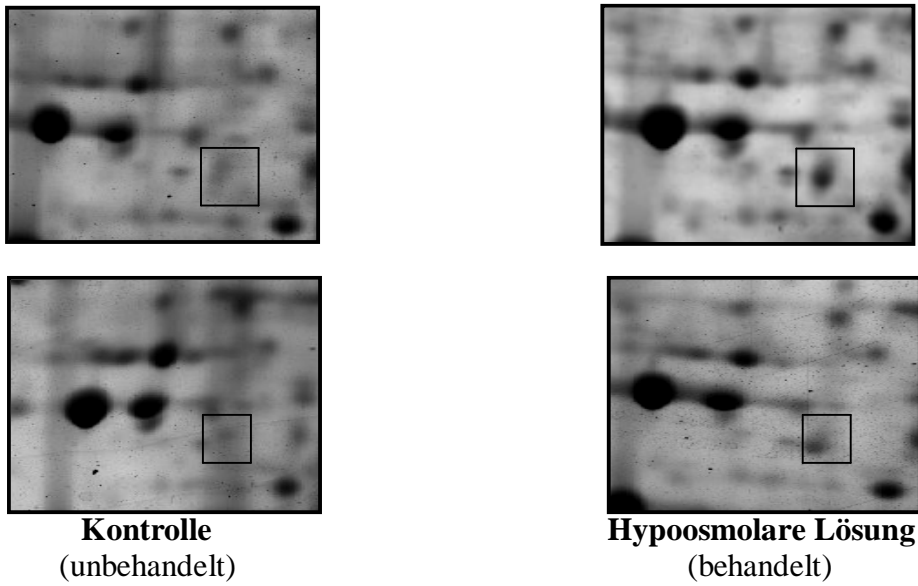
Protein 1: Vimentin

Vergrößerter Ausschnitt von je zwei von insgesamt 6 Originalgelen

Links: Protein 1 in der Kontrollgruppe (Kontrollprobe)

Rechts: Vermehrte Expression des Protein 1 in der mit hypoosmolarer Lösung behandelten Proben.

Abb.10



Protein 2: Cytokeratin 8

Vergößerter Ausschnitt von je zwei von insgesamt 5 Originalgelen

Links: Protein 2 in der Kontrollgruppe (Kontrollprobe)

Rechts: Vermehrte Expression des Protein 2 in der mit hypoosmolarer Lösung behandelten Proben

4.2 Analysen durch MALDI

Abb.11 Bestimmung von Molekulargewicht und Isolelektrischen Punkt der Proteine Vimentin und Cytokeratin 8 durch MALDI

Protein	MW- Sequenz	PI- Sequenz	Sequenz - Abdeckung	Intensität - Abdeckung
Vimentin-				
Cricetulus griseus	44,5 kD	4,7	59,5 %	58,5 %
Cytokeratin 8				
Bos taurus	42,4 kD	5,1	51,6 %	43,2 %

MW=Molekulargewicht

PI =Isolelektrischer Punkt

Cricetulus griseus=Hamster

Bos taurus =Rind

Durch die Bestimmung von Molekulargewicht und des speziellen Isoelektrischen Punkts der einzelnen Proteine, erfolgte die Analyse der Proteine Vimentin und Cytokeratin 8 mit MALDI (Matrix-Assisted-Laser- Desorption/ Ionisation).

4.2.1 Proteinsequenz Vimentin -Cricetulus griseus (Hamster)

Abb.12 Proteinsequenz für Vimentin der Spezies Cricetulus griseus Die Proteinsequenz wurde der Nukleotiddatenbank entnommen (Acession Number:gi/860908).

Protein Sequence (380 aa)					
10	20	30	40	50	
SLADACNTEF	KNTRTNEKVE	LQELNDRFAN	YIDKVRPLEQ	QNKILLAELE	
60	70	80	90	100	
QLKGQKSR	LDLYEEEMRE	LRRQVDQLTN	DKARVEVERD	NLAEDIMRLR	
110	120	130	140	150	
EKLQEEMLQR	EEAESTLQSF	RQVDNASTLA	RLDLERKVES	LQEEIAFLKK	
160	170	180	190	200	
LHDEEIQLQ	AQIQEQHVQI	DVDVSKPDLT	AALRDVRQQY	ESVAAKNLQE	
210	220	230	240	250	
AEEWYKSKFA	DLSEAAANRNN	DALRQAKQES	NEYRROVQSL	TCEVDALKGT	
260	270	280	290	300	
NESLERQMR	MEENFALEAA	NYQDTIGRLQ	DEIQNMKEEM	ARHLREYQDL	
310	320	330	340	350	
LNVKMALDIE	IATYRKLEEG	EESRISLPLP	NFSSLNLR	ETNLESPLVD	
360	370				
HSKRTLLIKT	VETRDGQVIN	ETSQHDDLE			

Über die Peptide-Mass-Fingerprint-(PMF) Messung erhielt man eine mit der Vimentin-Sequenz des Hamsters CAA60679 (gi/ 860908) übereinstimmende Sequenzabdeckung. Dabei ergab sich ein Molekulargewicht von 44.5 kD und ein pI von 4.7 (Abbildung 11). Wie in Abbildung 12 verdeutlicht, wurden von 380 Aminosäuren 226 zugeordnet, somit besteht eine Übereinstimmung von 59,5 %. Die folgenden Sequenz-Abschnitte konnten durch den PMF eindeutig identifiziert werden und sind in Abbildung 12 und 13 dunkel hervorgehoben.

TNEKVELQELNDR
VELQELNDR
LDLYEEEMR
EEAESTLQSF
NLQEAEEWYK
FADLSEANR
FADLSEAAANRNDALR
LLEGEESR
ISLPLPNFSSLNLR

Für meine Arbeit wurden ausschließlich Schweinenieren präpariert, so dass eine Kontamination mit Hamstergewebe im Verlauf des Experimentes ausgeschlossen werden kann.

Aus diesem Grund erfolgte der Vergleich von Vimentin des Schweins (*Sus scrofa*) und des Hamsters (*Cricetulus griseus*) mit Einträgen der NCBI-Datenbank. Die Aminosäuresequenz des Schweins wurde erstmalig von Geisler und Weber 1992 beschrieben [Geisler N. et. al., 1992]. In diesem Zusammenhang stellte er Überlappungen mit Sequenzbereichen des Hamster-Vimentins fest. Jedoch ergaben sich Unterschiede sowohl in der Proteinlänge, als auch in einigen Bereichen ihres Sequenzmusters. Das Hamster-Vimentin besitzt 380 Aminosäuren, wohingegen das Schwein 273 aufweist. Um die Variabilität der Struktur des Vimentins in anderen Organismen zu untersuchen, wurden wie in Abbildung 13 gezeigt, die Überlagerungen von Vimentin des Hamsters, des Menschen, der Hausmaus und des Schweins durchgeführt. Festzustellen ist, dass die Hausmaus mit 446 über die längste und das Schwein mit 273 über die kürzeste Aminosäuresequenz verfügt. Hamster und Hausmaus lassen, abgesehen von ihrer unterschiedlichen Aminosäureanzahl, eine nahezu identische Abfolge erkennen.

4.2.2 Proteinsequenz Cytokeratin 8 -Bos taurus

Abb.14 Proteinsequenz für Cytokeratin-8 der Spezies Bos taurus Die Proteinsequenz wurde der NCBI Nukleotiddatenbank entnommen (Accession Number:gi/125109).

Protein Sequence (370 aa)				
10	20	30	40	50
FASFIDKVRH	LEQQNKVLET	KWNLLQQQKT	ARSNIDNMFE	SYINNLRRL
60	70	80	90	100
ETLAQEKLKL	EVELGNMQGL	VEDFKTKYED	EIQKRTDMEN	EFVVIKKDVD
110	120	130	140	150
EAYMNKVELE	SRLEGLTDEI	NFYRQLYEEE	IREMQSQISD	TSVVLSDMNN
160	170	180	190	200
RNLDDLGIIA	EVKAQYEEIA	NRSRAEAEAM	YQIKYEELQT	LAGKHGDDLRL
210	220	230	240	250
RTKTEISEMN	RNINRLQAEI	EGLKGRASL	EAAIADAEQR	GEMAVKDAQA
260	270	280	290	300
KLARLEAALR	NAKQDMARQL	REYQELMNVK	LALDVEIATY	RKLLEGEESR
310	320	330	340	350
LESGMQNMSI	HTKTTSGYAG	GLTSSYGTPG	FNYSLSPGSF	SRTSSKPVVV
360				
KKIETRDGKL	VSESSDVLSK			

In dieser Probe konnte durch die PMF Übereinstimmung das K2C8 BOVIN Keratin, type II cytoskeletal 8- Cytokeratin 8 (CK A) P05786 (gi/ 125109) gefunden werden. Dieses Protein besitzt, wie in Abbildung 11 aufgelistet, ein MW von 42.4 kD und einen pI bei 5.1. Von 370 Aminosäuren konnten 191 zugeordnet werden, somit besteht eine Übereinstimmung von 51,6 %. Diese 191 Aminosäuren sind in Abbildung 14 und 15 aufgeführt. Folgende Sequenzabdeckungen konnten dabei eindeutig identifiziert werden und sind daher in Abbildung 14 und 15 dunkler hervorgehoben.

FASFIDK
LEGLTDEINFYR
QLEEEIR
AQYEEIANR
ASLEAAIADAEQR

Abb.15 Vergleich der Proteinsequenz des Cytokeratin 8 der Spezies *Bos taurus* und *Homo sapiens* Die Proteinsequenzen wurden der NCBI Nukleotiddatenbank entnommen.



Sequenz 1: gi/125109	Cytokeratin 8 (<i>Bos taurus</i>)	370 aa
Sequenz 2: gi/37555893	Cytokeratin 8 (<i>Homo sapiens</i>)	482 aa

Durch MALDI konnte CK 8 mit bovinen Ursprung identifiziert werden und es wurde versucht ein Zusammenhang zum Cytokeratin 8 des Schweins herzustellen. Die Suche in den Datenbanken ergab, dass Einträge über das Cytokeratin 8 des Schweins nicht zur Verfügung stehen und somit die Auswertung der Ergebnisse nur unvollständig durchführbar war. Der Vergleich der CK 8 Aminosäuresequenz des Schweins und des Rindes konnte aus diesem Grund nicht erfolgen. Wie in Abbildung 15 dargestellt, soll durch Sequenzvergleich die Kontamination durch humanes Material während des Experiments ausgeschlossen werden.

4.3 Nachweis von Vimentin und Cytokeratin 8 im Western Blot

Durch die massenspektrometrischen Analysen konnten sowohl der pI als auch das Molekulargewicht des Vimentins und des Cytokeratin 8 angegeben werden. Für den Western Blot wurde der Versuch mit jeweils zwei verschiedenen Probenpaaren durchgeführt, wobei eine Gesamtproteinmenge von 20 µg eingesetzt wurde. Man erkennt in Abbildung 16 und 17, dass ähnlich wie in den 2-D Gelen, Unterschiede zwischen der Kontroll- und behandelten Gruppe vorliegen, besonders im Bereich von 40- 45 kD lassen sich relevante Veränderungen aufzeigen. Durch die Suche in Datenbanken ließ sich feststellen, dass sich das Protein Vimentin in einem Bereich von 44.5 kD befindet. Wie in Abbildung 16 dargestellt, erkennt man in der behandelten Gruppe eine Intensitätszunahme der untersten Bande bei ca. 44 kD, die Vimentin zugeordnet wurde. Die außerhalb des Vimentin- spezifischen Bereiches liegende Bande (50-80 kD), zeigte ebenfalls eine Reaktion auf den Vimentin-Antikörper. Möglicherweise handelt es sich um ein unspezifisches Binden des zweiten Antikörpers, jedoch kann es sich auch um eine Vimentin-Isoform handeln. Weiterführende Untersuchungen müssten dies klären. Die Abbildung 17 verdeutlicht bei 42.4 kD eine Intensitätszunahme der Proteine in den behandelten Gruppen. Das im Western Blot aufgetrennte Cytokeratin 8 befindet sich in diesem Bereich und so wurde die unterste Bande dem Cytokeratin 8 zugeordnet. Gleichzeitig ließ sich eine zusätzliche Bande bei ca. 55 kD feststellen. Da die Aminosäuresequenz des CK 8 des Schweins noch nicht bekannt ist, konnte keine vollständige Analyse erfolgen. Durch den eingesetzten Antikörper wurde möglicherweise eine zusätzliche Bande erkannt, jedoch können auch Cytokeratin-Isoformen in den Proben vorhanden gewesen sein.

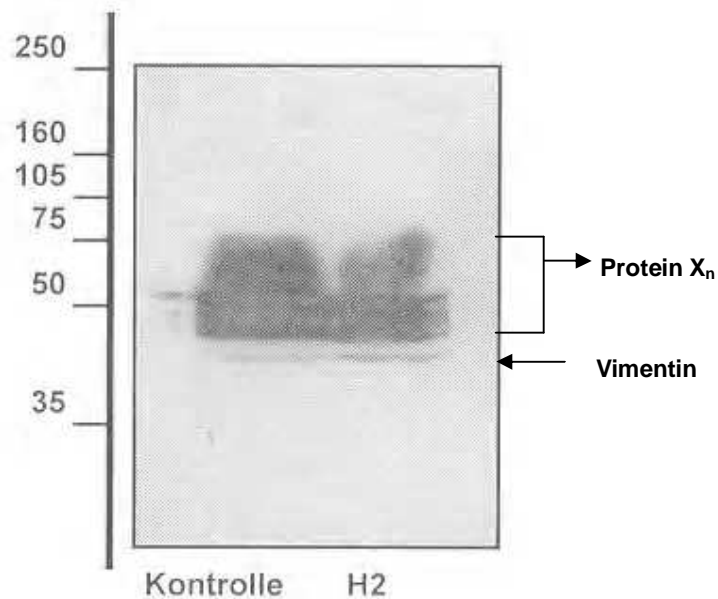


Abb.16 Westernblotanalyse für Vimentin (Protein-1) Solubilisierte Proteine aus Nierenepithelzellen des Schweins wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Membrantransfer mit einem Antikörper gerichtet gegen Vimentin inkubiert. Vimentin weist ein Molekulargewicht von 44,5 kD auf. In der behandelten Probe (H2) zeigt sich eine Intensitätszunahme, im Bereich von 44,5 kD. Proteine >44,5 kD konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

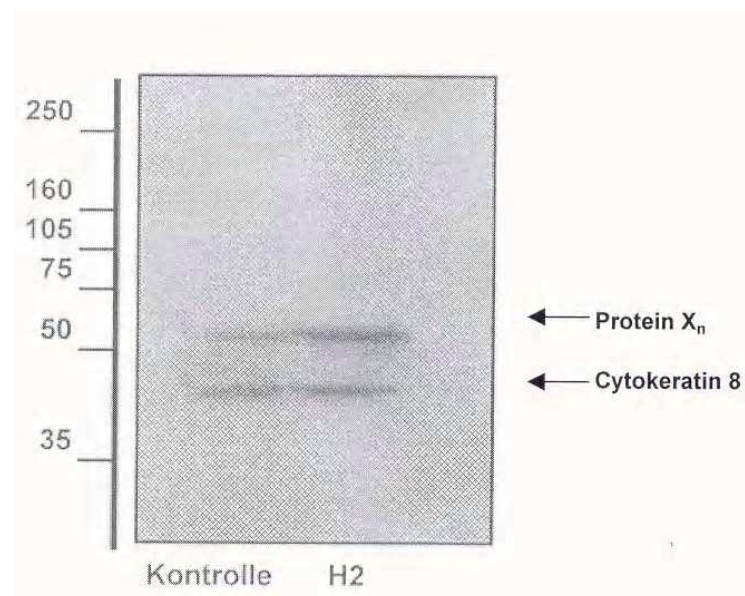


Abb.17 Westernblotanalyse für Cytokeratin 8 (Protein-2) Solubilisierte Proteine aus Nierenepithelzellen des Schweins wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Membrantransfer mit einem Antikörper gerichtet gegen Cytokeratin inkubiert. Cytokeratin 8 weist ein Molekulargewicht von 42 kD auf. In der behandelten Probe (H2) zeigt sich eine Intensitätszunahme, im Bereich von 42 kD. Proteine >42,4 kD konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisse Massenspektrometrie

5.1.1 Vimentin

Durch den Peptide-Mass-Fingerprint (PMF) war es möglich die Proteine Vimentin und Cytokeratin zu identifizieren. Somit wurde zum einen dem Protein 1 die Vimentinsequenz des Hamsters zugeordnet, zum anderen wurde das Protein 2 als bovines Cytokeratin 8 analysiert. Vimentin zeigte bei 226/380 Aminosäuren eine Sequenzabdeckung von 59,9 % und Cytokeratin 8 bei 191/370 Aminosäuren eine Übereinstimmung von 51,6 %. Wie oben erwähnt, ergab die Proteinidentifizierung eine Sequenz, die dem des Hamstervimentins entspricht, obwohl im Experiment Schweinezellen verwendet wurden. Eine Kontamination mit Hamsterzellen kann dabei ausgeschlossen werden. Um das Analyseergebnis zu erklären, wurde die Vimentinsequenz mehrerer Spezies verglichen. Dabei ließen sich Abweichungen beim Schwein gegenüber den anderen Organismen finden. Die Vimentinsequenz der Maus war die längste unter den verglichenen Sequenzen verschiedener Spezies, deshalb wurden alle anderen ihr angeglichen. Ab der 93. Aminosäure der Mausequenz fand sich eine annähernd gleiche Abfolge beim Mensch, Hamster und Maus, wohingegen die Sequenz des Schweins erst ab der Aminosäure 173 begann. Für alle vier Organismen ließen sich ab der 270. Aminosäure Gemeinsamkeiten feststellen. Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit zwischen dem Hamster und der Hausmaus fand sich eine fast identische Abfolge der Vimentinsequenz. Unterschiede ergaben sich nur in ihrer Länge: die Hausmaus besitzt 446 und der Hamster 380 Aminosäuren. Beim weiteren Vergleich zeigten sich relevante Übereinstimmungen der Sequenz vom Hamster und des Menschen. Obwohl versucht wurde eine Kontamination durch den Experimentator während des Experimentes so gering wie möglich zu halten, kann sie jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Aminosäuren, die durch PMF eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden mit dem Muster des Menschen verglichen. Dabei konnten Unterschiede in den Sequenzen festgestellt werden. Wie die Ergebnisse verdeutlichen, lässt sich die durch PMF gefundene Sequenz der Aminosäuren 81 bis 93 nicht mit der des humanen Vimentins abdecken (Abbildung 13). Aufgrund der Längendifferenz des menschlichen Vimentins begann die Abfolge erst ab der 93. Aminosäure. Dieser Vergleich wurde mit der vollständigen Sequenz des Menschen durchgeführt, so dass man annehmen kann, dass dieses Segment beim Menschen nicht vorkommt.

Weiterhin fanden sich, wie in Abbildung 13 aufgezeigt, Abweichungen von 2 Aminosäuren der Position 297 und 318 zwischen Maus und Mensch, die jedoch mit der Sequenz des Schweins übereinstimmen. Da das Schwein mit 273 Aminosäuren die kürzeste Abfolge aller verglichenen Organismen aufwies, ließ sich auch hier keine Abdeckung der Bereiche 81 bis 93 vorfinden. Wie in Abbildung 12 verdeutlicht, wurde diese Region zwar durch den PMF eindeutig erkannt, jedoch konnte sie weder beim Schwein noch beim Menschen festgestellt werden. Daher wird vermutet, dass es sich um eine Vimentin-Isoform des Schweins handelt, die in dieser Studie erstmals gefunden wurde. Das Schwein zeigt zwar erst ab der Aminosäure 272 die größte Gemeinsamkeit im Vergleich mit den anderen Organismen aber die Übereinstimmung der Aminosäure 297 und 318 sprechen für eine genetische Zuordnung. Zu bedenken ist, dass durch den PMF von 380 nur 226 Aminosäuren dem Vimentin des Hamsters zugeordnet werden konnten und sich somit die restlichen 154 Aminosäuren von der Sequenz des Hamsters unterschieden. Es wird vermutet, dass es sich deshalb bei der gefundenen Sequenz, um eine noch unentdeckte Isoform des Vimentins des Schweins handelt. In der Literatur sind momentan keine Angaben über Schwein-Vimentin-Isoformen zu finden. Möglicherweise handelt es sich auch um ein Protein, das zwar Ähnlichkeit mit der Vimentin-Struktur aufweist aber einer anderen Proteinfamilie angehört.

5.1.2 Cytokeratin 8

Als weiteres Analyseergebnis wurde durch PMF das bovine Cytokeratin (CK) 8 bestimmt. Als Zellmaterial wurden, wie oben erwähnt, Schweinezellen verwendet. Durch Recherchen sollte ein Vergleich der CK 8 Sequenz des Rindes und der des Schweins erfolgen. Da die verfügbaren Datenbanken die Abfolge der Schweinesequenz nicht beinhalteten, konnte dieser Vergleich nicht durchgeführt werden. Zusätzliche Literaturangaben [Margin et. al., 1986], beschreiben eine Homologie zwischen dem bovinen und dem humanen CK 8, so dass es nun auszuschließen galt, dass es sich bei dem Analyseergebnis um Folgen menschlicher Kontamination handelt. Aus diesem Grund wurde die durch PMF angegebene Sequenz mit der des Menschen verglichen und wie in der Abbildung 10 verdeutlicht, relevante Unterschiede gefunden. Zum einen ist die humane Abfolge mit 482 Aminosäuren länger als die des Rindes mit 370, zum anderen lassen sich Abweichungen bei verschiedenen Aminosäuren feststellen. Beim Vergleich der menschlichen mit der bovinen Sequenz fanden sich keine Übereinstimmung der Aminosäuren der Position 124, 136, 177, 184, 188, 195, 224, 269, 280, 421, 422 und 446.

Daher wird angezweifelt, dass menschliches Cytokeratin 8 die Proben kontaminiert hat. Jedoch muss bedacht werden, dass im Experiment notwendigerweise mit bovinen Medien gearbeitet wurde und aus diesem Grund mögliche Einflüsse auf das Ergebnis nicht ausgeschlossen werden können. Sowohl die behandelten Proben, als auch die Kontrollgruppen wurden mit bovinem Medium behandelt, wie aber in Abbildung 8 verdeutlicht, fand sich bei den behandelten Proben eine verstärkte Proteinexpression. Somit wird angenommen, dass diese Proteinveränderung nicht durch die Behandlung der Zellen mit bovinem Medium verursacht wurde. Da das CK 8 Muster des Schweins in den Datenbanken nicht verfügbar war, konnten keine definitiven und gesicherten Aussagen über seine Struktur oder Besonderheiten gemacht werden. So ist es möglich, dass es sich bei der gefundenen Sequenz um das Cytokeratin 8 des Schweins handelt. Jedoch kann man sagen, dass sich auch Übereinstimmungen mit der Sequenz des Menschen und der des Rindes feststellen ließen (Abdeckung 51,6%, siehe Abbildung 5). Im Experiment konnte der Einfluss von hypoosmolarer Lösung auf das Expressionsmuster von m-TAL Zellen des Schweins belegt werden. Ob es sich bei diesen Modifikationen um Isoformen bekannter oder um unentdeckte Sequenzen handelt, ist unklar.

5.2 Auswertung Western Blot

5.2.1 Vimentin

Mit Hilfe einer zweiten Methode wurde das Analyseergebnis bestätigt. Wie in Abbildung 16 und 17 dargestellt, wurde für Kontroll- und behandelte Gruppe ein Marker verwendet, wodurch man das entsprechende Molekulargewicht der Proteine ablesen kann. Dies war zuvor durch den Peptide-Mass-Fingerprint mit MALDI bestimmt wurden. Wie oben erwähnt, fanden sich sowohl in den Kontroll- als auch in den behandelten Proben, die Proteine Vimentin und Cytokeratin 8. Durch den Western Blot war es möglich eine Intensitätszunahme, in den behandelten Proben nachzuweisen. Vimentin besitzt ein MW von 44,5 kD wie in Abbildung 16 dargestellt. Man erkennt Veränderungen in der behandelten Gruppe bei diesem MW, somit kann man annehmen, dass es sich bei der untersten Bande um Vimentin handelt. Es fällt auf, dass außerhalb dieses Bereiches, bei 50-80 kD weitere Banden zu erkennen sind, die im Vergleich zu der des Vimentins kräftiger und intensiver sind. Da durch den PMF das MW von Vimentin bei 44,5 kD bestimmt wurde, lässt sich vermuten, dass es sich bei den zusätzlichen Banden um Isoformen dieses Proteins handelt.

Durch die Auswertung der Aminosäuresequenz konnten Isoformen des Vimentins nicht ausgeschlossen werden und somit dienen o.g. Ergebnisse als Bestätigung dieser Vermutung. Eine weitere Ursache für die zusätzlichen Banden könnte der zu unspezifische Antikörper sein.

5.2.2 Cytokeratin 8

In der Abbildung 17 ist ein Cytokeratin 8-Western Blot dargestellt. Das Protein liegt im Bereich von 40 kDa, das sich mit dem hypothetischen MW von 42,4 kD deckt. Auch hier ließen sich Intensitätsunterschiede in der behandelten Probe feststellen. Es wurden zwei Banden pro Spur sichtbar, wobei sich die untere bei 42 kDa und die obere Bande bei etwa 52 kDa befindet. Zu erwähnen ist, dass ein CK-Gesamt-Antikörper eingesetzt wurde, der möglicherweise zu unspezifisch war und zusätzliche Cytokeratine erkannt hat. Es ist jedoch ersichtlich, dass durch die Stimulation mit hypoosmolarer Lösung die o.g. Proteinveränderungen herbeigeführt wurden. Sowohl Vimentin, als auch Cytokeratin 8 zeigen eine höhere Expression in den behandelten Proben, die zum einen mittels 2-D Elektrophorese, zum anderen im Western Blot nachgewiesen wurden.

5.3. Vorkommen & Funktion von Vimentin und Cytokeratin 8

5.3.1 Vimentin

Die Analyse der mit hypoosmolarer Lösung behandelten SDS-Gele ergab eine vermehrte Expression der Strukturproteine Vimentin und Cytokeratin 8 (CK 8). Als wesentliche Bestandteile des Zytoskeletts der Säugetierzellen sind Intermediäre Filamente (IF) bekannt. [Bachmann et. al., 1983]. Die IF-Proteine setzen sich wiederum aus verschiedenen Komponenten zusammen, einschließlich Vimentin und Cytokeratin 8 [R.Kellner et. al., 2002]. Das Intermediäre Filament der Klasse 3: Vimentin lässt bis heute noch Fragen offen, beispielsweise über seine konkrete Funktion oder auch seine Beeinflussung durch verschiedene Medien. In vivo lässt sich Vimentin hauptsächlich in mesenchymalen und endodermalen Zellen des Embryos aber nur in mesenchymalen Zellen des Erwachsenen vorfinden [Bachmann et al., 1983; Holthöfer et. al., 1984]. In epithelialen Zellen wurde in vivo unter pathologischen Bedingungen ein erneutes Vorkommen festgestellt [Runembert et. al., 2002].

Wie die Re-Expression von Vimentin als Marker einer zellulären De-Differenzierung zu sehen ist und wie entscheidend sie für den Erhalt der Zellstruktur bzw. Funktion ist, kann noch nicht sicher gesagt werden. Die bisherigen Erkenntnisse über Vimentin deuten folgende Funktion an: (1) Organisation anderer zytoplasmatischer Strukturen, wie Mikrotubuli und Mikrofilamente und der Erhaltung der zellulären/nuklearen Form. (2) Sicherung der Zellstabilität bei mechanischem und osmotischem Stress. (3) Membrantransport [Faigler et al., 2000] und Granulasekretion [Pryzwansky and Merricks, 1998]. (4) Ansammlung von Lipidtropfen in Adipozyten und dem Metabolismus von Lipoproteinen und dem Recycling von Sphingosinen & Glycosphingolipide. (5) Zellzyklus. Weiterhin ist Vimentin bekannt als ein Immediate-Early-Gen und (6) entscheidend in der Interaktion mit verschiedenen Nicht-Strukturproteinen, wie der Protein-Kinase C, dem Polycystin-1, dem Stress-Response-Protein, als auch einer Co-Expression mit Cytokeratin 8 [Evans, 1998].

In der normalen adulten Niere wird Vimentin hauptsächlich in den Glomeruli, den Blutgefäßen und in intestinalen Zellen ausgebildet. Jedoch wurde keine Expression in den tubulären Zellen beobachtet [Bachmann et. al., 1983; Holthöfer et. al., 1984].

Andere Studien zeigten eine vermehrte Expression von Vimentin in proximal tubulären Zellen während einer Wiederherstellungsphase nach Ischämien oder nephrotoxischen tubulären Nekrosen [Grossrau et. al., 1989; Gröne et. al., 1987; Nouwen et. al., 1994; Wallin et. al., 1992; Witzgall et. al., 1994], bei Nierenzellkarzinomen [Dierick et. al., 1991; Holthöfer et al., 1983; Waldherr und Schwechheimer, 1985] und in Kultur [Franke et. al., 1979; Hatzinger et. al., 1988]. Dabei wird die Expression von Vimentin unter o.g. Konditionen als ein Marker für eine zelluläre De-Differenzierung angesehen, wobei die Frage, ob das Strukturprotein direkt in dem Wiederherstellungsprozess der Zelle involviert ist, ungeklärt bleibt. Durch die in meiner Studie induzierten osmotischen Veränderungen der m-TAL Zellen, kann vermutet werden, dass die Zellen in dieser Stresssituation mit einer vermehrten Proteinexpression reagiert haben. Da die Zellen über einen festgelegten Zeitraum mit einer hypoosmolaren Lösung inkubiert wurden, begünstigte dies ein Wassereinstrom in die Zellen und beeinflusste damit ihre natürliche osmotische Zusammensetzung, so dass ich annehme, dass aufgrund dieser Beeinflussung und der Gefahr des Verlustes der Zellstabilität, Vimentin vermehrt exprimiert wird. So beschrieben Baer et. al., 1999, eine erhöhte Expression von Vimentin besonders dann, wenn epitheliale Zellen ihre räumliche Organisation verloren haben und ihre mitotische Aktivität ansteigt, wie beispielsweise während Wiederherstellungs- bzw. Regenerationsprozessen nach Nierenzellschädigungen.

Möglicherweise kann Vimentin als Indikator für tubuloepitheliale regenerative Aktivitäten angesehen werden [Baer et. al., 1999]. Studien, die eine Expression von Vimentin bei geschädigten epithelialen Zellen untersuchten, beschrieben ebenfalls eine entscheidende Rolle des Proteins in der Aufrechterhaltung der Membranstruktur, um den Erhalt der Transportfunktion zu ermöglichen [Runembert et. al., 2002]. Andere Experimente ergaben, dass Zellen, die vorübergehend alkalinem Stress ausgesetzt waren, ebenfalls mit einer gesteigerten Expression von Vimentin reagieren [Pollack et. al., 1997].

Neue Forschungsergebnisse verdeutlichten die Expression des Proteins bei unterschiedlichen Krankheitsbildern. So berichteten Shu Y et. al., 2002, dass bei induzierten progressiven Nierenerkrankungen im Tiermodell nach einem zwölfwöchentlichen Beobachtungszeitraum, die Ratten Nephrosen mit tubulointestinalen Schäden, Proteinurie und Glomerulosklerose gezeigt haben und immunhistochemisch Vimentin nachzuweisen war.

Weiterhin fanden sich bei durch Streptozytocin induzierter chronischer diabetischer Nephropathie, die assoziiert ist mit Glomerulosklerose und tubulointestinaler Fibrose, mit charakteristischer Proteinurie und progressiver renaler Insuffizienz, sowohl eine gesteigerte Bildung des collagen-binding-stress-proteins HSP 47 (Heat-shock-protein), als auch von Vimentin. Liu D et. al., 2001, beschrieben, dient dies als Beweis einer durchlaufenen tubulären epithelialen Zellschädigung.

Andere Arbeiten beschäftigten sich mit der Inkubation renaler tubulärer epithelialer Zellen für den Zeitraum von 7 Tagen mit einer hoch konzentrierten Glucoselösung, hoch konzentrierter Albuminlösung und niedrig konzentriertem bovinen Serum. Dabei stellte man fest, dass eine Expression von Vimentin und Cytokeratin induziert wird und zugleich eine phänotypische Transformation in mesenchymale Zellformen stattfindet [Li L et. al., 2003].

Aufgrund dieser Experimente bestätigt sich die Vermutung, dass Vimentin bei verschiedenen Nierenzellschädigungen und unter Stresseinfluss exprimiert wird.

5.3.2 Cytokeratin 8

Cytokeratin 8 eine entscheidende Komponente von Desmosomen, ist als spezielle Struktur an den Oberflächen korrespondierender Zellen für die Zellhaftung verantwortlich. Dabei werden Desmosomen in Geweben ausgebildet, die unter erhöhtem mechanischem Stress stehen [G. Mark Xu et. al., 2001]. Charakteristisch für Desmosomen sind Verdichtungen im Interzellularraum, die durch transmembranöse filamentöse Verbindungsproteine ermöglicht werden und Haftplatten, die als spezielle Zytoplasmaverdichtungen im Desmosomenbereich,

Ankerstellen für verschiedene Komponenten des Zytoskeletts liefern. Histophysiologisch lässt sich sagen, dass Desmosomen den Interzellularraum nicht verschließen und dadurch den parazellulären Transport nicht behindern [Junqueira et. al., 1996]. Als ein Bestandteil von Desmosomen, zeigt Cytokeratin 8 eine vermehrte Expression in adulten Nieren, im Bereich des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife, dem distalen Konvolut und im Sammelrohr [G. Mark Xu et. al., 2001].

Verschiedene Arbeiten zeigen ein physiologisches Vorkommen von CK 8 im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. Da in meinem Versuch diese Proteinveränderungen in der Kontrollgruppe nicht festzustellen waren, vermute ich, dass die CK 8 Expression durch induzierte Stresssituation, beispielsweise durch die Inkubation mit hypoosmolare Lösung hervorgerufen wurde.

Studien von Sun et. al., 2002 und G. Mark et. al., 2001, ergaben ein besonders hohes Vorkommen von CK 8 in normalen adulten Nieren im Gebiet der distalen Hälfte des Nephrons, da dort die Verbindungen zwischen den epithelialen Zellen schwächer ausgebildet sind. In diesem Segment lässt sich trotz des erhöhten osmotischen Stresses nur eine eingeschränkte parazelluläre Leitung vorfinden.

Es ist bekannt, dass ein gut ausgebildetes Netzwerk von Intermediären Filamenten die Zellen vor Deformierungen aber auch vor physikalischen und osmotischen Stress schützen sollen [G. Mark Xu et. al., 2001].

Mit den Ergebnissen meiner Studie wird verdeutlicht, dass durch osmotische Veränderung in der Zelle verschiedene Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Zellstabilität und Funktion aktiviert werden. Es erklärt sich die vermehrte Expression der Strukturproteine Vimentin und Cytokeratin 8, die durch die unphysiologische Dehnung der Zellwände und des Verlustes der Zellkontakte ausgebildet wurden.

5.4 Bedeutung der Studie und Ausblick

Da Proteome den physiologischen oder pathologischen Zustand einer Zelle, eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt oder unter bestimmten Bedingungen beschreiben, ist es sinnvoll, die in einem spezifischen Gewebe exprimierten Proteine zu untersuchen. Damit können metabolische Veränderungen und Netzwerke der Signaltransduktion aufgedeckt werden. Durch Vergleich von krankem bzw. behandeltem und gesundem Gewebe können Krankheitsverläufe verstanden und biologische Marker wissenschaftlich definiert werden [Frauenhofer ITEM, Jahresbericht 2003].

In dieser Arbeit wurden sämtliche Ergebnisse anhand eines Zellkulturmodell mit primär kultivierten Epithelzellen der Schweineniere gewonnen. Dies stellt experimentell einen einfacheren Zugang zur Versuchsdurchführung und Hypothesenüberprüfung dar, als z.B. an Organsystemen oder am Versuchstier. Allerdings birgt sie die Problematik der Übertragbarkeit zum einen auf komplexere Systeme wie ein Organ oder Tier und zum zweiten auf die physiologische/pathologische Situation beim Menschen. Obwohl die Pathophysiologie der Schweineniere eine Ähnlichkeit zu der des Menschen aufweist, lässt sich kein vollständiger und gesicherter Zusammenhang stellen. Möglicherweise würde die Untersuchung von Biopsiematerial wertvolle Hinweise auf eine Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Zellkulturmodellen auf die Krankheitsmechanismen beim Menschen liefern [Frauenhofer ITEM, Jahresbericht 2003]. Hierbei lässt sich vorstellen, dass der Nachweis von Vimentin und Cytokeratin 8 als Markerproteine in Biopsieproben von Patienten mit Salzverlusttubulopathien zur Diagnosesicherung beitragen könnten. Dafür müssten Experimente in vivo durchgeführt werden, die jedoch ethisch nur bedingt vertretbar sind. Ein weiterer Ansatz könnte die Simulation der Pathophysiologie des antenatalen Bartter-Syndroms/Hyperprostaglandin- E₂-Syndroms am Tiermodell darstellen. Die Verwendung von Furosemid am Tiermodell der Maus oder Ratte würde sich gut eignen, da durch die Verabreichung von Furosemid über einen längeren Zeitraum ähnliche Symptomen, wie bei FSLT-Patienten festzustellen sind. Ein wichtiger Aspekt bei diesem Syndrom ist die erhöhte renale Prostaglandinausscheidung, besonders des Prostaglandin E₂ [Seyberth et. al. 1987]. Ein wichtiges Enzym, welches die Synthese der Prostaglandine katalysiert, ist die Cyclooxygenase. Interessanterweise wird die Cyclooxygenase in primär kultivierten Epithelzellen der Schweineniere nach Furosemid-Applikation bzw. unter hypoosmolaren Bedingungen induziert und eine verstärkte Prostaglandinbildung ist nachweisbar (persönliche Mitteilung Andrea Koch, Universität Marburg). Nach Khan et. al. 1998, sind Säugetierarten wie z.B. die Maus, die Ratte oder der Mensch fähig mindestens 2 Isoformen der Cyclooxygenase, die COX 1 und die COX 2, in der Niere zu bilden. In vorausgegangenen Studien wurde in Versuchen das Schleifendiuretikum Furosemid bei einer Kontrollgruppe von genetisch unbeeinflussten Wildtyp-Mäusen, als auch bei genetisch veränderten Knock-out-Mäusen (COX1^{-/-} und COX2^{-/-}) verwendet. Diese Tiere sind nicht fähig die Cyclooxygenase 1 und 2 zu synthetisieren. Dabei konnte beispielsweise die Beeinflussung verschiedener Parameter wie Furosemid- und PGE₂-Konzentration im Urin, die Diurese der Tiere (ml/kg/24h), die Konzentration der Elektrolyten Natrium und Kalium im Urin, das Trinkvolumen, die Gewichtsbilanz, das Renin im Plasma, ADH im Plasma sowie die

Proteinausscheidung im Urin nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass es nach Furosemid Gabe zu einer Erhöhung der renocorticalen COX2-mRNA sowie zu einem Anstieg des COX2-Proteins in den TAL-Zellen und in der Macula densa kommt [Kömhoff et.al.2000]. Diese Konzentrationssteigerung ließ sich ebenfalls bei Patienten mit antenatalem Bartter-Syndrom nachweisen. Bezugnehmend auf meine Arbeit wäre zu untersuchen, ob sich in diesem Tiermodell ebenfalls Modifikationen auf Proteinebene nachweisen lassen. Die Präparation der Mäuseniere zur Gewinnung der m-TAL-Zellen der Henle-Schleife, sowie der Proteinnachweis mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und massenspektrometrischen Verfahren wäre durchzuführen. Als zusätzliche Nachweismethode könnte die Western Blot-Analyse verwendet werden. Es wäre zu überprüfen, ob sich in diesem Experiment, ähnlich wie in dem o.g. Zellmodell, eine gesteigerte Synthese der Proteine Vimentin und Cytokeratin 8 feststellen lässt.

Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass beide Proteine sowohl separat als auch gemeinsam in Geweben und Zellen unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen ausgebildet werden [Magre G et. al., 2001; R.Kellner et. al., 2002]. So wird als Reaktion auf veränderte osmotische oder auch mechanische Stressbedingungen, mit der vermehrten Expression der Proteine geantwortet, um den Erhalt der Zellstruktur zu bewirken. Dieses Verhalten zeigte sich in den o.g. Forschungsberichten und klinischen Beispielen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass genetische und individuelle Varietäten der Schweineniere einen großen Einfluss auf die Ergebnisse haben können. Zu berücksichtigen sind unbekannte Krankheiten, Zystische Veränderungen, Nahrungs- und Trinkwasserzusätze, Medikamentenapplikationen aber auch Stressreaktionen und Schmerzempfindungen während des Schlachtvorgangs. Die Präparation der Nierenabschnitte ist ein durchaus anspruchsvoller Arbeitsschritt, bei dem sich mögliche Kontaminationen nicht vollständig ausschließen lassen. Daher wurde versucht diese Aufarbeitung standardisiert durchzuführen.

Eine wichtige Rolle spielt die Co-Expression von Vimentin und Cytokeratin 8 in der Tumordetektion, mit einer häufig vorzufindenden Entdifferenzierung, einer Invasion/ Migration und metastatischen Ausbreitungen. Die Ergebnisse der Studie von R. Kellner et. al., 2002 ergaben bei humanen-renalen-Karzinomzellen (RCC), die mit Hilfe der Zwei-Dimensionalen Elektrophorese, dem Immunoblotting und PROTEOMEX analysiert wurden, eine gemeinsame Ausbildung von CK 8 und Vimentin. Das Verfahren wird eingesetzt zur Identifizierung von differenziert ausgebildeten Markerproteinen der Niere, die es erlauben eine Subklassifizierung von RCC vorzunehmen und somit eine frühzeitigere Diagnose dieser Krankheit zu ermöglichen.

Wie auch aus dem Artikel von W. Wu et. al., 2002 zu entnehmen ist, lässt sich der hohe Stellenwert der Proteomforschung in der Tumorforschung und die Anwendung in der Aufdeckung von Tumormetastasen erkennen.

Anhand dieser Beispiele kann sicher nur ein kleiner Einblick in die Funktion der Proteine Vimentin und Cytokeratin 8 gegeben werden. Erst durch weitere Forschung in den nächsten Jahren, wird man zu neuen Erkenntnissen gelangen und die noch unbekanntes Proteinsequenzen aufdecken und identifizieren. Die Proteomanalyse bietet einen viel versprechenden Weg die Proteinexpression zu einem definierten Zeitpunkt und unter konstanten Bedingungen quantitativ zu erfassen. So können die Auswirkungen von Medikamenten und anderen Einflüssen auf biologische Mechanismen untersucht werden. Besonders die 2-D Elektrophorese hat viele Eigenschaften, die sie für die Proteomanalyse geeignet machen. Durch die hohe Auflösung, können bis zu 10.000 Komponenten in einem Gel getrennt werden. Mit Immobilinien in der IEF werden bestimmte pH-Bereiche gespreizt, was den Vorteil höherer Auflösungen in speziellen pH-Bereichen bietet.

Des Weiteren ist die 2-D Elektrophorese mit Detergenzien kompatibel und daher für alle Proteine universell einsetzbar, so können prinzipiell auch hydrophobe Proteine, wie Membranproteine aufgetrennt und durch neue Auftragechniken Milligramm-Mengen von Proteinen präparativ in einem 2-D Gel verwendet werden. Nicht zu vergessen ist, dass es sich hierbei um eine hochparallele Methode handelt, d.h. es werden alle Proteine zur gleichen Zeit bearbeitet. Jedoch zeigt sich auch eine Limitation der 2-D Elektrophorese. Besonders die anspruchsvolle technische Durchführung und auch der nicht vollständige Transfer der Ersten (IEF) auf die Zweite Dimension (SDS-PAGE) birgt die Gefahr von Proteinverlusten. Auch durch die Wahl eines bestimmten pH-Bereichs, lässt sich somit nur ein kleiner Ausschnitt als Stichprobe aufzeigen und vernachlässigt somit andere relevante Proteinveränderungen.

Daher könnte ein Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten, die Analyse von Proteinen in anderen pH-Bereichen sein. Die Quantifizierung der Proteine in der Gelmatrix trifft die zentrale Aussage der Proteomanalyse. Die Proteine müssen für eine Quantifizierung angefärbt werden. Die Färbungsintensität ist je nach Eigenschaft des Proteins spezifisch, ebenso findet sich eine Abhängigkeit von individuellen Proteinmengen. Zur weiteren Analyse müssen die Proteine aus der Gelmatrix extrahiert werden, daher können zwei oder mehrere unterschiedliche Proteine, die durch ihren ähnlichen pH-Wert auf dem Gel überlagert sind, nicht als separate Proteine aufgeschlüsselt werden und somit eine Zuordnung erschweren.

Zusätzlich ist es möglich, dass sich einige Proteine nicht analysieren lassen, da schon kleinste Variationen in den Färbebedingungen zu unterschiedlichen Intensitäten führen können.

Es wird schwierig bleiben, schnell ablaufende Prozesse direkt zu beobachten, so dass sich am günstigsten zeitlich stabile und langdauernde Zustände messen lassen. Weiterhin gestaltet sich die Analyse von sehr niedrig exprimierten Proteinen als problematisch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Methode Möglichkeiten bietet, die Genomanalyse, die m-RNA Messung und die klassischen biochemischen Analysen, durch eine weitere zukunftsorientierte Technik zu bereichern. Möglicherweise kann man somit Krankheitsbilder, wie das antenatale Bartter-Syndrom/Hyperprostaglandin-E₂-Syndrom, schneller diagnostizieren oder spezifische Proteinänderungen als Verlaufparameter nutzen.

Wurden in den letzten Jahren die ersten Genome von Organismen vollständig entschlüsselt und gehört die Bearbeitung weiterer Gesamtgenome schon zur Routine, befindet sich die Proteomforschung noch in ihren Anfängen. Zu hoffen ist, dass dies eine Herausforderung für die Wissenschaft der nächsten Generation wird.

6 Quellenangaben

Alejandro *Kidney International*, 2000, p 1571-1580, Phenotypic profiles of cultured glomerular cells following repeated cycles of hydrocarbon injury

Alon *Pediatric Nephrology*, 1996, p 10,

Histological long-term outcome of furosemide-induced nephrocalcinosis in the young rat

Amersham Biosciences, p 27-76, *Abb.5*,

Principles and Methods 2-D Elektrophoresis using immobilized pH gradients

Anderson and Anderson *Electrophoresis*, WILEY-VCH, 1998,

Proteome and Proteomics: New technologies, new concepts and new words

Ben-Ze' ve; J *Cell Sci Suppl* 8, 1987, p 293-312,

The role of changes in cell shape and contacts in the regulation of cytoskeleton expression during differentiation

BIO-RADiations, *A Resource for Life Science Research*, No. 109, p 25-29, BIO-RAD

BIO-RAD Elektrophoresis, *High-Performance 2-D Gel Electrophoresis Using Narrow pH-Range ReadyStrip IPG Strips*

BIO-RAD, *2-D Electrophoresis for Proteomics, A Methods and Product Manual*, p 01-17, *Abb. 6-7*

BIOspektrum, 06/2005 11. Jahrgang, Höchste Sequenzabdeckung gefordert- Massenspektrometrische Strukturcharakterisierung Gel-separierte Proteine

Daniel C. Liebler *Humana Press*, Introduction to Proteomics, p 03-68

Eckert RL *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988 Feb, 85(4), p 1114-8,

Sequence of human 40-kDa keratin reveals an unusual structure with very high sequence identity to the correspond bovine keratin

El-Koraire AF *Nephrol Dial Transplant*, 2002 May, 17(5), p 803-12,

Cytoskeletal protein expression and regenerative markers in schistosomal nephropathy

Fenn JB, Mann M, Meng CK *Wissenschaft* 1989, Electrospray Ionisierung für Massenspektrometrie der großen Moleküle

Frauenhofer ITEM, *Jahresbericht 2003* Pharmaforschung, Medizinische Biotechnologie und Molekulare Medizin

Fukuzawa R *Pediatr Nephrol.*, 2003 Jan, 18(1), p 9-13,

Embryonal hyperplasia of Bowman`s capsular epithelium in patients with WT1 mutations

Geisler N *FEBS Lett.*, 1983 Oct 31, 163(1), p 22-4,

Amino acid sequence characterization of mammalian vimentin, the mesenchymal intermediate filament protein

Geisler N *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981 Ju, 78(7), p 4120-3,

Comparison of the proteins of two immunologically distinct intermediate-sized filaments by amino acid sequence analysis: desmin and vimentin

Geisler N. *Eur J Biochem.*, 1989 Aug, 183(2), p 441-7,

Phosphorylation in vitro of vimentin by protein kinase A and C is restricted to the head domain. Identification of the phosphoserine sites and their influence on filament formation

Geisler N. *Nature.* 1982 Apr, 296(5856), p 448-50,

Related amino acid sequences in neurofilaments and non-neural intermediate filaments

Görg 2000, The current state of two- dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients Proteomics Group, Institute of Food Technology and Analytical Chemistry, Technical University of Munich, Freising-Weihenstephan, Germany Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim

Jeck, Konrad und Seyberth *Endokrinopathien Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2001,*

Molekulare Pathophysiologie der angeborenen Salzverlusttubulopathien mit Hypokaliämie

Jorcano JL *Differentiation.* 1984, 28(2), p 155-63,

Amino acid sequence diversity between bovine epidermal cytokeratin polypeptides of the basics (type II) subfamily as determined from cDNA clones

Junqueira, Carneiro und T.H. Schiebler *Springer Verlag 4. Auflage, p 53ff,*

Histologie

Karas M und Hillenkamp F. *Anales Chem 1988,* Laser Desorption- Ionisierung der Proteine in den molekularen Massen, die 10 000 daltons übersteigen

Karas M, Bachmann D. *MassenSpectrom u. Ion Proc 1987* Matrix- unterstützte ultraviolette Laser Desorption der permanenten Mittel

Kaufmann *Pathologe 2002, 23(3), p 183-97,*

Immunohistochemical diagnosis in cancer metastasis of unknown primary Tumor

Kellner *Proteomics 12 2002, p 1743-51,*

Targetting a tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteom- based analysis and their clinical significance

Khan *Toxicologic Pathology, 1998, Vol. No.5,*

Interspecies Differences in Renal Localisation of Cyclooxygenase

Kim MK *Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2002 Dec, 10(4),p 332-8,*

Immunohistochemical profile of common epithelial neoplasms arising in the kidney

Köckerling, Konrad und Seyberth *Deutsche Ärzteblatt 95, Sonderdruck*

1998 Juli Heft 30, Abb.1-3, Hereditäre Tubulopathien mit Diuretika-ähnlichem Salzverlust

Kömhoff M, Jeck NDM, Seyberth HW *Kidney Int 58 2000*

Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like syndrome *Kidney Int 58 2000*

Krauss S *German Cancer Research Center, Heidelberg, F.R.G., Gene, 1990 Feb 14, 86(2), p 241-9,* Organization and sequence of the human gene encoding cytokeratin 8

Krück Urban Schwarzenberg Verlag , p 183-190, Pathophysiologie

Li, Zhang *2003, 35 (1), p 7-12,*

The phenotypic transformation of renal tubular epithelial affected by pathological stimuli

Liu, Razzaque *Histochem J.* 2001, 33 (11-12), p 621-8,

The renal expression of heat shock protein 47 and collagens in acute and chronic experimental diabetes in rats

Lothar Thomas *TH-Books 5.Auflage*, p 1474-1478, Labor und Diagnose

Lottspeich F. und Zorbas H. *Spektrum Akademischer Verlag*, 1989, p 327-335, Bioanalytik

Magro *Histochem J.* 2001, 33 (4), p 221-226,

Comparative Immunohistochemical analysis of the expression of cytokeratins, vimentin and alpha-smooth muscle actin in human fetal mesonephrons and metanephrons

Mann M, Hojrup P, Roepstorff P *Biol. Massenspectrom.* Jun 1993, 22(6), p338-45

Gebrauch von spektrometrischen Molekulargewichtsmasseninformationen

Margin TM *Differentiation* 1986, 30(3), p 254-64

Cytokeratin expression in simple epithelia.II. cDNA cloning sequence characteristics of bovine cytokeratin A (no. 8)

Mark Xu *Biol. Chem.*, 2001 Dec 7, Vol. 276, Issue 49, p 46544-46552,

Polycystin-1 Interacts with Intermediate Filaments

Murer *Nephron*, 2002 Aug 91(4), p 588-93, Expression of nuclear transcription factor PAX2 in renal biopsies of juvenile nephronophthisis

Okada H *Am J Pathol.*, 2002 Mar, 160(3), p 765-72,

Interstitial fibroblast-like cells express renin-angiotensin system components in a fibrosing murine kidney

Oppermann *Kidney International*, 2001, Vol 60,

Polarized function of thick ascending limbs of Henle cells in osmoregulation Grunewald

P.H. Lane *Pediatric Research*, 1995, Vol.37, No.6,

Furosemid Treatment, Angiotensin II, Renal Growth and Development in the Rat

Pollack *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2002, Vol. 241, Issue 2, p 541-547, Loss of Cytokeratin Expression and Formation of Actin Stress Fibers in Dedifferentiated MDCK-C7 Cell Lines

Protocol Guide *Hoefler Automated Gel Stainer Pharmacia Biotech*
Automated Silver and Coomassie, Staining of Polyacrylamide Gels

Rakozy C *Mod Pathol.*, 2002, Nov 15(11), p 1162-71,
Low-grade tubular-mucinous renal neoplasms: morphologic, immunohistochemical and genetic features

Runembert *Journal of Cell Science* 115, 2002, p 713-724,
Vimentin affects localization and activity of sodium- glucose cotransporter SGLT1 in membrane rafts

Schenk und Kolb *Gustav Fischer Verlag Jena*, p 439-450, Grundriß der physiologischen Chemie

Sehl, T. N. *Circulation*, 2000,
Application of cDNA Microarrays in Determining Molecular Phenotype in Cardiac Growth, Development, and Response to Injury

Seyberth, Leonhardt A, Soergel M et al, *Monatsschr. Kinderheilkunde* 142 1994
Das Hyperprostaglandin-E2-Syndrom

Shiratsuchi H *Int J Surg Pathol.*, 2001 Jan 1, p 37-48,
Cytokeratin subunits of inclusion bodies in rhabdoid cells: Immunohistochemical and clinicopathological study of malignant rhabdoid tumor and epitheloid sarcoma

Shu *Pathol. Int.*, 2002, 52 (3), p 214-223,
Phenotypical changes and cell cycle activation in early tubulointerstitial injury of rat adriamycin nephrosis

So 2002, 36 (5), p 301-4,
Aristolochic acid induced transdifferentiation and apoptosis in human tubular epithelial cells in vitro

Sun DF *Am J Nephrol.*, 2002 Sept-Dec; 22(5-6), p 405-16,

Relation of distal nephron changes to proximal tubular damage in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats.

Tunn *Experimental Nephrology*, 1999, Vol.7. No.4,

Transdifferentiation of Distal but not Proximal Tubular Epithelial Cells from Human Kidney in Culture Baer

Turner JR *Eur J Cell Biol.* 1990, Apr, 51(2), p 259-64,

On the relation between distinct components of the cytoskeleton: an epitope shared by intermediate filaments, microfilaments and cytoplasmic foci

Yaoita *Histochem Cell Biol.*, 1999, 111(2), p 107-15,

Identification of renal podocytes in multiple species: higher vertebrates are vimentin positive/vertebrates are desmin positive

Westermeier p 45-272

Electrophoresis in Practice - Third Edition, WILEY-VCH

7 Anhang

Lebenslauf:

Name: Franziska Wenzel

Anschrift: Waltershäuser Straße 18
99867 Gotha
Telefon: 03621/734 335
Handy: 0171/3216951

Geburtsdatum und -ort: 30.05.1979 in Halle/Saale

Familienstand: Lebensgefährtin Herr Axel Schnurr

Nationalität: deutsch

Eltern: Reinhard Wenzel
Diplom-Ingenieur
Martina Wenzel, geb. Gahlbeck
Diplom-Ingenieur

Schulausbildung:

1985-1993 Polytechnische Oberschule Makarenko-Schule
in Halle/Saale

1993 -1997 Europaschule Torgymnasium in Halle/Saale

09.07.1997 Abitur mit der Note -gut-

Sprachkenntnisse Englisch 6 Jahre
Russisch 6 Jahre
Latein 4 Jahre und Kleines Latinum

Praktika	2 Wochen Informationspraktikum Abteilung Hormonforschung des Institutes für Pflanzenbiochemie, Weinberg in Halle/Saale
1995-1997	Teilnahme am Forschungsprojekt der Martin-Luther- Universität- Halle-Wittenberg und der Arbeitsgemeinschaft „Ökologie“ der Europaschule Torgymnasium in Halle/Saale
09.1997- 04.1998	Freiwilliges Soziales Jahr im Alten- und Pflegeheim St. Cyriaci et Antonii in Halle/Saale
Hochschulausbildung:	
04.1998- 09.2000	Vorklinisches Studium der Medizin an der Philipps- Universität Marburg
20.09.2000	Ärztliche Vorprüfung
10.2000- 09.2001	Klinisches Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg
17.09.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23.03.2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.- 11.2004	Chirurgisches und Inneres Tertial im HELIOS- Klinikum Erfurt
11.2004- 04.2005	Wahlfach Kinderheilkunde im Städtischen Klinikum Fulda
28.04.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Abschluß des Medizinstudiums mit der Note -gut-

03.05.2005

Approbation als Ärztin

01.06.2005

Ärztin in Weiterbildung in der Fachabteilung Pädiatrie,
im HELIOS-Kreiskrankenhaus Gotha/Ohrdruf

Famulaturen:

02.2001- 03.2001

Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
in Halle/ Saale

02.2002- 03.2002

Klinikum Philipps Universität Marburg
Medizinisches Zentrum für Kinderheilkunde

09.2002- 10.2002

Gemeinschaftspraxis Gstöttner& Ochs
FÄ für Haut- und Geschlechtskrankheiten/
Allergologie in Halle/ Saale

02.2003- 03.2003

Gottfried von Preyer`sches Kinderspital der Stadt Wien

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. R. M. Nüsing für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Kinderklinik-Marburg, der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau Stefanie Achenbach, Frau Kristina Rösser für die gute Zusammenarbeit und für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ein Besonderer Dank gilt Herrn Detlef Fründ für die Einarbeitung in mein Themengebiet, für die Lösung der technischen und allgemeinen Probleme.

Meinen Eltern danke ich für Ihre liebevolle und ausdauernde Unterstützung, dass sie immer für mich da sind und bedingungsloses Verständnis für alle größeren und kleineren Sorgen haben. Axel Schnurr, der Mann an meiner Seite, gab und gibt mir zu jeder Zeit Kraft, Unterstützung und all seine Liebe um auch Schwierigkeiten meistern zu können.

Nicht zu vergessen meine beste Freundin Denise Ecke, die mir eine sehr wichtige Person ist. Sie hat sich mit viel Geduld meinen fachlichen Fragen gestellt und diese Arbeit Korrektur gelesen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichten Arbeit mit dem Titel „Differentielle Proteinexpression in Nierenepithelzellen unter hypoosmolaren Kulturbedingungen“ in dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde unter der Leitung von Prof. Dr. R. F. Maier, mit Unterstützung durch das Forschungslabor der Kinderklinik unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. R. M. Nüsing ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Gotha, den