

PROTEOMANALYSE DES MENSCHLICHEN UTERUS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Mohammed Masree
aus Gazastreifen / Palästina

Frankfurt am Main 2004
(DF1)

Vom Fachbereich chemischen und pharmazeutischen Wissenschaften der Johann
Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen

Dekan	Prof. Dr. H. Schwalbe
Erster Gutachter	Prof. Dr. C. R. Noe
Zweiter Gutachter	Prof. Dr. D. Steinhilber

Datum der Disputation: 26. Juli 2004

Berichte aus der Pharmazie

Mohammed Masree

Proteomanalyse des menschlichen Uterus

Meinem Vater und meiner verstorbenen Mutter

Die vor liegende Arbeit wurde von Januar 1999 bis Mai 2003 im Institut für Pharmazeutische Chemie der Johan Wolfgang Goethe Universität Frankfurt angefertigt.

Meinem verehrten Doktorvater

Herrn Prof. Dr. C. R. Noe

danke ich für die Auswahl und Überlassung des Themas und für die zahlreichen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt seiner großzügigen Unterstützung auch in persönlicher Hinsicht.

Meiner Frau danke ich für die Geduld und das Verständnis während der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Chemie, die durch ihr Mitwirken zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ebenfalls herzlich danken.

Frau Dr. Marion Noe danke ich insbesondere ganz herzlich für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge; und auch für die reichliche Unterstützung meiner Arbeit mit den Proben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die 2D-Polyacrylgel Elektrophorese (2D-PAGE)	6
1.1.1.	Historischer Überblick der Methodenentwicklung	6
1.1.2.	Computerunterstützte Bildauswertung	10
1.1.3.	Limitation der Methode	11
1.1.4.	Ausblick in der Zukunft	14
1.2.	Medizinischer Hintergrund	15
1.2.1.	Makro- und Mikroanatomie des menschlichen Uterus	15
1.2.2.	Das Endometrium	16
1.2.3.	Aufbau der Gebärmuttermuskulatur	16
1.2.4.	physiologische Konzepte des menschlichen Uterus	18
1.2.5.	Steroidhormonrezeptoren in Endometrium	19
1.3.	häufige Erkrankungen des Uterus: Uterus myomatosus	21
1.3.1.	Äthiologie Pathogenese	23
1.3.2.	Therapie	24
2.	Ergebnisse	25
2.1.	Methodenerarbeitung	25
2.2.	Probenvorbereitung	25
2.2.1.	Probengewinnung	26
2.2.2.	Zellaufschluss	26
2.2.2.1.	Zellaufschluss mit Mörsern	27
2.2.2.2.	Zellaufschluss mit Schwenkmühle	27
2.2.2.3.	Zellaufschluss mittels Ultraschall	28
2.3.	Proteinsolubilisierung	29
2.3.1.	Die Zusammensetzung des Lysepuffers	30
2.3.2.	Die Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers	34

2.4.	Optimierung der isoelektrischen Fokussierung	37
2.5.	Optimierung der aufgeladenen Proteinkonzentration	38
2.6.	Typ der verwendeten IPG-Streifen	38
2.7.	Optimierung des Fokussierungsprozesses	40
2.8.	Lagerung der IPG-Streifen nach der Fokussierung	41
2.9.	Optimierung der SDS-PAGE	41
3.	Reproduzierbarkeit	42
3.1.	Auflösungsqualität der 2-DE-Gele	43
3.2.	Reproduzierbarkeit der Probenpräparation	44
3.3.	Matcheffizienz der Spots	46
3.4.	Reproduzierbarkeit der Gel-Färbung und Spotintensität	47
4.	Differenzielle Proteomanalyse von uterinem Gewebe	49
4.1.	Identifizierung der House-Keeping-Proteine	49
4.2.	Abweichung der Proteinexpression beim Ut. myomatosus	52
4.2.1.	krankheitsabhängige Überexpression von Proteinen	53
4.2.2.	krankheitsabhängige Verminderung der Proteinexpression	58
4.2.3.	In Einzelfällen abweichende Proteinexpression	60
4.3.	Vergleich der untersuchten Gewebeschnitten untereinander mittels differenzieller Proteomanalyse	62
4.3.1.	Vergleich von Endometrium mit subserösem Myometrium	63
4.3.2.	Vergleich von Endometrium bzw. subendometrialem Myometrium mit subserösem Myometrium	64
4.3.3.	Vergleich der Gesamtspotzahl in verschiedenen Schichten	68
4.4.	Vergleich des Myomgewebes mit subendometrialem und subserösen Myometrium	69
4.4.1.	Expression von Desmin	70
4.4.2.	F-Actin und Osteoglycin, Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin Peroxidase	72
4.4.3.	Expression von Transaldolase im Myomgewebe	73
4.5.	orientierende Proteinbestimmung	75
4.5.1.	Die ECL-Detektion von α -ER und β -PR auf 2-DE-Gele	75
4.5.2.	Die Detektion von α -ER und β -PR mittels ECL-West. blot	76

5.	Diskussion der Ergebnisse	79
5.1.	Methodenbearbeitung	79
5.2.	Reproduzierbarkeit de Methode	80
5.3.	Bestimmung der Haus-Keeping-Proteine	81
5.4.	Detektion der Proteinmuster der verschiedenen Schichten	82
5.5.	differentielle Proteomanalyse des Uterus myomatosus	84
6	Experiminteller Teil	91
6.1.	Probengewinnung	91
6.2.	Etablierung des Zellaufschlusses	92
6.2.1.	Zellaufschluss mit Mörsern	92
6.2.2.	Zellaufschluss mit Schwenkmühle	92
6.2.3.	Zellaufschluss mit Ultraschall	93
6.3.	Etablierung der Proteinsolubilisierung	94
6.3.1.	Standardisierung des Lysepuffers	94
6.3.2.	Standardisierung des Rehydrierungspuffers	94
6.3.3.	Optimierung der aufgeladenen Proteinkonzentration	95
6.3.4.	Typ der verwendeten IPG-Streifen	95
6.3.5.	Typ der 2. Dimension (SDS-PAGE)	95
6.4.	Reproduzierbarkeit der Methode	96
6.4.1.	Reproduzierbarkeit der Probenpräparation	96
6.4.2.	IEF in den IPG-Streifen	97
6.4.3.	Äquilibration der IPG-Streifen	97
6.4.4.	Die zweite Dimension	97
6.4.4.1.	Herstellung der SDS Gelelektrophorese	97
6.4.4.2.	Durchführung der 2. Dimension	99
6.4.4.3.	Visualisierung der getrennten Proteine	99
6.5.	Bestimmung der Haus-Keeping-Proteine	100
6.5.1.	Verdauung und Vorbereitung der Protein für MALDI-TOF	101
6.5.2.	Messung der Peptidproben aller HKP	102
6.6.	Differentielle Proteomanalyse der uterinen Schichten	104
6.6.1.	Endometrium	104

6.7.	Spotzahl der verschiedenen Gewebeschichten	106
6.8.	Vergleich des Myomgewebes mit dem SE- und SS-Gewebe	107
6.9.	ECL-Detektion von α ER und β PR mittels 2-DE	107
6.9.1.	Detektion von α ER mittels Western blot	108
6.9.2.	Detektion von β PR	109
6.10.	Herstellung von polyklonaren Antikörper gegen Aromatase	109
6.10.1.	Herstellung der Expressionsfaktors	110
6.10.2.	Überexpression von Aromatase	111
6.10.3.	Proteinaufreinigung	111
7.	Zusammenfassung	113
8.	Literaturverzeichnis	117
9.	Materialien	125
10	Lebenslauf	127

Einleitung

Von den 70er bis zu den 90er Jahren kam es auf dem Gebiet der Proteinforschung zu einer Stagnation. An Proteinen allein mit den seit langem etablierten Methoden der Proteinchemie zu forschen galt zunehmend als überholt und entbehrte der Aktualität und der rasanten Entwicklungen, die parallel in der Molekularbiologie stattfanden. Diese Kluft zwischen der „modernen“ Molekularbiologie und der „altertümlichen“ Proteinforschung ändert sich mit einem Schlag, als 1994 der Begriff „Proteom“ von Marc Wilkins in die Forschungsgemeinde eingeführt wurde. Heute sind Proteom und Proteomanalyse von so zentraler Bedeutung wie es „PCR“ Ende der 80er Jahre einmal war. Im Gegensatz zu den anderen Wörtern, die die Welt veränderten (z.B. Gleichheit oder Sozialismus), ist das Wort Proteom sogar eindeutig definiert: Man versteht darunter die quantitative Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus, also die Erfassung aller exprimierten Proteine und ihrer jeweiligen Konzentration unter bestimmten äußeren Bedingungen zu einem gegebenen Zeitpunkt. Natürlich, in Wirklichkeit hatte doch nicht das Wort die Verhältnisse geändert. Der Strom der Wissenschaft hatte schleichend seine Richtung geändert und dies wurde durch die Formulierung des Begriffs Proteom schlagartig offenbart. Die 2D-Gelelektrophorese selbst, als Basis der Methode, war ja schon in den 70er Jahren erstmals vorgestellt worden. Mangelnde Reproduzierbarkeit und fehlende Auswertungsmöglichkeiten verhinderten jedoch zu diesem Zeitpunkt eine breite Anwendung. Einer der Meilensteine in der Entwicklung der Proteomanalyse bestand daher in der neuen Massenspektrometrie. Sie zog erst in der 60er Jahren in die Labors, indem die Chemiker diese zur Massenbestimmung und Strukturaufklärung von flüchtigen Moleküle und Molekülbruchstücken benutzt haben. Bei Proteinen und Peptiden versagen der herkömmliche Massenspektrometer, weil solche große Moleküle geladen und nicht flüchtig sind. Im Laufe der

Zeit wurde Ende der 80er Jahre (von Franz Hillenkampf) dennoch gelingt, hochmolekulare Ionen ins Vakuum springen zu lassen. Dies nannte man Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization (MALDI). Diese ist eine ideale Ionenquelle für ein TOF-MS, da für die Ionenerzeugung die Probe mit einem gepulsten Laser beschossen wird, der diskrete „Ionenpakete“ erzeugt, die nacheinander beschleunigt und am Detektor nachgewiesen werden. Diese aktuelle Technik ermöglichten die Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen und Peptiden schnell und mit hoher Genauigkeit und damit deren Identifizierung. Weniger spektakulär, aber von ähnlicher Reichweite war die Einführung der immobilisierten pH-Gradienten „**IPG**“ in die isoelektrischen Fokussierung. Als dritter wesentlicher Faktor ermöglichte die rasante Entwicklung der Bioinformatik einen erneuten Entwicklungssprung, da die Auswertung von Datenmengen, wie sie bei der Proteomanalyse entstehen, ohne ein leistungsfähiges Computersystem nicht vorstellbar ist. So gelangte man zu der Möglichkeit, sich wieder auf das eigentliche Ziel der Biologie die Untersuchung der Lebensäußerungen von Zellen. Die Lebensäußerungen einer Zelle gründen aber auf den exprimierten Proteinen, die Nukleinsäuren liefern dazu nur die Baupläne. Das neue Ziel der biologischen Forschung besteht nun darin, das funktionelle Netzwerk der Zelle sowie das Zusammenspiel zwischen Proteinen, RNA und DNA aufzuklären. Es gibt wohl nichts, was den Zustand einer Zelle oder eines Gewebes empfindlicher ausdrückt, als das quantitative Spektrum seiner Proteine. Die Erfassung des Proteoms eines Gewebes oder einer Zelle hat also die 2D-Gelelektrophorese in Kombination mit der Massenspektrometrie und dem Auswertungssystem zur methodischen Grundlage. Die Abbildung 1 demonstriert die einzelnen Schritten des 2-DE-Prozesses beziehungsweise die Proteinidentifizierung.

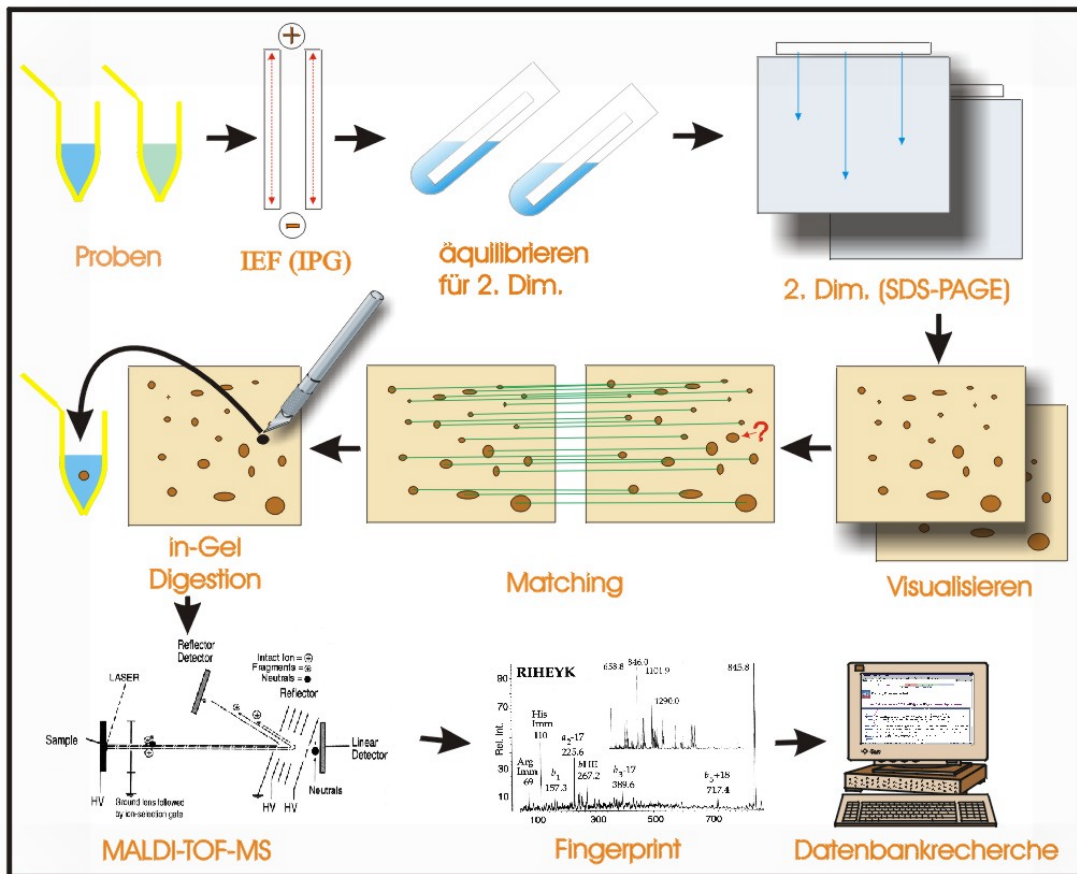


Abbildung 1: Die Darstellung der einzelnen Schritten der aktuell entwickelten 2DE-Methode für das Aufftrennen und Charakterisierung der Proteinen aus einer Proteinprobenmischung der Zellen, Geweben, Organen etc.

Eine Krankheit wird die Expression bestimmter Proteine unterdrücken und die Expression anderer Proteine erhöhen oder überhaupt erst anwerfen. Das Proteinspektrum eignet sich so als Krankheits- bzw. Gesundheitsindikator. Das weiteren lässt sich über das Proteinspektrum die Wirkung von Pharmaka und deren Nebenwirkungen abschätzen. In der Abbildung 2 wird die Veränderung an der Expression des Proteinspektrums genauer demonstriert.

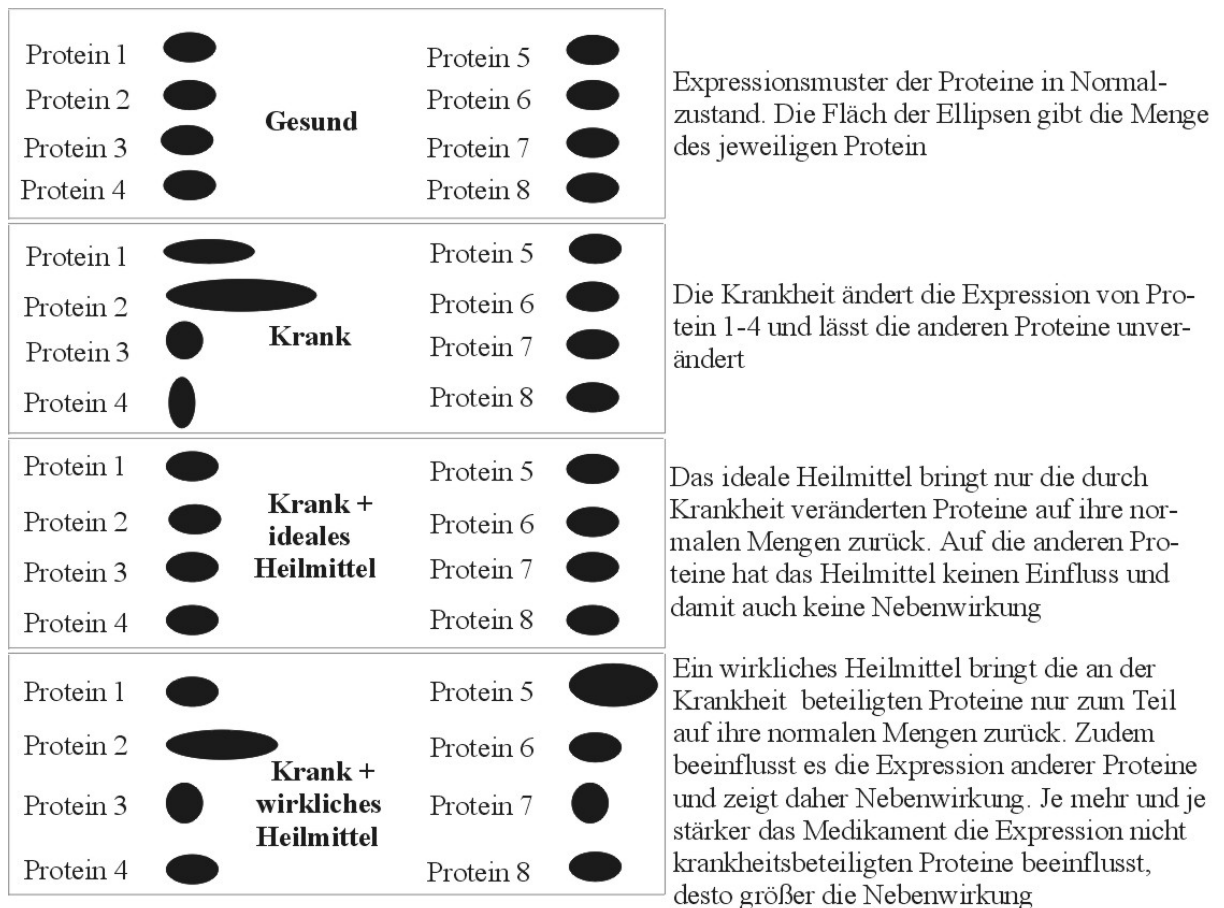


Abbildung 2: Der Wert quantitativer Proteinspektren für die Diagnose von Krankheiten und die Wirkung von Medikamenten.

Das Uterus (Gebärmutter), ist ein Organ, welches wie kein zweites physiologischen Änderungen unterworfen ist. Fast täglich ändert sich das makro- und mikroskopische Erscheinungsbild der Gebärmutter, und damit untrennbar verknüpft auch die biochemische Zusammensetzung des Gewebes, abhängig von den hormonellen Veränderungen im menstruellen Zyklus. Diese Veränderungen bilden die Grundlage für die Funktion der Gebärmutter im reproduktiven Prozess. Erst in den letzten Jahren, bedingt durch die Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin, wurde jedoch klar, welches außerordentliches Ausmaß an Aktivität dieses Organ schon im nicht-schwangeren Zustand entwickelt, da bisher angenommen wurde, dass große Umbauprozesse erst im Rahmen der eingetretenen Schwangerschaft bzw. unter pathologischen Bedingungen eintreten.

Die erste Zyklushälfte steht unter steigendem Östrogeneinfluß. In dieser Zeit kommt es zur Proliferation des Endometriums und zur zunehmenden Durchblutung der Gebärmutter. Nach der Ovulation wird im Gelbkörper des Ovars zusätzlich Progesteron gebildet. Dieses bewirkt einen Differenzierungsprozess und löst die sekretorische Transformation des Endometriums aus. Neben den hormonabhängigen physiologischen Veränderungen spielen auch hormonabhängige Erkrankungen, wie das Leiomyom des Uterus oder die Endometriose, eine wesentliche Rolle für die Gesundheit der Frau, über deren Ursachen jedoch nach wie vor fast nichts bekannt ist. Das Leiomyom des Uterus ist die häufigste gynäkologische Erkrankung in der westlichen Welt und aufgrund der fehlenden Kausaltherapie noch immer die häufigste Ursache gynäkologischer Operationen. Leiomyome sind gutartige monoklonale Tumore, die aus glatten Muskelzellen des menschlichen Uterus entstehen. Die Häufigkeitsangaben in der Literatur schwanken zwischen 25 und 50%. Nur etwa 15-20 % der betroffenen Frauen geben keine besonderen Beschwerden an, Schmerzen treten bei ca. einem Drittel der Patientinnen auf, bei ca. der Hälfte aller Myompatientinnen kommt es jedoch zu Blutungsstörungen, die letztendlich oft zur Entfernung der Gebärmutter führen.

Diese und auch andere Erkrankungen verändern die Struktur und das funktionelle Verhalten des Uterusgewebes, wobei diese Änderungen ihrerseits mit einer abnormen Expression von Proteinen verbunden sein muss. Zur Betrachtung der veränderten Proteinexpression während eines Krankheitsprozesses erscheint die 2-DE-Technik in hervorragender Weise geeignet. Ziel der Proteomanalyse ist die Identifizierung von Marker-Proteinen, die charakteristisch für den spezifisch physiologischen und pathologischen Zustand all von einem rein diagnostischen Ansatz zu einem therapeutischen Konzept führen sollten.

In der vorliegenden Arbeit war zunächst eine standardisierte Methodik der 2-DE im speziellen Fall des Uterusgewebes zu erarbeiten und die Reproduzierbarkeit der Methode zu untersuchen. Anschließend sollte die Methode im Sinn einer differentiellen Proteomanalyse für die Suche nach Proteinen verwendet werden, die in den verschiedenen Gewebearten des

erkrankten Uterus im Vergleich gegen die Gesunde ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigen. Im Rahmen dieser Untersuchungen ist eine bestimmte Anzahl von Haus-Keeping-Proteine für die verschiedenen Gewebeschichten (Endometrium, subendometriales Myometrium und subseröses Myometrium) festzulegen und zu identifizieren. Als besonderer Untersuchungsansatz war überdies der Vergleich der verschiedenen muskulären Schichten (subendometriales und subseröses Myometrium) untereinander im Sinne einer weiteren Differenzierung als unterschiedliche Funktionseinheiten durchzuführen.

1.1. Die 2D-Polyacrylamid Gelelektrophorese (2D-PAGE)

1.1.1. Historischer Überblick der Methodenentwicklung

Die Bedeutung der Elektrophorese für die Proteinanalytik wurde zum ersten Mal von Tiselius¹ in seiner mit dem Nobelpreis ausgezeichneten Arbeit demonstriert. Daraus folgte die Entwicklung vieler Methoden wie der Papier- und Gelelektrophorese, der Molekularsieb-, Immun-, Disk- und SDS-Elektrophorese. Eindimensionale Trenntechniken wie die Disk- und die SDS-Elektrophorese sind leistungsfähige elektrophoretische Methoden zur Trennung und Charakterisierung von Proteinen. Diese Trenntechniken können jedoch auch im günstigsten Fall nur ungefähr 50-100 Proteine auftrennen. Für die Analyse von vielen hundert oder sogar 1000 Proteinen, wie sie in ganzen Zellen oder Geweben vorkommen, ist dieses Auflösungsvermögen unzureichend. Entsprechend dieser Trenntechnik für mehr extensive Analyse der Komplexsysteme wurde eine Methode für die Auftrennung gesamter Proteine entwickelt. Erst die Entwicklung der zwei dimensional Gelelektrophorese ermöglichte die Analyse komplexerer Systeme⁽²⁻⁴⁾. Mit Hilfe der **2D-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)** lassen sich auch komplexe Proteingemische aus biologischen Quellen detektieren und analysieren. Die Leistungsfähigkeit dieser Technik beruht auf der Proteinauftrennung mittels zweier von einander unabhängiger Kriterien. In der ersten Dimension erfolgt die Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt durch isoelektrischen Fokussierung, in der

zweiten Dimension entsprechend dem Molekulargewicht durch SDS-Elektrophorese. Die ersten Elektrophoresen, die Proteingemische nach diesem Prinzip auftrennten, wurden von Mercko und Stegemann⁵, sowie von Dale und Latner⁶ durchgeführt. Während die unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführte 2D-Elektrophorese (2-DE) der 69`er sich auf die Trennung löslicher Proteine beschränkte, erfuhr die Technik der 2D-Elektrophorese 1975, insbesondere durch O` Farrell⁷ und Klose⁸, die erstmals ganze Zellinhalte in hunderte bzw. tausende Proteinspots auftrennen konnten, eine entscheidende Wende. Seit 1975 hat die hochauflösende 2D-Elektrophorese ihre Leistungsfähigkeit und herausragende Rolle in der Proteinanalytik mit tausenden von Veröffentlichungen aus den Gebieten der Biochemie, klinischen Chemie, Molekularbiologie, Pharmazie, Medizin etc. bewiesen. Nichtsdestotrotz wird die 2D-Elektrophorese in weit weniger Labors durchgeführt als angenommen. Dies beruht nicht nur darauf, dass der apparative und experimentelle Aufwand nach wie vor groß ist und die Beherrschung der eindimensionalen Trenntechniken voraussetzt, sondern auch darauf, dass mit der erhöhten Auflösung auch erhöhte Ansprüche an der Reproduzierbarkeit der Methode gestellt werden müssen. Das Problem der Reproduzierbarkeit der 2D-Elektrophorese, besonders, wenn Ergebnisse unterschiedlicher Labors verglichen werden sollen, ist mehrfach beschrieben worden⁹. Ein erheblicher Teil der Probleme wurde während der Entwicklung der Methode durch Standardisierung der Arbeitsvorschriften, einschließlich der verwendeten Chemikalien und Apparaturen gelöst. Das nächste zu lösende Problem stellten die Positionsveränderungen der Proteinspots im 2D-Pherogramm in Abhängigkeit von den während der Fokussierung verwendeten Trägerampholyten dar. In den Anfängen der 2D-Elektrophorese war die isoelektrische Fokussierung mit freien Trägerampholyten nach O` Farrell die Verfahrensweise der Wahl. Die dabei auftretenden Probleme lassen sich im Prinzip jedoch alle auf Instabilitäten der durch freie Trägerampholyte erzeugten pH-Gradienten zurückzuführen. Ein wirkliches Gleichgewicht der isoelektrischen Fokussierung (IEF) lässt sich mit freien Trägerampholyten kaum erreichen, da es mit zunehmender

Fokussierungszeit zu einer Verschiebung des Gradienten zur Kathode (Kathoden-Drift) kommt, wobei im mittleren Bereich des pH-Gradienten ein pH Plateau entsteht und die basischen Proteine verloren gehen⁽¹⁰⁻¹¹⁾. Dies alles und die nur eingeschränkt erreichbare Uniformität von Trägerampholytpräparationen bedingen eine überaus subtile Zeit-, Temperatur- und Rezepturabhängigkeit von Proteinmuster, die diese Methode eher zu einer Angelegenheit für sehr erfahrene und geübte Spezialisten werden lässt. Ein weiteres Problem der isoelektrischen Fokussierung mit Trägerampholyte ist die Chargenvariabilität, wobei diese sich technologisch nicht vermeiden lässt, da Trägerampholyte ein heterogenes Synthesegemisch, entstanden aus Polyaminen und organischen bzw. anorganischen Säuren, sind. Das Problem der Trägerampholyt-IEF und der damit vorhandenen mangelnden Reproduzierbarkeit im 2D-Pherogramm konnte schließlich mit der Einführung immobilisierter pH-Gradienten¹² (IPG) gelöst werden. Man kann ohne Übertreibung sagen, dass die Einführung immobilisierter pH-Gradienten eine der wichtigsten Voraussetzungen für den Durchbruch der Proteomforschung war. Mit diesem Schritt wurden erhebliche Verbesserungen bezüglich der Herstellung und Geometrie der Fokussierungsgele, der praktischen Durchführung der isoelektrischen Fokussierung, sowie des Proteintransfers von der ersten auf die zweite Dimension erarbeitet, um 2D-Pherogramme von hoher Qualität zu erhalten⁷. In den folgenden Punkten sind die wesentlichen Merkmale, die die beiden Systeme unterscheiden, aufgeführt.

1- Der Verlauf (Linearität, Steigung, pH Bereich) des IPG ist unabhängig von der Produktionscharge, da für die Erzeugung eines pH-Gradienten anstelle eines heterogenen Synthesegemisches aus hunderten unterschiedlichen amphoteren Substanzen (Trägerampholyte) nur wenige, nämlich sechs Acrylamidderivate mit definierten pK Werten, benötigt werden. Damit lassen sich höchst reproduzierbare und definierte pH-Gradienten herstellen und die Spotverschiebung aufgrund synthesebedingter Variabilitäten des pH-Gradienten kann damit zum großen Teil ausgeschlossen werden.

2- Immobilisierte pH-Gradienten unterscheiden sich weiters von mit Trägerampholyten erzeugten pH-Gradienten durch die so genannten Immobiline (Acrylamidderivaten mit Amino- und Carboxylgruppen), die während der Herstellung mit der Acrylamidgelmatrix kopolymerisieren. So wird ein kovalent verankerter pH-Gradient erzeugt, der im elektrischen Feld weder auf- noch abgebaut werden kann. Der Gradient driftet somit auch nicht in Abhängigkeit von der Fokussierungszeit in Richtung Kathode, sondern ist unendlich stabil. Dies bedeutet, dass die Proteine ausreichend Zeit haben, zu ihren tatsächlichen isoelektrischen Punkten zu wandern, womit ein zeitunabhängiges Fokussierungsmuster entsteht. Daraus wiederum folgt die ausgeprägte Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Spotposition entlang der IEF-Achse im 2- Pherogramm.

3- Im Gegensatz zur Elektrophorese in Puffersystemen ist die Elektrophorese im pH-Gradienten (= IEF) eine Gleichgewichtsmethode. Im elektrischen Feld wandern die Proteine gemäß ihrer Eigenladung bis zu dem isoelektrischen Punkt, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Die isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten ist in Wahrheit keine echte Gleichgewichtsmethode, da der mit Trägerampholyten erzeugte pH-Gradient nicht stabil ist, so dass Proteine mit hohem Molekulargewicht und niedriger Eigenladung durch die Konkurrenz mit dem Kathodendrift niemals ihren isoelektrischen Punkt erreichen können. Im Gegensatz dazu ermöglicht die isoelektrische Fokussierung mit IPG eine echte Gleichgewichtsfokussierung mit stationären Proteinmustern, da der pH-Gradient durch Kopolymerisation in der Gelmatrix verankert ist. Die Proteine bilden nach Erreichen ihrer isoelektrischen Punkte konstante IEF-Muster, die über Stunden und Tage stabil sind.

4- Die maximale Auflösung der IEF mit Trägerampholyten erreicht etwa ein ΔpH von $0,01^{15}$ und mit IPG etwa ein ΔpH von $0,001^{16}$. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der Proteinauftrennung ebenfalls erhöht. Abbildung 3 demonstriert die oben genannten Punkte⁽¹³⁻¹⁴⁾.

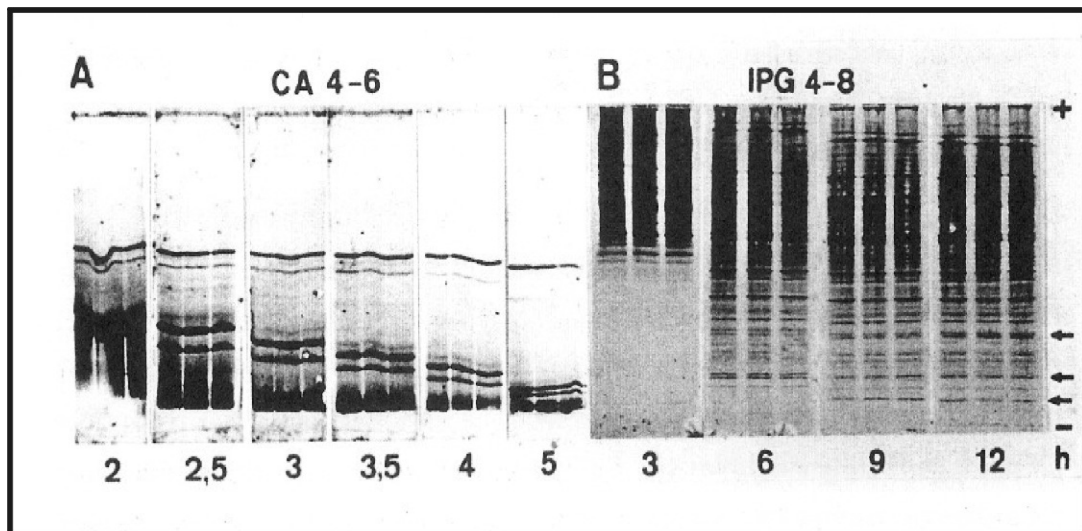


Abbildung 3: Vergleich der IEF mit Trägerampholyten (A) und immobilisierten pH-Gradienten (B), Proben: (A) Markerprotein, (B) Bohnensamenproteine. Aus Görg et al. 1987

1.1.2. Computerunterstützte Bildauswertung

Durch 2D-Gelelektrophorese ist möglich, eine große Zahl von Proteinen aufzutrennen. Diese Proteine müssen zunächst durch diverse Detektionsmethoden auf dem Gel visualisiert und anschließend ausgewertet werden. Der Vergleich von Gelen verschiedener Proben z.B. gesundes versus krankes Gewebe, Zellen vor und nach Zugabe eines Wirkstoffes, liefert wichtige Informationen über die Unterschiede der Proben auf der Ebene der Proteinexpression. Die subjektive visuelle Auswertung von 2-DE-Gelen anhand der Originale oder Photographien kann aufgrund der Komplexität der Spotmuster nicht durchgeführt werden. Außerdem würde sich eine solche Auswertung im wesentlichen auf die Erfassung qualitativer Unterschiede und eine teilweise semiquantitative Erfassung der Proteinmenge beschränken. Eine breite Anwendung der 2D-Gelelektrophorese wurde daher erst durch die computerunterstützte Bildauswertung ermöglicht. Erst dadurch wurde gesichert und umfassende qualitative und quantitative Informationen von einer Vielzahl von 2-DE-Gelen möglich. Computerunterstützten Bildauswertungssysteme⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ sind ein unerlässliches Werkzeug für die folgenden Punkte:

- Speicherung und Strukturierung der anfallende Datenmengen
- Schnell und gezielte Informationsbeschaffung bei der Analyse der durchgeführten Experimente
- Ergänzung und Weitergabe von Daten in Zusammenarbeit mit anderen Labors
- Erstellung von 2-DE-Proteindatenbank

Auf dem Markt werden mehrere solcher Auswertungssysteme, die unabhängig voneinander entwickelt wurden, angeboten.

- **PD Quest** **(Bio-Rad Laboratories, USA)**
- Image Master (Amersham pharmacia, Sweeden)
- Phoretix (Phoretix international, GB)
- 2-D Analyzer (Bio Image CO, USA)

Alle diese genannten Systeme sind nach dem gleichen Prinzip (Digitalisierung der Gele, Spoterkennung, Spotquantifizierung, Gelvergleich und Datenanalyse) aufgebaut, sie unterscheiden sich jedoch in den Hardwarekomponenten. Der erste Schritt der Bildauswertung ist immer die Umwandlung des 2D-Pherogramms in eine digitale Form (also Bilderfassung). Dabei werden die Absorptionswerte kleiner, benachbarter Gelregionen, sogenannte Pixel (picture element) gemessen und die Analogwerte in digitale Form, die der Computer interpretieren kann, transformiert. Dann folgt mit dem Bildauswertungssystem alle Prozesse der Bildanalyse. Die primäre Auswertung des Computers kann anschließend manuell adaptiert und verfeinert werden.

1.1.3. Limitation der Methode

Seit Einführung Mitte der 70er Jahre wurde die Methode der 2D-Gelelektrophorese in vielen kritischen Punkten stark verbessert, so dass sie nunmehr für die Detektion vieler verschiedener Typen von Proteinen verwendet werden kann. Trotz dieser ständigen Weiterentwicklung ist die Methode bis zum heutigen Tag jedoch immer noch nicht frei von

Limitationen. Ein nach wie vor nahezu ungelöstes Problem ist die Erfassung der membranständigen Proteine, also von Proteinen, die an oder in der Membran eingelagert sind. Etwa 30 % der Gesamtproteinmenge einer Zelle sind Membranproteine⁽¹⁹⁻²⁰⁾. Sie spielen eine zentrale Rolle in den verschiedenen zellulären Prozessen, wie dem Ionentransport, der Signaltransduktion, der Zelladhäsion und Metabolismus²¹. Membranproteine sind im Wesentlichen auf zwei Arten in der Membran verankert. Im ersten Fall ist die Polypeptidkette des Proteins vollständig in die Lipid-Doppelschicht eingebaut. Diese Proteine werden als integrale Membranproteine bezeichnet. Am Anfang der 80er Jahre wurden massive Anstrengungen zur Erfassung der integralen Membranproteine mittels 2-DE unternommen, in mehreren Arbeiten konnten erste Ergebnisse präsentiert werden⁽²²⁻²⁴⁾. Bisher gelang die Membranproteinanalyse jedoch nur in wenigen Ausnahmen. Ein wichtiger Teil der integralen Membranproteine wird offenbar durch die Verwendung der klassischen Harnstoff-Detergenzien-Mischung auf der 2-DE verloren²⁵. Mehrere Hypothesen zu diesem Phänomen wurden aufgestellt. So wurde von einer Gruppe vorgeschlagen, dass es während des Fokussierungsprozesses zu einer zu starken Wechselwirkung zwischen Membranproteinen und der Gelmatrix der IPG-Streifen käme²⁶, eine Ansicht, der inzwischen die meisten Experten widersprechen, da unter dieser Bedingung ansonst einige horizontalen Streifen auf einem Teil des Gels oder auf dem ganzen Gel aufgetreten werden kann²⁷, was bei vielen Untersuchungen nicht zu beobachten war. Ein andere Hypothese besagt, dass die Wechselwirkung mit der Gelmatrix des IPG-Streifens erst am isoelektrischen Punkt ausschlaggebend wird. In diesem Modell werden die Proteine zunächst fokussiert, werden aber am isoelektrischen Punkt unlöslich und können dann in der 2. Dimension (SDS-Gel) nicht transportiert werden. Diese Hypothese findet derzeit eine breitere Akzeptanz²⁸. Eine erfolgreiche Auflösung eines Teils von integralen Membranproteinen mittels 2D-Gelelektrophorese konnte von Charron et al.²⁹ demonstriert werden.

Diese Proteintypen können vom Standpunkt der Solubilität als einfache Membranproteine aufgefasst und als hydrophile Membranproteine bezeichnet werden. An Hand wertvoller Ergebnisse der beiden

dargestellten und noch weiterer Publikationen wurde festgestellt, dass die Problematik der Proteinauflösung in der 2-DE in erster Linie auf die Hydrophobizität der Membranproteine zurückzuführen ist. Die Beziehung zwischen der Protein-Hydrophobizität und der Wiedergewinnung solcher Proteine auf dem 2-DE-Gel wird durch den GRAVY-Wert (**GRAND AVERAGE of HYDROPATHICITY**) bestimmt. Membranproteine mit einem hohen, positiven GRAVY-Wert sind stark hydrophob und können mit derzeitigen Methoden auf dem 2-DE-Gel nicht dargestellt werden. Im Gegensatz dazu sind schwach hydrophobe (GRAVY-Wert $\leq +0,15$) oder Membranproteine mit überwiegend hydrophilem Charakter auf 2-DE-Gel sehr wohl dargestellt. Die GRAVY-Werte können nach Kyte und Doolittle³⁰ für alle Proteine in der SWISS-PROT Datenbank³¹ kalkuliert werden. Seit dem Anfang der 90er Jahre haben sich mehrere Gruppen von Wissenschaftlern mit der Problematik der hydrophoben Membranproteine intensiv beschäftigt und versuchten, die Auftrennung aller hydrophoben Membranproteinarten auf dem 2-DE-Gel zu verbessern. Dazu wurde im Lauf der letzten 10 Jahre eine große Anzahl von unterschiedlichen Detergenzien eingesetzt. Die Bemühungen in diesem Bereich zeigten jedoch bisher kaum Erfolg. Die Untersuchungen von einigen Gruppen (u.a. Rabilloud et al.) haben zwar gezeigt, dass die Solubilisierung der hydrophoben Membranproteine im großen Umfang durch eine geeignete Kombination von Chaotopen (Urea und Thiourea) und Detergenzien (oder Cocktail von Detergenzien) erleichtert werden kann³², wobei die Urea-Thiourea-Mischung in der Lösung bei den meisten Untersuchungen exzellente Ergebnisse ergab und die Proteinsolubilisierung während der Fokussierung mehrfach verbessert³³. Die Kombination von IPG mit Urea-Thiourea und Detergenzien, insbesondere zwitterionischen Detergenzien, gab die beste Solubilisierung für hydrophobe Membranproteine am isoelektrischen Punkt⁽³⁴⁻³⁷⁾. Die Verwendung von einigen wichtigen Detergenzien, insbesondere die nichtionischen und zwitterionischen Detergenzien mit kurzem linearen und hydrophoben Schwanzteil (Alkylschwanzteil), in Anwesenheit hoher Konzentration von Urea löste zunächst das Problem nicht, da diese Detergenzien mit hohen Konzentration von Harnstoff nicht kompatibel sind⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ und sie damit nur

eine schwache Effizienz bei der Solubilisierung hydrophober Membranproteine während der Fokussierung entwickeln können. Aufgrund der schlechten Lösbarkeit am isoelektrischen Punkt kommt es dann zur Präzipitation der Membranproteine. In der Folge zeigte sich, dass Detergenzien mit einem stärker polaren und längeren Alkylschwanzteil (12 oder mehr Kohlenstoffgruppen) eine deutlich höhere Effizienz in stark chaotropen Mischungen zeigen. Für die Verbesserung einer optimalen Solubilisierung von hydrophoben Membranproteinen wurden inzwischen drei verschiedenen Typen von Detergenzien (kompatibel zu hoher Konzentration von Urea) entwickelt, mit welchen die 2-DE weitgehend abgedeckt werden kann.

Der erste Typ besitzt einen Phenyl-Ring im hydrophoben Teil und einen polaren Oligooxyethylen-Kopfteil und wird von Triton (Triton X-100 und Triton X-114) vertreten. Der zweite Typ beruht auf einer komponierten Struktur vor allem CHAPS [(3-Cholamidpropyldimethylamino)-1-Propanosulfat] auf, bei welchen sich ein umfangreicher polyzyklischer Hydrophobenteil mit hydrophilem Sulfobetainteil verbindet. Dieser Detergenzien-Typ ist meist effizienter als der Triton-Type⁽⁴¹⁻⁴⁶⁾, und hat eine weite Popularität im Feld der 2-DE gewonnen. Es gibt auch andere Typen von Detergenzien wie SDS, Digitonin, C80 usw., die aber nur in seltenen Fällen verwendet werden.

1.1.4. Ausblick in der Zukunft

In den letzten Jahren wurden auf dem Gebiet der hydrophoben Proteinanalyse durch 2-DE einige Fortschritten erzielt. Trotz dieser bedeutsamen Fortschritten bleiben die Möglichkeiten für die Membranproteinanalyse mittels 2-DE beschränkt. Obwohl die Technik der 2-DE mit der Verwendung der IPG-Streifen (Aufladen von Proteinmengen im Milligramm-Bereich⁴⁷ und Proteinauflösung in weiten pH-Bereiche) einen Quantensprung erfahren hat und die Entwicklung vieler Detergenzien-Typen die Methodik zusätzlich bereichert hat, kann die Solubilisierung hydrophober Proteine während der Fokussierung immer noch nicht standardisiert werden. Die durch die Hydrophobizität entstandenen Probleme scheinen tatsächlich schwieriger zu lösen. Das Ziel

ist deswegen eine obere Grenze für die Proteinhydrophobizität für die 2-DE-Kompatibilität festzusetzen. Vielleicht lässt sich die Entwicklung neuer Detergenzien die Anwendbarkeit der Methode für solche Proteine noch verbessern. Eine völlig anderer Ansatz wäre die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, die für die Extraktion von stark hydrophoben Proteinen benutzt werden. Eine derartige Methode wurde von Molloy et al.³⁷ vorgestellt. Mit organischen Lösungsmitteln die stark hydrophoben Proteine extrahiert und anschließend mittels 2-DE aufgetrennt. Diese Methode wurde jedoch in der Folge nicht mehr weiter entwickelt.

1.2. Medizinischer Hintergrund

1.2.1. Makro- und Mikroanatomie des menschlichen Uterus

Der Uterus (Gebärmutter) ist ein birnenförmiges, etwa faustgroßes Organ, welches im kleinen Becken der Frau zwischen Blase und Mastdarm lokalisiert ist. Nach unten kommuniziert der Uterus mit der Vagina, nach oben setzt er sich in die Eileiter fort und ist damit über eine gemeinsame Bandaufhängung auch mit den Eierstöcken, den Ovarien, flexibel verbunden. Grob-anatomisch ist der Uterus von innen nach außen aus der Schleimhaut, dem Endometrium, dem muskulären Anteil, dem Myometrium, und dem Serosaüberzug aufgebaut. Zusätzlich unterscheidet man den Uteruskörper, das Corpus uteri, vom Gebärmutterhals, der Cervix⁴⁸. In den Tubenwinkeln geht das Corpus uteri in die Eileiter, die Tuben, über. Während seit langem bekannt ist, dass die Gebärmutter Schleimhaut sich entsprechend den hormonellen Schwankungen des weiblichen Zyklus monatlich auf- und abbaut und damit wesentliche Funktionen des Uterus im Rahmen des unmittelbaren Reproduktionsvorganges erfüllt, wurde bisher angenommen, dass die Muskulatur der Gebärmutter abgesehen von den Aufgaben bei der Geburt, im sonstigen Leben einer Frau in weitgehender Ruhe⁵⁰ verharrt. Rezente Ergebnisse aus der reproduktionsmedizinischen Forschung haben diese Ansicht jedoch zuletzt in Frage gestellt.

1.2.2. Das Endometrium

Das Endometrium ist eine die Gebärmutterhöhle auskleidende Schleimhautschicht. Es setzt sich aus einer basalen (Stratum basale) und einer oberflächlichen Schicht (Stratum functionale) zusammen, die wiederum in eine lumennahe „Zona spongiosa“ und in lumenferne „Zona compacta“ unterteilt werden kann. Das Stratum functionale wird während der Menstruation weitgehend abgestoßen. Die wichtigsten zellulären Bestandteile des Endometriums sind Epithelzellen, Stromazellen und die blutgefäßbildenden Zellen⁵⁰. Die Epithelzellen kleiden die Drüsen des Endometriums aus und setzen sich dabei bis auf die luminale Oberfläche des Endometriums fort. Die Zellen am Grund der Drüsen haben Stammzellcharakter, denn aus ihnen bilden sich im Lauf des Zyklus sowohl die Zellen der Drüsenschläuche als auch die luminalen Epithelzellen⁵¹. Im Gegensatz zu den Epithelzellen in den meisten anderen Organen sind die uterinen Epithelzellen mesenchymalen Ursprungs, was einige ihrer Funktionen erklären könnte, die für andere Epithelzellen untypisch sind⁵². Das endometriale Stroma besteht aus einer heterogenen Zellpopulation. Den wichtigsten Zelltyp stellen die stromalen Fibroblasten dar, die regionale und zyklusabhängige Unterschiede zeigen⁵³. Neben den Fibroblasten enthält das Stroma auch zahlreiche lymphoide Zellen, entweder als Einzelzellen im Stroma verteilt oder als drüsennahe, im Stratum basale eingelagerte zelluläre Aggregate⁵⁴. Die verschiedenen Komponenten des Endometriums interagieren miteinander durch komplexe parakrine Mechanismen und beeinflussen einander in ihrer koordinierten Entwicklung und Differenzierung innerhalb des Zyklus und der Schwangerschaft

1.2.3. Aufbau der Gebärmuttermuskulatur

Nach der klassischen Einteilung nach Wetzstein⁵⁵ gliedert sich die Gebärmuttermuskulatur in drei Schichten, das Stratum subvasculare, das Stratum vasculare und das Stratum supravasculare. Direkt an das Endometrium schließt sich eine Schicht zirkulär verlaufender

Muskelfasern, das Stratum subvasculare an. Diese beginnt kaudal in der Höhe der unteren Zervix und durchzieht das Corpus uteri und setzt sich über die Cornua uteri als tubare Ringmuskulatur in den Eileitern fort. Auf diese Schicht folgt das Stratum vasculare, welches mit seinen kreuz und quer vernetzten Fasern die Hauptmasse der Uterusmuskulatur ausmacht. Zuletzt schließt sich das Stratum supravasculare mit längs verlaufenden Muskelbündeln an. Diese Schicht wird vom visceralen Peritoneum, auch Serosa genannt, überzogen.

Vor kurzem konnte nun in immunhistochemischen Studien gezeigt werden, dass die Gebärmuttermuskulatur morphologisch und funktionell in zwei verschiedene Einheiten geteilt werden muss. Die schmale subendometriale, zirkulär verlaufende Muskelschicht des Stratum subvasculare zeigt sowohl embryologisch und morphologisch als auch biochemisch-funktionell deutliche Unterschiede zu den zwei außen liegenden Muskelschichten (Stratum vasculare und supravasculare nach Wetzstein). Die subendometriale Muskelschicht entwickelt sich gemeinsam mit dem Endometrium während des ersten Trimenons aus den paramesonephrischen Gängen. Die außen liegenden Muskelschichten des Uterus entwickeln sich erst im dritten Trimenon und zum Teil auch noch nach der Geburt aus dem den primordialen Uterus umgebenden mesenchymalen Bindegewebe⁵⁶. Die Ontogenese ist auch in diesem Fall ein Spiegel der Phylogenese, da der innere Teil der Gebärmutter in ähnlicher Form auch schon im Ovidukt der Vögel und Reptilien aufzufinden ist, während zusätzliche Muskulatur im Tierreich in Abhängigkeit von den aufzubringenden Gebärkräften auftritt und eine dem Menschen vergleichbare Schichtung regelmäßig erst bei den Säugern auftritt⁵⁷. Aus diesem Grund wird der innere Anteil, bestehend aus Endometrium und subendometrialem Myometrium mit dem Begriff „Archimetra“ den übrigen Anteilen des Uterus, welche nunmehr auch als „Neometra“ bezeichnet werden, gegenübergestellt. Abbildung 4 demonstriert in schematischer Darstellung das Konzept der Archimetra und Neometra⁵⁸.

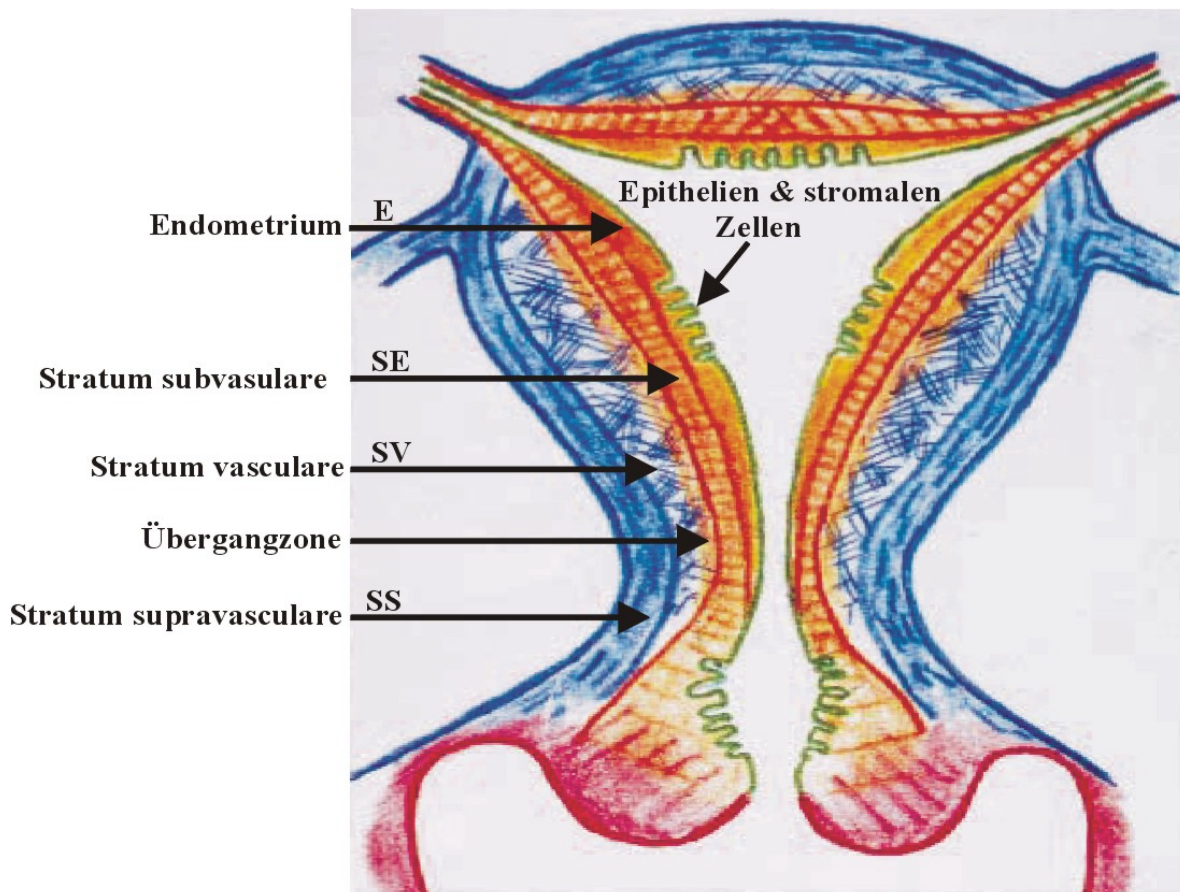


Abbildung 4: Ein schematischer Aufbau der Archimetra und Neometra innerhalb der Uterus. Zwischen Archimetra und Neometra ist eine Übergangzone miteinander vermischenden Muskelfasern

1.2.4. Physiologische Konzepte des menschlichen Uterus

Während die Neometra neben dem Schutz des Conceptus ganz offensichtlich dem Aufbringen der Gebärfähigkeit dient und in ihrer Funktion weitgehend von Conceptus, also dem Feten und der Plazenta gesteuert wird, erfolgt die funktionelle Kontrolle der Archimetra durch das Ovar und findet ihr biochemisches Korrelat in einer zyklischen Expression der Östradiol- und Progesteronrezeptoren⁵⁷. So wurde in den Komponenten der Archimetra (Endometrium und subendometriales Myometrium) eine zyklische Schwankung dieser Steroidrezeptoren nachgewiesen⁽⁵⁹⁻⁶³⁾, während in der Neometra eine konstant hohe Rezeptorexpression vorliegt⁵⁷. Bei der Schwangerschaft erfordert auch das Wachstum und die Ruhigstellung der Neometra eine konstant hohe Expression beider Steroidhormonrezeptoren. Auch die immunhistochemischen Befunde der Postmenopause zeigen, dass eine hohe Expression der Steroidrezeptoren

offenbar konstitutiv für alle uterinen Schichten ist⁶⁴. Die zyklischen Schwankungen in den Schichten der Archimetra sind damit anscheinend weitgehend die Folge einer Downregulation durch Progesteron⁶⁵. Insgesamt unterliegen sämtliche Komponenten der Archimetra während des Zyklus erheblichen strukturellen und biochemischen Veränderungen, die die Archimetra in die Lage versetzen, ihre Aufgabe im Rahmen der Reproduktion zu erfüllen⁶⁶. Die schmale subendometriale Muskelschicht wurde als funktionelles Substrat einer zyklusabhängigen Peristaltik der Gebärmutter identifiziert, der offenbar eine zentrale Bedeutung beim Befruchtungsvorgang zukommt. Die Kontraktionen der Gebärmutter ändern sich im Verlauf des Zyklus in Richtung, Intensität und Frequenz in Abhängigkeit von der Konzentration des Östradiols und des Progesterons. Während der Menstruation laufen die peristaltischen Wellen vom Dach der Gebärmutter in Richtung Muttermund und dienen zu diesem Zeitpunkt dem Transport der abgestoßenen Gebärmutterschleimhaut nach außen. Schon gegen Ende der Menstruation treten diesen entgegenlaufende Wellen, welche vom Muttermund in Richtung Eileiter laufen, auf. Diese verstärken sich bis zum Zeitpunkt des Eisprungs unter Östrogeneinfluß immer mehr⁶⁷. Die Funktion der zerviko-fundalen Peristaltik dient dem gerichteten Spermientransport. Während der Gelbkörperphase tritt unter Progesteroneinfluß die Gebärmuttermuskulatur in eine Ruhephase ein, die die Implantation der Blastozyste ermöglicht. Mit dem Progesteronabfall vor Beginn der Menstruation werden erneut fundo-zervikale Kontraktionen ausgelöst. Aktuellste Untersuchungen zeigen, dass Störungen dieser peristaltischen Funktionen als Ursache der weiblichen Sub- bzw. Infertilität wohl ebenso eine Rolle spielen, wie bei der Entstehung gynäkologischer Erkrankungen, wie etwa der Endometriose.

1.2.5. Steroidhormonrezeptoren im Endometrium

Die zyklischen Schwankungen der Steroidhormonrezeptoren werden im folgenden anhand der molekularen Grundlagen der Steroidhormoneffekte in der Archimetra beschrieben. In der ersten Zyklushälfte findet unter dem Einfluss von Östradiol die Proliferation endometrialer Komponenten statt.

Der durch Östradiol induzierte Östrogenrezeptor bewirkt diese Veränderungen sowohl direkt, d.h. durch Induktion von Genen, die für die Proliferation verantwortlich sind, als auch indirekt, d.h. durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie dem proliferationsfördernden Faktoren AP-1 (aktiviertes Protein 1)⁶⁸. Dieser im Endometrium produzierte und durch Östrogene aktivierte Faktor stellt eines der proliferationsfördernden Gene in der ersten Zyklushälfte dar⁶⁹. Der aktivierte Östrogenrezeptor stimuliert auch die Expression des Genes für den Progesteronrezeptor und schafft damit die Voraussetzung für die Progesteronwirkung⁷⁰. Daneben sprechen neueste Erkenntnisse dafür, dass auch in der ersten Zyklushälfte der von Progesteron noch nicht besetzte Rezeptor eine funktionelle Rolle in der endometrialen Physiologie spielen könnte, indem er nämlich durch Interaktion mit dem genannten AP-1 die endometriale Proliferation zusätzlich zu Östradiol stimuliert⁷¹. In der zweiten Zyklushälfte produziert das Ovar zusätzlich Progesteron, das an die unter Östrogeneinfluss gebildeten Progesteronrezeptoren im Endometrium bindet. Dadurch wird die durch Östradiol bewirkte endometriale Proliferation gehemmt. Die proliferationshemmende Wirkung des durch Progesteron besetzten Progesteronrezeptors besteht einmal in der direkten Downregulation von proliferationsfördernden Genen (z.B. Östrogenrezeptor), zum anderen in der Hemmung des proliferationsinduzierenden AP-1-Transkriptionsfaktors⁷¹. Progesteron hemmt nicht nur die weitere Proliferation des Endometriums, sondern bewirkt auch dessen Differenzierung. Dieser als Transformation bezeichnete Vorgang hat eine Bedeutung für die Dezidualisierung und für eine mögliche Implantation⁷² und verursacht jene morphologische Veränderung des Endometriums. Die oben genannten physiologischen sowie morphologischen Veränderungen des Endometriums, die man unter dem Begriff sekretorische Umwandlung zusammenfasst, werden in der Abbildung 5 genauer demonstriert.

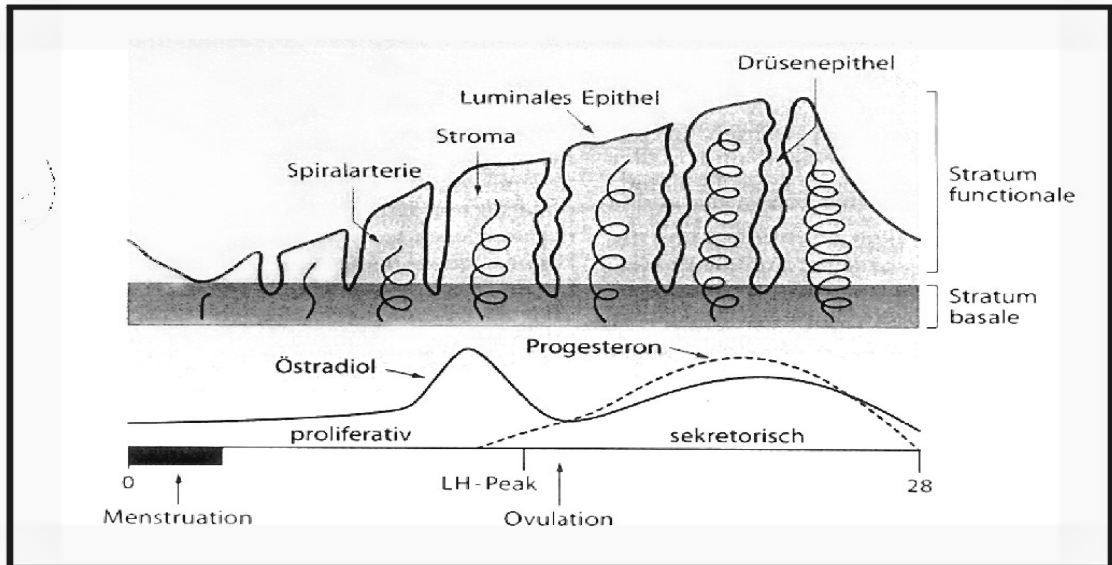


Abbildung 5: Schematische Darstellung des zyklischen Aufbaus von Endometrium, hier zeigt die morphologische Veränderung der Endometriumdüse während der beiden Zyklusphasen (Proliferations- und Sekretionsphase)

1.3. Häufige Erkrankungen des Uterus: Uterus myomatosus (Syn.: Leiomyomatosis uteri)

Myome sind vom Gebärmuttermuskel ausgehende gutartige Tumoren in der Gebärmutter. Da sie von glatter Muskulatur ausgehen, werden sie auch als **Leiomyome** bezeichnet. Das Leiomyom des Uterus stellt die häufigste Geschwulstbildung bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter dar, generell nimmt man ab einem Lebensalter von über 35 Jahren eine Inzidenz von zwischen 20-50 % an⁷³. Myome haben sowohl makroskopisch als auch histologisch ein charakteristisches Erscheinungsbild. Am Präparat fällt zunächst das gut abgegrenzte Tumorgewebe mit der starken kapselartigen Außenschicht komprimierter Muskelfasern auf. Ähnlich wurde histologisch ein typisches Geflecht glatter spindelartiger Muskelfasern mit einer unterschiedlichen Menge von eingelagertem kollagenem Gewebe gezeigt, und makroskopisch kommt es zumeist zu einer Hyalinisierung des Kollagens. Leiomyome können in allen Schichten des Uterusmuskels entstehen und wachsen. Auf Grund der Positionierung werden folgende Subtypen unterschieden:

- Submuköse Myome: liegen direkt unter der Schleimhaut des Uterus und verursachen schon bei kleinem Durchmesser Blutungsstörungen, Dysmenorrhoe, Subfertilität und eine verstärkte Abortneigung.
- Intramurale Myome; die Knoten befinden sich in der mittleren Muskelschicht des Uterus. Größere intramurale Myome können ebenfalls zu schmerzhaften und verstärkten Regelblutungen führen.
- Subseröse Myome liegen am äußeren Rand der Muskelschicht direkt unter dem Bauchfellüberzug des Uterus. Diese verursachen meist nur im Falle einer erheblichen Ausdehnung Beschwerden.
- Intraligamentäre Myome wachsen in die seitlich des Uterus gelegenen Bindegewebeschichten der Parametrien ein, dort können sie auf Blutgefäße bzw. den Harnleiter drücken und zu entsprechenden Beschwerden führen.

Die verschiedenen möglichen Lokalisationen von Myomen im Uterus werden in der Abbildung 6 gezeigt.



Abbildung 6: erkranktes Uterus mit verschiedenen Typen der Myome, (1) intramurales Myom, (2) subseröses Myom, (3) submuköses Myom

1.3.1. Ätiologie und Pathogenese

Die eigentliche Ursache für die Entstehung von Leiomyomen ist nach wie vor nicht bekannt. In den Mittelpunkt des Interesses zu ätiologischen und pathophysiologischen Überlegungen sind in letzter Zeit besonders die Regulations- und Steuerungsfaktoren des Myomwachstums gerückt. Fest steht, dass Myome monoklonalen Ursprungs sind und dass im Uterus die einzelnen Tumorknoten unabhängig voneinander entstehen. Unumstritten ist jedoch noch immer der Einfluss der Sexualhormone Östrogen und Progesteron auf das Myomwachstum. Progesteron steigert offenbar die Mitoseaktivität der Tumoren besonders bei jüngeren Frauen, wobei der genaue Mechanismus und die Rolle von Wachstumsfaktoren unklar sind.

Zusätzlich wird dem Progesteron eine Rolle bei der Downregulation der Apoptose zugeschrieben. Östrogen steigert möglicherweise die Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten und von Faktoren, die deren Expression stimulieren. Zwischengeschaltet sind dabei jedoch eine ganze Reihe von Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-I+II, PDGF und Prolaktin), deren Rezeptoren im Tumorgewebe zu finden sind. Interessant ist, dass bisher bei etwa 1/3 der Myome chromosomale Aberrationen wie Translokation, Deletion oder Trisomie nachgewiesen werden konnten. Eine ganze Reihe von Genen kann von diesen Mutationen betroffen sein, unklar ist jedoch noch immer, ob und wie die chromosomalen Veränderungen das Wachstum der betroffenen Myome beeinflussen.

1.3.2. Therapie

Die Behandlung uteriner Leiomyome erfolgt in erster Linie operativ. Hierbei ist in vielen Fällen bei noch bestehendem Kinderwunsch eine Operation unter Erhaltung der Gebärmutter möglich. Bei hartnäckigen Blutungsstörungen oder sehr ausgedehnten Myomen kann jedoch als ultima ratio auch die Entfernung der gesamten Gebärmutter notwendig werden. Medikamentöse Therapieansätze konnten sich bisher in der Klinik nicht durchsetzen. Versuche der medikamentösen Therapie von Leiomyomen durch die Verabreichung von Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten (GnRH-Analoga) sowie Progesteronrezeptor-Antagonisten führten zwar zunächst zu einer Schrumpfung der Myomknoten. Unmittelbar nach dem Absetzen der Therapie kam es jedoch zu einer erneuten Größenzunahme der Tumore. In histologischen Untersuchungen konnte inzwischen dementsprechend nachgewiesen werden, dass es unter GnRH-Therapie lediglich zu einer Abnahme der Extrazellulärsubstanz, aber nicht zu einer Reduktion der Zellzahl im eigentlichen Tumorgewebe kommt. Semikonservative Behandlungsversuche mittels arterieller Embolisation werden aufgrund von wechselnden Erfolgsraten und möglichen Komplikationen ebenfalls kontroversiell beurteilt und haben bisher keine breite Anwendung gefunden.

Ergebnisse

2.1. Methodenerarbeitung

Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese ist s.o. eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung der Proteinexpression in komplexen biologischen Systemen. Die Anwendung der Methode setzt jedoch die strikte Beachtung einiger kritischer Punkte voraus, ohne die eine reproduzierbare Auftrennung der komplexen Proteingemische unter Beibehaltung der qualitativen und quantitativen Verhältnisse nicht zu erreichen ist. Daher wurden auch im Falle des vorliegenden Forschungsprojektes zunächst die kritischen Parameter evaluiert und die entscheidenden Schritte hernach einer sorgfältigen Methodenoptimierung unterzogen, bevor die differentielle Untersuchung der uterinen Gewebsarten stattfand.

Die drei folgenden Punkte waren zu optimieren:

- 1) Probenherstellung
 - a) Etablierung des Zellaufschlusses von Uterusgewebe
 - b) Etablierung der Proteinsolubilisierung
- 2) Isoelektrische Fokussierung
- 3) 2. Dimension (SDS-PAGE)

2.2. Probenvorbereitung

Es existiert bis heute leider keine einsetzbare Methode der Probenvorbereitung, die für alle Probenmaterialien Gültigkeit besitzt. Idealerweise sollte eine gelungene Probenvorbereitung für die 2D-Elektrophorese dazu führen, dass die Proteine des Ausgangsmaterials komplett gelöst, deaggregiert, denaturiert und reduziert vorliegen. Die

störenden Substanzen wie Lipide, Nukleinsäuren, Phenole und Salze, die die Qualität der 2D-Elektrophorese beeinflusst, sollte entfernt werden.

2.2.1. Probengewinnung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Gewebeproben von 18 regelmäßig zyklisierten Patientinnen untersucht, die sich aus verschiedenen Gründen einer Gebärmutterentfernung unterziehen mussten. Die Auftrennung der Proben in die verschiedenen Gewebsschichten erfolgte jeweils unmittelbar nach Gewinnung des Operationspräparates. Bei einer ersten kritischen Analyse der Abhängigkeit der Probenqualität von der Operationsdauer bzw. der Zeitdauer von der Unterbindung der Blutversorgung bis zur Probengewinnung zeigte sich eine ausreichende Stabilität des Systems im gegebenen Zeitrahmen, so dass abhängig von der Probengewinnung eine ausreichende Reproduzierbarkeit gegeben war.

2.2.2. Zellaufschluss

Der Zellaufschluss der Probe bildet einen zentralen Punkt in der Methode der 2D-Elektrophorese, da ein hohes Risiko besteht, einen großen Teil Proteine schon während der ersten Probenbearbeitung zu verlieren. Aus diesem Grund wurde die Methodik der Probenaufarbeitung optimiert. Während die Schleimhaut der Gebärmutter (Endometrium) aus einem vergleichsweise lockeren Verband eher kleiner Zellen besteht, handelt es sich beim muskulären Gewebe um ein dichtes Geflecht fest verbundener und großer Zellen, wobei hier sogar die zwei unterschiedlichen untersuchten Muskelschichten (die zirkulär verlaufenden Fasern des subendometrialen gegenüber dem netzartig verflochtenen subserösen Myometrium) ein verschiedenes Verhalten zeigten. Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaues dieser Gewebe mussten unterschiedliche Wege der Probenaufarbeitung entwickelt und evaluiert werden, wobei sich besondere Probleme daraus ergaben, dass aus Gründen der Probenkonservierung die Proben im tiefgekühlten Zustand bearbeitet werden mussten.

2.2.2.1. Zellaufschluss durch Mörsern

Das Prinzip dieser Methode ist die Pulverisierung der Uterusprobe in gefrorenem Zustand. Die Bearbeitung des Endometriumgewebes verlief bei allen Patientinnen problemlos. Aus 250 mg Gewebestück konnten etwa 200 mg Pulverprobe gewonnen werden. Die Qualitäten der 2-DE-Gele von verschiedenen Präparationen derselben Gewebeproben von Endometrium zeigten keine beträchtlichen Unterschiede. Schwierigkeiten traten jedoch beim Zellaufschluss von Myometrium, und zwar mehr beim netzförmig verlaufenden subserösen (SS-Gewebe) als beim zirkulär verlaufenden subendometrialen (SE-Gewebe) Gewebe auf. Myometrium konnte auf Grund seiner Struktur nur schlecht pulverisiert werden. Die Ausbeute aus 250 mg Rohprobe betrug oft nur bis zu 25 mg Pulverprobe, was für eine weitere Bearbeitung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu wenig war. Da die Uterusproben aller Gewebeschichten für die geplante differentielle Proteomanalyse zur Gewährleistung vergleichbarer Bedingungen grundsätzlich gleich bearbeitet werden müssen, konnte diese Methode im Rahmen dieser Untersuchungen nicht weiter verwendet werden.

2.2.2.2. Zellaufschluss mit der Schwenkmühle

Das Grundprinzip dieser mechanischen Methode ist identisch mit dem der vorherigen Methode. Die Bearbeitung des Uterusgewebes aller Schichten konnte problemlos ausgeführt werden, sowohl Endometrium als auch Myometrium wurden vollständig pulverisiert. Alle Proben nahmen jedoch im Zuge der Bearbeitung mit der Schwenkmühle eine dunkelgraue Farbe an. Die Qualität der nach dieser Methode der Probenaufarbeitung erhaltenen 2-DE-Images war durch die Veränderungen der Probe stark beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde auch diese Methode nicht weiter für den Zellaufschluss verwendet. Die Abbildung 7 zeigt ein Beispiel.



Abbildung 7: 2-DE-Gel aus Endometrium einer menschlichen Uterusprobe, die mit der Schwenkmühle aufgearbeitet ist. 100 μ g Protein in IPG-Streifen 3-10NL fokussiert, 20cm SDS-Gradientengel 10-15%..

2.2.2.3. Zellaufschluss mittels Ultraschall

Aufgrund der oben beschriebenen Probleme beim Zellaufschluss mittels etablierter Methoden wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine neue Aufschlussmethode entwickelt. Diese bildete die Grundlage für die schonende Aufarbeitung des zähen Muskelgewebes ohne größere Proteinverluste. Abbildung 8 zeigt die Qualität der 2-DE-Images für die drei verschiedenen uterinen Gewebeschichten, die mit der neu entwickelten Methode homogenisiert wurden.

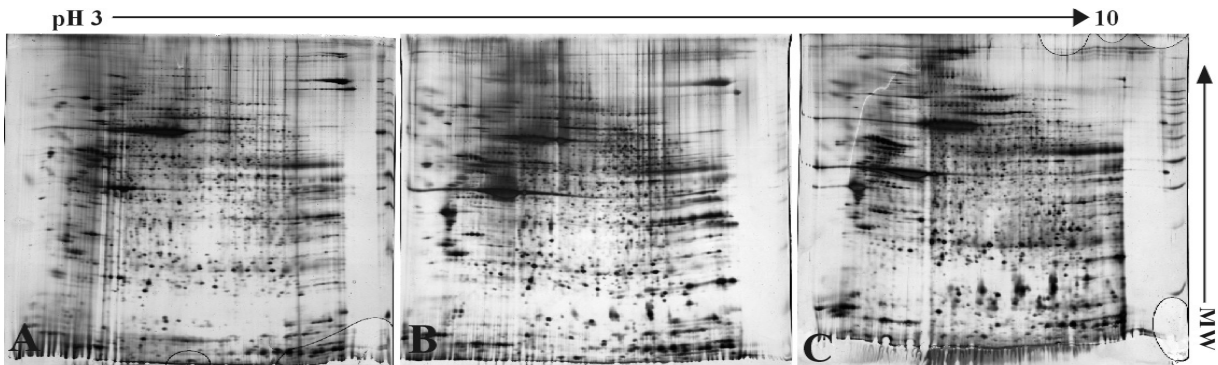


Abbildung 8 : 2-DE-Images aus dem Uterusgewebe, 100µg Protein in IPG-Streifen 3-10NL fokussiert, 20cm SDS-Gradientengel 10-15%, (A) Gel aus Endometrium, (B) aus SE-Gewebe und (C) aus SS-Gewebe.

Somit wurde dieses Verfahren als optimale Standard-Methode für den Zellaufschluss und die Homogenisierung der Uterusproben etabliert. Die Methode setzt sich aus folgenden Hauptschritten zusammen

- 1) Das Gewebe wird in kleine Stücke geschnitten und in 10-fachen Überschuss (w/v) von Lysepuffer eingebracht.
- 2) Die Gewebestücke werden für 3 min. stufenweise bis 13 000 rpm. mit dem Ultra-Turrax zerkleinert
- 3) Anschließend wird die Probe für 1.5 min. mit der Ultraschallpistole unter Kühlung homogenisiert.

2.3. Proteinsolubilisierung

Der Solubilisierungsprozess der Probe für die 2D-Elektrophorese hat primär mehrere Ziele zu erreichen:

1. Die Auflösung von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Diese umfasst die Spaltung von Disulfidbindungen ebenso, wie die Zerstörung aller nichtkovalenten Wechselwirkungen. Davon sind sowohl Protein-Protein Wechselwirkungen als auch Interaktionen zwischen dem Protein und Nicht-Proteinkomponenten, wie Nukleinsäuren oder Lipide, betroffen.
2. Verhinderung artifizieller Modifikationen der Polypeptide im Solubilisierungsmedium.
3. Beseitigung von Substanzen, die in der 2-D-Elektrophorese stören können (z.B. Nukleinsäuren, Proteasen etc.)

4. Stabilisierung der Proteine für den 2-DE-Prozess

Wesentlich ist das Solubilisierungsmedium weiters zur Vorbereitung des isoelektrischen Fokussierungsschrittes. Durch die Wahl des Solubilisierungsmediums muss drei Problemen begegnet werden:

- a) Schon während der initialen Solubilisierung der Probe im Lysepuffer ist die Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen mit weit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI) und/oder zwischen den Proteinen und störenden Verbindungen wie Nukleinsäuren wesentlich, da derartige Effekte zur schwachen Solubilisierung und damit zum Verlust einiger Proteine führen können.
- b) Während des Eintritts der Proteinprobe in die fokussierende Gel-Matrix (also im Rehydrierungspuffer) könnte ein Anhäufungseffekt durch den Übergang zwischen flüssiger Phase und Gelphase mit höherem Reibungskoeffizient entstehen. Eine derartige Anhäufung erhöht die Konzentration der Proteine und führt zur vorzeitigen Präzipitation.
- c) Am, bzw. in der Nähe des isoelektrischen Punktes besteht naturgemäß ein Minimum der Proteinsolubilisierung.

2.3.1. Die Zusammensetzung des Lysepuffers

Um unter Berücksichtigung der ersten beiden Punkte optimale Puffersysteme zu finden, müssen zunächst die Eigenschaften des zu bearbeitenden Gewebes (Uterus) sowie die möglichen störenden Substanzen in Betracht gezogen werden. Im Fall von muskulärem Uterusgewebe handelt es sich um ein sehr hartes, zähes Gewebe. Zur Solubilisierung von Proteinen aus solchem Gewebe wird in der Literatur häufig eine Lösung aus hoch konzentrierten Harnstoff (8 M Urea) und 2 % zwitterionische Detergenzien wie CHAPS empfohlen⁷⁴, in der CHAPS für das Herauslösen der hydrophoben Proteine (einige integrale und die meisten peripheren Proteine) sowie die Verminderung von Protein-Protein-Wechselwirkungen zuständig ist. Die Löslichkeit der cytosolischen Proteine in der Probe soll laut Literaturen durch Zugabe von 20 mM Tris

erhöht werden⁷⁵. Diese Lösung ist aber nicht in der Lage, alle störende Komponenten (wie Nukleinsäuren und Protease) in der Probe zu beseitigen. Nukleinsäuren und Proteasen sind jedoch die wichtigsten allgemeinen Störfaktoren in der 2-DE-PAGE. Die Nukleinsäuren haben als Polyanionen und oft auch aufgrund der Größe der Fragmente einen ganz erheblichen Einfluss auf die Trenneigenschaften elektrophoretischer Methoden. Sie erzeugen hier unreproduzierbare Artefakte sowie eine drastische Verminderung der Trennschärfe, indem sie während der isoelektrischen Fokussierung durch elektrostatische Wechselwirkung gleichzeitig direkt an Ampholyte und Proteine binden. Die gebildeten Komplexe beeinflussen zudem aufgrund ihrer elektronischen Eigenschaften die Leitfähigkeit in bestimmten Zonen des Gelstreifens oder verstopfen darüber hinaus rein mechanisch die Poren der Gele⁽⁷⁶⁻⁷⁷⁾. Makroskopisch lässt sich die reichliche Anwesenheit von Nukleinsäuren in der Probenlösung durch ein dickflüssiges Erscheinungsbild der Proteinproben nach der Homogenisierung (gelierte Probenlösung) erkennen. Der Einfluss der Nukleinsäuren auf die Qualität der Proteinauflösung im Gel wird in der Abbildung 9 gezeigt.

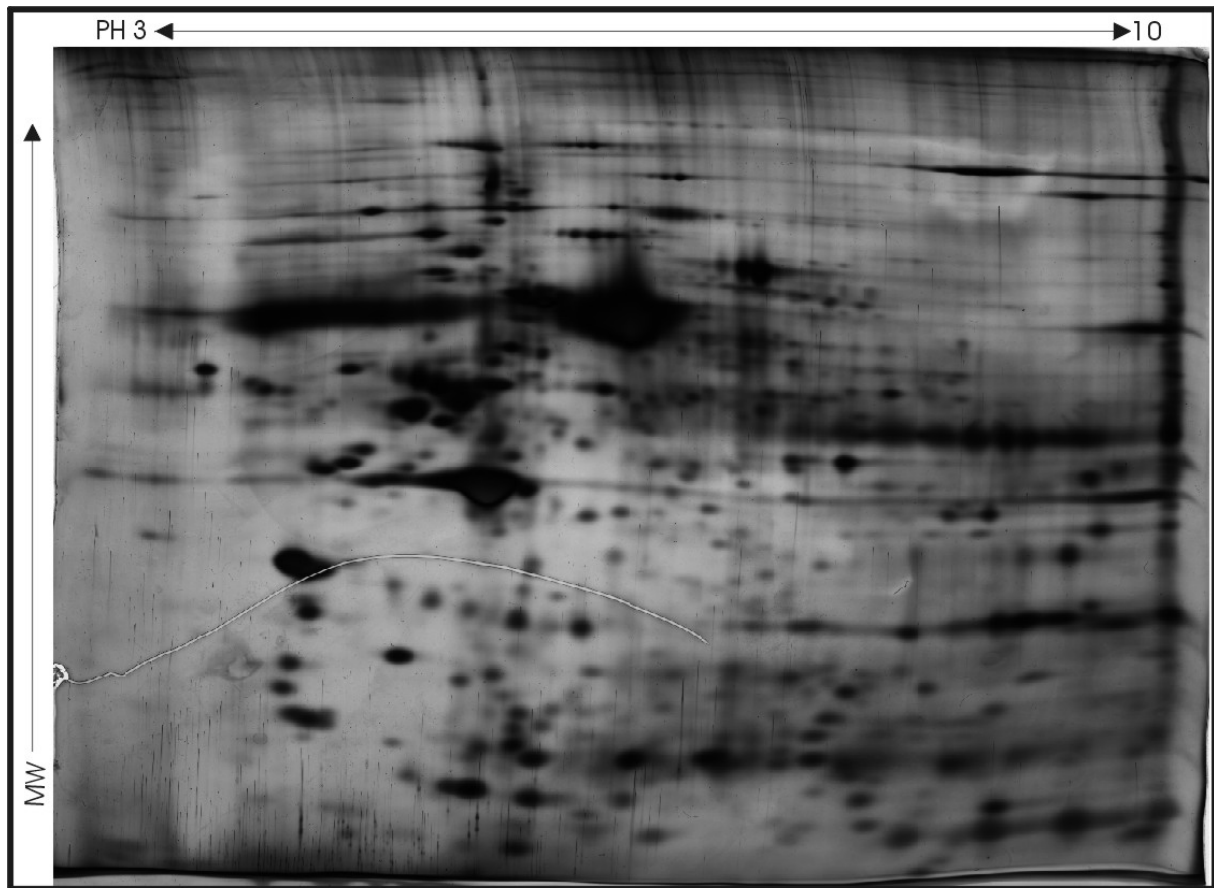


Abbildung 9: 2-DE-Gel aus Endometrium eines menschlichen Uterus, zeigt der Einfluss der Nukleinsäure auf die Proteinauflösung in der 2D-Gelelektrophorese, 100µg total Protein, 20 cm SDS-Gradientengel, 18 cm IPG-Streifen pH 3-10NL

Die hohe Nukleinsäurelast führt im vorliegenden Fall zu ausgeprägten Artefakten und zu einer schlechten Auflösung.

Die Lösung dieses Problems konnte durch zwei unterschiedliche Ansätze in vergleichbarer Qualität erreicht werden.

- Verdauung der Nukleinsäuren durch Zugabe von Nukleasemischung (DNase und RNase) zum Lysepuffer, gefolgt von TCA-Präzipitierung des verdauten Nukleinsäureproduktes.
- Zentrifugation der Proteinlösung bis zu 45 min. bei hoher Drehzahl (25 000 rpm.).

Aufgrund der geringeren Kosten wurde in der Folge die Zentrifugation bei 25000 rpm. für die Beseitigung der Nukleinsäuren verwendet.

Der letzte kritische Punkt, der während der Proteinextraktion aus dem Uterusgewebe zu berücksichtigen ist, ist die Proteaseaktivität, durch die einige Proteinfamilien komplett degradiert werden können. Die vollständige Protease-Inhibition kann basierend auf ihrer Grundreaktivität gegenüber der Peptidbindung auf folgendem Weg erfolgen:

Durch Zugabe von 8 M Harnstoff sowie 20 mM Tris in den Lysepuffer bekommt die Proteinlösung basische Eigenschaften, in der lysosomale Proteasen gehemmt werden, da lysosomale Proteasen im denaturierten Zustand nur im sauren Milieu aktiv sind. Dieser Schritt allein ist aber nicht ausreichend, um alle Proteasen zu inhibieren, deshalb wird meistens ein Cocktail von Protease-Inhibitoren zum Lysepuffer gegeben, um auch die anderen Proteasen (Serin- und Trypsin-Protease sowie Chymotrypsin) vollständig zu hemmen. Im allgemeinen enthält dieser Cocktail sowohl kompetitive (peptidische) als auch irreversible bindende Inhibitoren⁷⁸. Der derzeit am meisten verwendete irreversible Inhibitor für Serin-Proteasen ist bis zu 0.5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluorid). Dieser ist in der Lage das aktive Zentrum der Serin-Protease anzugreifen und komplett zu hemmen. Die Verwendung von PMSF ist jedoch nicht ohne Nachteil:

- PMSF ist in Wasser schwer löslich, so dass mit Hilfe anderer Substanzen (Aceton oder Ethanol) seine Löslichkeit erhöht werden muss.
- PMSF ist bei Raumtemperatur instabil (Halbwertszeit von 30 min.).
- Einige Serinproteasen sind resistent gegen PMSF.

Einige dieser Nachteile können durch gleichzeitige Zugabe von zusätzlichen irreversiblen Inhibitoren, wie zum Beispiel 0.05 mM TLCK (Tosyl-Lysyl-Chloromethyl-Keton) und 0.05 mM TPCK (Tosyl-Phenylalanyl-Chlormethyl-Keton), beseitigt werden. Der erste Inhibitor ist spezifisch für die Inhibition von Trypsin und der andere für Chymotrypsin. Wichtig ist, die Inhibitoren in der angegebenen niedrigen Konzentration

und erst kurz vor Solubilisierung der Proteine zum Lysepuffer zu geben, damit sie ihre Aktivitäten behalten können.

Die vollständige Zusammensetzung des Lysepuffers für die Proteinextraktion aus dem Uterusgewebe ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Konzentration	Substanz
8 M	Harnstoff (Urea)
2 %	CHAPS
20 mM	Tris
0.5 mM	PMSF
0.05 mM	TLCK und TPCK

Tabelle 1: Zusammensetzung des Lysepuffers für Proteinextraktion

2.3.2. Die Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers

Der nächste kritische Punkt in der Methode der 2-DE ist die Solubilisierung der Proteine während der isoelektrischen Fokussierung, also die Auflösung der Uterusproteine im Rehydrierungspuffer. Zur Evaluierung und Standardisierung des Rehydrierungspuffers wurden hier einige kritische Parameter untersucht, durch die die isoelektrische Fokussierung wiederum stark beeinträchtigt werden kann. Im allgemeinen wird die Auflösung der hydrophoben Proteine (einige periphere und integrale Proteine) in der 2-DE als sehr kritisch gesehen, da diese Proteine meist schon zur Präzipitation in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes neigen. Dies führt zu Proteinverlust sowie schlechter Proteinauflösung in der 2-DE. Die Löslichkeitsprobleme der hydrophoben Proteine, insbesondere der peripheren Proteine, wurden in großen Umfang durch den Zusatz von 2 M Thioharnstoff zur 7 M Harnstoff-Lösung als chaotrope Verbindung und die Anwesenheit von einem zwitterionischen Detergenzien (etwa 4 % CHAPS)⁷⁹ stark minimiert. Der Thioharnstoff

erhöht den Denaturierungsgrad der Proteine und vermindert die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinen⁸⁰. Diese Maßnahmen sollen zu einem erhöhten Wiederfindungsgrad der hydrophoben Proteine auf den 2-DE-Gelen führen. Auf diese Weise konnte tatsächlich ein großer Teil der Membranproteine, insbesondere der peripheren Proteine aufgelöst werden⁸¹. Integralen Proteine sind in die Membrandoppelschicht hydrophob eingelagert. Negative Effekte einer derartigen Kombination von Detergenzien und Harnstoff sind jedoch nicht auszuschließen (z.B. Proteinpräzipitation). Als Ursache einer derartigen Präzipitation wird die Bildung nicht stöchiometrischer Komplexe aus Harnstoff und der linearen Alkyl-Kette des Detergens vermutet, die schlechter löslich sind als freier Harnstoff. Dieser die Präzipitation auslösende Effekt tritt oft mit der Erhöhung der Alkyl-Kettelänge und einer gleichzeitig hohen Harnstoffkonzentration auf. Aus diesem Grund können etliche nichtionische oder zwitterionische Detergenzien in Anwesenheit von hochkonzentriertem Harnstoff nicht verwendet werden. Dies limitiert wiederum die Auswahl der Detergenzien auf solche mit einem kurzen oder verzweigten Alkyl-Teil, welche jedoch in bezug auf die Unterdrückung hydrophober Wechselwirkungen weniger effektiv sind⁽³⁸⁻³⁹⁾.

Ein anderer störende Effekt in der 2-DE während der isoelektrischen Fokussierung ist die Carbamylierung der Proteine. Die Carbamylierung kann durch Verwendung von analysenreinem Harn- und Thioharnstoff sowie zusätzliche Zugabe von Tris in geringer Konzentration (etwa 20 mM) stark vermindert werden.

Letztendlich erwies sich die Verwendung eines Detergenzien-Cocktails aus 4 % CHAPS und 1 % Triton-X100 zur Denaturierung der gesamten Proteine während der isoelektrischen Fokussierung sowie der Unterdrückung der hydrophoben Wechselwirkung am erfolgreichsten. Die Kombination dieser zwei Detergenzien (CHAPS und Triton-X100) führt auch zu einer befriedigenden Lösung der peripheren Proteine sowie eines Teil der integralen Proteine in der Rehydrierungspufferlösung, so dass sie auf den 2-DE-Gelen detektiert werden konnten.

Eine weitere Verbesserung der Trennschärfe (Beseitigung der vertikalen Streifen) lässt sich durch Reduktion der Proteinprobe während der isoelektrischen Fokussierung durch die Verwendung eines geeigneten Reduktionsmittels erreichen. Es wurde die Verwendung von drei verschiedenen Reduktionsmitteln getestet. Die Abbildung 10 zeigt die Abhängigkeit der Bildqualität der 2-DE-Gele von verschiedenen Reduktionsmitteln.

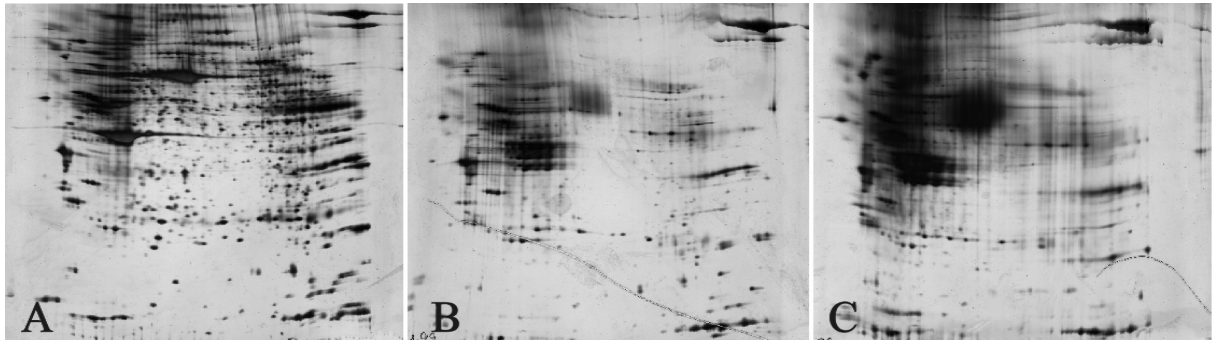


Abbildung 10: 2-DE-Images einer Patientenprobe, totale Protein 100 µg, 18 cm IPG pH3-10NL, 20 cm SDS-Gradientengel 10-15%, (A) Proteinprobe mit dem Rehydrierungspuffer (7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 20 mM Tris, 0,5% IPG-Puffer und 32 mM DTT) gelöst, (B) Proteinprobe mit 2 mM TBS gegen DTT eingesetzt, (C) gegen 2mM TCEP ersetzt.

In der Anwesenheit von DTT konnte eine optimale Proteinauflösung erreicht werden, während sich mit TBS und TCEP nur eine schlechte Auflösung bei der isoelektrischen Fokussierung erzielen ließ. Deshalb wurde in der Folge 32 mM DTT als Reduktionsmittel für die Fokussierung verwendet.

Die Tabelle 2 zeigt die optimale Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers für die isoelektrische Fokussierung.

Konzentration	Substanz
7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
4 %	CHAPS
20 mM	Tris
32 mM	DTT
1 %	Triton-X100
0,5 %	IPG-Puffer (3-10NL)
Spatelspitze	Bromphenolblau

Tabelle 2: Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers für Protein-solubilisierung während der IEF

2.4. Optimierung der isoelektrischen Fokussierung

Als weitere kritische Parameter für die Reproduzierbarkeit und die Qualität der 2-DE-Methode wurden folgende Punkte untersucht und optimiert:

- Proteinauftrag auf dem Streifen
- Typen der IPG-Streifen
- Fokussierungsparameter
- Behandlung und Lagerung der fokussierten IPG-Streifen

2.5. Optimierung der aufgeladenen Proteinkonzentration

Die Menge der Proteine, die auf die einzelnen IPG-Streifen geladen werden, hängt von der Art des verwendeten Gewebes sowie dem vorgegebenen pH-Gradienten und der Länge der IPG-Streifen ab. Außerdem hängt die aufgetragene Proteinmenge in hohem Maße von der verwendeten Färbemethode (stark unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Methoden!) ab. Für das in der vorliegenden Dissertation hauptsächlich verwendete Verfahren mittels Silberfärbung wurden drei verschiedene aufgetragenen Konzentrationen von Uterusgewebe (50, 100 und 120µg Proteinmenge) untersucht. Eine optimale Bildqualität der 2-DE wurde bei 100µg (vgl. Abb. 11B) Protein auf 18 cm IPG-Streifen erzielt. In der Abbildung 10 wird diese Beobachtung genauer demonstriert.

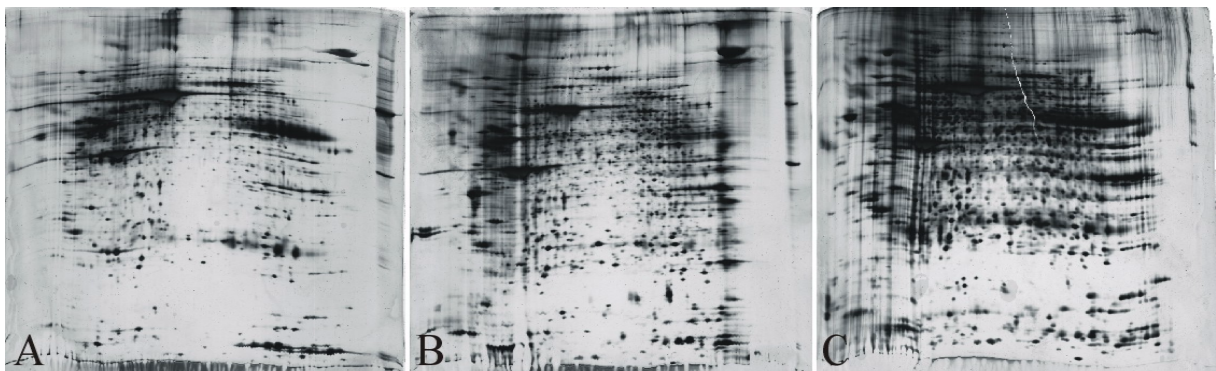


Abbildung 11: 2-DE-gel des Endometriums für die Optimierung der Proteinmenge, (A) Gel mit 50µg Proteinmenge, (B) 100µg totale Proteinmenge und (C) 120µg Proteinmenge, die Proteine in 18cm IPG-Streifen pH 3-10 NL fokussiert

Hierbei wurde in der Abbildung 11A durch die Silberfärbung wenige Spots detektiert, wohingegen beim Auftragen von 120µg (vgl. Abb. 11C) durch das Verfahren der Silberfärbung eine Überladung der Spots gezeigt.

2.6. Typ der verwendeten IPG-Streifen

Immobilisierte pH Gradient-Streifen (IPGs) für die isoelektrische Fokussierung wurden 1982¹³ erstmalig vorgestellt und das Grundprotokoll der 2-DE mit IPG-Streifen 1988¹⁴ festgelegt. Diese Methodenverbesserung stellte einen wesentlichen Fortschritt für die 2D-Gelelektrophorese dar.

Seither lassen sich ausgezeichnete Ergebnisse innerhalb eines weiten pH-Gradienten (im Bereich von pH 3-10) erzielen. Die Proteinauflösung wurde in den linearen und nicht-linearen IPG-Streifen mit pH 3-10 (L und NL) untersucht. Hierbei wurden die mit IPG-Streifen (pH 3-10 NL) fokussierten Proteine auf der gesamten Fläche des SDS-Gels gut aufgelöst, wohingegen bei der Verwendung von IPG-Streifen (pH 3-10 L) die Proteine sowohl im stark basischen als auch im schwach sauren und neutralen Bereich deutlich schlechter aufgelöst wurden (vgl. Abb. 12). Dieser signifikante Unterschied in der Proteinauflösung ist hier durch den Abstand zwischen den einzelnen markierten Gelbereichen der beiden 2-DE-Images, insbesondere der Abstand zwischen den markierten Gelbereichen A und D sowie den Gelbereichen A und B beider 2-DE-Images, gut erkennbar. Aufgrund der deutlichen Überlegenheit der NL-Streifen wurden für die weiteren Untersuchungen IPG Streifen (pH 3-10 NL) verwendet.

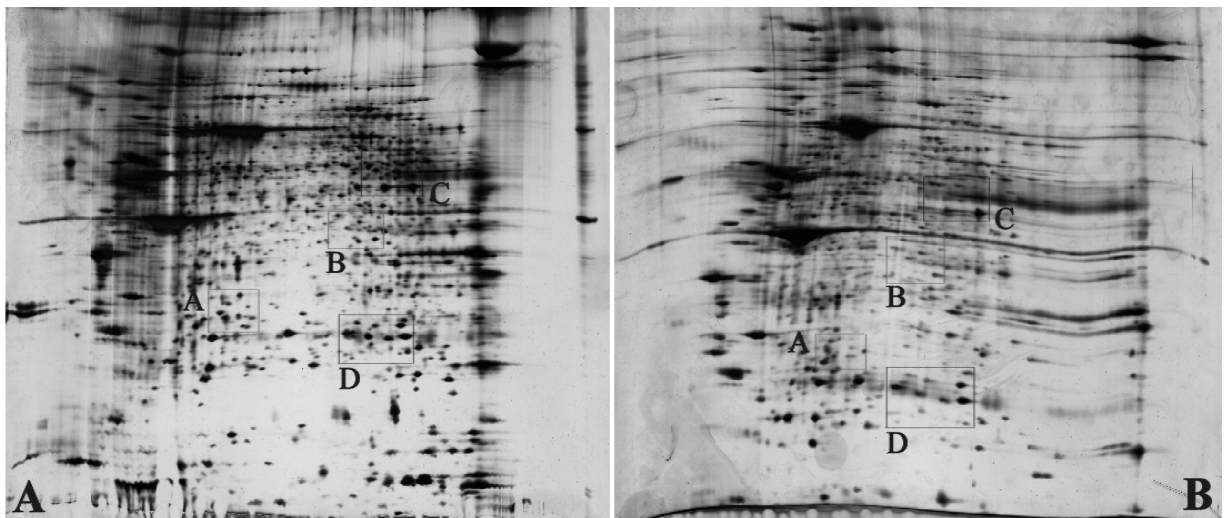


Abbildung 12: 2-DE-Images einer gesunden Uterusprobe (Endometrium), 100 µg Proteinmenge, 20 cm SDS-Gradienten-Gel 10-15 %, (A) 18 cm IPG-Streifen pH3-10 NL, (B) 18 cm IPG-Streifen pH3-10 L, Proteinvisualisierung nach Blum et al.

Abbildung 13 zeigt die Auflösungsqualität der Proteine in vier verschiedenen Bereichen der beiden oben gezeigten Gele. Hierbei wurden die Spots mit NL-IPG im Vergleich zu L-IPG insbesondere bei schwach sauren und neutralen Proteinen, deutlich besser aufgelöst (vgl. Abb. 13A,D). Im Gegensatz dazu zeigt die Auflösung der Proteine im basischen

sowie sauren (bis zum pI 4.2) Bereich kaum Unterschiede (vgl. Abb. 13B,C).

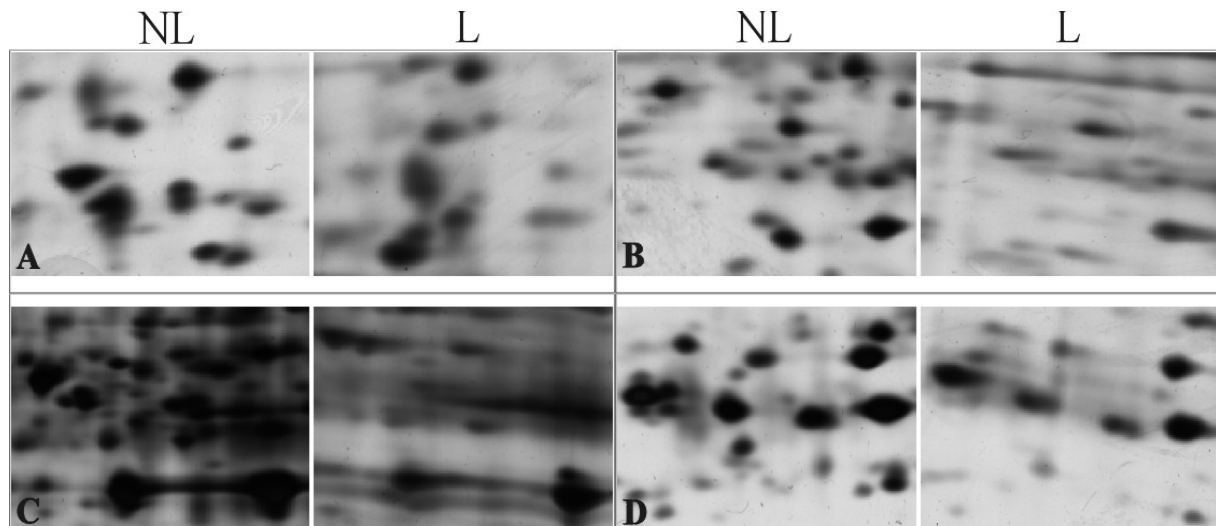


Abbildung 13: Vergleich der Auflösungsqualität zwischen den nichtlinearen und linearen IPG-Streifen bei Fokussierung, (A) Gel-Ausschnitte des sauren Bereiches, (B) Gel-Ausschnitte des neutralen Bereiches, (C) Gel-Ausschnitte des basischen Bereich hochmolekularer Proteine und (D) sind Gel-Ausschnitte des basischen Bereich niedermolekularer Proteine. NL für nichtlineare und L für lineare IPG-Streifen.

2.7. Optimierung des Fokussierungsprozesses

Das Optimum des Fokussierungsprozesses für die 2-DE ist erst dann gegeben, wenn die isoelektrische Fokussierung einen stabilen Zustand erreicht hat⁸². Die notwendige Dauer der Fokussierung hängt stark von den Eigenschaften der verwendeten Probe ab. Insuffiziente Fokussierung kann horizontale und vertikale Streifen auf dem 2-DE-Gel ab dem Punkt des Auftrags verursachen. Die Anzahl der detektierbaren Spots hängt damit auch stark vom Fokussierungsschema ab. Daher waren die Fokussierungsparameter zu evaluieren.

Folgendes Fokussierungsschema (Probenmenge 100 µg) wurde im Lauf der Untersuchungen erarbeitet:

- Rehydrierung für 12h mit niedriger Spannung von 30 V, um besseren und schnellen Eintritt der Proteine in der Gelmatrix zu ermöglichen.

- graduelle Spannungserhöhung im Zeitabstand von 30 min. (500, 1000, 2000, 4000 V), und
- von 4000 V auf 8000 V im Zeitabstand von 1h.
- abschließende Fokussierung über 7h auf gesamte Spannungsstunde von 56000 Vh.

Mit diesem Protokoll konnten 2-DE-Gele von hoher Qualität und auch hoher Spotzahl (bis zu **1700 ±200** Spots) erhalten werden. Im Gegensatz dazu waren nach dem Standardprotokoll (Amersham Pharmacia) lediglich etwa **970-1000** Spots abgrenzbar, wobei die hochmolekularen und basischen Proteine besonders schlecht detektierbar waren.

2.8. Lagerung der IPG-Streifen nach der Fokussierung

Nach dem Fokussierungsprozess wurden IPG-Streifen, welche nicht unmittelbar für die zweite Dimension verwendet wurden, bei -80 °C aufbewahrt. Eine Aufbewahrung bei -20 °C führt zum Verlust vor allem kleinerer Proteinen, wie mehrere vergleichende Untersuchungen zeigten.

2.9. Typ der 2. Dimension (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist seit langem eine der populärsten Methoden der Proteinanalytik überhaupt. Die grundlegende Idee ist dabei, alle Proteine nach kompletter Denaturierung in einheitliche, vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichartigen Ladungseigenschaften zu überführen⁸³. Die relative Mobilität der SDS-Proteinkomplex in einem elektrischen Feld ist abhängig von der Acrylamidkonzentration der Gelmatrix. Diese bewegt sich in der Regel zwischen 6 und 15% und bestimmt damit die durchschnittliche Porengröße der Gele. Im Rahmen der Evaluierung der kritischen Prozessparameter in der 2 Dimension ergaben sich sehr wenig Probleme. Bei der vergleichenden Untersuchung von homogenen 10% SDS-Gel und Gradienten-Gel⁸⁴ (10-15 %) für die zweite Dimension zeigte sich bei Gradienten-Gelen eine deutlich bessere Auftrennungsqualität, insbesondere im schwach sauren bis neutralen Bereich, sowie auch eine schärfere Auftrennung im basischen Bereich. Daher wurden die folgenden

Untersuchungen in der 2. Dimension in Porengradientengel (10-15 %) durchgeführt.

3. Reproduzierbarkeit der Methode

Die Proteomanalyse eröffnet die Möglichkeit, anhand der Proteinexpressionsprofile durch die gezielte Suche nach Abweichungen unter gegebene Umständen Daten zur Beschreibung einer Veränderung in komplexen biologischen Systemen oder zur Charakterisierung von Krankheiten zu bekommen. Damit ist die Proteomanalyse geeignet, die molekulare Anatomie des Systems und ihre Veränderungen auf der Ebene der Proteinexpression zu beschreiben⁸⁵. Im Gegensatz zum Western Blot und der RT-PCR kann man mit dieser Methode auch bislang unbekannte Veränderungen auffinden. Sowohl die quantitative Auswertung der Gele als auch die vollständige Erfassung aller auftretenden Spots bringen die Methode jedoch rasch an ihre Limits. In der vorliegenden Untersuchung wurde daher ausschließlich die differentielle Proteomanalyse angewendet, das heißt, es wurden nur solche Proteine weiter untersucht und charakterisiert, die bei den vorgegebenen Fragestellungen deutliche Abweichungen von einem konstanten Spotmuster zeigten. Damit wurde sowohl das Problem der absoluten Konzentrationsbestimmung bzw. deren methodische Abweichung als auch die Frage eines methodenbedingten Spotverlustes in Falle schwach exprimierter bzw. leicht degradierbarer Proteine umgangen. Darüber hinaus bietet die differentielle Proteomanalyse in dieser Form die Gelegenheit, unmittelbar struktur- oder krankheitsrelevante Proteine zu ermitteln. Besonders wesentlich ist in diesem Zusammenhang jedoch nach wie vor die Frage der Reproduzierbarkeit der 2-D-Gele im Falle des einzelnen Patienten. Diese wurde daher zunächst für die Proteomanalyse des menschlichen Uterus in folgenden Punkten untersucht.

- 1- Qualität der Gel-Mustern der 2-DE
- 2- Reproduzierbarkeit der Probenpräparation (s.o.)
- 3- Matcheffizienz der Spots

4- Reproduzierbarkeit der Gel-Färbung und Spotintensität

3.1. Auflösungsqualität der 2-DE-Gele

Abbildung 14 zeigt die Qualität der 2-DE bzgl. Auflösung (Endometrium).

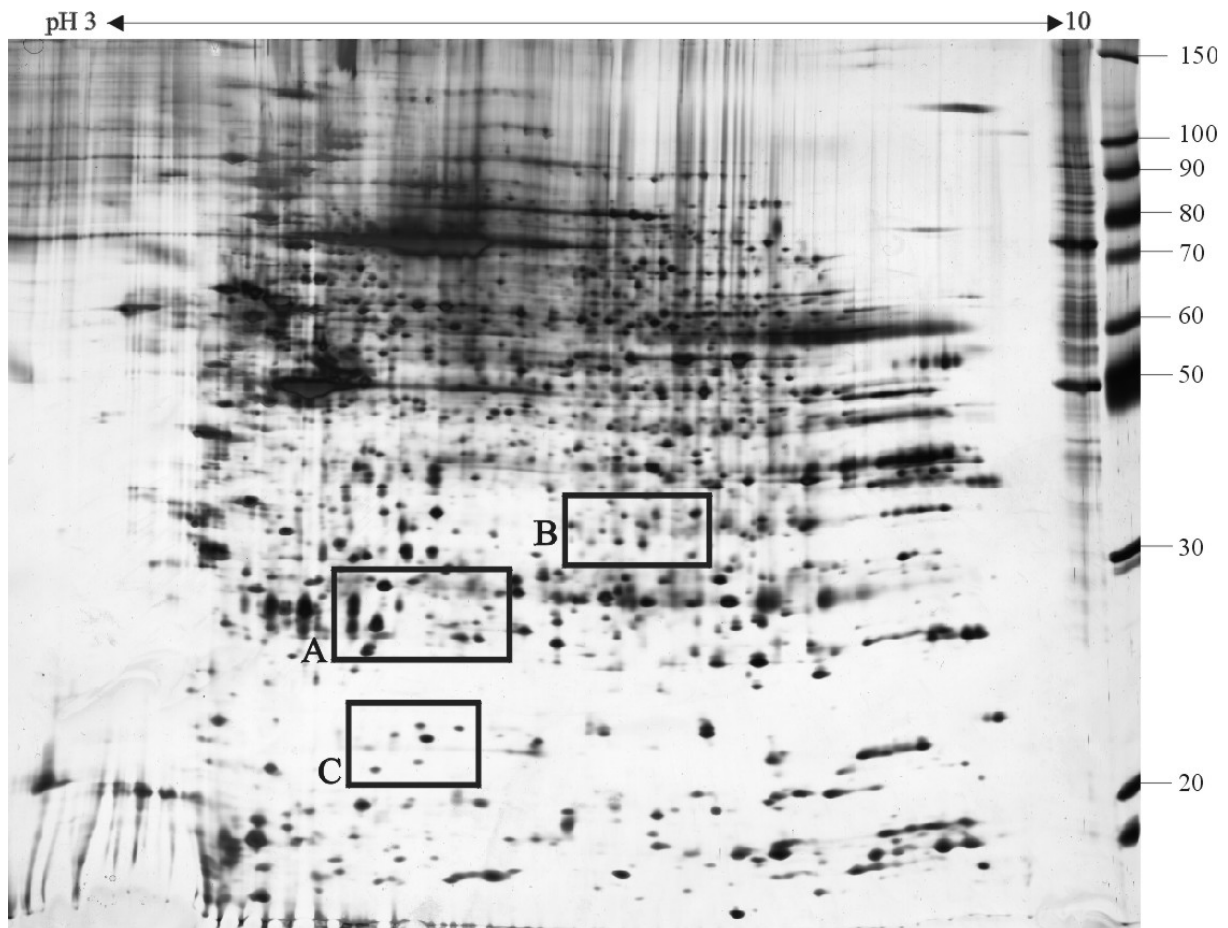


Abbildung 14: Qualität einer 2-DE-Gel, 100µg total Protein eines menschlichen Uterusgewebes, 18 cm IPG-Streifen (pH 3-10 NL), 20 cm SDS-Gradientengel 10-15 %, Visualisierung mit der Silberfärbung nach Blum et al.

Unter den zuvor beschriebenen optimierten Bedingungen wurden in den verwendeten 2-DE-Gelen durchschnittlich etwa 1700-Spots (± 200) je Probe erhalten. Die Spots sind annähernd gleichmäßig über die Gelfläche verteilt. Auf allen Gelen sind Spots zu finden, die miteinander verschmolzen sind. Auch dieser Effekt ist reproduzierbar, tritt jedoch nur in schlecht aufgelösten Bereichen auf, vor allem im stark sauren Bereich (pI 3.5-4.3). Auch im basischen Bereich wurde bei den meisten Gelen eine

schlechte Proteinauflösung, insbesondere im hochmolekularen Bereich, beobachtet. Für die vorliegende Fragestellung wurde die Auflösungsqualität der Gele jedoch trotzdem zunächst als ausreichend akzeptiert.

3.2. Reproduzierbarkeit der Probenpräparation

Abbildung 15 zeigt Gele von vier Proben, die aus dem gleichen Uterusgewebe in vier Ansätzen unter identischen Bedingungen hergestellt wurden. Die Gele wurden an verschiedenen Tagen hergestellt. Es sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

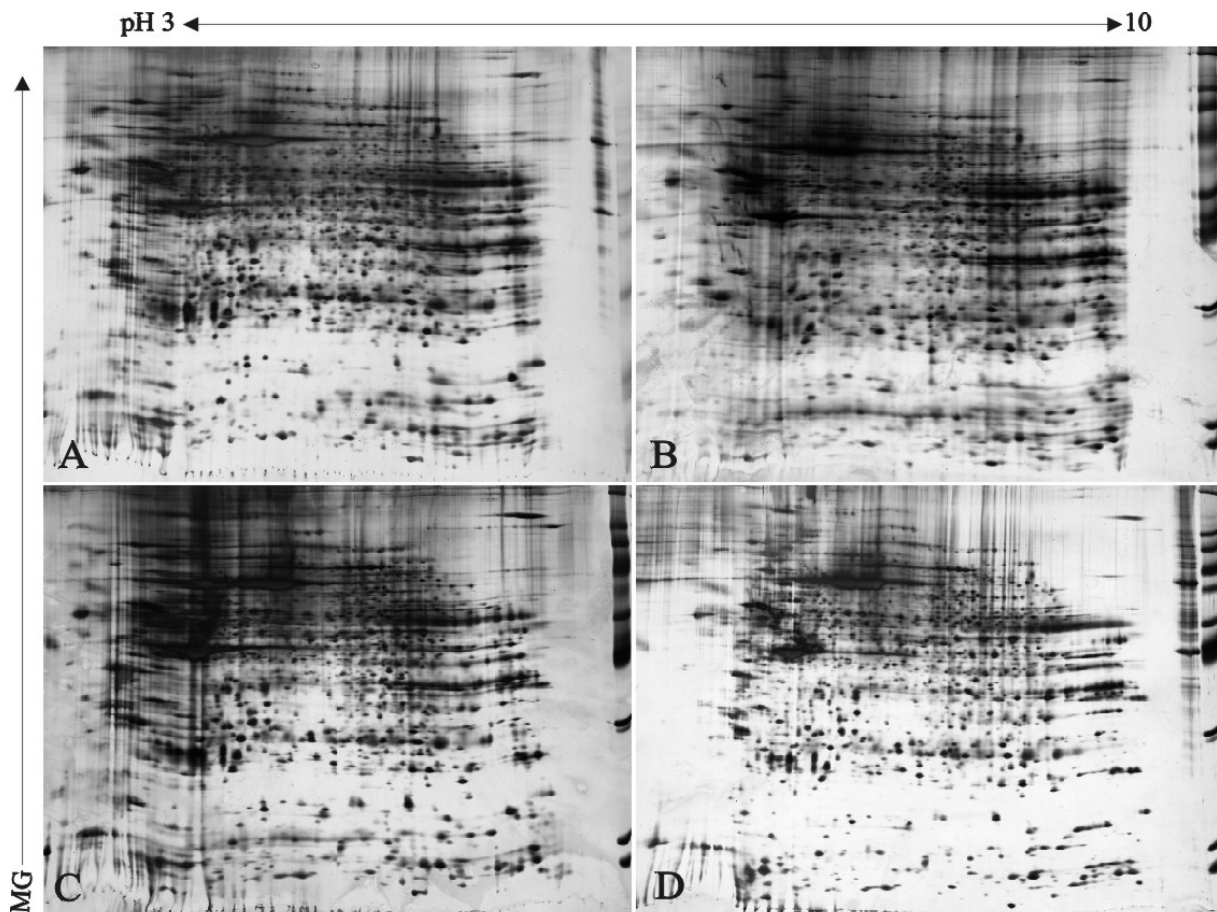


Abbildung 15: Vier typischen 2-DE-Gele, die von den (A, B, C und D)-Proben stammen und unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet aber in unterschiedlichen Tagen durchgeführt waren, 100µg total Protein, 20 cm SDS-Gradientengel 10-15 % und mit Silberfärbung nach Blum visualisiert.

In Abbildung 16 sind verschiedene Abschnitte von mehreren 2-DE-Gelen der gleichen Probe aus zwei unterschiedlichen Bereichen nebeneinander dargestellt.

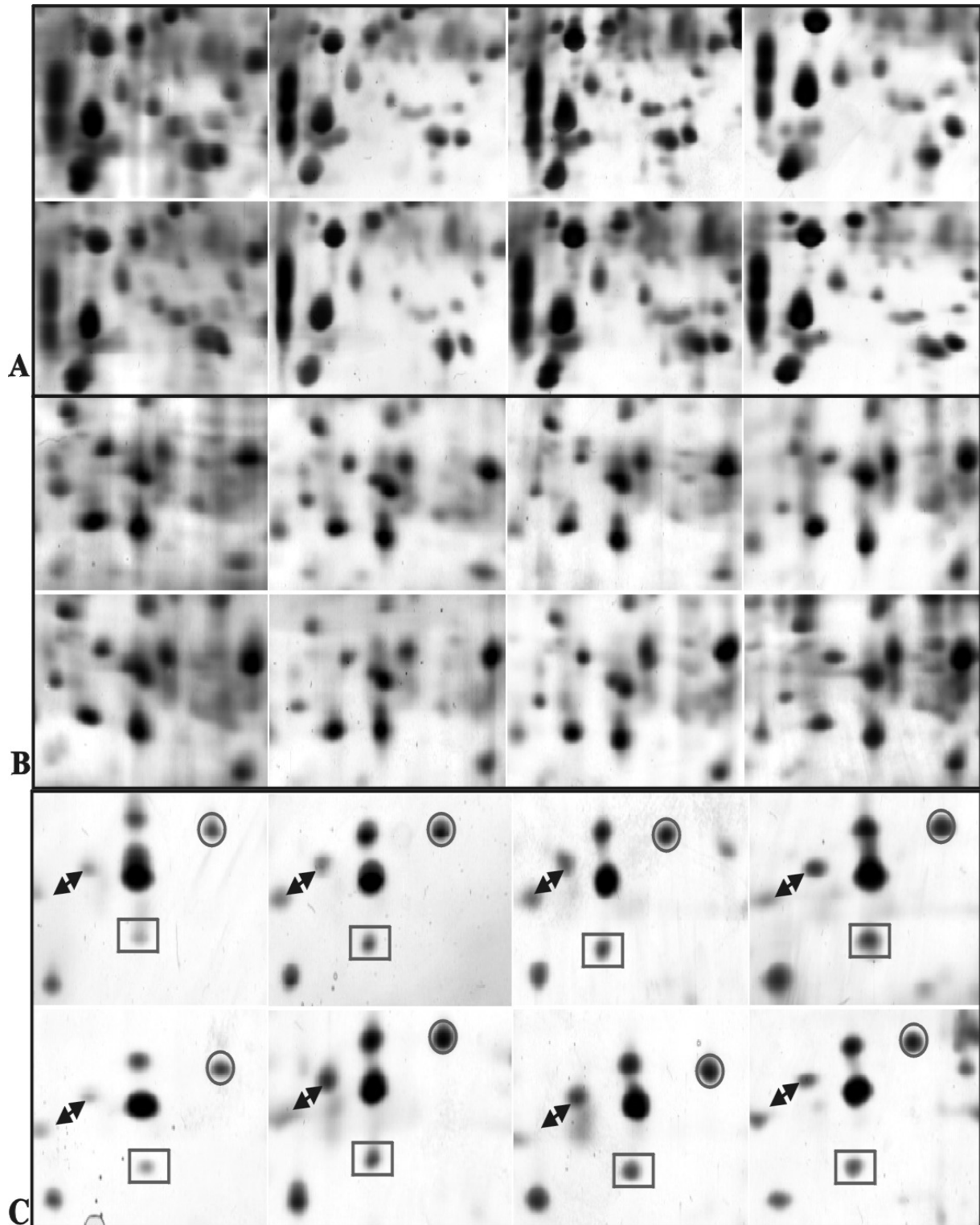


Abbildung 16: Gel-Ausschnitte aus verschiedenen Bereichen der in verschiedenen Tagen durchgeführten Gel-Muster zeigen die Reproduzierbarkeit der 2-DE-Technik und Spotposition, (A) (B) sind Gel-Ausschnitte von zwei Bereichen der Gel-Images aus einer in unterschiedlichen Tagen durchgeführten Probe, (C) sind Gel-Ausschnitte aus anderem Bereich gleicher Probe mit der veränderten Spotposition bei der Durchführung in unterschiedlichen Tagen.

Abbildung 16A zeigt einen Ausschnitt aus dem sauren Bereich, (pI 5.2-5.8 und MW 20-30 kDa), Abbildung 15B einen Ausschnitt aus dem neutralem Bereich (pI 6-6.7 und MW 40-50 kDa). Bezüglich der Spotmuster sowie der Spotpositionen der einzelnen Spots sind weder in Serie der (A) noch in Serie (B) auffällige Abweichungen zwischen den 2-DE-Gelen zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen die gute Reproduzierbarkeit der gewählten Präparationstechnik für das Uterusgewebe. Minimale Abweichungen einzelner Spots um etwa 1-2 mm in reproduzierbaren Gel-Mustern (vgl. Abb. 16C) wurden auf eine besondere Empfindlichkeit spezifischer Proteine gegenüber den experimentellen Bedingungen zurückgeführt. Ein derartiger Effekt wurde z.B. einmal beobachtet, nachdem frische Acrylamid-/Bis-Acrylamid-Lösung verwendet wurde. Es ist daher naheliegend zu vermuten, dass ein Zusammenhang mit der Akkumulation von Acrylsäure in alten Acrylamidlösung besteht.

3.3. Matcheffizienz der Spots

Zur Evaluation der Matcheffizienz wurden jeweils vier Gele einer Probe von einem Tag, sowie vier Gele derselben Probe von verschiedenen Tagen untereinander verglichen und die Matcheffizienz in allen Gelen berechnet. Zum Matchen der Gele werden etwa 30-40 Spots als Landmark definiert. Die Quantifizierung der Matcheffizienz der gematchten Gele zeigt eine Übereinstimmung in etwa 80.5-88 % aller Spots (vgl. Abb. 17). Die Abweichungen (Mismatch) ergeben sich wiederum im kritischen Bereich der Gele, insbesondere im sauren Bereich für pI 3.5 - 4.4

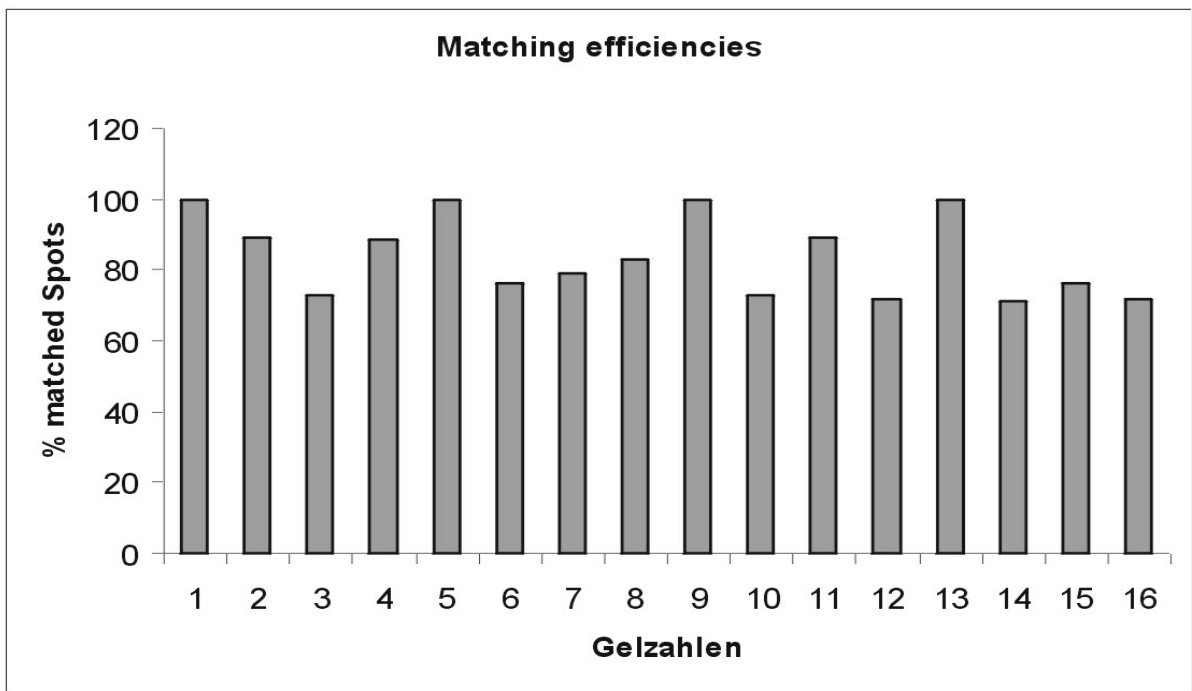


Abbildung 17: Diagramm für die Analyse der prozentualen matchenden Spots aller 16-Gele, die in verschiedenen Tagen durchgeführt sind.

Zusätzlich zur Auflösung spielt die Qualität und Reproduzierbarkeit der Spotfärbung für die Matcheffizienz eine wesentliche Rolle, während eine Erhöhung der Zahl der Landmarks keine deutliche Verbesserung bringen kann.

3.4. Reproduzierbarkeit der Gel-Färbung und Spotintensität

Die Silberfärbung stellt das größte Problem für die Reproduzierbarkeit der 2-DE-Technik dar, da man einige Schritte des Verfahrens schwer kontrollieren kann. Im Rahmen der Methodenevaluierung wurden 16 Gele unter den gleichen Bedingungen gefärbt. Es zeigte sich, dass einige identische Spots auf Gelen, die parallel prozessiert und gefärbt wurden, trotzdem nicht die gleiche Intensität zeigten. Dies trifft insbesondere für schwache Spots zu, insgesamt für etwa 15 % aller Spots. Ursachen könnten leichte Unterschiede in der Probenkonzentration, aber auch minimale Abweichungen im Färbverfahren sein. Die Abbildung 18 zeigt Unterschied in der Spotintensität bei der Proteinvisualisierung mit Silberfärbung.

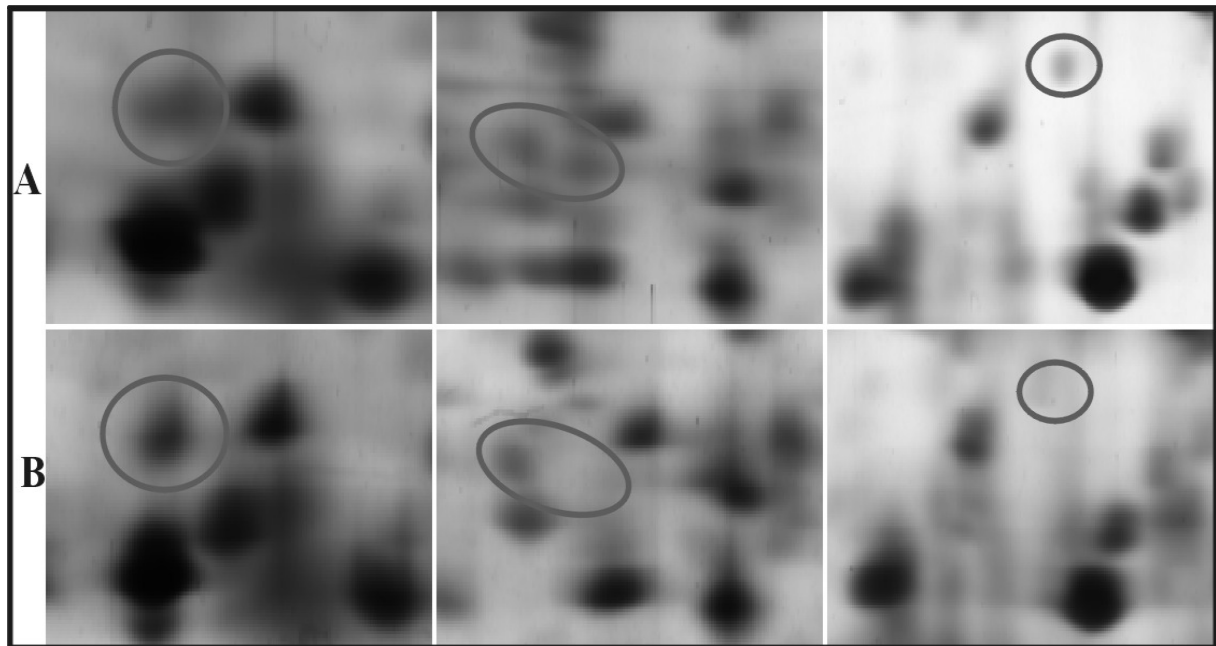


Abbildung 18: Reproduzierbarkeit der Silberfärbung, Unterschiede in der Spot- Intensität, A und B sind Ausschnitte aus zwei Gelen gleicher Probe, die parallel und gleichzeitig durchgeführt sind.

Serie A Ausschnitte zeigt die Visualisierung einiger schwachen Spots durch Silberfärbung, wohingegen die Visualisierung solcher Spots in der Serie B Ausschnitte nicht beobachtet wurde. In beiden Serien werden bei einigen Spots auch Unterschiede in der Spotintensität beobachtet.

Die absoluten Werte der quantitativen Spotvolumen werden durch die Variation der gesamten Spotintensität der 2-DE-Gelmuster beeinflusst. Hier wurden in den vier Gelen der Proben A; B; C und D, die an verschiedenen Tagen jeweils parallel durchgeführt wurden, alle Spots gematcht und quantifiziert, anschließend die relative Standardabweichung (RSD) der Spotvolumina bestimmt⁸⁶. Für die Spotdaten betrug die mittlere RSD jeweils ungefähr 28.5 % . Nach der Normalisierung der OD-Daten wurde eine mittlere RSD von unter 17 % erhalten. Zusätzlich wurden die einzelnen Spotdaten der vier Gele vom ersten Tag mit denen der vier Gelen vom zweiten Tagen kombiniert, sowie die vier Gele des dritten Tages mit denen des vierten Tages und die kombinierten Spotdaten miteinander verglichen, Dabei ergab sich nur bei 1 aus 45 Spots ein signifikanter Unterschied (Student T-test, $P < 0.05$) . Das entspricht damit einer Fehlerrate von etwa 2.2 % an „falsch-positive“ Spots.

4. Differentielle Proteomanalyse von uterinem Gewebe

4.1. Identifizierung der House-Keeping-Proteine

In allen Gewebetypen des Uterusgewebes wurde eine Vielzahl von Proteinen unabhängig von Krankheitsbild und Zyklusphase der Patientinnen konstant exprimiert. Derartige Proteine bilden die gemeinsame Basis für die Festlegung der 2-DE-Gelmuster eines Gewebes zur Auswertung und werden als sogenannte Haus-Keeping-Proteine (HKP) klassifiziert. 48 dieser Proteine konnten mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Aufgrund ihrer Funktion wurden diese Proteine in 4 Gruppen eingeteilt. Unter Protein Nr. 1-9 sind Aktin-bindende Proteine, unter 10-15 glykolytische Proteine, 16 – 18 Proteine des Pentosephosphatwegs aufgelistet (vgl. die Tabelle 3). Im Falle von 3 Spots ergab die Analyse eine Mischung aus 2 Proteinen (36/37; 38/39, 47/48).

SpotNr	Protein Name	Abk.	Akzess.Nr	match. Peptide	Cove. %	pI	MG (kDa)
1	Transgelin	SM 22	gi 3123283	12	58	8.9	22.56
2	Gelsolin	ADF	P 06396-01	27	38	5.97	86.042
3	Vinculin	VCL	gi 24657579	40	43	5.84	117.23
4	Heat shock Protein 27	HSP 27	gi 662841	10	60	7.83	22.427
5	α -Filamin		P 21333-04	23	23	5.7	283.30
6	Annexin 4	A4	gi 1703319	22	61	5.84	36.088
7	meta-Viculin	m-VCL	gi 2144821	35	69	5.97	124.29
8	Annexin 5	A5	gi 999926	21	77	4.98	35.839
9	Integrin- β 4	GP150	P 16144-12	13	23	6.35	205.25
10	Triosephosphat Isomerase	TPI	P 009138	12	48	6.5	26.807
11	Enolase 1	PGH	gi 4503571	14	33	6.99	47.530
12	Phosphglycerat Mutase	PGM	P 18669	10	45	6.75	28.757
13	Glycerinaldehyd-3-Phosphat DH	GAP-DH	gi 31645	10	43	8.26	36.202
14	Aldose-Reduktase	ALR	gi 442618	9	33	6.56	36.099

15	Triosephosphat Isomerase 1	TIM	gi 4507645	11	73	6.54	26.938
16	Transketolase	TK	gi 18645119	18	34	6.4	59.089
17	Phosphoglucomutase 5	PM	gi 11415050	28	50	6.8	56.091
18	Superoxid Dismutase	SODM	gi 31615344	12	73	5.7	16.023
19	Disulfid Isomerase-A3	DSI-A3	P 30101	22	36	5.98	57.146
20	Disulfid Isomerase-ER 60	DSI-60	gi 7437388	26	36	6.38	57.160
21	Immunoglobulin-kappa-constant	IgG-kap	gi 4176418	7	49	6.92	23.69
22	Carbonic Anhydrase I	CA-I	P 00915	7	38	6.63	28.778
23	Peroxiredoxin 2	TRPO	P 32119	7	30	5.66	22.049
24	Glutathion-S-Transferase	GST	P 09211	7	40	5.44	23.464
25	Adenin Phosphoribosyltransferase	AMP-T	gi 4502171	10	56	5.79	19.766
26	Chlorid intercellular Chanel 4	Cl-Ch	gi 7330335	9	37	5.45	28.982
27	γ -Actin		gi 178045	12	48	5.65	26.147
28	COP 9-Complex-Subunit4		gi 7705845	20	56	5.57	46.454
29	Fibrin-fragment D		gi 28373959	19	59	5.62	38.081
30	Proapolipoprotein		gi 178775	17	43	5.45	28.944
31	Lamin B2	L-B2	gi 27436951	24	41	5.29	67.762
32	Lamin A/C isoform 3-Precursor		gi 27436946	32	57	6.57	74.38
33	Myosin regulat. light Chain 2	M-rlCh2	gi 20141521	12	45	4.80	19.871
34	Phosphatidylethanolamine	PEBP	P 30086-01	8	77	7.42	21.027
35	GTP bindendes Protein		gi 4092054	8	36	7.00	24.668
36	WD repeat-containing Protein 1		gi 9257257	13	53	6.17	66.836
37	Lamin A/C Isoform 2		gi 5031875	17	57	6.4	65.153
38	Keratin Typ I	CK	P 04264-01	11	52	5.14	62.35
39	ATP-Synthase β -Chain	ATP-S	P06576	9	34		56.525
40	Glucose-reguleted Protein	GRP 78	gi 16507237	13	23	5.07	72.402
41	Galaktokinase 1	GK	gi 190164	12	63		42.702
42	RNA-binding Protein	DJ-1	gi 31543380	11	43	6.33	20.050
43	Peroxiredoxin Isoform 3		gi 5802974	9	42	7.67	28.017
44	Anti-Oxidant Protein 2	A-OP 2	gi 4758638	9	62	6	25.133
38	Nukleosid diphosphat Kinase	NDPK	gi 21674813	9	69	5.49	15.550
45	Transferin		gi 4557871	34	48	6.81	79.28

46	Sulfonamide Drug with Human Ca	SAD	gi 515084	9	47	6.63	28.778
47	Osteoblast specific factor 2	OB-F2	gi 393319	12	40	8.09	87.611
48	Lamin A/C Isoform 3		gi 27436948	23	43	8.55	70.903

Tabelle 3: die detaillierten Informationen über die identifizierten Haus-Keeping-Proteine

Abbildung 19 zeigt die Lokalisation aller ausgewählten Haus-Keeping-Proteine mit einer Nummerierung entsprechend der Tabelle.

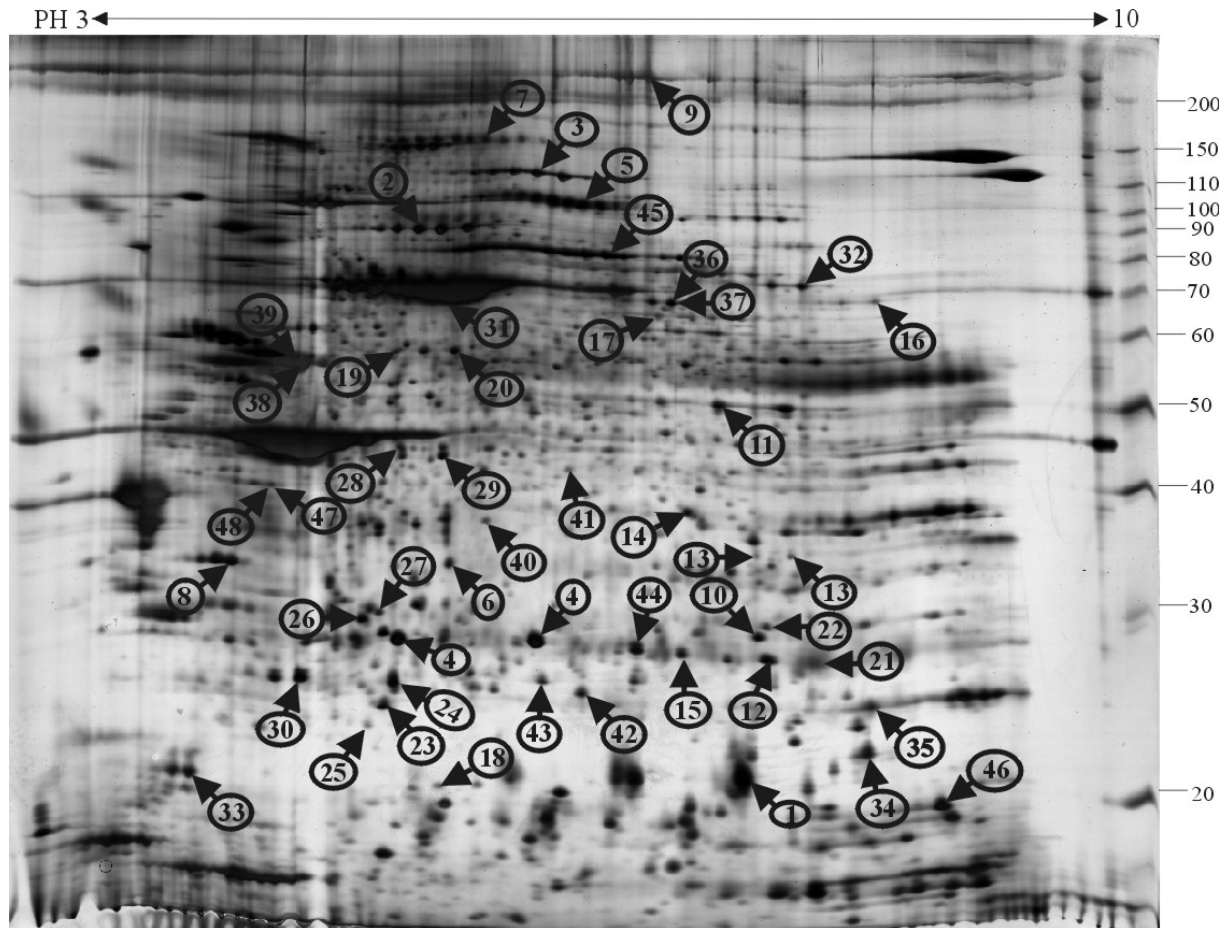


Abbildung 19: 2-DE-Image aus einem Endometrium (gesund), 100 µg totales Protein, 18 cm IPG-Streifen (3-10 NL), 20 cm SDS-Gradientengel 10-15%, es zeigt hier die Spot Nr. der Haus-Keeping-Proteine in verschiedene Bereiche der 2-DE

4.2. Abweichungen der Proteinexpression beim Uterus myomatosus

Bei pathologischen Abweichungen der Proteinexpression sind grundsätzlich drei Varianten möglich:

- 1) krankheitsbedingte Proteinexpression bzw. Erhöhung der Proteinexpression
- 2) krankheitsbedingte Herabsetzung bzw. Auslöschung der Proteinexpression
- 3) in Einzelfällen abweichende Proteinexpression

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Variationen der Proteinexpression bei einer häufigen uterinen Erkrankung, dem Uterus myomatosus untersucht. Als „gesundes“ Vergleichskollektiv wurden Patientinnen mit Senkungszuständen der Gebärmutter bzw. mit Gebärmutterhalsdysplasien bzw. Gebärmutterhalskarzinomen im Anfangsstadium verwendet.

Die Tabelle 4 gibt eine kurze Übersicht über im Rahmen dieser Arbeit entdeckte Abweichungen der Proteinexpression. Die Feststellung, ob im Einzelfall die Expression eines Proteins überhaupt nicht stattfindet, lässt sich beim derzeitigen Stand der Technik nicht mit absoluter Sicherheit treffen, da im Falle schwach exprimierter Proteine die Quantifizierung an die Grenzen der Methode stößt. Das heißt, nur der direkte Vergleich von „gesund“ und „krank“ lässt eine semiquantitative Analyse der krankheitsbedingten Veränderungen zu. Die beschriebenen Abweichungen betreffen sowohl das Endometrium wie auch das direkt darunter liegende subendometriale Myometrium.

Spot Nr.	Protein Name	Akzess.Nr	match. Peptid	Cove. %	theo. pI	MW (kDa)
1	Prohibitin	gi 4505773	8	40	5.57	29.843
2	α 2-Aktin	gi 4501883	12	74	5.23	42.381
3	Proteasom subunit Beta 4	P 28070.02	8	29	5.72	29.242
4	Growth factor receptor Protein	P 29354.02	9	39	6.31	23.541
5	Fibrinogen Beta	P 02675 00	24	50	7.02	49.768
6	Glycinaldehyd-3-Phosphat DH	gi 35053	11	48	8.22	35.698
7	Putativ P150	gi 14755958	8	43	9.39	20.482

Tabelle 4: die detaillierten Informationen über die abweichend exprimierte Proteine in Endometrium und SE-Gewebe

4.2.1. Krankheitsabhängige Überexpression von Proteinen

Prohibitin

Bei allen Patientenproben aus myomatosus veränderten Uteri wurde im Vergleich mit gesunden Uterusproben unabhängig von der Zyklusphase ein Protein mit einem Molekulargewicht von 29.843 kD und einem experimentellen pI von etwa 5.57 überexprimiert. Abbildung 20 demonstriert den entsprechenden Ausschnitt aus 3 gesunden und 6 kranken Proben. Der Spot konnte als das Protein Prohibitin, auch PHB 1 genannt, identifiziert werden.

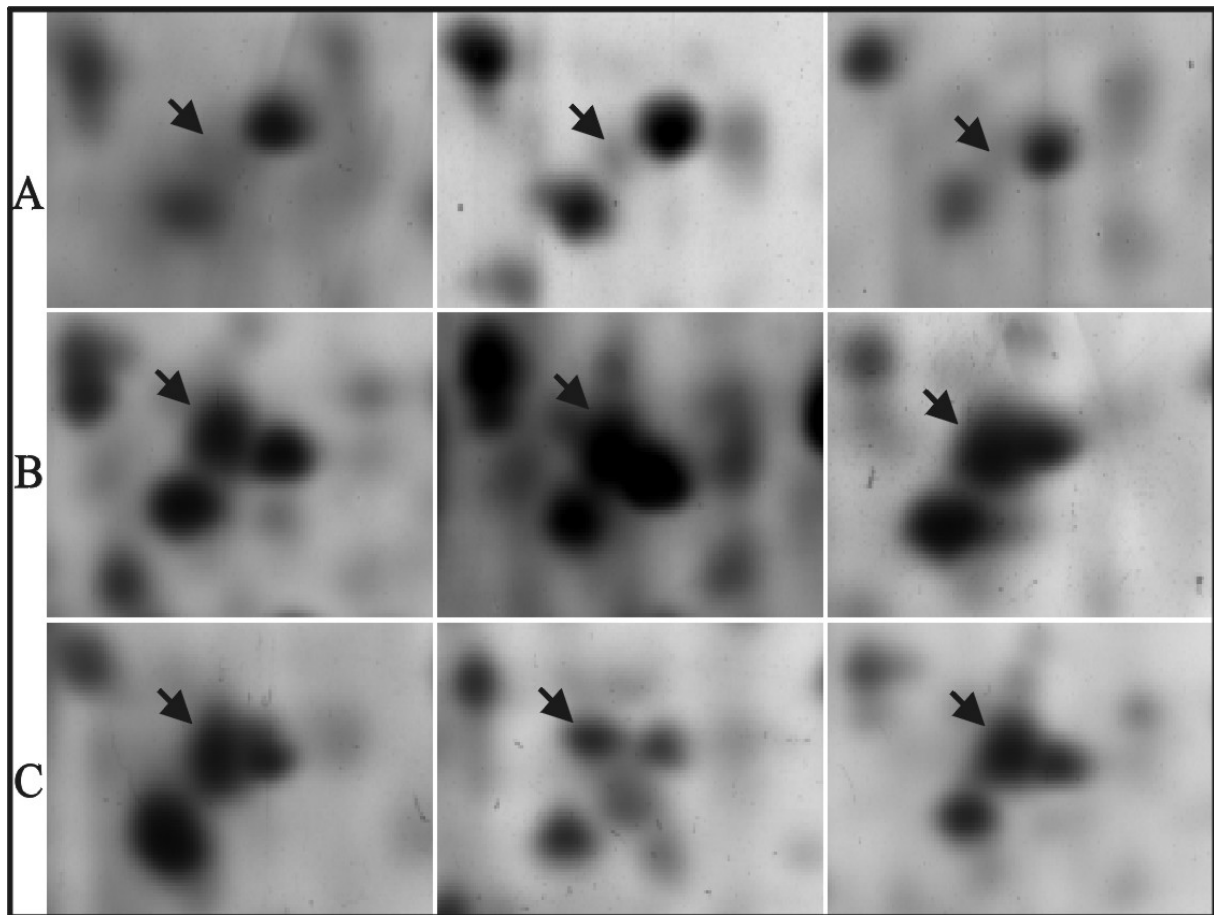


Abbildung 20: Ausschnitte aus den 2-DE-Gelen des Endometriums für das Protein Prohibitin, die Serie der A-Ausschnitte aus gesunden Patientinnen, die Serie der B und C aus Patientenprobe(Leiomyome).

Serie A zeigt Ausschnitte aus der Vergleichsgruppe, in denen keine bzw. minimale Expression von Prohibitin im Endometrium bzw. in der subendometrialen Muskulatur beobachtet wurde, wohingegen in den Serien B und C Ausschnitte aus Gelen von Patientinnen mit Uterus myomatosus dargestellt sind. Diese zeigen eine deutliche Überexpression von Prohibitin. Die Expression von Prohibitin im SS-Gewebe war konstant hoch, unabhängig vom Krankheitsbild.

Growth Faktor Rezeptor Protein

Beim Wachstumsfaktor-Rezeptor-Protein wurde ebenfalls eine deutlich unterschiedliche Expression zwischen gesunden Uterusproben und Patientinnen, unabhängig von der Zyklusphase, gefunden. Hierbei sieht man in der Serie der A Gel-Ausschnitte (aus gesunden Uterusproben) der

Abbildung 21 eine schwache Expression von GFRP, wohingegen bei vorhandenen Myomen eine erhöhte Expression dieses Proteins vorliegt, wie in den Serien der B-und C-Gel-Ausschnitte gezeigt.

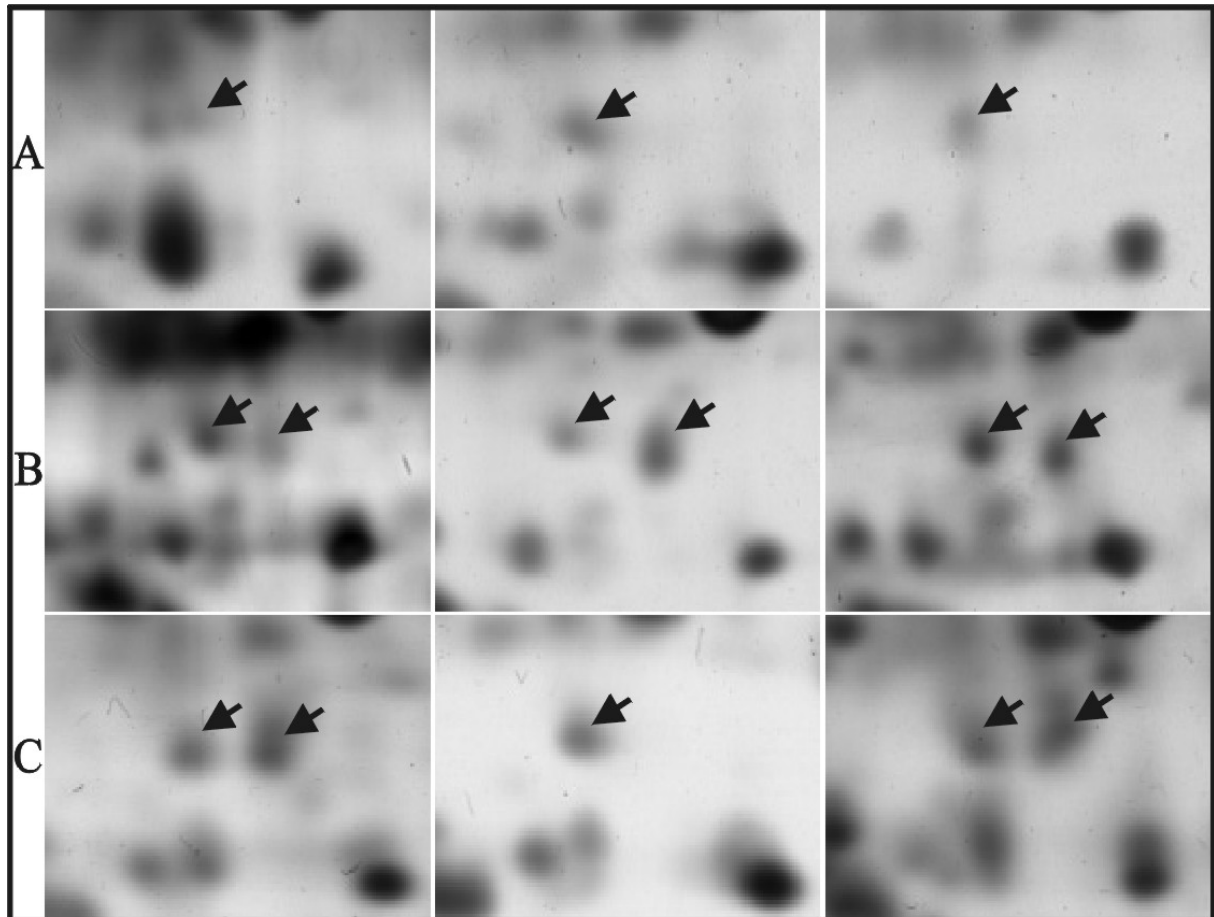


Abbildung 21: Ausschnitte aus den 2-DE-Gelen des Endometriums für das Protein Growth factor Receptor Protein (GFRP), die Serie der A-Ausschnitte aus gesunden Patientinnen, die Serie der B und C aus Patientenproben (Leiomyome).

α 2-Aktin

Abbildung 22 zeigt die Gel-Ausschnitte für das Protein α -2-Aktin. Auch in diesem Fall wurde in den Proben erkrankter Frauen gegenüber dem Vergleichskollektiv eine konstante Überexpression festgestellt.

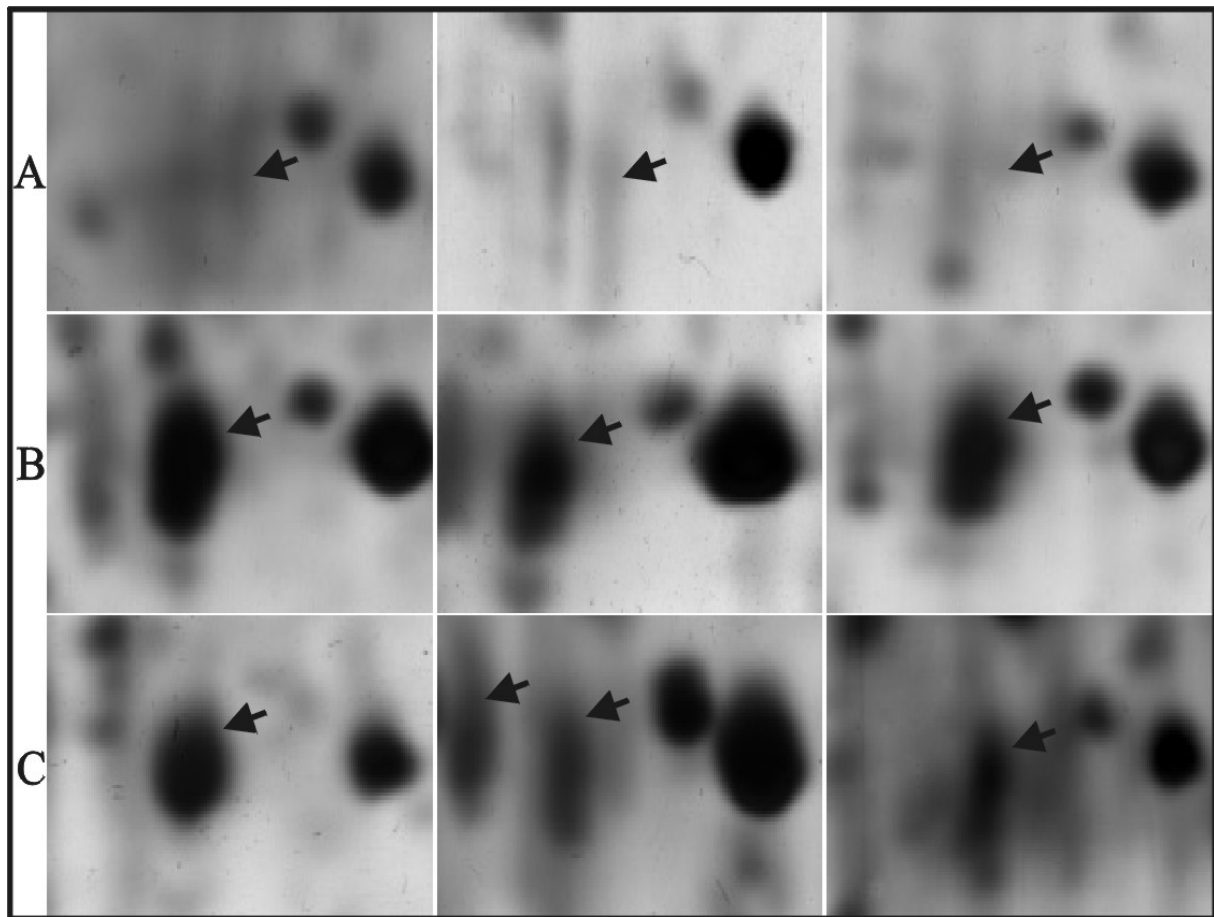


Abbildung 22: Ausschnitte aus den 2-DE-Gelen des Endometriums für das Protein Alpha2-Actin (cardiac muscle Actin), in der Serie der A-Ausschnitte aus den gesunden Patientinnen, in der Serie der B und C aus Patientinproben (Leiomyome).

Die tryptischen Verdauprodukte von Prohibitin und α 2-Aktin wurden in der Abbildung 23 dargestellt, in der die Peptidmassen beider Spektren über die Suche in die Datenbank eine Mowse-Score von 114 % mit (8 und 12) gematchten Peptiden zeigte.

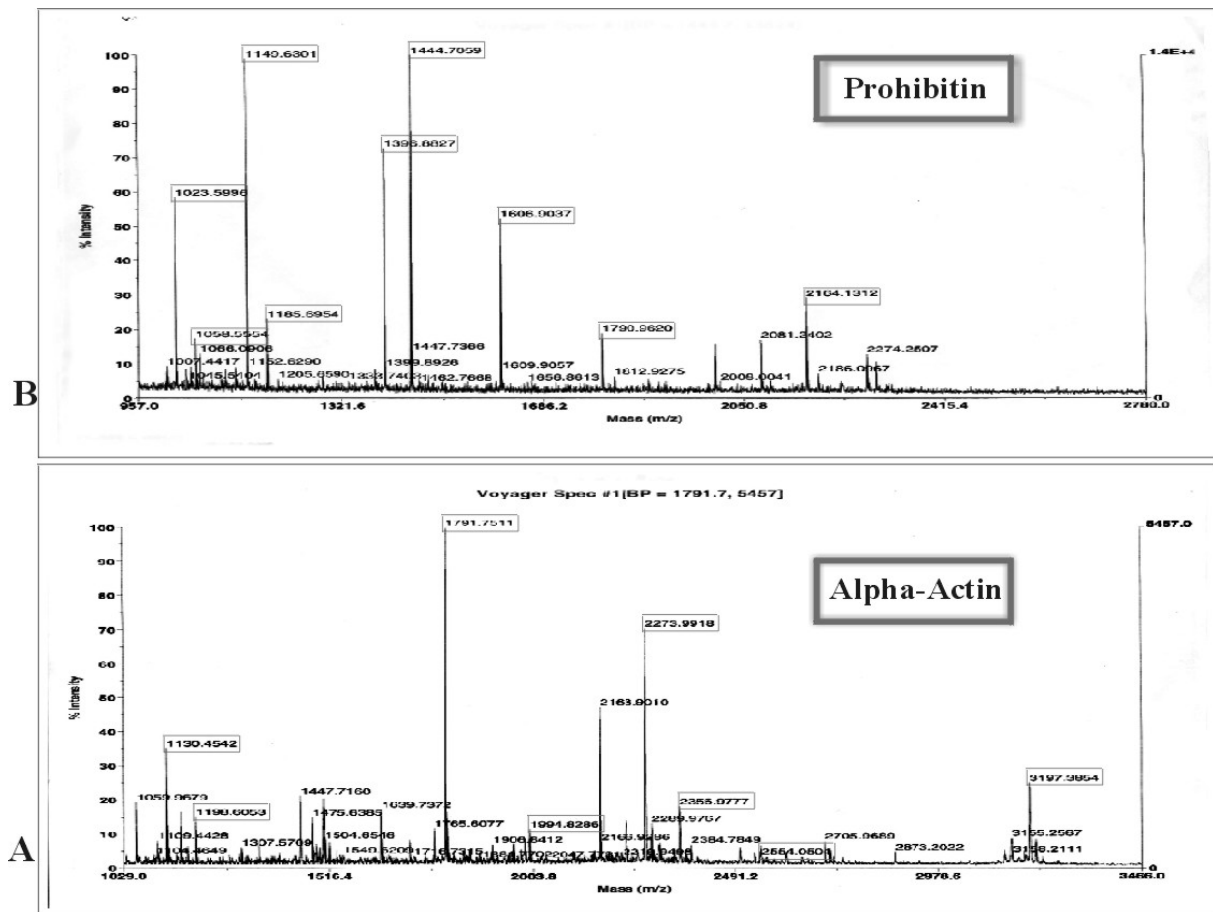


Abbildung 23: MALDI-TOF-MS der erhaltenen Peptiden bei dem tryptischen Verdau beider Proteine aus Endometrium, (A) Spektrum des Prohibitin und (B) Spektrum des Alpha-Actin.

Bei der Identifizierung des Proteins „Aktin“ über eine Datenbankanalyse wurde eine Liste von 4 Proteinen mit einem Mowse-Score in Höhe von 114 % angegeben, die möglicherweise als Urheber des angegebenen Peptidmassen Fingerabdruck (**PMF**) in Frage kommen. Diese 4 Proteine sind Aktin-Isoformen, die sich in der Anzahl sowie der Position ihrer Aminosäuren voneinander unterscheiden. Die angegebenen Aktin-Isoformen der Datenbank sind in der folgenden kurzen Übersicht gezeigt.

- 1- Alpha 2 Aktin oder (alpha-cardiac Aktin) mit einer Aminosäurezahl von 351 AS. und Akzession Nr. von (gi/4501883 und MW = 42.381)
- 2- Aktin oder (cardiac muscle precursor) mit einer Aminosäurezahl von 377 AS. und Akzession Nr. (gi/ 4885049 und MW = 42.334)

- 3- Gamma-2-Aktin oder (gamma 2 Propeptide) mit einer Aminosäurezahl von 301 AS. und Akzession Nr. (gi/ 4501889 und MW = 42.249)
- 4- Alpha-2-Aktin oder (aortic smooth muscle) mit einer Aminosäurezahl. von 351 AS und Akzession Nr. (gi/ 1070613 und MW = 42.480)

Über den Vergleich der Aminosäuresequenz der aus der Datenbank erhaltenen Proteine mit den Aminosäuren der untersuchten Peptide ergab sich tatsächlich mit dem Alpha-2-Aktin (alpha-cardiac Actin) eine Übereinstimmung von etwa 74 % der gesamten Aminosäuren. Die Übereinstimmung mit den anderen Aktin-Isoformen lag unter dem Wert von 35 %. Dieser Vergleich wurde in der SWISS-PORT Datenbank über den Protein-Prospekt und den Gen-Akzession-Code (GAC) durchgeführt.

4.2.2. Krankheitsbedingte Verminderung der Proteinexpression

Eine deutliche Herabsetzung der Expression bei Patientinnen mit Uterus myomatosus wurde für die Proteine β -Proteasome und Fibrinogen D beobachtet. In Abbildung 24 werden Unterschiede in der Proteinexpression von β -Proteasome wiedergegeben.

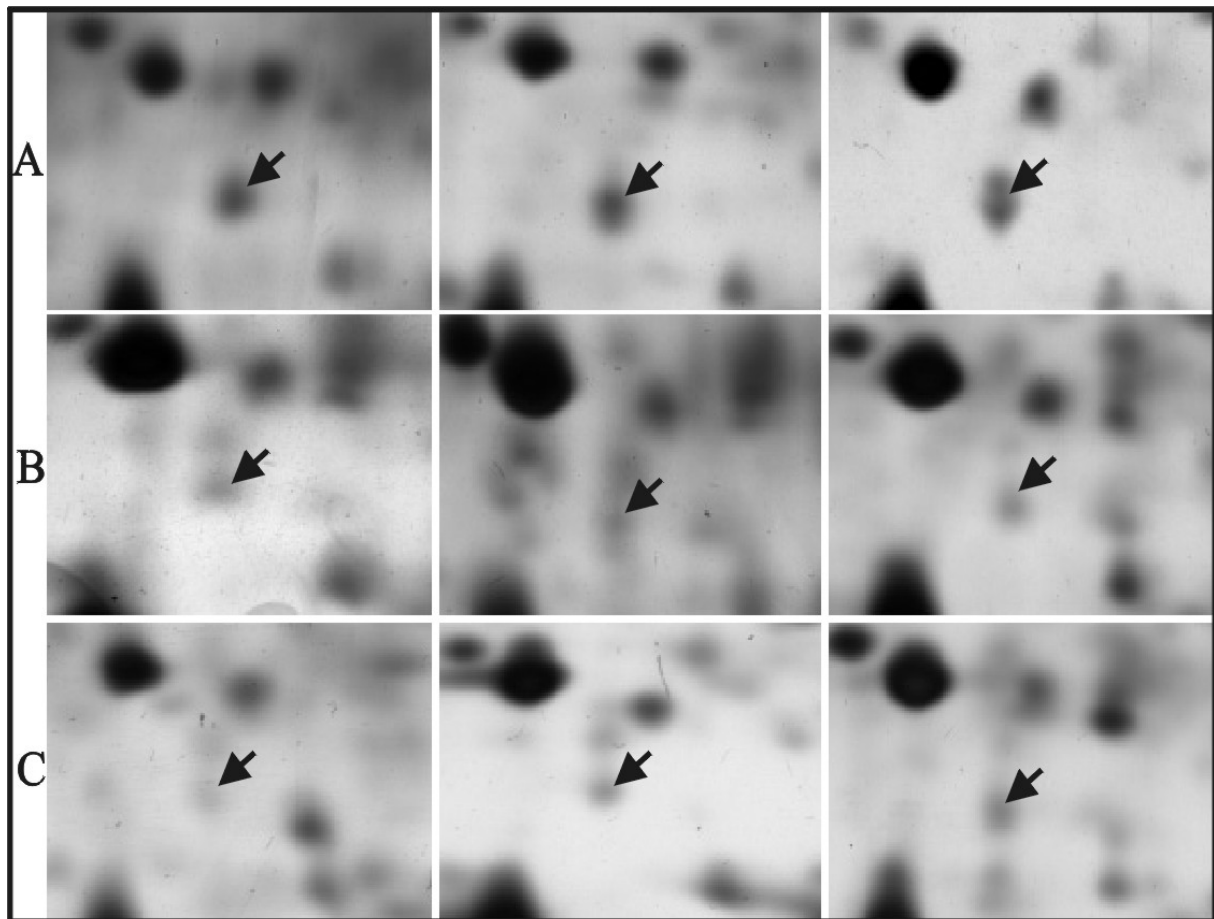


Abbildung 24: Ausschnitte aus 2-DE-Gelen des Endometriums für das Proteine Proteasom, die Serie der A-Ausschnitte aus gesunden Patientinnen, die Serie der B und C aus Patientenproben (Leiomyome).

Hierbei sind in der Serie A die Gel-Ausschnitte der Vergleichsproben mit starker Expression zu beobachten, wohingegen bei den Patientenproben in den B und C Gel-Ausschnitten die Expression dieses Proteins stark herabgesetzt ist (schwache Spots). Die Abbildung 25 zeigt die Gel-Ausschnitte für das Protein Fibrinogen D. Auch in diesem Fall wurde in den Proben erkrankter Frauen gegenüber dem Vergleichskollektiv eine schwache Expression dieses Proteins festgestellt (vgl. Abb. 24C, B).

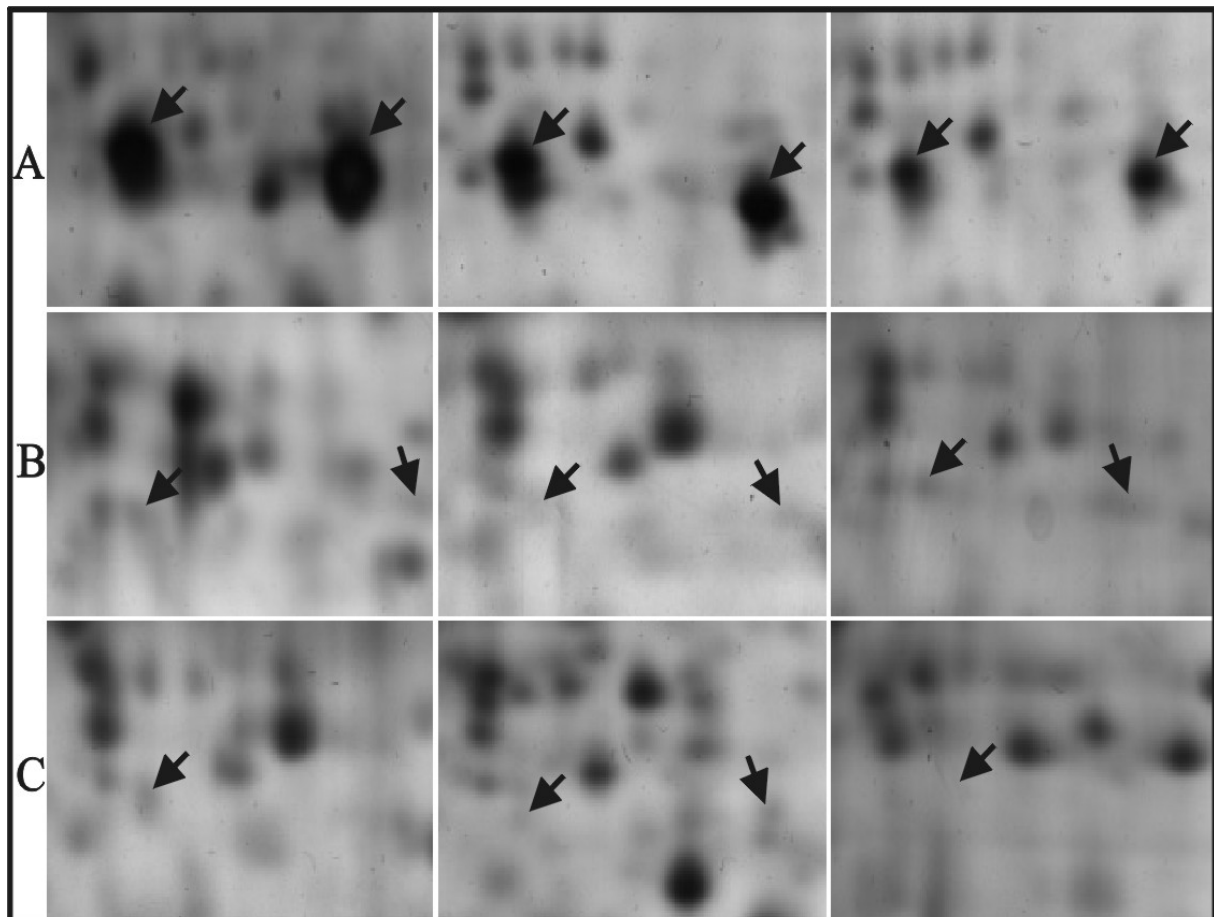


Abbildung 25: Ausschnitte aus 2-DE-Gelen des Endometriums für das Protein Fibrinogen, die Serie der A-Ausschnitte aus gesunden Patientinnen, die Serie der B und C aus Patientenproben (Leiomyome).

4.2.3. In Einzelfällen abweichende Proteinexpression

In 3 Fällen mit myomatös wurde bei zwei weiteren Proteinen (Subtyp der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAP-DH) und Putativ 150P eine deutliche Überexpression gefunden (Gel-Ausschnitte 1-3). Abbildung 26 zeigt die unterschiedliche Expression von GAP-DH in den verschiedenen Uterusproben.

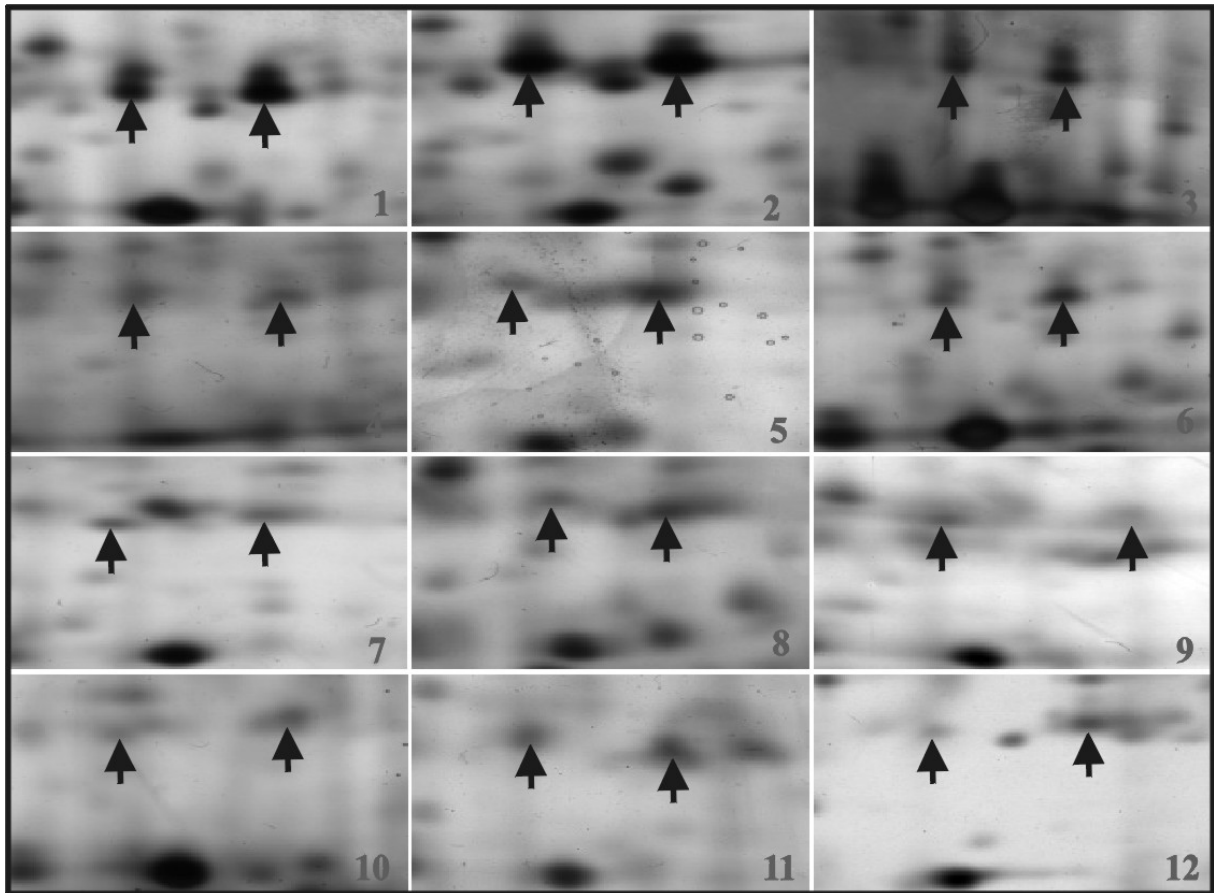


Abbildung 26: Ausschnitte aus 2-DE-Gelen des Endometrium für das Protein GAP-DH, die Ausschnitte 1-9 aus Patientinproben (Leiomyome), Ausschnitte 10-12 aus gesunden Patientinnen. Hier zeigt, wie das Protein bei verschiedenen Patientinnen verschiedener Zyklusphase unterschiedlich exprimiert ist.

Abbildung 27 zeigt die Lokalisation aller der oben genannten Proteine auf einer 2D-Gelelektrophorese. Außerdem wurde durch den Vergleich der theoretischen Molekulargewichtswerte (s.o. die Tabelle) eine Übereinstimmung mit den experimentellen Werten (ausgenommen α 2-Aktin) aus dem 2-DE-Imag beobachtet. Das Protein „ α 2-Aktin“ hat ein theoretisches Molekulargewicht von 42.381 kDa., wohingegen zeigt die Position des Proteins in den 2-DE-Gelen aller Proben jedoch ein Molekulargewicht von etwa 28.5 kDa.

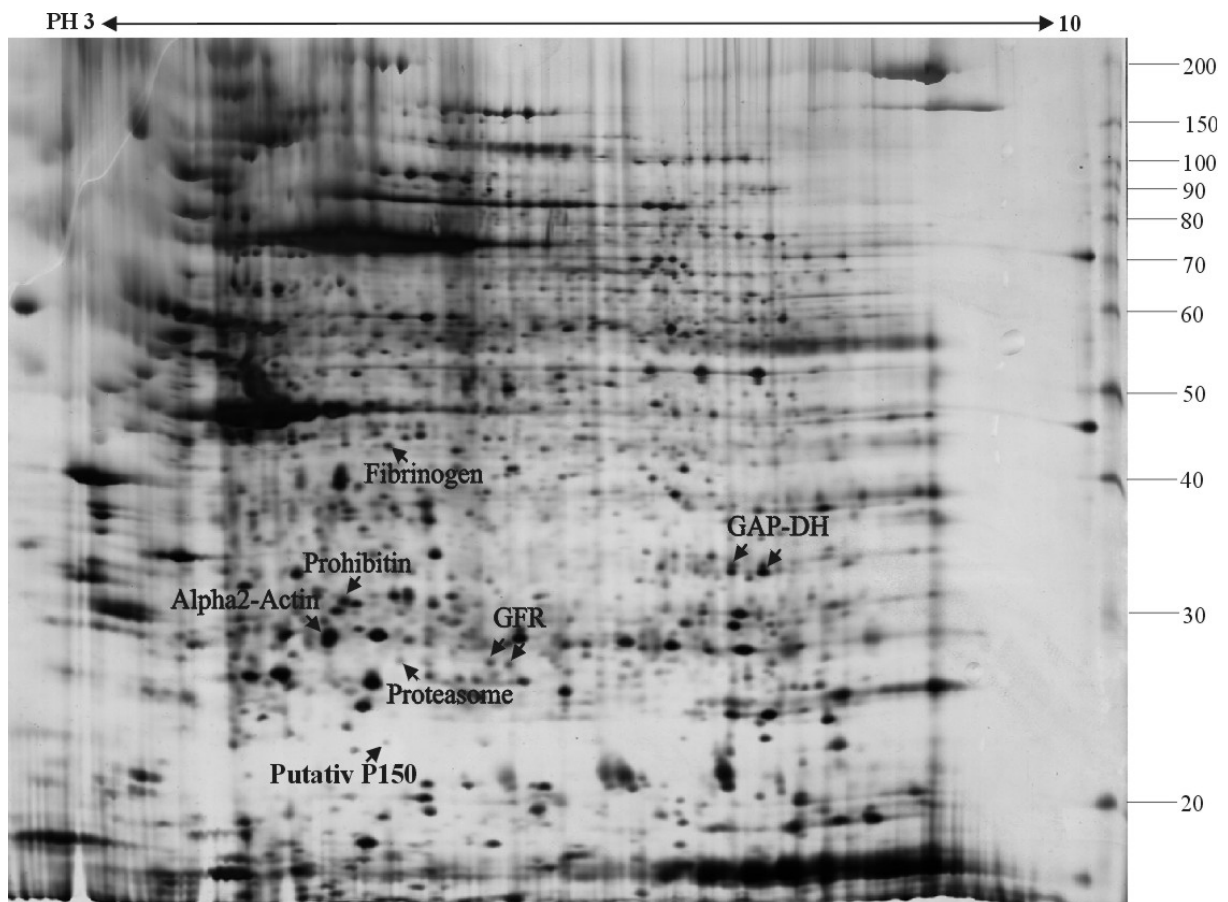


Abbildung 27: 2-DE-Image der gelösten Endometrium-Proteine eines Uterusgewebes, 18 cm IPG-Streifen pH 3-10 NL zweite Dimension 20 cm, 10-15 % SDS-Gradienten-Gel, die Lokalisation aller Proteine, deren Expression variierende Unterschiede bei Uterus myomatosus zeigen.

4.3. Vergleich der untersuchten Gewebsschichten untereinander mittels differentieller Proteomanalyse

Neueste Forschungsergebnisse ergaben Hinweise auf eine deutlich unterschiedliche Funktionalität der inneren, zirkulär verlaufenden Muskelschicht (subendometriales Myometrium) und der außen liegenden Hauptmasse der Uterusmuskulatur. In immunhistochemischen Studien zeigte darüber hinaus das subendometriale Myometrium eine enge Verwandtschaft mit dem Endometrium⁵⁷. Es existieren Hinweise, dass Stammzellen des basalen Endometriums in der Lage sind, an der endometrialen/myometranen Grenze in Muskelzellen zu differenzieren⁸⁷. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten daher im Sinne einer weiteren Charakterisierung der einzelnen uterinen Gewebstypen auch diese

zwei Muskelschichten gegeneinander und mit dem Endometrium verglichen werden.

4.3.1. Vergleich von Endometrium mit subendometrialem Myometrium

Das Endometrium zeigt im Verlauf des Menstruationszyklus und im Rahmen einer Schwangerschaft deutliche makroskopische, mikroskopische und biochemische Veränderungen, also letztlich auch Veränderungen der Proteinexpression. Die Gruppe von Byrjalsen⁸⁸ konnte in einer Proteomstudie am Endometrium von 13 Patientinnen eine unterschiedliche Expression von 125 verschiedenen Proteinen im Zyklusverlauf feststellen. Myometrium wurde bis zur vorliegenden Arbeit noch nie proteomanalytisch untersucht. In der vorliegenden Studie wurden rein zyklusabhängige Abweichungen der Proteinexpression nicht weiter verfolgt.

Das subendometriale Myometrium (SE-Gewebe) ist eine etwa 2 mm breite Muskelschicht, die mit dem Endometrium direkt in Kontakt ist und mit dem Endometrium zusammen die sogenannte Archimetra bildet (Definition und Hintergrund s.o.). Bei der Gegenüberstellung der Gele aus Endometrium und subendometrialem Myometrium wurden in bezug auf die krankheitsbedingten Abweichungen der Proteinexpression fast identische Ergebnisse erhalten. Bei dem Protein Prohibitin wurden kaum Unterschiede an der Expression zwischen Endometrium und SE-Gewebe (sowohl bei Gesunden als auch bei Patientenproben) festgestellt. Im Gegensatz zu den gesunden Uterusproben von Endometrium wurde bei SE-Gewebe allerdings eine sehr schwache Expression von α 2-Aktin beobachtet. In der Abbildung 28 wird dies demonstriert.

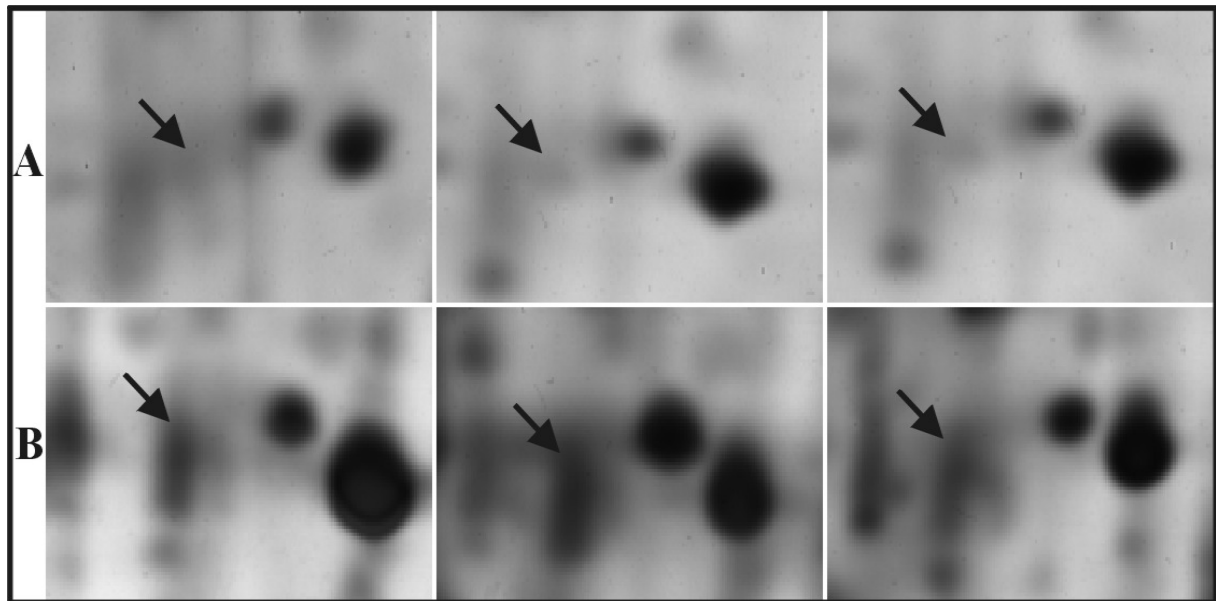


Abbildung 28: Ausschnitte aus den 2-DE-Gelen der Endo- und SE-Gewebeschichten für das Protein Alpha2-Actin, die Serie der A-Ausschnitte aus 3 gesunden Patientinnen des Endometriums, die Serie der B-Ausschnitte aus gesunden Patientinnen des SE-Gewebes.

Gezeigt sind in der Serie der A-Ausschnitte Gele aus gesunden Uterusproben des Endometriums, in denen keine Expression von $\alpha 2$ -Aktin nachweisbar war, wohingegen es eine schwache Expression von $\alpha 2$ -Aktin bei gesunden Uterusproben des SE-Gewebe (in der Serie der B Gel-Ausschnitte) gibt. Bei den Patientenproben läuft die Expression dieses Aktin-Subtyps im internen Vergleich parallel zum Endometrium. Auch die Abweichungen bezüglich Growth Factor Receptor Protein (GFRP), β Proteasom und Fibrinogen D verliefen analog.

4.3.2. Vergleich von Endometrium bzw. subendometrialem Myometrium mit subserösem Myometrium („Neomyometrium“)

Als „subseröses Myometrium“ wird hier die Hauptmasse der Uterusmuskulatur, bestehend aus dreidimensional angeordneten Bündeln kurzer Muskelfasern und den longitudinal verlaufenden, unmittelbar subserös liegenden Muskelbündeln zusammengefasst. Unter phylogenetischen Aspekten wird deutlich, dass dieser Teil des Myometriums zum Aufbringen der erforderlichen Gebärkräfte unter den Bedingungen der Viviparität erworben wurde⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾. Die Auswertung der

Proteomanalyse gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proteinen der SS-Gewebe aller 18 Uterusproben untereinander, also keine Abweichungen bezüglich Zyklusphase oder Grunderkrankung. Im Vergleich zu Endometrium und SE-Gewebe ergaben sich jedoch beim SS-Gewebe einige signifikante Unterschiede. Abbildung 29 zeigt Gel-Ausschnitte aus 9 Uterusproben von SS-Gewebe, in denen eine gleichmäßig starke Expression einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (MW 36.2 kDa und pI 8.26) in allen Uterusproben vorliegt, welche in Endometrium und SE nicht gefunden wurde.



Abbildung 29: Ausschnitte aus den 2-DE-Gelen des SS-Gewebes (suberöses Myometrium) für das Protein GAP-DH, in der Serie der A Gel-Ausschnitte aus gesunden Patientinnen, (B) und (C) aus Patientenproben mit Uterus myomatosus.

Abbildung 30 demonstriert die Expressionsmuster von GAP-DH in den verschiedenen Gewebeschichten. Eine starke Expression dieser Modifikation der GAP-DH ist nur im SS-Gewebe sichtbar, im SE-Gewebe und Endometrium sind die entsprechenden Spots nicht bzw. kaum nachweisbar.

Gleichzeitig wurde hier nachgewiesen, dass die Expression dieses GAP-DH-Typs im SS-Gewebe der Uterusproben weder durch physiologische Veränderungen noch durch die Myomerkrankung des Uterus beeinträchtigt wird.

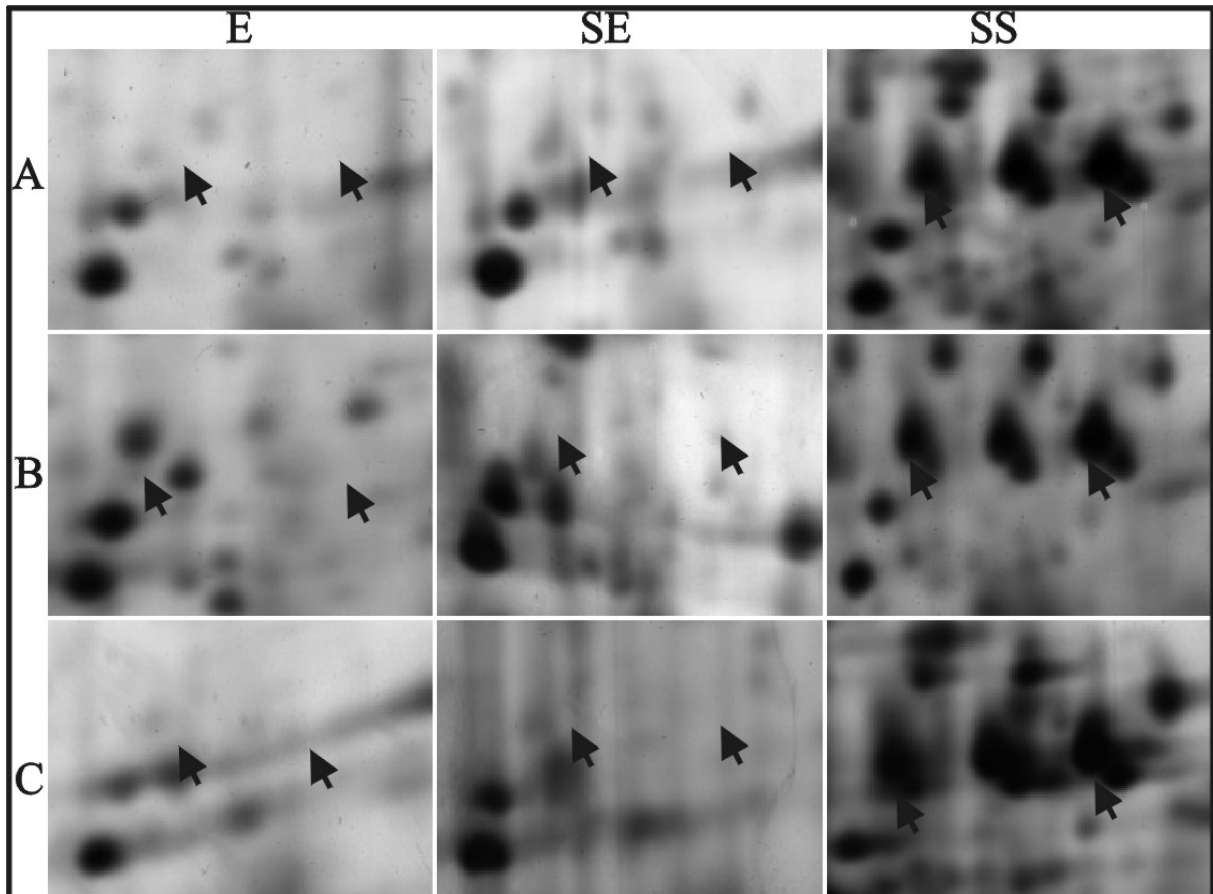


Abbildung 30: Ausschnitte aus den 2-DE-Gelen der drei verschiedenen Gewebeschichten (E-, SE-, und SS-Gewebe) für das Protein GAP-DH, in der Serie A Gel-Ausschnitte aus den drei Gewebeschichten einer gesunder Patientin, B und C Gel-Ausschnitte aus zwei Patientinnen mit Uterus myomatosus.

In SS-Gewebe wurde als zweiter signifikanter Unterschied im Vergleich mit den anderen Gewebeschichten das Expressionsmuster von zwei Aktin-Subtypen beobachtet. Abbildung 31 demonstriert die beträchtlichen Unterschiede der beiden Aktin-Subtypen zwischen den verschiedenen Gewebeschichten, die durch massenspektrometrische Untersuchungen als α 2-Aktin mit dem Molekulargewicht von 42.381 kDa. (cardiac muscle actin, mit rotem Pfeil gezeichnet) und α -Aktin (cardiac muscle precursor) mit dem Molekulargewicht von 42.334 kDa (mit schwarzem Pfeil gezeichnet) identifiziert wurden. Während in den gesunden

Vergleichsproben keine Expression der beiden Aktin-Subtypen im Endometrium beobachtet wurde, zeigte das SE-Gewebe eine schwache Expression, das SS-Gewebe jedoch zeigte immer eine ausgeprägte Expression dieser Proteine (vgl. Abb. 31B). Im Gegensatz dazu wurde bei den Patientinnen mit Uterus myomatosus eine starke Expression dieser Proteine in allen Gewebsschichten gefunden! (vgl. Abb. 31C).

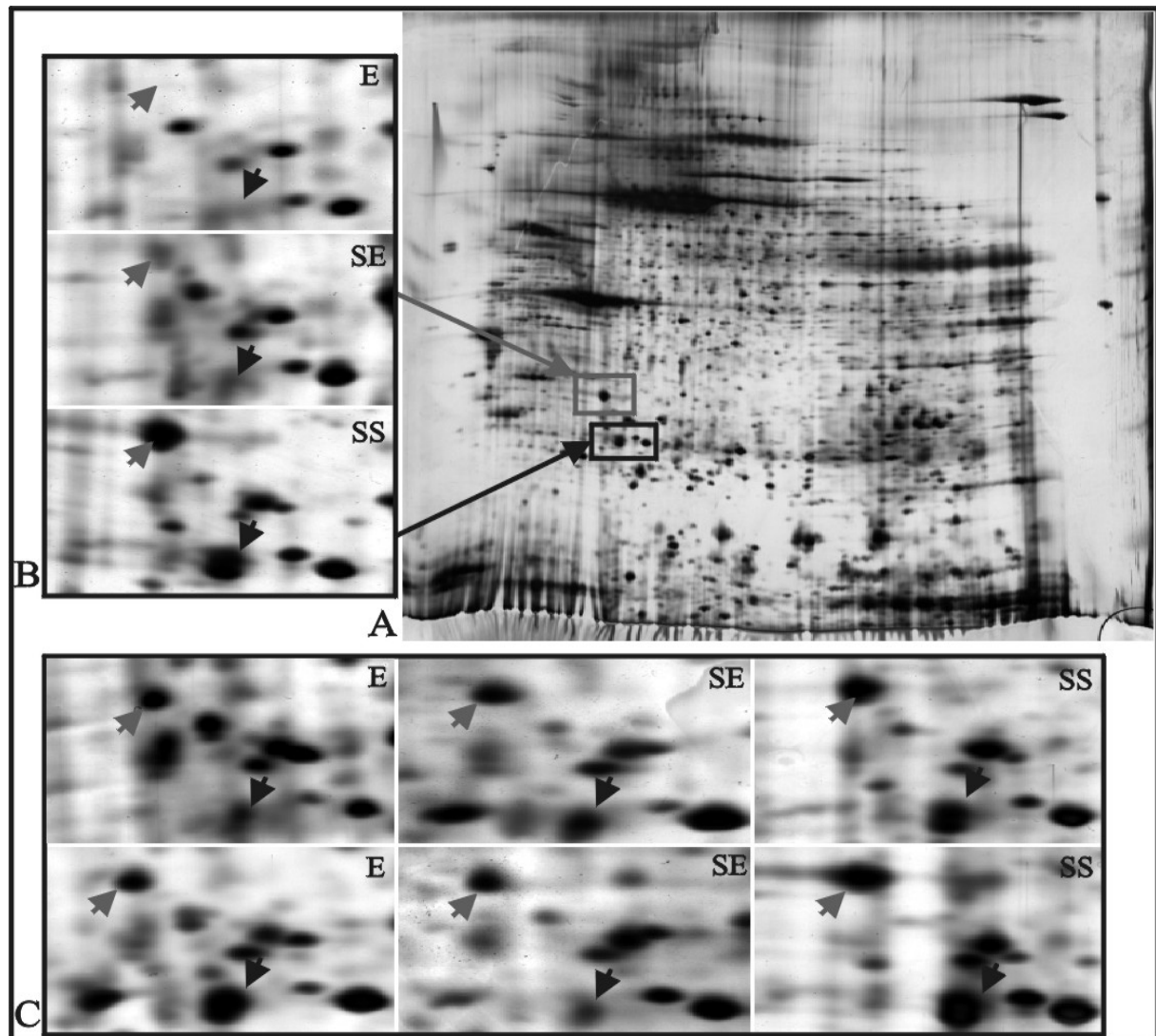


Abbildung 31: Zeigt die Unterschiede an der Expression beider Actin-Subtypen und ihre Lokalisation auf 2-DE-Gel (A), in der Serie der B-Ausschnitte aus einer gesunden Patientin verschiedener Gewebeschichten, in der Serie der C-Ausschnitte aus zwei Patientenproben mit Uterus myomatosus, schwarze **Pfeil** (Cardiac muscle actin) und rote Pfeil (Alpha-Actin, cardiac muscle precursor).

Abweichungen zwischen SE und SS Gewebe wurden auch in der Expression von Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin Peroxidase und Transaldolase gefunden (siehe auch Kap.4.4.2).

4.3.3. Vergleich der Gesamtspotzahl in den verschiedenen Gewebeschichten

Schon bei der Betrachtung der 2D-Gele der verschiedenen Uterusgewebe mit „freiem Auge“ werden deutliche Unterschiede der Spotverteilungsmuster, fast im Sinne eines „finger-prints“ sichtbar. Diese Unterschiede wurden in quantitativer Hinsicht mit Hilfe des Auswertungsprogramms PD-Quest rechnerisch untersucht. Dazu wurden Gele der drei verschiedenen Gewebeschichten (Endometrium, SE-, und SS-Gewebe) von je vier Proben verwendet. Zunächst wurden die Gele des Endometriums mit denen des SE-Gewebes aus jeweils derselben Probe verglichen. Dann wurden die Gele des SE-Gewebes mit denen des SS-Gewebes aus jeweils derselben Probe verglichen. Anschließend wurde die Spotzahl der jeweiligen Gewebeschichten sowie das Verhältnis der prozentualen Matches zwischen den verschiedenen Gewebeschichten bestimmt. Dies wird in der folgenden Tabelle genauer demonstriert.

Gewebe	Spotzahl	match Spots			match Spots %
		SE	SS	E	
E-Gewebe	1300	1000	855	xxxx	74.8 %
SE-Gewebe	1650	xxxxx	1150	1000	65.5 %
SS-Gewebe	2050	1150	xxxxxx	855	52.4 %

Dabei beträgt die durchschnittliche Spotzahl des Endometriums etwa 1300-Spots, des SE-Gewebes etwa 1650-Spots und des SS-Gewebes etwa 2050-Spots. Nach dem Vergleich der Gele des Endometriums mit denen des SE-Gewebes wurden etwa 1000 Spots aus den Gelen der beiden Gewebeschichten miteinander zusammengematcht. Bei dem Vergleich zwischen den des SE-Gewebes und den des SS-Gewebes wurden hier etwa 1150 Spots zusammengematcht. Die Bestimmung des Spot-Matchens zwischen den Gelen verschiedener Gewebeschichten kann auch auf andere Weise erläutert werden. Bei dem Endometrium sind etwa 74.8 % der

gesamten Spotzahl des Gels sowohl in den Gelen des SE- und SS-Gewebes zu finden. Andererseits sind bei SE-Gewebe etwa 65.5 % der gesamten Spotzahl des Gels sowohl in den des Endometriums und des SS-Gewebes zu finden.

Die Abbildung 32 zeigt ein Diagramm für den Spotzahlvergleich der drei verschiedenen Gewebeschichten aus den vier ausgewählten Uterusproben.

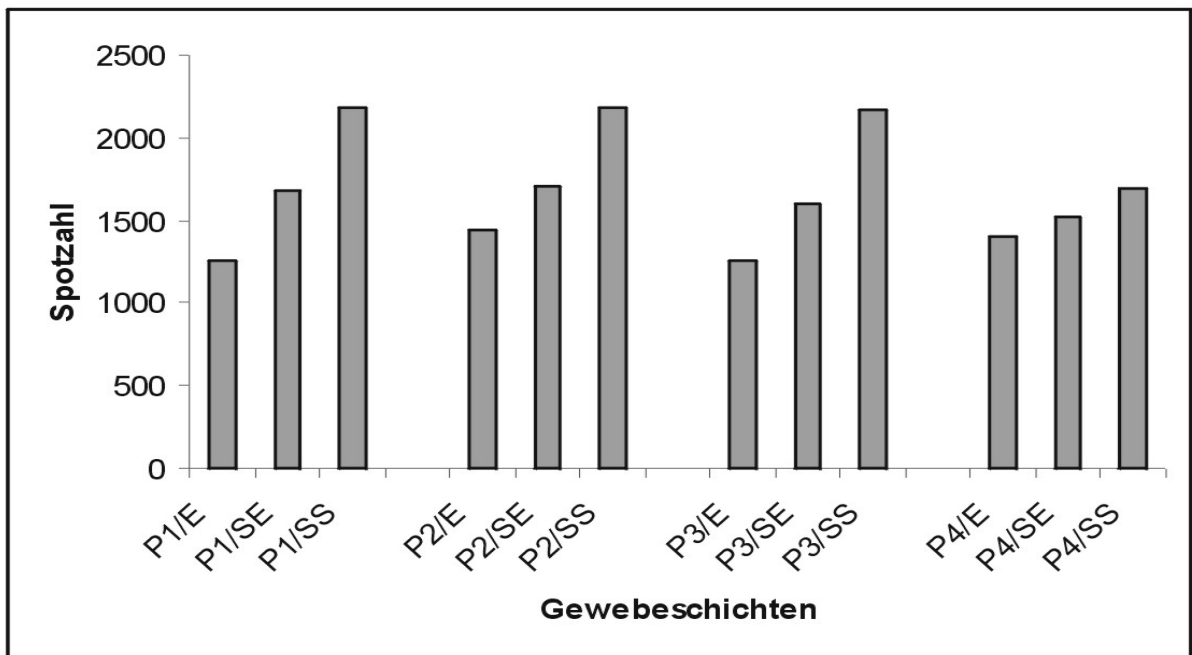


Abbildung 32: Vergleich der gesamten Spotzahl in den drei verschiedenen Gewebeschichten des Uterusgewebes, P = Patientin, Ziffern 1-4 = Patienten-Nummer

4.4. Vergleich des Myomgewebes mit subendometrialem und subserösem Myometrium

Myome haben sowohl makroskopisch als auch histologisch ein charakteristisches Erscheinungsbild. Das vom umliegenden gesunden Gewebe gut abgegrenzte Tumorgewebe wird von einer starken, kapselartigen Außenschicht komprimierter Muskelfasern umgeben. Myome sind monoklonalen Ursprungs, die einzelnen Tumorknoten entstehen unabhängig voneinander im Uterus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Myomgewebe von 8 Patientinnen untersucht

und mit den 2D-Gelen des subendometrialen bzw. des subserösen Myometriums verglichen. Im Myomgewebe konnten einige signifikante Unterschiede in der Proteinexpression festgestellt werden.

4.4.1. Expression von Desmin

Der in Abbildung 33 gezeigte Spot mit einem Molekulargewicht von 53.588 kDa. und einem pI. von 5.21 konnte als das Protein **Desmin** identifiziert werden. Serien (A) und (B) zeigen die entsprechenden Gel-Ausschnitte aus den Myomen von 6 Patientinnen. Als Vergleich sind in Serie (C) 3 Proben derselben Patientinnen aus dem SE-Gewebe, in Serie (D) aus SS-Gewebe gezeigt. Man kann eine signifikante Expression von Desmin im Myomgewebe erkennen, während dieses Protein weder im SE-Gewebe noch im SS-Gewebe nachgewiesen werden konnte.

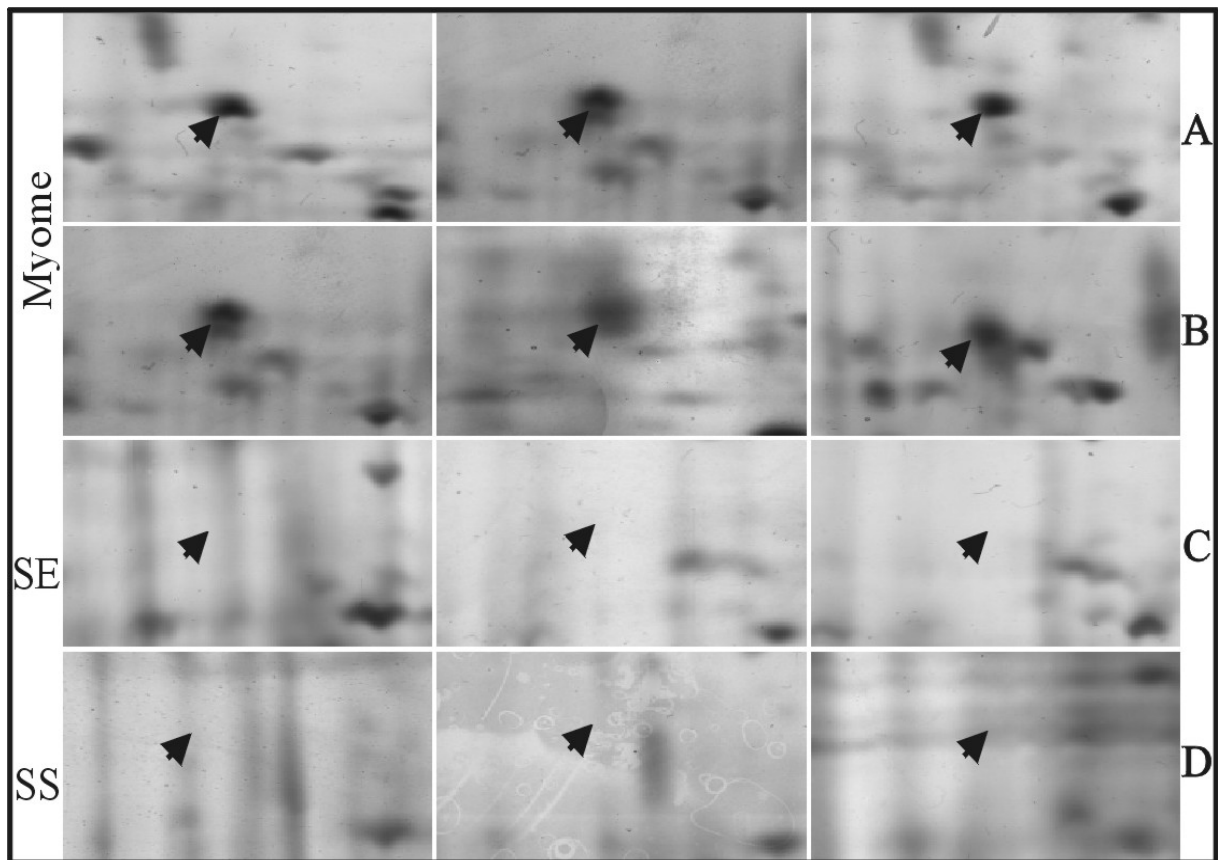


Abbildung 33: Expression von Protein "Desmin" in Myome-Gewebe, in der Serie A und B der Gel-Ausschnitte aus Myome-Gewebe, in der Serie C der Gel-Ausschnitte aus SE-Gewebe gleicher Patientinnen von A Gel-Ausschnitte, in der Serie der D Gel-Ausschnitte aus SS-Gewebe gleicher Patientinnen von C Gel-Ausschnitte.

Das tryptische Verdauprodukt von Desmin wurde in der Abbildung 34 in Form eines Spektrums dargestellt.

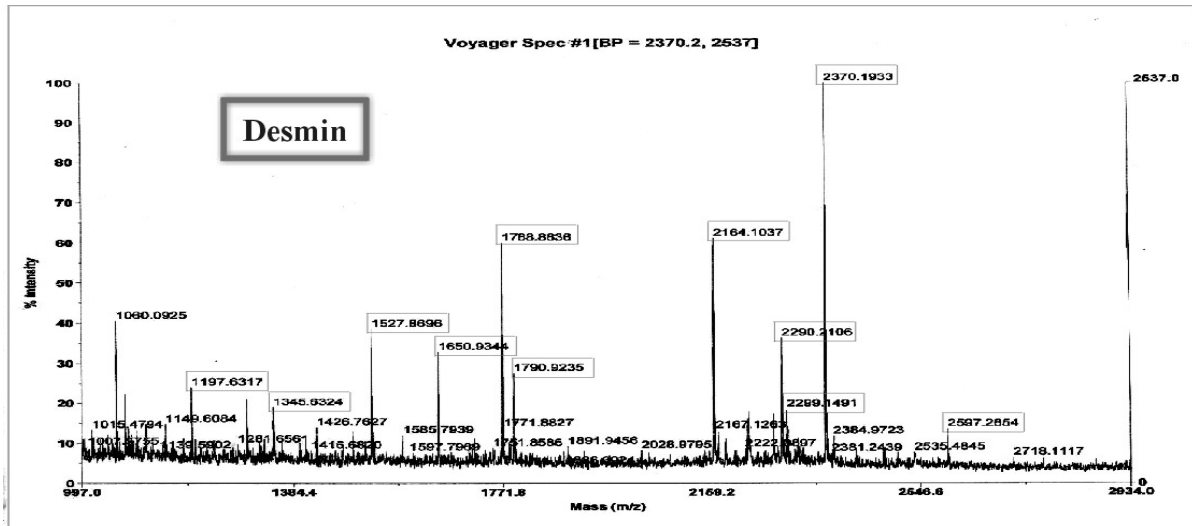


Abbildung 34: MALDI-TOF-MS der erhaltenen Peptide beim tryptischen Verdau des Proteins Desmin aus dem Myomegewebe (die matchende Peptide sind rot markiert).

Bei der Identifizierung des Proteins „Desmin“ über die Datenbankanalyse wurde wie beim Aktin (vgl. Kapitel 4.2.1) eine Liste von 16 Desminsubtypen (4 für Desmin und 12 für Desmin-Mutation) mit einem Mowse-Score in Höhe von 150 % angegeben, die alle als gesuchtes Protein in Frage kommen könnten. Über den Vergleich der Aminosäuresequenz (siehe Aktin) der untersuchten Peptidprobe ergab sich jedoch eine höhere Übereinstimmung (etwa 63 %) zu „Desmin“ (MW = 53.489 kDa. und pI von 5.21) gegenüber allen anderen Desminen und Desmine-Mutationen (Übereinstimmung zwischen 25-33 %). Im Gegensatz zu dem theoretischen Molekulargewicht zeigt die Position des Proteins in den 2-DE-Gelen aller 8 Patientenproben jedoch ein Molekulargewicht von etwa 26.5 kDa.

4.4.2. F-Aktin und Osteoglycin, Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin Peroxidase

Weitere Abweichungen in der Proteinexpression zwischen Myomgewebe und makroskopisch unauffälligem Uterusgewebe sind in Abbildung 35 dargestellt. (A) zeigt Gel-Ausschnitte von 2 Patientinnen für jeweils drei Gewebeschichten. Im Myomgewebe wurde eine deutliche Überexpression dieser Proteine im Vergleich zu dem aus SE- sowie SS-Gewebe gleicher Patientenproben beobachtet. Die Identifizierung dieses Spots aus dem Myomgewebe ergab eine Mischung aus zwei Proteinen, F-Actin (MW von 33.073 kDa und pI von 5.45) und Osteoglycin (MW von 34.243 kDa und pI von 5.46). Die Isolierung des Spots aus SE-Gewebe ergab das gleiche Ergebnis. In Abbildung 35B ist die starke Expression von zwei weiteren Proteinen (Glutathion-S-Transferase und Thioredoxin Peroxidase) im Myomgewebe sowie teilweise im SE-Gewebe und deren Fehlen im SS-Gewebe dargestellt.

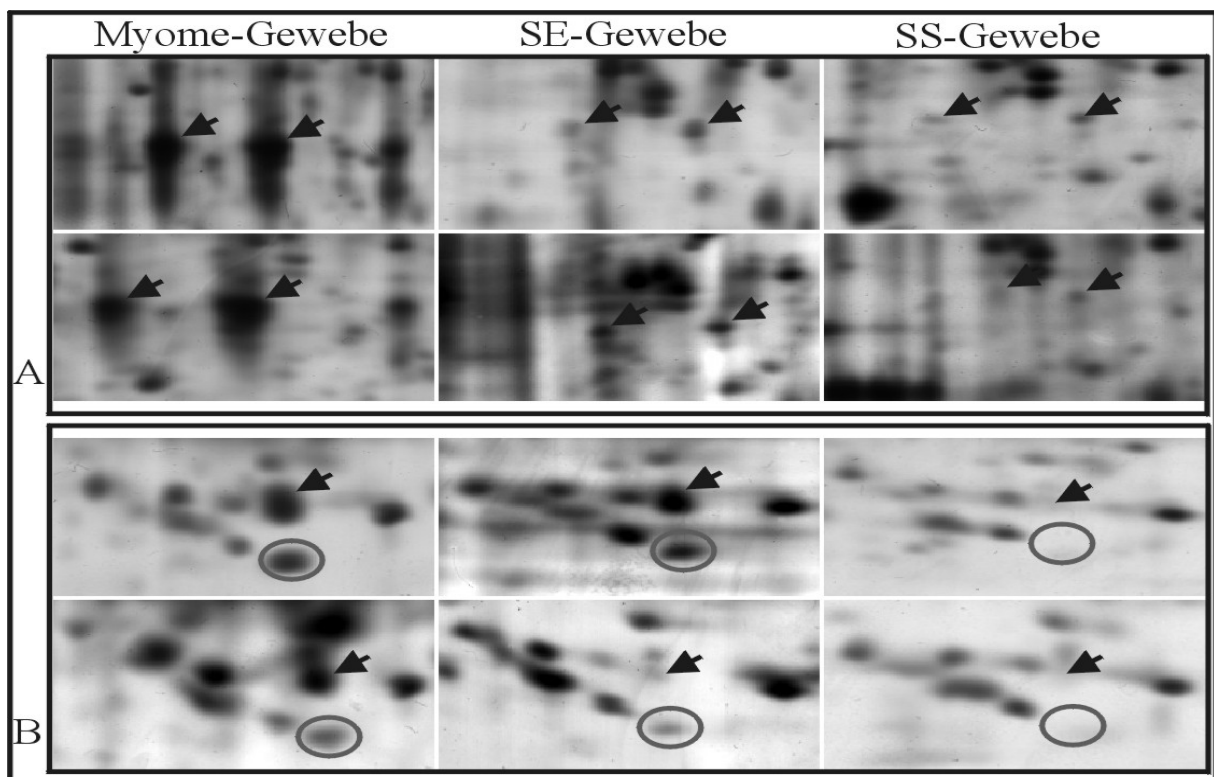


Abbildung 35: Vergleich zwischen Myom-, SE- und SS-Gewebe in der Expression von 3-Proteine (F-Aktin, Thioredoxin-Peroxidase und Glutathion Transferase), (A) sind Gel-Abschnitte aus 2 Patientinnen für das Protein F-Aktin, (B) sind Gel-Abschnitte gleicher Patientinnen für die Proteine Thioredoxin Peroxidase (Ring) und Glutathion Transferase (Pfeil).

4.4.3. Expression von Transaldolase im Myomgewebe

Transaldolase ist das Enzym, über das der Pentosephosphatweg und die Glykolyse miteinander verbunden sind. Es überträgt eine aus drei C-Atomen bestehende Dihydroxyacetoneinheit von einem Ketosedonor auf einen Aldoseakzeptor. Im Myomgewebe erfolgt eine starke Expression der Transaldolase in Form einer Kette von Spots (unterschiedlicher Phosphorylierungsgrad), im Gegensatz dazu lässt sich im SE-Gewebe die Expression nur als einzelner schwacher Spot und im SS-Gewebe überhaupt nicht nachweisen. Abbildung 36 zeigt die entsprechenden Expressionsmuster der Transaldolase anhand der Gel-Abschnitte verschiedener Gewebeschichten von drei Patientinnen.

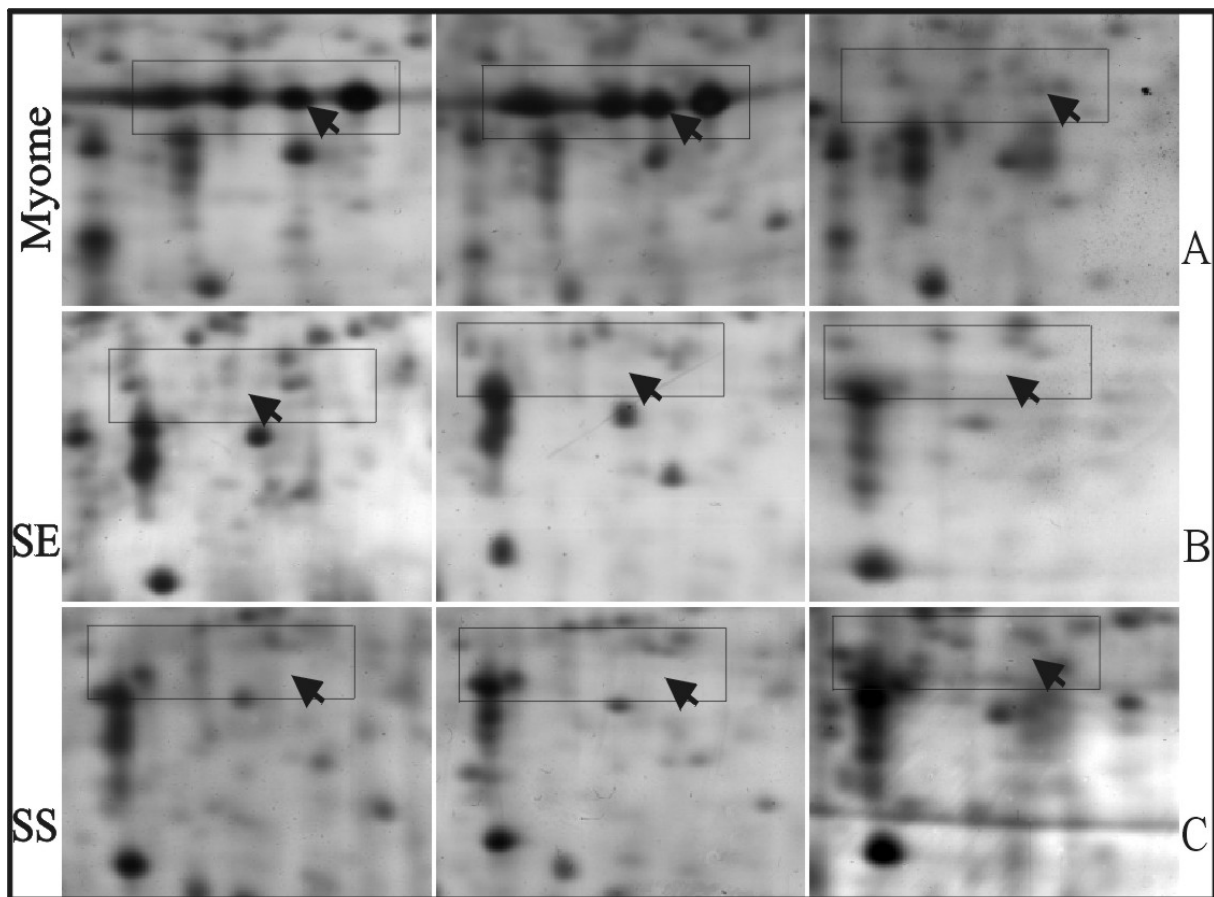


Abbildung 36: Vergleich zwischen Myom-, SE- und SS-Gewebe in der Expression von Transaldolase, die Serie A-Gelausschnitte aus 3 Patientenproben der Myomgewebe, die Serie der B und C der Gel-Ausschnitte aus SE- und SS-Gewebe gleicher Patientinnen von A-Gelausschnitte.

Abbildung 37 zeigt die Lokalisation aller genannten Proteine auf dem Gel sowie die entsprechenden Gel-Ausschnitte der einzelnen Proteine in größerem Format.

Auffällig am Vergleich der Expressionsmuster dieser Proteine zwischen Myomgewebe, SE- und SS-Gewebe ist die deutlich größere Übereinstimmung der Proteinexpression zwischen Myomgewebe und SE-Gewebe im Vergleich zum SS-Gewebe.

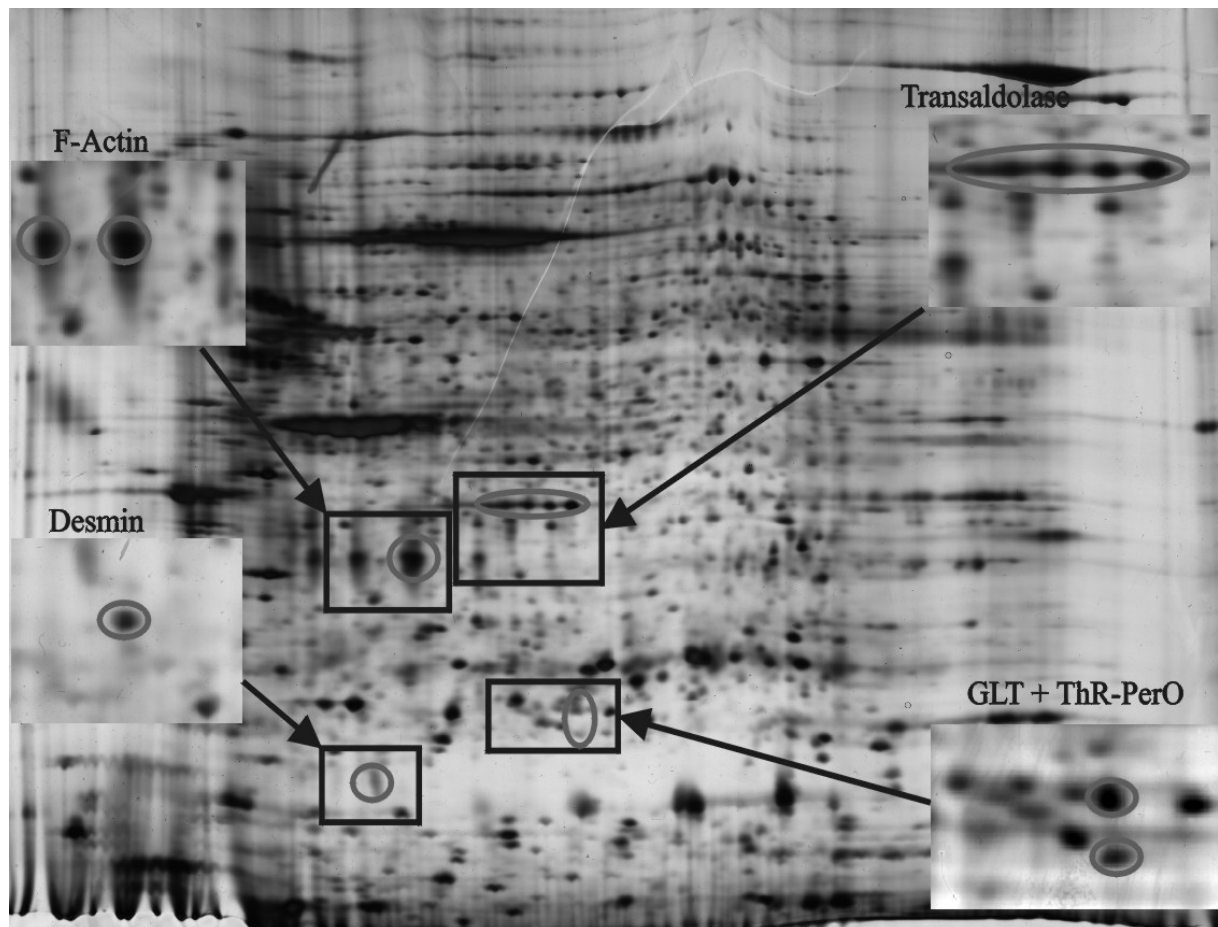


Abbildung 37: 2-DE-Image aus Myomgewebe, 20 m SDS-Gradienten Gel (10-15%), 18 cm IPG. (PH 3-10NL), Lokalisation der variierten Proteineexpression in Myom-, SE- und SS-Gewebe.

4.5. Orientierende Proteinbestimmung

4.5.1. Die ECL-Detektion von ER α und PR β auf 2-DE-Gel

Die hier verwendete Methode (kolloidale Goldfärbung komponiert mit der Immundetektion) ist hier gut geeignet für die einfache Zuweisung der Spots auf den 2-DE-Mustern durch Immunblot. Die hohe Empfindlichkeit der Goldfärbung machen die Zuweisung der positiven Spots präziser als bei anderen Färbetechniken⁸⁹, und bilden damit eine effiziente Qualitätskontrolle des Blots. In der Abbildung 39C ist ein Signal von ER α auf ECL-Film (Beleuchtungszeit von 3 min.) erkennbar. Der tatsächliche isoelektrische Punkt des Spots zeigt zum theoretischen pI von 8.3 eine Abweichung von etwa (1.7). Diese Abweichung könnte aufgrund verschiedener Gründe verursacht werden. Die direkte Zuordnung von Spot des Estrogenrezeptors (**ER**) auf beiden 2-DE-Gelen (vgl. Abb. 38B und C) war bei uns nicht möglich. Wir haben aber den Bereich markiert, in dem das Spot von Estrogenrezeptor aufgrund seines bekannten Molekulargewichts und isoelektrischen Punktes vorhanden sein kann.

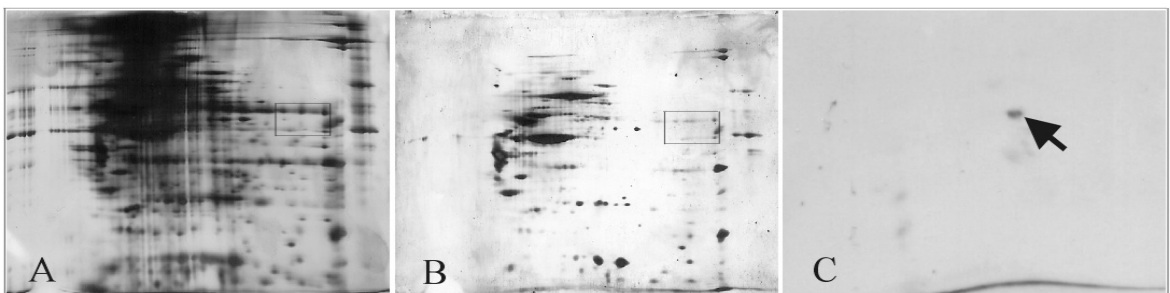


Abbildung 38: Detektion des Estrogenrezeptors in Endometrium der menschlichen Uterus auf 2-DE mittels Western-blot, (A) 2-DE-Gel mit 15 μ g Proteinprobe (Silberfärbung), (B) die 15 μ g transportierten Proteinprobe auf Nitrocellulos-Membran (kolloidale Goldfärbung), (C) detektierte ER auf 2-DE-Gel mittels Western-blot.

Das Problem konnte höchstwahrscheinlich durch die Verwendung von Gradienten-Gel in der 2-Dimension oder durch Auswählen von anderen pI-Bereich für die IEF (zB. pH 6-11) gelöst werden. Da die beiden Möglichkeiten in unserem Labor nicht durchführbar waren, wurde die oben beschriebene Methode für den Zweck nicht mehr verwendet und

stattdessen auf die Detektion von ER auf die 2-DE die allgemeine Methode von ECL-Westernblot zurückgegriffen⁹⁰. Progesteronrezeptor (**PR**) konnte auf Grund seiner hohen Hydrophobizität (GRAVY = + 0.5) in der 2-DE nicht identifiziert werden

4.5.2. Die Detektion von ER α und PR mittels ECL-Western blot

Die Immundetektion von Proteinen auf Blots ist als Standardmethode für die Identifikation spezifischer Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung etabliert. Der Estrogenrezeptor (MW von 66 kDa) wurde in fast allen Zellen sämtlicher Organe (wie Uterus, Knochen, Brustdrüse und ZNS) des menschlichen und tierischen Körpers nachgewiesen⁹¹. Bis auf die Zellen des Uterus und einige Hirnareale exprimieren alle anderen Organe beide Rezeptoren (ER α und ER β). Diese differentielle Expression von ER α und ER β bildet die Grundlage für die organspezifische Wirkung der Östrogene und von organspezifischen Estrogenrezeptor-Modulatoren⁹². Wir konnten auch in den eigenen Untersuchungen zeigen, dass sowohl Endometrium als auch SE-Gewebe des gesunden Uterus in der Proliferationsphase nur den ER α exprimieren. Die Expression des Estrogenrezeptors in Abhängigkeit vom Krankheitsbild verschiedener Patientinnen wurde in der Abbildung 39 genauer demonstriert.

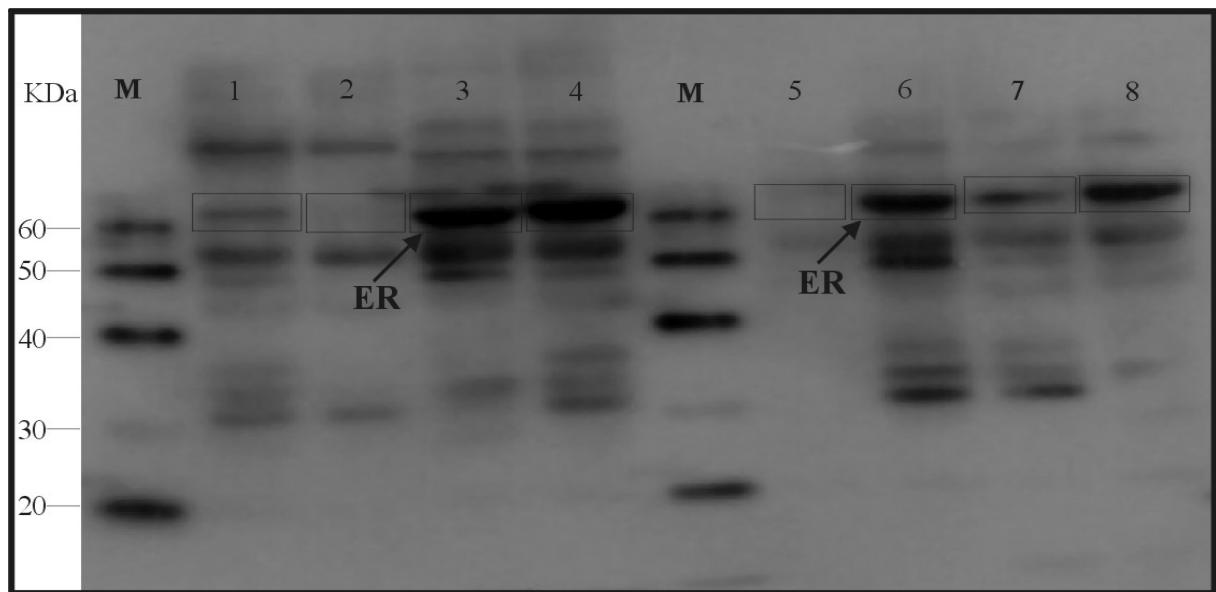


Abbildung 39: Nachweis von ER in Endometrium aus Patientenproben mit Uterus myomatosus, gesunde Patientenprobe als vergleichbar, Proteinmenge 10 μ g, in 10% SDS- Gel (8 X 5.5cm) aufgetrennt, (M=Markerprotein, ER=Estrogenrezeptor).

Die Expression von Estrogenrezeptor wurde bei gesunden Patientinnen nur in Abhängigkeit von Zyklusphase (ausgenommen der Fall von Schwangerschaft) beobachtet (Line Nr. 1 gesunde Probe mit 15-Zyklustag und Line Nr. 2 mit 3-Zyklustag), wohingegen eine starke Expression in Patientinnen mit Uterus myomatosus nur in Abhängigkeit von Krankheitsbild beobachtet wurde.(Vgl. Line Nr. 3-8 Patientinnen mit unterschiedlichen Zyklusphasen). Von den untersuchten 13 Patientenproben (Uterus myomatosu) konnte nur in eine einzige Patientin keinen **Estrogenrezeptor** nachgewiesen werden (vgl. Abb. 39, Line Nr. 5). Wir können aber für den Punkt keine schlüssige Erklärung finden. Bei der Untersuchung in SE-Gewebe wurde für die Expression von ER die ähnlichen wie in Endometrium beobachtet (Abb. nicht gezeigt)

Die Expression von Progesteronrezeptor (MW von 89 kDa) nur zyklusabhängig und nicht in Abhängigkeit vom Krankheitsbild (vgl. Abbildung 40) beobachtet.

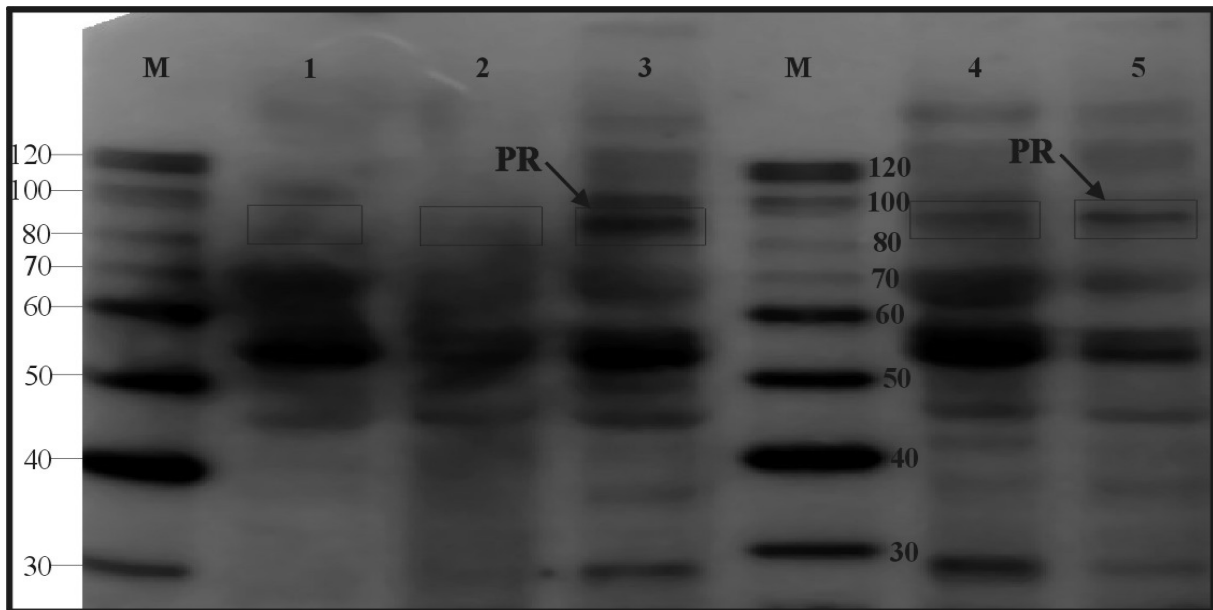


Abbildung 40: Nachweis von PR in Endometrium des Uterusgewebes, verschiedene Patientenprobe mit Uterus myomatosus im Vgl. mit gesunden Patientenprobe, Proteinmenge 10µg, in 10% SDS-Gel (5.5 X 8cm) aufgetragen, BOA-Markerproteine (MoBiTec).

Hierbei wurde eine starke Expression von Progesteronrezeptor bei gesunden und Myompatienten nur in Sekretionsphase beobachtet (auf Line Nr. 3 gesunde Probe und Line Nr. 4-5 Myompatienten), wohingegen wurde keine Expression bei Patientenproben in Proliferationsphase beobachtet (vgl. Line Nr. 2). Im Gegensatz dazu wurde eine sehr schwache Expression bei gesunder Patientin mit 9. Zyklustag beobachtet (vgl. Line 1). Bei der Untersuchung von Progesteronrezeptor in SE-Gewebe wurde auch die identischen Ergebnisse erhalten.

Die auftretenden Hintergrunde in den beiden Abbildungen liegt an der Zeitlagerung des Antikörpers (etwa 8 Monate) vor der Verwendung, Diese kann zur Herabsetzung seiner Bindungsaffinität an Proteinen führen.

Diskussion der Ergebnisse

5.1. Methodenbearbeitung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinexpression des Uterusgewebes unter verschiedenen Aspekten mittels hochauflösender 2-dimensionaler Gelelektrophorese im Sinn einer differentiellen Proteomanalyse untersucht. Dabei wurde erstmalig auch muskuläres Uterusgewebe auf diese Weise analysiert. Die Herkunft der Proteinprobe hat bekanntermaßen einen bedeutenden Effekt auf die Probenbearbeitung. Die in der vorliegenden Untersuchung zu verwendenden Proben stammten mit Ausnahme der Endometriumpuben aus einem sehr harten und zähen (weil stark vernetzten und mit Bindegewebe durchsetzten) muskulären Gewebe (Uterusgewebe). Der erste Arbeitsteil war daher der Entwicklung eines geeigneten Probenaufschlußverfahrens gewidmet, da die herkömmlichen, in der Literatur beschriebenen Verfahren zwar für das Endometrium gute Ergebnisse erbrachten, für das schwierig zu bearbeitende Muskelgewebe mit herkömmlichen Verfahren jedoch keine ausreichende Qualität der 2D-Elektrophorese erzielt werden konnte. Beim Zellaufschluss durch Mörsern verläuft die Probenbearbeitung zwar im gefrorenen Zustand und damit sehr schonend, Schwierigkeiten traten jedoch beim Zellaufschluss von Myometrium, und zwar mehr beim stark vernetzt verlaufenden subserösen (SS) als beim zirkulär verlaufenden subendometrialen (SE) Gewebe auf. Die Ausbeute betrug oft nur etwa 10% w/v. Da die Uterusproben aller Gewebeschichten zur Gewährleistung vergleichbarer Bedingungen grundsätzlich gleich bearbeitet werden mussten, konnte diese Methode im Rahmen dieser Untersuchungen nicht weiter verwendet werden. Beim Zellaufschluss mit der Schwenkmühle konnten alle Proben zwar vollständig pulverisiert werden, nahmen jedoch im Zuge der Bearbeitung, vermutlich aufgrund lokaler Überhitzungsvorgänge eine dunkelgraue Farbe an. Die Qualität der nach dieser Methode der Probenaufarbeitung erhaltenen 2-DE-Images war durch diese Veränderungen der Probe stark

beeinträchtigt, die Gele waren nicht auswertbar. Eine ideale Methode wurde schließlich im Zellaufschluss mittels Kombination von mechanischem Aufschluß mit dem Ultra-Turrax gefolgt von einer Ultraschallbehandlung gefunden. Wesentlich an dieser Aufschlussmethode ist, dass der Aufschluss unter Kühlung stattfinden kann. Damit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine völlig neue Aufschlußmethode entwickelt, die in der Folge die Grundlage für die schonende Aufarbeitung des zähen Muskelgewebes ohne größere Proteinverluste bildete.

Eine 2D-Gelelektrophorese hoher Qualität sollte möglichst viele nicht überlappende Spots zeigen, wenig Hintergrundfärbung, vertikale oder horizontale Streifen aufweisen und eine möglichst gleichmäßige Spotverteilung über die gesamte Gelfläche zeigen. Die Betrachtung der in dieser Arbeit ausgewerteten Gele zeigt, dass die Spotverteilung in den meisten Bereichen der Gele kein ernstes Problem darstellt. Das Auftreten von Spotüberlappungen und einer schlechten Auflösung der Proteine im saueren Bereich (pI3.5-4.6) liegt offenbar an einer besonderen Präzipitationsneigung einer Gruppe von Proteinen im Lauf der Fokussierung, eventuell aufgrund einer mangelnden Solubilisierung dieser Proteine.

5.2. Reproduzierbarkeit der Methode

Durch die im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Optimierungsarbeiten bezüglich der Methodik konnte bezüglich der Auflösung eine hohe Qualität der Gele erreicht und damit eine semiquantitative Auswertbarkeit gesichert werden. Bezüglich der quantitativen Auswertung (Reproduzierbarkeit der Spotintensität und des Spotvolumens) traten auch im vorliegenden Fall die methodeninhärenten Probleme auf, weil offensichtlich der Stand der Technik in der Proteomanalyse bezüglich der hier einfließenden Parameter wie Gelfärbung, Auswertungsverfahren und Probenpräparation noch nicht ausreichend entwickelt ist. Vermutlich ist die Spotdetektion mittels Silberfärbung ein Hauptproblem für die Reproduzierbarkeit der Spotintensität, da dieses Verfahren in einigen Teilen nicht ausreichend kontrollierbar ist. Im Rahmen der Methodvalidierung konnte diesbezüglich gezeigt werden, inwieweit das Auswertungsverfahren (Matcheffizienz)

besonders in Hinblick auf schwache Spots, dadurch beeinflusst wird. Die quantitativen Spotdaten haben durch die Bestimmung der mittleren RSD gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit des Spotvolumens hingegen durch die Probenpräparation nicht stark beeinflusst wird und der in dieser Arbeit erhaltene mittlere RSD-Wert nach Spotnormalisierung von 17 % als gering betrachtet werden kann. Für die semiquantitative Auswertung ist die angewendete 2-DE-Technik zur Proteinanalyse aus dem Uterusgewebe jedoch gut reproduzierbar. Die Spotmuster von unterschiedlichen Ansätzen von Gelen derselben Gewebeprobe zeigen in relativen Werten sowohl quantitativ als auch qualitativ nur geringe Abweichungen. Die Optimierung der Methodik ergab im vorliegenden Fall die Möglichkeit, die Expression von $\approx 1700 (\pm 200)$ Protein-Spots im pI-Bereich von 3-10 NL und den relevanten Molekulargewicht-Bereich von 10-180 KDa. zu analysieren.

5.3. Bestimmung der House-Keeping-Proteine

Als Basis der differentiellen Auswertung der 2D-Gele erfolgte zunächst die Bestimmung der Haus-Keeping-Proteine (HKP), das heißt eines Satzes von Proteinen mit konstanter Expression unter allen gegebenen Bedingungen (Zyklusphase, Gewebstyp, Pathologie). Mit Hilfe der HKP lässt sich über die Gele ein Koordinatensystem legen, mit welchem nachfolgende Proteinidentifizierungen deutlich erleichtert werden können. Die Bestimmung möglichst vieler HKP liefert außerdem die Grundlage einer gewebstypischen Proteindatenbank. Nach der Entwicklung des jeweiligen Gels wurden die als Haus-Keeping-Proteine festgelegten Spots ausgeschnitten, wobei die Spots aus allen Bereichen des Gels ausgewählt worden waren. Nach der Verdauung wurden die Proteine durch MALDI-TOF-MS und Proteinsequenzdatenbank identifiziert. Da die Silberfärbung für die MALDI-TOF-MS nicht kompatibel ist, wurden für die Proteinidentifizierung nach der Durchführung der 2-DE die Proteine mit der Coomassie-Färbung visualisiert. Aufgrund der niedrigeren Empfindlichkeit der Coomassie-Färbung wurden 300 μg Proteinmenge in die Fokussierung eingesetzt. Von 60 als HKP festgelegten Spots, die bearbeitet und mittels MALDI-MS untersucht wurden, konnten jedoch nur 48 Spots tatsächlich identifiziert werden. Unter den identifizierten Spots

fand sich auch HSP 27, einem Transportprotein u. a. des Östrogenrezeptors. Dieses zeigte unter den Bedingungen der vorliegenden Studie nahezu keine quantitativen Schwankungen und wurde dementsprechend den HKP zugeordnet. In Übereinstimmung mit diesem Befund fand die Gruppe um Brialsen in einer Studie über Abweichungen der Proteinexpression im Endometrium beim Endometriumkarzinom eine signifikante Erhöhung dieses Proteins, jedoch keine Erhöhung bei einer benignen Hyperplasie⁵⁷. Die restlichen 12 unidentifizierten Protein-Spots waren entweder in der Sequenzdatenbank nicht erhältlich (unnamed protein product) oder zeigten eine sehr niedrige Mowse-Score. Die meisten identifizierten HKP wurden auf den Gelen in Form von Spot-Ketten beobachtet. Derartige Ketten besitzen gleiches Molekulargewicht, aber verschiedene isoelektrische Punkte. Dieses Phänomen wird durch posttranslationelle Modifikationen verursacht, im Falle der Ketten handelt es sich meist um Phosphorylierungen. Schon durch gering gradige Phosphorylierungen wird der Ladungszustand und damit der isoelektrische Punkt erkennbar beeinflusst, wohingegen das Molekulargewicht nahezu unverändert bleibt.

5.4. Detektion der Proteinmuster der verschiedenen Gewebeschichten.

Die Auswertung der Proteomanalyse gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proteinen der SS-Gewebe aller 18 Uterusproben untereinander, also keine Abweichungen bezüglich Zyklusphase oder Grunderkrankung. Im Vergleich zu Endometrium und vor allem auch zum muskulären SE-Gewebe ergaben sich jedoch beim SS-Gewebe einige signifikante Unterschiede. Im SS-Gewebe wurde eine Kette von Proteinen, von der 3 Spots mit besonders starker Expression in einem experimentellen pI Bereich zwischen 6.8 – 8.8 und einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa zweifelsfrei als GAP-DH experimentell identifiziert wurden, gefunden, welche im SE-Gewebe und Endometrium nicht bzw. kaum nachweisbar waren. Statt dessen konnten in diesen beiden Schichten zwei andere Spots als Modifikationen der GAP-DH mit einem experimentellen pI von 6.5 und 6.8 und einem Molekulargewicht von 36.2 kDa identifiziert

werden, welche deutlich schwächer exprimiert waren, offenbar jedoch ebenfalls Teile einer Proteinexpressionskette bilden. Die Aktivität des Phosphoproteins GAP-DH wird über den Phosphorylierungsgrad reguliert. Da die GAP-DH das Schlüsselenzym der Glykolyse ist, weisen diese Befunde offenbar auf einen deutlichen Unterschied der beiden Muskelschichten im Energiestoffwechsel hin. Zusätzlich auffällig ist, dass im Myomgewebe dasselbe Expressionsmuster wie im SE-Gewebe vorliegt. Aus den in der Literatur verfügbaren Daten lässt sich derzeit kein Beweis für eine niedrigere Aktivität der im SS-Gewebe vorkommenden Proteinspecies ableiten. Die klinischen Befunde (peristaltische Aktivität des SE-Gewebes fast während des gesamten Zyklus im Gegensatz zur ruhenden SS-Muskulatur, üblicherweise erhöhte Stoffwechselaktivität in Tumorgewebe) würden jedoch eine solche Auffassung unterstützen. Die fast selektive Expression der (cardiac muscle actin bzw. cardiac muscle precursor) Aktin-Subtypen in SS-Gewebe kann klinisch nicht interpretiert werden. Besonders auffällig war jedoch die Aufhebung dieser selektiven Expression mit einer starken Expression dieser Proteine in allen Gewebsschichten (auch dem morphologisch unauffälligen Gewebe) bei den Patientinnen mit Uterus myomatosus. Beim Vergleich der Gesamtspotzahl in den verschiedenen Gewebeschichten welcher im Sinne einer weiteren Charakterisierung der uterinen Schichten durchgeführt wurde, traten schon bei der Betrachtung der 2D-Gele der verschiedenen Uterusgewebe mit „freiem Auge“ deutliche Unterschiede der Spotverteilungsmuster, fast im Sinne eines „finger-prints“ hervor. Die gefundenen durchschnittlichen Spotzahlen von etwa 1300 Spots im Endometrium, etwa 1700 Spots im SE-Gewebe und etwa 2100 Spots im SS-Gewebe zeigen doch recht deutliche Unterschiede in der Menge der exprimierten Proteinspecies in den einzelnen Gewebstypen. Dies könnte eventuell als Maß für die Einheitlichkeit des Gewebes dienen. Insgesamt ist aber die Aussagekraft dieser Ergebnisse aufgrund der zu großen statistischen Ungenauigkeit eher kritisch zu bewerten. Sinnvoll könnte eine derartige Analyse jedoch für spezielle Fragestellungen, wie etwa einer Analyse von Proteinfamilien (Ketten) mit einem Matching über sehr kleine

pI/MW-Bereiche eventuell auch in Kombination mit unterschiedlichen IPG-Streifen sein.

5.5. Differentielle Proteomanalyse des Uterus myomatosus

Als thematischer Schwerpunkt wurden im Rahmen dieser Dissertation Abweichungen der Proteinexpression im Falle des Uterus myomatosus, einer der häufigsten Erkrankungen des inneren weiblichen Genitales, im Vergleich zu einem Kollektiv ohne muskuläre Pathologien der Gebärmutter untersucht. Ziel der krankheitsbezogenen Untersuchungen war die Identifizierung von Proteinen, die mit der nach wie vor völlig unklaren Pathogenese der Erkrankung in Zusammenhang stehen könnten, um daraus in weiterer Folge gegebenenfalls neue diagnostische oder kausalthérapeutische Ansätze entwickeln zu können. Durch die vorliegende Arbeit konnten aus den Gelen durch MALDI-TOF-MS in Kombination mit nachfolgender Sequenzdatenbanksuche insgesamt 14 Protein-Spots (entsprechend 0.95 % der gesamten Spotzahl) ermittelt und identifiziert werden, die im Vergleich deutlich abweichende Expressionsmuster zeigten.

Besonders auffällig war, dass die Abweichungen der Proteinexpression nicht nur das eigentliche Tumorgewebe (Myomgewebe) betrafen. In der Mehrzahl der Fälle fanden sich aberrante Expressionsmuster im morphologisch gesunden, sowohl pathoanatomisch als auch histologisch unauffälligen Gewebe der erkrankten Organe. Hier wiederum zeigten vor allem das Endometrium und das darunter liegende subendometriale Myometrium die pathologischen Veränderungen, während das subseröse Gewebe in unseren Untersuchungen keine derartigen Reaktionen zeigte. Daraus ergibt sich die Frage, ob einige der hier identifizierten Proteine im Sinne einer parakrinen Sekretion der Archimetra eine besondere Neigung zur Entwicklung von Uterusmyomen auslösen.

Die Analyse der 2-DE von 13 Patientenproben ergab eine Überexpression von Prohibitin (PHB1) im Endometrium und im subendometrialen Myometrium und eine hohe Expression im Myomgewebe. In den Vergleichsproben wurde in diesen Schichten nur eine sehr schwache

Expression beobachtet, während im subserösen Muskelgewebe eine konstant sehr starke Expression dieses Proteins gefunden wurde. Prohibitin ist ein hochkonserviertes Protein, dessen Homologe von der Hefe bis zum Menschen nachgewiesen werden können und das offenbar eine zentrale Rolle in der Zellphysiologie spielt. Die Deletion des Prohibitin-Gens führt bei Mäusen zum Absterben des Embryos in frühesten Embryonalstadien. Prohibitin wurde mit so verschiedenen Aufgaben wie der Kontrolle des Zellzyklus⁹³, Zellproliferation und Zelldifferenzierung⁹⁴, antiproliferativen Aktivitäten⁹⁵, Alterungsprozessen wie auch der Stabilisierung der Mitochondrien in Zusammenhang gebracht. Eine Rolle im Energiestoffwechsel der Mitochondrien wird vermutet⁽⁹⁶⁻⁹⁷⁾. Besonders hohe Expression von Prohibitin wird in Geweben, die eine besondere Abhängigkeit vom mitochondrialen Stoffwechsel zeigen, gefunden (z.B. in Neuronen, Muskelgewebe, Nierentubuli, Pankreasinzellen u.a.m.). Die Lokalisation des Proteins wurde bisher hauptsächlich an der inneren Mitochondrienmembran vermutet^(98,93,95,96), es mehren sich jedoch die Hinweise, dass der Prohibitinkomplex auch im Zellkern (T47D- und MCF7-Zelle) vorhanden ist⁹⁹. Prohibitin liegt *in vivo* grundsätzlich als Komplex mit einem zweiten, eng verwandten Protein, dem Prohibiton oder PHB 2 vor. Unter pathologischen Umständen wurde eine Überexpression von Prohibitin in einer Vielzahl maligner Tumore gefunden. Die konsistente Überexpression von PHB in den Patientenproben legt nahe, dass diese Expression von Prohibitin hier in engem Zusammenhang mit der Entwicklung der benignen Leiomyome steht.

In der Literatur ist eine Vielzahl von Wechselwirkungen von Prohibitin mit Onkogenen und Transkriptionsfaktoren beschrieben⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾, ohne jedoch ein schlüssiges Konzept über die tatsächliche Funktion dieser Proteins zu liefern. Darüber hinaus stammen die meisten der bisherigen Ergebnisse aus artifiziellen Systemen, eine Übertragung dieser Untersuchungen in *in vivo*-Untersuchungen steht noch aus⁽¹⁰³⁻¹⁰⁴⁾. Die Entstehung eines zellulären, im speziellen mitochondrialen Ungleichgewichts durch erhöhte Expression von PHB könnte auch auf Protein-Ebene zu einer erhöhten Expression von Hormonen (über die Aromataseinduktion) oder Hormonrezeptoren wie dem Estrogen- und Progesteron-Rezeptor (ER & PR) und damit zu einer

lokalen Wirkungsverstärkung von Steroidhormonen führen. Diese Beobachtung könnte durch das Ergebnis der Westernblot-Analyse dieser Rezeptoren in den meisten der Uterusproben aus erkrankten Organen bestätigt werden, in denen eine zyklusabhängige Überexpression von ER sowie PR beobachtet wurde. Auch eine erhöhte Expression des mitochondrialen Enzyms Aromatase, welches das Schlüsselenzym der Östradiolsynthese darstellt, könnte eine Folge einer erhöhten Prohibitin-Konzentration sein. Eine Erhöhung der lokalen Aromataseproduktion bei Uterus myomatosus im eutopen Endometrium wurde bereits von Kitawaki et al¹⁰⁵ beschrieben. Die Überexpression von PHB im Uterusgewebe könnte auch als Reaktion auf die Destabilisierung der mitochondrialen Funktion¹⁰⁶, die zur Zellzyklushemmung der Uteruszellen sowie zur Entwicklung von Tumorzellen führen soll, zu verstehen sein. Inzwischen ist auch über eine Reihe von Mutationen im Prohibitin-Gen berichtet worden¹⁰⁷. Auch eine derartige Ursache der geänderten Regulation der Prohibitinexpression wäre denkbar.

Ein weiterer klinisch höchst bemerkenswerter Befund dieser Arbeit war das Auffinden einer verstärkten Expression des **human Growth Hormone Receptors** (hGHR, Wachstumshormonrezeptor) im Gewebe von Frauen mit Myomen. Das Wachstumshormon existiert in 2 Formen und wird von 5 Genen codiert. Eines dieser Gene ist die hypophysäre Variante, drei Gene werden in der Plazenta exprimiert. Das hypophysäre hGH wird vom Hypophysenvorderlappen sezerniert. Die Regulation des hypophysären hGH-Genes erfolgt durch das *growth hormone releasing hormone* (GHRH) aus dem Hypothalamus, das Schilddrüsenhormon und Glukocorticoide. Die Ausschüttung des Wachstumshormons erfolgt pulsatil mit einem Maximum während der Nachtstunden. Die hypophysäre Sekretion wird entscheidend durch Sexualsteroiden beeinflusst. Das hGH ist für das Wachstum und die Geschlechtsreifeung essentiell. Es entfaltet seine Wirkung am Zielorgan über einen lokal produzierten Faktor, den *Insulin-like growth factor-I*. Normales Wachstum erfordert das konzertierte Zusammenwirken von hGH, IGF-I und den Sexualhormonen. Dabei erhöht eine Erhöhung der Sexualsteroiden die hGH-Spiegel und damit wiederum die IGF-I-Spiegel.

Bei Ratten wurde ein experimentell induzierbares Uteruswachstum unter erhöhten hGH-Spiegeln beschrieben. Frauen mit Akromegalie (hormonelle Erkrankung mit erhöhten Spiegeln von hGH) leiden in einem erhöhten Prozentsatz an Uterusmyomen¹⁰⁸. In einer Studie über die Expression von Growth Hormone Receptor mRNA im Uterus myomatosus konnte sowohl im Myomgewebe als auch im umliegenden morphologisch unauffälligen Gewebe GHR mRNA nachgewiesen werden. In dieser Studie gab es allerdings kein gesundes Vergleichskollektiv¹⁰⁹. Die verstärkte Expression des hGHR bei der Leiomyomatose des Uterus wird in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber hGH durch eine verstärkte Rezeptorexpression könnte ein wesentlicher pathogenetischer Faktor beim Wachstum von Myomen sein. IGF-I verursacht *in vitro* die Differenzierung von Stammzellen zu Muskelzellen. Unter dem Einfluss einer parakrinen Überexpression von IGF-I kam es zur Hyperplasie glatter Muskulatur in Blase, Darm, Uterus und Gefäßen¹¹⁰. In einer immunhistochemischen Studie konnte eine signifikante Erhöhung der ILGF-I-beta-Rezeptor (Insulin light Growth factor receptor I) im Myomgewebe im Vergleich zu umliegendem Muskelgewebe nachgewiesen werden¹¹¹. Die Abhängigkeit des Myomwachstums von Sexualsteroiden findet in einem GH-abhängigen Konzept der Pathogenese durch den Einfluss der Geschlechtshormone auf die GH-Sekretion ebenfalls Berücksichtigung.

Eine Downregulation des entsprechenden Proteins bei Patientenproben zeigt die 2-DE-Analyse im Fall von β 4-Proteasom, im Vergleichskollektiv ist dieses Protein konstant hoch exprimiert. Chrysis et al.¹¹² konnten zeigen, dass ILGF-I die Expression verschiedener Proteasom-Untereinheiten unterdrücken kann. Dieser Befund könnte somit die beim GH-R gefundenen Abweichungen (s.o.) und die Rolle von IGF-I bei der Myomentstehung unterstreichen.

Auch im Vergleich der Aktin-Expression fanden sich interessante Ergebnisse. Die Aktine bilden eine Familie hochkonservierter zytoplasmatischer Proteine, die in allen Eukaryonten vorkommen. Zur funktionellen Charakteristik der Aktine gehören als wesentliche Merkmale die Fähigkeit zur spontanen Bildung filamentärer Strukturen und die

Fähigkeit dieser Filamente, die ATPase-Aktivität von Myosin zu stimulieren⁽¹¹³⁻¹¹⁴⁾. In höheren Eukaryonten existiert eine Vielzahl von Aktin-Isoformen, die von einer noch größeren Anzahl von Genen codiert werden. Die physiologische Bedeutung dieser Vielzahl von Subtypen scheint in der funktionellen Diversifikation zu bestehen. So werden sowohl innerhalb einer Zelle diverse Isoformen gefunden, die Isoformen werden aber darüber hinaus auch gewebstypisch exprimiert. Damit in Übereinstimmung wurden auch im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Expressionsmuster in den einzelnen Gewebstypen gefunden. Das zytoplasmatische **γ -Actin** fand sich schwach im Endometrium, im SE-Gewebe und im Myomgewebe exprimiert, während eine konstant hohe Expression im SS-Gewebe gefunden wurde. **F-Aktin** wurde im Myomgewebe von 8 Patientinnen mit hoher Expression gefunden, während im SS-Gewebe und im SE-Gewebe dieser Frauen nur eine vergleichsweise schwache Expression nachweisbar war. Die beobachtete Überexpression von F-Aktin in Form einer Kettenserie auf den 2-DE-Gelen ist wiederum auf eine posttranslationelle Modifikation (wie etwa Phosphorylierung) zurückzuführen. F-Aktin ist die polymerisierte Form des Aktin-Proteins und dient als Templat für die Bildung von Clustern von cytoplasmatischen Enzymen, insbesondere glykolytischer Enzyme, entweder individuell oder in Übereinstimmung mit den anderen Komponenten der Cytomatrix⁽¹¹⁵⁻¹¹⁶⁾. Diese Proteincluster sind in der Lage, die Kinetik der sequentiell katalysierten Reaktionen zu regulieren. Die Identifizierung zahlreicher glykolytischer Proteine in allen Gewebeschichten des Uterus und im Myomgewebe unterstreicht große Bedeutung der Glycolyse in diesen Geweben. Die zusätzlich im Myomgewebe ebenfalls selektiv erhöhte Expression von **Transaldolase** könnte wieder auf die besondere energetische Situation im Myomgewebe, welches offenbar mehr Energie als die normalen Uteruszellen zum Wachstum und Überleben benötigt, hinweisen (siehe Prohibitin).

Für **α 2-Aktin** (alpha-cardiac actin) konnte eine abweichend erhöhte Expression sowohl im (makro- und mikroskopisch gesunden) Endometrium als auch SE-Gewebe der Patientenproben gegenüber dem Vergleichskollektiv nachgewiesen werden (vgl. Prohibitin). Das mit

MALDI-TOF-MS identifizierte α 2-Aktin hat ein theoretisches Molekulargewicht von 42.381 kDa., die Position des Proteins in den 2-DE-Gelen aller Proben zeigt jedoch ein Molekulargewicht von etwa 28.5 kDa. Der Unterschied im Molekulargewicht könnte auf einige Modifikationen zurückgehen, die im Wesentlichen von den chemischen Prozessen bei der Probenaufarbeitung, der Gelherstellung und dem Proteinverdauen abhängen. Bei der Probenaufarbeitung könnten derartige Veränderungen durch intrinsisch Faktoren, wie z.B. eine unvollständige Inhibition der Proteasen, entstehen. An sich bringt jede zusätzliche Manipulation während der Probenvorbereitung große Gefahr, einige Proteine unerwünscht zu modifizieren. Andere mögliche Modifikationen von Proteinen können auch auf die 2. Dimension zurückgeführt werden. In diesem Fall können die Eigenschaften beziehungsweise das Laufverhalten der Proteine sich ändern, weil die entsprechenden Proteine aufgrund chemischer Wechselwirkung (wie z.B. Bindung von Calcium-Ionen, in Gegenwart von weniger als 0.5 mM EDTA) in SDS-Gelen schneller als dieselben unveränderte Proteine laufen können.

Bei der Identifizierung des Proteins „Aktin“ ergab sich über die Datenbank eine Liste von 4 Aktin-Isoformen, die alle einen gleich hohen Mowse-Score von 114 % haben und möglicherweise als Urheber des angegebenen PMF in Frage kommen. Diese führte zu einer zusätzlichen Komplikation bei der Identifikation des Proteins, die jedoch über den Protein-Prospekt und GAC in die Internet-Seite <http://www.expasy.org> mit hoher Sicherheit gelöst werden konnte. Die Aminosäuren des untersuchten Proteins zeigten danach eine Übereinstimmung in Höhe von etwa 74 % mit denen des Proteins „Alpha 2 Aktin“ (alpha-cardiac actin) gegenüber den anderen Aktin-Isoformen. Aufgrund dieser Aussage der Datenbankuntersuchung kann man damit das gesuchte Protein als „**Alpha 2 Aktin**“ identifiziert.

Die Regulation des Aktin-Stoffwechsels erfolgt durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Differenzierungsfaktoren. Das funktionelle α 2-Aktin spielt im Zellmetabolismus als Bestandteil des Zytoskelets eine bedeutende Rolle bei der ATP-Hydrolyse. Eine Reihe zytoplasmatischer Proteine, darunter auch Bestandteile der glykolytischen Kaskade liegen nicht frei im Zytoplasma, sondern an Aktin gebunden vor,

damit besteht ein weiterer enger Zusammenhang zwischen dem Energiehaushalt der Zelle und den Aktinen. Darüberhinaus sind Aktine an der Regulation vieler Ionenkanäle, an Endo- und Exozytosevorgängen beteiligt. Auch die Abweichung der Expression von verschiedenen Aktin-Subtypen weist wiederum auf ein geändertes Profil des Energiestoffwechsels als zentralen pathogenetischen Mechanismus bei der Myomerkrankung hin.

Desmin, Transaldolase, Thioredoxin-Peroxidase und eine Glutathion-Transferase-Mutante wurden ebenfalls in 8 Myomgewebsproben mit hoher Expression gefunden während im SE und SS-Gewebe keine bzw. nur eine geringe Expression dieser Proteine beobachtet werden konnte.

Das aus den Proben identifizierte Desmin-Protein hat das Molekulargewicht von 53.489 KDa. und ist ein Strukturprotein, dessen Gen, welches 9 Exons¹¹⁷ enthält, auf der 2q35-Band¹¹⁸ liegt. Das funktionelle Protein besteht aus einer zentralen Domäne mit 4 α -helikalen Anteilen, welche von einer nicht-helikalen Kopf- und Schwanz-Domäne flankiert werden¹¹⁹ und wird in allen Muskelzellen exprimiert¹²⁰. In normalen Muskelzellen bildet Desmin das muskelspezifische intermediärfilamentäre Zytoskelet. Desmin ist am Erhalt der strukturellen und funktionellen Integrität der Myofibrillen beteiligt¹²¹ und trägt durch seine Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von weiteren Strukturproteinen zur Aufrechterhaltung der räumlichen Ordnung im Zytoplasma bei. Durch die Wechselwirkung mit einigen Proteinen, insbesondere HSP 27, ist Desmin in der Lage, einen Schutzeffekt gegen die stressinduzierte Zellschädigungen zu erzeugen¹²². Das über Datenbank identifizierte Desmin hat ein theoretisches Molekulargewicht von 53.489 kDa., die Position des Proteins in den 2-DE-Gelen aller 8 Proben zeigt jedoch ein Molekulargewicht von etwa 26 kDa. Der Unterschied im Molekulargewicht ist wahrscheinlich auch hier (siehe den Fall von α 2-Aktin) auf Modifikationen zurückzuführen, die im Wesentlichen von den chemischen Prozessen bei der Probenaufarbeitung, der Gelherstellung und dem Proteinverdauen abhängen. Ein Mutation von Desmin wird aufgrund des Vergleiches der

Aminosäuresequenz der untersuchten Peptidprobe mit denen aller 12 Mutanten-Desmine in der Datenbankausgeschlossen.

Die hohe Expression von Desmin-Proteinen könnte auch im Fall von Myomen zur Anhäufung von abnormalen, unorganisierten Desmin-Aggregaten führen, wie sie z.B. schon für eine desmin-abhängige Myopathie beschrieben wurden¹²³. Dies kann Gegenstand weiterer, immunhistochemischer Untersuchungen sein¹²⁴.

Die sowohl in Endometrium und SE-Gewebe als auch im Myomgewebe erhöht exprimierten Proteine PHB, α 2-Aktin, GHR und eine Desmin kämen aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eventuell als Markerproteine bzw. als pathogenetische Faktoren des Uterus myomatosus in Frage. Etlichen der gefundenen Abweichungen ist gemeinsam, dass sie in engem Zusammenhang mit einem gestörten Energiehaushalt der Zelle stehen. Aus den gefundenen Ergebnissen lässt sich jedoch nach wie vor nicht ableiten, ob derartige Störungen beim Uterus myomatosus als Ursache oder aber als Reaktion auf die Krankheit zu bewerten sind, obwohl gerade diejenigen Fehlexpressionen, die auch im morphologisch gesunden Gewebe gefunden wurden, auf eine Bedeutung als Krankheitsursache hinweisen.

Experimenteller Teil

6.1. Probengewinnung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Gewebeproben von 18 regelmäßig zyklisierten Patientinnen untersucht, die sich aus verschiedenen Gründen einer Gebärmutterentfernung unterziehen mussten. Die Auftrennung der Proben in die verschiedenen Gewebeschichten erfolgte jeweils unmittelbar nach Gewinnung des Operationspräparates unter sterilen Bedingungen. Die separierten Gewebeproben wurden mit einem Skalpell grob zerkleinert und

anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte die Lagerung der Gewebeproben bei -80°C.

6.2. Etablierung des Zellaufschlusses

Für die Homogenisierung der unterschiedlichen Gewebeschichten des Uterusgewebes wurde drei verschiedene Methoden untersucht.

6.2.1. Zellaufschluss durch Mörsern

Zunächst wurde die Gewebeschichten des Uterus (Endometrium, SE-Gewebe und SS-Gewebe) mit einer spezifischen elektrischen Säge voneinander getrennt und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Ein 250 g Gewebestück (aus SE-Gewebe oder Endometrium) wurde mit einem frischen Skalpell zerkleinert und sofort in flüssigen Stickstoff für 2 min. schockgefroren. Dann wurden die Gewebestücke in einer dicken Schale (gefüllt mit flüssigem Stickstoff) mit dem Mörser pulverisiert. Beim Ausdünsten des flüssigen Stickstoffes wurde immer kleine Mengen zugegeben. Nach dem kompletten Pulverisieren der Gewebestücke wurden 100 mg von dem Pulver abgenommen und mit dem 10-fachen Volumen (**1 ml**) Lysepuffer versetzt. Das Homogenat wurde dann in Eppendorf Kaps (1 ml) überführt, und für 45 min. bei 20 000 rpm. (Sigma 3 K30) zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Proteinbestimmung in 100 µl portioniert und für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert.

6.2.2. Zellaufschluss durch Zelmühle

Bei dieser mechanische Methode wurde , ähnlich wie bei der oben beschriebenen Methode, die Pulverisierung der Proben unter gefrorenen Zustand durchgeführt. Für die Pulverisierung wurde eine sogenannte Schwingmühle verwendet. Die Schwingmühle besteht aus einer programmierbaren Zelmühle, einem Mahlbecher und einer Mahlkugel aus Edelstahl. Es wurden 250 g Uterusgewebe (Endometrium, SE- und SS-Gewebe) zerkleinert, anschließend wurde das zerkleinerte Uterusgewebe

und die Mahlkugel in den Mahlbecher eingeführt und für etwa 2 min. in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Auf Empfehlung des Herstellers wurde der Mahlbecher und die Mahlkugel 2-3 mal mit Seesand gewaschen, um eine mögliche Oxidation zu vermeiden. Der Mahlbecher wurde sofort in der Zelmühle eingespannt und die Probe für 3 min. auf 400 Schwenker/min. pulverisiert. Während des Pulverisierungsprozesses wurde den Mahlbecher noch einmal für 2 min. in flüssigen Stickstoff eingetaucht, um ein Auftauen der Uterusprobe zu verhindern. Nach dem Pulverisieren wurden die erhaltenen 50 mg mit dem 10-fachen Volumen (**500 µl**) Lysepuffer homogenisiert und anschließend für 45min. bei 20 000 rpm. zentrifugiert. Schließlich wurde die Proteinprobe nach der Proteinbestimmung portioniert und sofort bei – 80 °C gelagert.

6.2.3. Zellaufschluss durch Ultraschall

Diese einfache mechanische Methode wurde von unserer Arbeitsgruppe selbst entwickelt. Es wurden 100 mg Gewebeprobe (Endometrium, SE- und SS-Gewebe) mit frischen Skalpell zerkleinert anschließend mit dem 5-fachen Volumen (500 µl) Lysepuffer versetzt, und dann für 3 min. stufenweise (0-13 000 rpm.) mit dem Ultra-Turrax weiter zerkleinert. Man sollte den Schritt aufgrund der Schaumbildung (wegen dem Vorhandensein von CHAPS) vorsichtig durchführen. Zu der Suspension wurden noch weitere 500 µl zugegeben. Die Probe wurde dann für weitere 1.5 min. mit Ultraschallpistole (UW 200, Power 30%) unter Kühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde für 45 min. bei 20 000 rpm. zentrifugiert und das Sediment verworfen. Schließlich wurde die Proteinkonzentration des Überstandes mit der Methode nach Bradford¹²⁵ bestimmt. Der Proteingehalt der Proben lag meistens zwischen 10-12 µg/µl. Danach wurden die Proteinproben allquotiert und bei – 80°C gelagert.

6.3. Etablierung der Proteinsolubilisierung

6.3.1. Standardisierung des Lysepuffers

Bei dem Uterusgewebe handelt es sich um sehr hartes Gewebe, das reich an Bindegewebe ist, wie die Abbildung 4 zeigt. Für die Solubilisierung solcher Gewebeproben wurde, in Literaturstellen beschrieben, grundsätzlich eine Lösung aus 8 M Harnstoff (0.48 g/ml), 2 % CHAPS (0.02 g/ml) verwendet. Zusätzlich wurde 20 mM Tris (0.02g/ml) zugegeben, um cytosolischen bzw. peripheren Membranproteinen besser zu lösen. Eine Mischung aus jeweils 0.5 mM PMSF, TPCK und TLCK (1 µl/ml aus Stammlösung. von 0.05 M) wurde als Protease-Inhibitoren zugefügt. Dann wurde 100 mg Uterusgewebe aus Endometrium in 1 ml Lysepuffer homogenisiert. Das Homogenat wurde dann in jeweils 500 µl geteilt, der erste Teil für 15 min. auf 10 000 rpm. und der zweite Teil für 45 min. auf 20 000 rpm. zentrifugiert. Schließlich wurden von jeder Probe 2-DE-Gele hergestellt und miteinander über Bildauswertungssystem „PD-Quest“ verglichen.

6.3.2. Standardisierung des Rehydrierungspuffers

Für die Solubilisierung aller möglichen Proteine während des Fokussierungsprozesses wird von mehreren Gruppen eine Rehydrierungslösung aus Chaotrope (7M Harnstoff und 2M Thioharnstoff), 4 % CHAPS, 20 mM Tris, Bromphenolblau und 0.5 % IPG-Puffer empfohlen. Um eine bessere Proteinauflösung in der 2D-Gelelektrophorese zu erreichen, wurden drei verschiedener Reduktionsmittel in Rehydrierungspuffer eingesetzt: Dithiotriethol (DTT), Tributylphosphin (TBP) und Tricarboxyethylphosphin (TCEP). Der Einfluss auf die Qualität des 2-DE-Bildes wurde untersucht. Etwa 3 ml Rehydrierungspuffer wurde auf drei Kaps zu je 1 ml verteilt. Jeweils 32 mM DTT (5 mg/ml), 2 mM TBP (4.1 mg/ml) und 2 mM TCEP (6 mg/ml) wurden den Kaps zugefügt. Dann wurden jeweils 100 µg Proteinprobe aus dem Endometrium einer gesunden Uteruspatientin in 350 µl Rehydrierungspuffer gelöst. Nach 30 min. Inkubation beim

Raumtemperatur wurde die Probe in der Gel-Matrix der IPG-Streifen (pH 3-10 NL) rehydriert und anschließend über die Nacht fokussiert. Die Proteine wurden nach der Durchführung der zweiten Dimension mit der Silberfärbung nach Blum et al¹²⁶ visualisiert. Schließlich wurden die Gele aufgrund der deutlichen unterschiedlichen Auflösungsqualität optisch miteinander verglichen. Auf die gleiche Weise wurde die Ab- und Anwesenheit von Triton-X100 in den Rehydrierungspuffer untersucht.

6.3.3. Optimierung der aufgeladenen Proteinkonzentration

Für die Optimierung der Proteinkonzentration, mit der durch Silberfärbung eine hohe Qualität der 2-DE-Gele erzielt werden kann, wurden hier drei verschiedenen Proteinkonzentrationen (50 µg und 100 µg sowie 120 µg) gleicher Uterusprobe (SE-Gewebe einer Myome Patientin) in 18cm IPG-Streifen fokussiert. Nach der Durchführung der zweiten Dimension wurden die Proteine mit der Silberfärbung visualisiert. Schließlich wurden die drei verschiedenen Gele über PD-Quest miteinander verglichen.

6.3.4. Typ der verwendeten IPG-Streifen

Um eine optimale Auftrennung der Proteine des Uterusgewebes mittels der 2-DE-Methode wurde ein breiter pI-Bereich „pH 3-10“ ausgewählt. IPG-Streifen sind sowohl als Typ pH 3-10 L als auch Typ pH 3-10 NL kommerziell erhältlich. 100 µg Uterusprobe (SE-Gewebe mit Myome) wurde jeweils in 18 cm IPG-Streifen pH 3-10L und in IPG-Streifen pH 3-10 NL fokussiert, unter Beachten auf der geeigneten IPG-Puffern. Nach der Visualisierung der Proteine wurde die Auflösungsqualität beider Gele miteinander verglichen.

6.3.5. Typ der zweiten Dimension (SDS-PAGE)

Die Proteomforschung hat mit der zweiten Dimension im Gegensatz zu der ersten Dimension sehr wenig Probleme. Trotzdem wurde die Auflösungsqualität der Proteine auf dem homogenen Gel und SDS-Gradientengel untersucht. Aus dem SE-Gewebe eine Patientenprobe wurde

2 x 100 µg Proteinprobe in IPG-Streifen pH 3-10 NL fokussiert. Die fokussierten Proteine wurden einmal auf 10 % SDS-Gel und auf SDS-Gradientengel (10-15%) übertragen. Nach der Visualisierung der Proteine wurden beide Gele miteinander optisch verglichen.

6.4. Reproduzierbarkeit der Methode

6.4.1. Reproduzierbarkeit der Probenpräparation

Zunächst wurden die Gewebeschichten des Uterus (Endometrium, subendometriales Myometrium und subseröses Myometrium) im gefrorenen Zustand (Uni. Klinik Wien) auseinander präpariert und getrennt bei – 80°C aufbewahrt. Für die vorliegende Untersuchung wurden Proben aus Endometriumgewebe einer Patientin (Ut. myomatosus) verwendet. Ein kleines Gewebestück (400 mg) wurde in vier gleiche Teile (A, B, C, D) zu jeweils 100 mg zerteilt, dann wurden die vier Gewebestücke mit dem gleichen Lysepuffer unter gleichen Bedingungen bearbeitet. Schließlich wurde die Proteinkonzentration der vier Proben mit der Methoden nach Bradford wie folgend bestimmt: 100 µl (1:50, 1:100 bzw. 1:200 verdünnte) Proteinlösung wurden zu 1 ml Bradford-Reagenz gegeben, kräftig gemischt, dann 5 min. beim RT inkubiert und die Extinktion photometrisch bei 595 nm gegen Blindprobe (Leerwert) bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit Hilfe einer mit 0.5 mg/ml BSA (Rindserumalbumin) erstellten Eichkurve (serielle Verdünnungsreihe: 5, 10, 15, 20 µg/ml). Der Proteingehalt der vier Proben (A, B, C, D) lag bei etwa 9.5 µg/µl. Von der Probe A werden am ersten Tag genau 100 µg Proteinmenge für vier Gele vorbereitet, indem das entsprechende Volumen von 100 µg (9.5 µl) in 350 µl Rehydrierungspuffer aufgenommen wurde und bei RT für 30 min. inkubiert.

6.4.2. IEF in IPG-Streifen

Die Probelösung wurde nach der Inkubation bei 15000 g für 5 min. zentrifugiert, anschließend in die Strip-Holder pipettiert und die 18 cm IPG-Streifen (pH 3-10 NL) luftblasenfrei auf die Probelösung gelegt. Die Rehydrierung des Gels und die Fokussierung der Probe erfolgen bei 20 °C nach folgendem Programm: 12 h Rehydrierung ohne Spannung, dann folgten für jeweils 30 min. graduelle Spannungserhöhung auf 500, 1000, 2000, 4000 und 8000 V und schließlich eine Fokussierung bei 8000 V für 56000 Vh. Am Ende der Fokussierung waren in der Regel folgende Parameter erreicht ; $V = 8000V$, $I = 29mA$ und ein gesamtes Voltstundenintegral von 61750 Vh.

6.4.3. Äquilibrierung der IPG Gelstreifen

Bevor die IEF-Gele auf die Oberfläche eines SDS-Gels aufgelegt werden können, müssen die fokussierten Proteine noch mit SDS beladen werden, um einen optimalen Proteintransfer von der 1. zur 2. Dimension zu erzielen. Hier werden diese Streifen in 10 ml Äquilibrierlösung [6 M Urea, 50 mM Tris, 2 % SDS, 30 % Glycerin, 30 mM (100 mg/10ml) DTT und etwa Bromphenolblau] 15 min. unter langsamen Schütteln inkubiert. Dann folgte eine Inkubation für weitere 15 min. in der gleichen Lösung, ausgenommen, dass DTT durch 2.5 % (250 mg/10ml) Iodacetamid ersetzt war.

6.4.4. Die zweite Dimension

6.4.4.1. Herstellung der SDS Gradientengelen

Gemäss O'Farrell's Arbeitsprotokoll werden die meisten 2D-Elektrophorese bis heute in vertikalen SDS Gradientengelen durchgeführt. Dabei wird das klassische System nach Laemmli in geeigneter Weise angepasst. Für unsere Untersuchungen haben wir in der zweiten Dimension SDS-Gradienten-Gele mit Vernetzungsgrad von 10-15% T hergestellt. Vor dem Gießen der Gele müssen die Glasplatten/-Küvetten

sorgfältig gesäubert werden, dann mit Aqua destilliertem Wasser gespült und schließlich mit Aceton behandelt werden. Die sauberen Glasplatten werden in der Gieß-Vorrichtung (Gieß-Apparatur für 10 SDS-Gele, aus Bio-Rad) gestapelt. Zwischen den einzelnen Gelküvetten liegen jeweils dünne Acrylfolien, um nach dem Auspolymerisieren des Polyacrylamids die Platten leicht voneinander trennen zu können. Der aus zwei Behältern bestehende Gradientenmischer wurde einerseits mit der Gieß-Apparatur und andererseits mit der peristaltischen Pumpe über kleine Schläuche (\varnothing von 0,5 cm) und zwei Hähne, die das Volumen der Acrylamidlösung regulieren, verbunden. Der eine Behälter, der näher am Flüssigkeitsausgang liegt, wurde mit der weniger dichten Acrylamidlösung gefüllt und mit einem Rührer bestückt, der andere mit der dichteren Acrylamidlösung. Bei Öffnung der Verbindung zwischen den Behältern strömt die dichtere Lösung unter die leichtere, durch die konstante Vermischung mit dem Rührer wird die Dichte der leichteren kontinuierlich erhöht, bis am Ende des auslaufenden Gradienten die reine Lösung höherer Dichte kommt (die Geometrie der Behältnisse steuert die Beschaffenheit des Gradienten). Das Gesamtvolumen der beiden Acrylamidlösungen für das niedrig und das hoch konzentrierte Ende des Gradienten haben wir jeweils für die verwendete Apparatur und die 8 Gele vorher genau bestimmt, indem wir das Gesamtvolumen der niedriger konzentrierten Acrylamidlösung von 152 ml und der höher konzentrierten Lösung von 152 ml (inklusive 80 μ l TEMED und 600 μ l APS) zusammengefasst haben. Mit dem berechneten Volumen wird die Gelhöhe etwa 5 cm unter der Glasplattenkante erreicht. Die Gele werden dann sofort mit Wasser beschichtet. Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurde etwa 4 cm Sammelgel gegossen. Schließlich werden die Gele über Nacht bei 4 °C gelagert.

6.4.4.2. Durchführung der SDS Gelelektrophorese

Die SDS äquilibrierten Gelstreifen wurden vorsichtig mithilfe eines Spatels an die Oberfläche der SDS-Gel aufgesetzt und so den vollständigen Kontakt zwischen SDS-Gelen und IPG-Streifen hergestellt. Man achtete aber darauf, dass keine Luftblase unter den Gelstreifen eingeschlossen werden, schließlich wurden die IPG-Streifen mit 0.5 % Agaroselösung bis zu dem oberen Rand der Glasplatten befestigt und anschließend die jetzt kompletten Gelküvetten in die SDS-Apparatur mit dem temperierten Elektrodenpuffer eingesetzt. Nach dem Zusammenbauen der Apparatur wurde die Elektrophorese bei gleicherbleibender Temperatur 12 °C (über Thermostatkühler) und konstanten Stromfluss von 25 mA/Gel bzw. bei konstanter Spannung von 550 mV für etwa 1 h durchgeführt, um einen möglichst vollständigen Proteintransfer zu gewährleisten. Nach dem Eintritt der Proteine in das Trenngel wurde der Stromfluss bis auf 50 mA/Gel bei gleicher Spannung erhöht und bis zum Ende des Laufes beibehalten (der gesamte Zeitablauf dauerte meistens etwa 3.5 h).

6.4.4.3. Visualisierung der getrennte Proteine

Die elektrophoretisch getrennten Proteine können im Gel ausgefällt und mithilfe „universeller“ Färbemethoden wie Silber, Coomassie, Fluoreszenzfärbung etc. sichtbar gemacht werden. In dem Projekt haben wir die Proteine mit der modifizierten Silberfärbung nach Blum wie folgend visualisiert: Zunächst werden die Gele mit (40 % Methanol und 10 % Essigsäure) für 1.5 h. fixiert, um die Proteinaffinität, insbesondere kleine Proteine, zur Gelmatrix zu erhöhen und den Rest von SDS zu entfernen, anschließend werden die Proteine für 2 x 20 min. mit 30 % Ethanol und für 1 x 20 mit destilliertem Wasser gewaschen, um das überschüssige Ethanol zu entfernen. Die Proteine werden für 1 min. mit 0.02 % Natrium-Thiosulfat (200 mg/1L) oxidiert, weil sie erst im oxidierten Zustand von Silber-Ionen gebunden werden können. Die Proteine werden dann 3 x 20 sec mit entionisiertem Wasser gewaschen, um den Rest von Natrium-Thiosulfat auszuwaschen. Dann für 1.x.30 min. in 0.2% Silbernitrat und 0.02 % Formaldehyd bei RT inkubiert, Der überschüssige Silbernitrat wird

3 x 20 sec. mit entionisiertem Wasser ausgewaschen. Die Proteine werden dann für genau 4 min. mit 3 % Natriumcarbonat und 0.05 % Formaldehyd entwickelt und folgt ein kurzes Waschen mit destillierten Wasser. Die Entwicklungsreaktion wird mit 0.5 % Glycin (für etwa 5 min.) gestoppt. Schließlich werden die Gele für 3 x 10 min. mit entionisiertem Wasser gewaschen. Nach dem Visualisieren der Proteine werden die Gel-Images mittels Bio-Rad Densitometer Typ 710 gescannt und anschließend mit der Software PD-Quest 6.1 ausgewertet. Die Parameter für die Spotdetektion mit Hilfe von PD-Quest „Spot-detektion Wizard“ wurden für alle Gele identisch gewählt. Manuelles Editieren von Spots war in einzelnen Gelen nötig. Für die Zuordnung und das Matchen von Spots wurden für die jeweilig bearbeitete Probe ein Gel als Mastergel ausgewählt und etwa 30-40 Spots als „Landmark“ ausgesucht, die in allen Gelen vorhanden sind. Der gesamte Prozess wurde mit der Probe **B** am zweiten Tag, der Probe **C** am dritten Tag bzw. der Probe **D** am vierten Tag gleich durchgeführt.

6.5. Bestimmung von House-Keeping-Proteinen

Für die Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie müssen die Proteine mit einer kompatiblen Färbemethode visualisiert werden. Da die visualisierten Proteine mittels Silberfärbung reich an Formaldehyd sind, welches ein starker Störfaktor für die Massenspektrometrie darstellt, wurden hier die Proteine mit einer anderen Färbemethode, nämlich die Coomassie nach Neuhoff et al.¹²⁷, visualisiert. Dabei wurde die aufgetragene Proteinkonzentration wegen der unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Färbemethoden jeweils angepasst. 300 µg Proteinmenge (≈ 25µl) wurden aus einer Patientenprobe (Endometrium, 14 Zyklustag) vorbereitet und das entsprechende Volumen der 300 µg in 400 µl Rehydrierungspuffer gebracht. Nach der Durchführung des Verfahrens der 2-DE wurden die Proteine mit der modifizierten Coomassie-Methode wie folgt visualisiert: Das Gel wurden zunächst in einer 25 x 25 cm Plastikschale mit 12 % Trichloressigsäure (TCA) für 2 h. fixiert und anschließend die Proteine für 3 min. mit destillierten Wasser gewaschen, um die überschüssige TCA zu entfernen. Dann wurde die Färbung über

Nacht mit der Färbelösung (200 ml Färbelösung II, 20 ml Färbelösung I und 30 ml Methanol/Gel) durchgeführt. Hierbei besteht die Farblösung I aus (30 g Coomassie G250, 100 ml Ethanol und 200 ml Aceton) und die Farblösung II aus (100 g Ammoniumsulfat, 20 g H₃PO₄ und H₂O). Man achtete darauf, dass die Färbelösung direkt vor dem Gebrauch vorbereitet wird. Die Entfernung der Farbhintergrund auf dem Gel erfolgte in drei Schritten: erstens die Proteine für 3 min. in 0.1 M Tris/H₃PO₄-Puffer (pH 6.5) waschen und dann für genau 1 min. mit 25 % Methanol spülen, schließlich wurde der Protein-Farbstoff-Komplex für 30 min in 20 % Ammoniumsulfat-Lösung stabilisiert.

6.5.1. Verdauung und Vorbereitung der Proteinprobe

Nach der Visualisierung wurden zunächst die für die HKP auszuschneidenden 60 Spots markiert, dann mit einem scharfen Messer etwa (1-2mm Ø) aus dem Spotzentrum ausgeschnitten. Die tryptische Verdauung der Proteine wurde entsprechend der folgenden beschriebenen Schritte durchgeführt: Die Gelstücke wurden für 2 x 15 min. mit (50 % Acetonitril/25mM Ammonium Bicarbonatlösung) gewaschen, dann folgte für 2 x 10 min. eine Entwässerung der Gelstücke mit ACN. Das ACN wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, indem darauf geachtet wird, dass die Pipette mit dem Gelstück nicht in Berührung kommt, ansonsten klebt es unter Kontaminierungsrisiko an der Pipette fest. Die rehydrierten Gelstücke wurden dann für 20 min. im Speed-Vakuum. getrocknet (alle diese Schritte bei RT durchgeführt). Danach folgte die Reduktion der Proteine für 1 h. mit 10 mM DTT in 100 mM NH₄HCO₃ bei 56 °C. Die DTT Lösung wurde verworfen und anschließend folgte die Inkubation für 45 min. mit 55 mM JAA in 100 mM NH₄HCO₃ (20.35 mg/2ml). Dann wurden die Proben für 2 x 5 min mit 100 mM NH₄HCO₃ gewaschen, anschließend für 1 x 10 min. mit ACN entwässert. Nach dem Trocknen der Proben für 20 min. in der Speed-Vakuum wurden sie für 45 min. auf Eis in (10-20 µl je nach Gelgröße) Verdaupuffer (50 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂ und 12.5 ng/µl Trypsin) inkubiert. Die Proben wurden alle 15 min kontrolliert, um sicher zu stellen, dass sie mit dem Puffer voll bedeckt

sind. Danach wurde der Rest des Verdaupuffers verworfen, schließlich die Probe über Nacht mit dem Inkubationspuffer (äquivalent dem Verdaupuffer ohne Trypsin) bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 5000 rpm. kurz zentrifugiert und der Überstand (Peptid-Sequenzen) in frische 0.5 ml Kaps eingeführt. Schließlich wurde der Überstand (etwa 10-20 µl Peptidlösung) für 1.5 h im Speed-Vakuum. temperiert (bei 40 °C) getrocknet, und diese in 5 µl (0.1 % TFA und 50 % ACN) gelöst. Das totale Verdauungsprodukt wurde durch Matrix-Assisted Laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) analysiert, wobei die 4-Hydroxy- α -Cyanozimtsäure (HCCA) als UV-Absorption MALDI-Matrix (etwa 3 g in 1 ml 50 % ACN und 0.1 % TFA Lösung) verwendet wird. Beim Auftragen auf das MALDI-Target wurden zunächst 0.4 µl Peptidprobe und dann 0.4 µl Matrixlösung pipettiert. Die Probe wurde für 15 min. bei RT getrocknet. Schließlich wurde der MALDI-Teller in der MALDI-TOF-MS (Voyager-DE STR) eingeführt.

6.5.2. Messung der Peptidproben aller HKP

Um eine hinreichende Genauigkeit bei der Bestimmung der Massen zu erreichen, ist eine Kalibrierung des Instruments erforderlich. Dabei wurde die Kalibrierung des Massenspektrometers mit der Verwendung von externen Massen-Standardproteinen durchgeführt, anschließend wurden die dabei entstehenden Peptide der unterschiedlichen Proteine gemessen. Bei der Aufnahme des Massenspektrums eine Probe wird eine Häufigkeitsverteilung von Ionen in Abhängigkeit ihres Wertes für das Verhältnis m/z (Masse pro Ladung) gemessen. Jedes Ion, das detektiert wird, erzeugt ein Peak an der Position im Spektrums, die seinem m/z -Wert entspricht. Die Massen aller Peptide, die in einem Massenspektrum gefunden werden, werden als Fingerabdruck der Peptidmassen (PMF) bezeichnet und wurde mit der zugehörigen MALDI-Software (Voyager) weiter bearbeitet. Nach der Bestimmung des PMF kann die Identifikation der Proteine über den Vergleich mit den Peptidmassen, die sich theoretisch bei einem enzymatischen Verdau der in Datenbanken gespeicherten Proteinsequenzen ergeben würden, erzielt werden. Verschiedene Anbieter

haben zu diesem Zweck Software entwickelt, die im Wesentlichen auf den gleichen Prinzipien aufgebaut sind, sich aber in den Algorithmen und der Implementierung unterscheiden. Diese wird mit der meist verwendeten Proteinsequenzdatenbank für die Proteinidentifizierung „Mascot-Server“ (<http://www.matrixscience.com>) erfolgt. Die Abbildung 41 zeigt ein Beispiel für Proteinidentifizierung über eine Datenbank (Eingabemaske und Ergebnis der Proteinidentifikation) anhand des Peptid-Massen-Fingerabdrucks

A

B

Protein	Mass	Total score	Peptides matched
desmin	53484	150	1
desmin (Homo sapiens)	53554	150	1
desmin (Homo sapiens)	53544	150	1
mutant desmin (Homo sapiens)	53588	150	1
desmin	53560	150	1
mutant desmin (Homo sapiens)	53578	131	1
mutant desmin (Homo sapiens)	53586	133	1
mutant desmin (Homo sapiens)	53561	133	1
mutant desmin (Homo sapiens)	53559	121	1
mutant desmin (Homo sapiens)	53544	120	1

Abbildung 41: Beispiel für Proteinidentifizierung im Internet-face von ProFound und Mascot, (A) Eingabemaske anhand eines FPM mit ProFound (gleiche Maske auch mit Mascot), (B) Ergebnis der Proteinidentifizierung mit Mascot.

6.6. Differentielle Proteomanalyse der uterinen Schichten

6.6.1. Endometrium

Das Endometrium wurde aus den Uterusgeweben der 18 menopausalen Frauen (in dem Alter 30-50 Jahre) präpariert, davon sind 4 Endometriumgewebe aus gesunden Patientenproben, 13 Gewebe aus Patientinnen mit Ut. myomatosus und ein Gewebe aus einer Patientin mit Myohyperplasia. In der Tabelle 5 sind die detaillierten Informationen über die enthaltenen Patientinnen dargestellt.

Nr.	Pat.	Alter	ZT	Erkrankung	Histo/Bemerkung
1	Z.A.	--	09	Deszensus	gesund
2	KR	42	28	Cervix-Ca pT1b	gesund
3	KE	47	14	N. Cervix	gesund
4	LG	43	15	Deszensus	gesund
5	DB	45	25	Ut. myomat.	---
6	KI	45	14	Ut. myomat.	V.a.anovulat. Zykl.
7	MN	45	15	Ut. myomat.	---
8	BP	31	-	Ut. myomat.	Hormon behandelt
9	LD	32	-	Ut. myomat.	---
10	HG	38	30	Ut.myomat.	Hormonspirale

11	LS	37	16	Ut. myomat.	+ Adenomyose
12	KI	41	27	Ut. myomat.	+ Adenomyose
13	SJ	48	5	Ut. myomat.	---
14	RE	-	3	Ut. myomat	+ Adenomyose
15	WA	50	19	Myohyperplasie	Dauerblutung
16	FE	49	-	Ut. myomat.	Amenorrhoe
17	Bu	41	7	Ut. myomat.	Dysmenorrhoe
18	ZP	39	8	Ut. myomat.	---

Tabelle 5: Informationen über die erhaltenen Patientenproben und ihres Krankheitsbild

Nach der Homogenisierung wurde die Proteinkonzentration bestimmt, indem der Proteingehalt der Proben von Endometrium zwischen 10-12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lag. Es wurde jeweils 100 μg Proteinmenge für die 2-DE aufgetragen, und die Proteine mit Silberfärbung visualisiert, schließlich wurden die Gele mit dem Densitometer 710 gescannt und mit der Analysen-Software (PD-Quest 6.1) ausgewertet, wobei hier das Gel aus der gesunden Uterusprobe als Referenz zum Vergleich ausgewählt wurde. Bei der Auswertung mit der Analysen-Software wurde zuerst in das Referenz-Gel mithilfe der Spot-Detektion-Wizard die Detektionparameter (schwacher Spot, großer Spot, kleiner Spot und Gel-Region ohne Hintergrund) eingegeben, anschließend wurde alle Gele der Endometriumprobe mit dem gleichen Parameter detektiert. Es kommt aber meistens zu einer falschen Detektion von Spots insbesondere am Rand der Gele. Diese wurden manuell sorgfältig entfernt, und nach der Herstellung des Matchset wurde einige Landmarks eingesetzt, um die identischen Spots in allen Gelen einander zu zuordnen, wobei bei der Herstellung des

Matchset ein Gel aus einer Patientenprobe als Referenz ausgewählt wurde. Die Datenanalyse ermöglicht uns die Expression relevanter Proteine in verschiedene Proben qualitativ und quantitativ zu vergleichen. Die gängige Software erlaubt uns auch eine grafische Repräsentation der Daten über den Vergleich von Bildausschnitten. Damit erhält man eine sehr gute visuelle Beurteilung der Bilder verschiedener Proben. Schließlich wurden die Unterschiede in den Spots zwischen den Gelen durch visuelle Betrachtung für die weitere Bearbeitung markiert. Um die Reproduzierbarkeit herzustellen, wurde für jede Probe der verschiedenen Patientinnen zwei Gele hergestellt. Für das Spotausschneiden und die Identifizierung wurde jeweils etwa 300 µg Proteinlösung aus zwei Uterusproben (aus einer gesunden Probe und Patientin mit Ut. myomatosus) in die 2-DE durchgeführt, anschließend die Proteine mit Coomassie visualisiert. Die aufgezeichnet variierten Proteine wurden ausgeschnitten und nach tryptischen Verdau die Peptidsequenzen mittels MALDI-TOF und anschließend über Datenbanksuche identifiziert. Die gleichen Untersuchungen wurden sowohl mit SE-Gewebeproben untereinander als auch SS-Gewebeproben durchgeführt.

6.7. Spotzahl der verschiedenen Gewebeschichten

Zu dem Vergleich der Spotzahl zwischen verschiedenen Gewebeschichten wurden die Gele der (Endo, SE und SS)-Gewebe aus vier Patientenproben untersucht. Ein Gel der Endometriumprobe einer Patientin wurde mit dem Gel der SE-Probe der gleichen Patientin gematcht und als Referenz für das Matchsat wird das Gel der SE-Probe ausgewählt. Dann wurde die Spotzahl sowie die gematchten Spots in beiden Gewebeproben notiert, wodurch die prozentuale gematchten Spots berechnet werden konnte. Das gleiche Verfahren wurde bei den anderen drei Patientenproben durchgeführt. Zum Vergleich der Gele der SS-Gewebe mit denen der SE-Gewebe wurde zunächst ein Gel der SE-Probe einer Patientin mit dem Gel der SS-Probe der gleichen Patientin gematcht, wobei hier das Gel aus der SS-Patientenprobe als Referenz ausgewählt wurde, da sie beträchtlich mehr Spots besitzt. Die weitere Auswertung wurde bei dem Vergleich von

Endometrium- und SE-Proben durchgeführt. Es wurde auch ein anderes Verfahren für den gleichen Zweck verwendet, indem die drei verschiedenen Gewebeschichten einer Patientin miteinander gematcht und das Gel der SS-Probe als Referenz ausgewählt wurde. Schließlich wurden die ähnlichen Auswertungen wie vorher durchgeführt, und die Ergebnisse beider Verfahren miteinander verglichen.

6.8. Vergleich des Myomgewebes mit dem SE- und SS-Gewebe

Während der Auftrennung der drei Gewebeschichten wurden auch gleichzeitig das Myomgewebe (Myomknoten) von 8 Patientinnen präpariert, indem die Myomknoten der Patientenproben unterschiedliche Größen besitzen. Nach der Herstellung der 2-DE-Gele aus allen Myomgeweben wurden deren Proteine mit den der SE- und SS-Gewebe gleicher Patientinnen mittels PD Quest verglichen, so dass die abweichende Proteinexpression zwischen diesen Geweben untersucht wurden. Solche Proteine wurden nach einer neuen Herstellung eines 2-DE-Gels aus einem Myomegewebe (DB-Patientin, 25. Zt, 43 J. alt) aus dem Gel geschnitten, schließlich nach tryptischen Verdau die Peptide der untersuchten Proteine mittels Massenspektrometrie und anschließender Suche in der Datenbank identifiziert.

6.9. Die ECL-Detektion von ER α und PR β mittels 2-DE

Es wurden hier der Estrogenrezeptor durch 2-D Elektrophorese mit kolloidaler Goldfärbung und ECL-Immundetektion identifiziert ¹²⁸. Wir haben für die Untersuchung eine Endometriumprobe aus gesunden Uterus (9. Zyklustag) verwendet. Hierbei wurde das entsprechende Volumen 15 μ g (1.5 μ l Probenlösung) in 125 μ l Rehydrierungspuffer eingebracht, anschließend nach 30 min. Inkubation sowie 5 min. Zentrifugation bei 15000 g wurde die Probenlösung in 7 cm Strip-Holder pipettiert und die IPG-Streifen (7 cm, pH 3-10 L, von Bio-Rad) auf die Probenlösung gelegt. Die Rehydrierung des Gels und die Fokussierung der Probe erfolgen bei 20°C nach folgendem Programm: 12 h Rehydrierung, dann folgte für jeweils 30 min. graduelle Spannungserhöhung auf 500, 1000, 2000 und

8000 V, und schließlich eine Fokussierung bei 8000 V für 32000 Vh. Für die zweite Dimension wurde die Proteine in 10 % SDS-Gel (5.5 x 8 cm) aufgetrennt, anschließend wurde die Proteine auf eine PVDF-Membran (6 x 9 cm) nach Kyhse et al.¹²⁹ mit einige Modifikationen transportiert. Hierbei besteht der Anodenpuffer I aus (3 % Tris und 30 % Ethanol), und der Anodenpuffer II aus (0.3 % Tris und 30 % Ethanol) sowie der Kathodenpuffer aus (0.3 % Tris, 0.5 % 6-Aminocapron Säure und 0.05 % SDS). Der Proteintransport wurde bei 0.8 mA/cm² für 1h durchgeführt, anschließend wurde die Membran für 3 x 5min. in 30 % Ethanol und dann für weiter 3 x 5min. (in 0.5 % Tween 20 in Wasser) gewaschen. Danach wurde die Membran übernacht in 30 ml kolloidale Goldlösung¹³⁰ bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert, anschließend wurde die Membran für 3 x 5 min. in PBST gewaschen. Darauf folgte das Blockieren¹³¹ für 2 h bei RT in einer PBST-Lösung (1% PVP 40 in PBST), anschließend wurde die Membran in 10 ml (1/500 verdünnte) primäre Antikörperlösung gegen ER α für 1 h bei RT inkubiert und folgte das Waschen für 4 x 5min. in PBST. Die Membran wurde dann für 1h bei RT in (1/5000 verdünnte) sekundäre Antikörperlösung in PBST inkubiert. Schließlich nach dem Waschen für weiter 4 x 5min. in PBST wurde eine ECL-Detektion nach Vorschrift von Amersham Pharmacia durchgeführt.

6.9.1. ECL-Detektion von ER mittels Western blot

Der Nachweis von Estrogen- und Progesteronrezeptoren in Uterusgewebe verschiedener Patientinnen wurde mittels ECL-Westernblot untersucht. Die Untersuchung wurde in den Uterusproben sowohl aus Endometrium als auch aus SE-Gewebe gleicher Patientinnen durchgeführt. Zunächst wurde jeweils etwa 10 μ g Proteinprobe mit Probenpuffer aus 10 mM Tris, 2 % SDS, 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, 5 % β -Mercaptoethanol und 0.005 % Bromphenolblau versetzt, dass sie günstigstenfalls ein Gesamtvolumen von 20 μ l haben. Die Proteinprobe und Standardproteine (1/5 verdünnter BOA-Marker in Probenpuffer, 20-120 kDa) auf 10 % SDS-Gel (5.5 x 8 cm) aufgetragen. Nach dem Laufen des Gels wurden die Proteine elektrisch (mittels Western blot Apparatur) auf Nitrocellulose-Membran

übertragen, es folgte dann das Waschen der Membran für 15 min. in TBST-Lösung, um die überschüssige SDS zu beseitigen. Anschließend wurden die Proteine übernacht (unter leichtem Schwingen) bei 4 °C in (3 % BSA in TBST) inkubiert, um unnötige Verbindungen auf der Membran zu blockieren. Es folgte dann die Inkubation auf Schüttler für 2 h bei RT in 5 ml (1/1000 verdünnt) mit primären Antikörper gegen ER α (primäre Antikörper in 1 % BSA in TBST). Anschließend wurde die Membranen 4 x 5 min. in 5 ml TBST gewaschen, um der überschüssige primäre Antikörper zu beseitigen. Nach der Inkubation der Proteine für 1h in 5 ml sekundären Antikörper folgte wieder den Waschschrift 4 x 5 min. in TBST. Schließlich wurde die ECL-Detektion nach Vorschriften von Amersham Pharmacia durchgeführt, indem die Membran für 60 sec. In der ECL-Reagenzien-Mischung (1/1 Volumenmenge) inkubiert wurde und dann folgte die Belichtung der Filmplatten mit verschiedenen Zeiten (0.5, 1.5, 3 und 5 min.).

6.9.2. ECL-Detektion von Progesteronrezeptoren

Zum Nachweis der Expression von PR wurden die Proben aus Patientinnen mit Uterus myomatosus und gesunden Uterus als Referenz mit der gleichen Methode untersucht. Hierbei wurden zwei gesunden Patientenproben (9. und 15. Zyklustag) und drei Patientinnen mit Uterus myomatosus (3., 14. und 27. Zyklustag) untersucht. Zunächst wurde jeweils etwa 10 μ g auf 10% SDS-Gel und zusätzlich 10 μ l (1/5 verdünnte) Standardproteine (BOA-Marker, 20-120 kDa) aufgetragen, dann folgte die Proteindetektion mittels ECL-Westernblot (s.o. die Detektion von ER).

6.10. Herstellung von polyklonaren Antikörper gegen Aromatase

Das Enzym „Aromatase“ ist bekannt durch seine Fähigkeit die Transformation von Androgen, wie Testosteron, in Estrogen zu katalysieren. Diese Umwandlung spielt eine kritische und limitierte Rolle in der Kontrolle mehrerer verhaltens- und physiologischen Prozessen. Aromatase gehört zu der Familie der Cytochrome und wird aus dem Gen CYP19 codiert.

6.10.1. Herstellung des Expressionsvektors

Der Vektor wurde ausgehend von Plasmiden pAX und pEG (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Germany) hergestellt. Das pAX-Plasmid enthielt die cDNA für Aromatase (CYP19-Gen), das ursprünglich über ein EcoRI-Schnittstelle einligiert wurde. Beide Plasmide wurden mit einem sequenziellen EcoRI und xhoI-Doppelverdau geschnitten. Das Insert aus dem pUC-Plasmid wurde in frame in pEG einligiert. Das resultierende Konstrukt codierte für eine C-Terminal hexahistidyl-getaggte Frankierungsmutante der Aromatase. Dies wird in der Abbildung 42 genauer demonstriert.

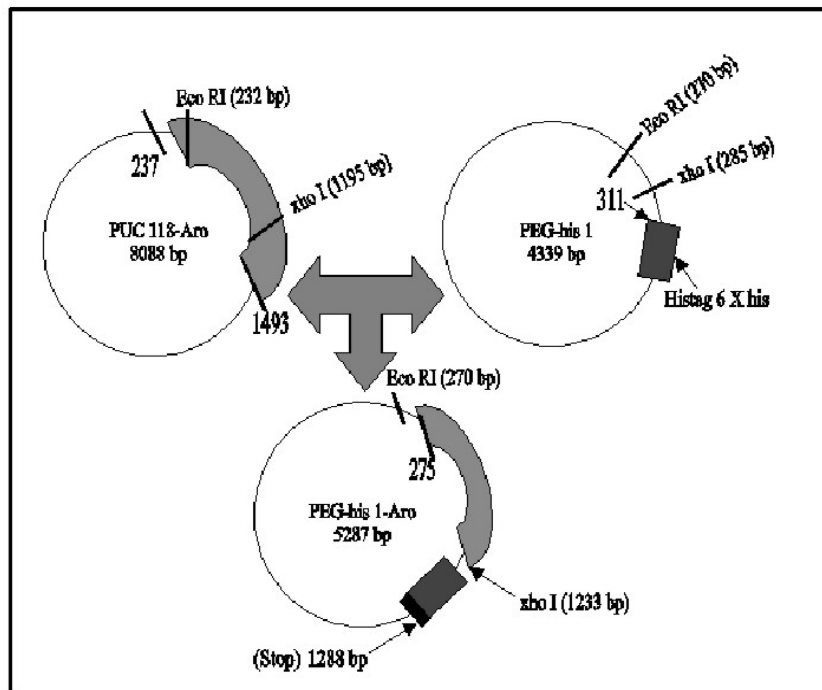


Abbildung 42: Bildung des Konstruktes für eine Frankierungsmutante der Aromatase, Plasmiden pAX und PEG sind die ausgehenden Vektors für das Aromatase-Gen.

Für die Transformationen wurde der Bakterienstamm **DH5 α** (Novargen GmbH, Germany) verwendet, indem max. 5 % der pDNA in 50 μ l Zellstamm (add. 400 μ l vorgewärmte LB-Medium mit Ampicilin)

zusammengemischt sind, dann folgte das Ausstreichen auf 1 % Agarplatte. Schließlich wurde die Platte für 16 h bei 37 °C inkubiert.

6.10.2. Überexpression von Aromatase

Die Expression von Aromatase wird erst mit der Einführung einiger Klone der fusionierten Aromatase-Gene in 50 ml LB-Medium und Ampicilin (1 mg/ml) gestartet. Um die Bedingung für die Expression zu erfüllen, werden die Zellen für 16h auf dem Schüttler (225 rpm.) bei 37 °C inkubiert. Davon wurde 25 ml entnommen und in weiterem 500 ml LB-Medium mit Ampicilin überführt. Nach 1h. Inkubation bei 37 °C auf dem Schüttler (die OD₂₅₀ erreichte 5.05 µg/µl) wurde zu dem Medium 0.8 mM IPTG zugegeben, um die Proteinexpression zu beschleunigen, danach wurden die Zellen für weitere 5h inkubiert. Schließlich wurden die Zell-Lysat für 20min. auf 10000 rpm. zentrifugiert. Hierbei wurde der Überstand verworfen und das Pellet bis etwa 4.5 g für den Schritt der Proteinaufreinigung bei –80 °C gelagert.

6.10.3. Proteinaufreinigung

Das Zellpellet (2 g) soll in 20ml Lysepuffer (aus 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris.Cl und 8 M Urea, pH 8 mit HCL einstellen) kräftig lösen anschließend mit Press-Frensch aufschließen. Die Zell-Lysat wurde in etwa 1.2 ml Ni-Agarose (die Menge von Ni-Agarose ist in der Tabelle 2 nach Vorschriften von QIAGEN 2000 empfohlen) kräftig gemischt, dann wurde übernacht bei 4 °C (die Inkubation ist besser mit langsamer Rotierung durchzuführen) inkubiert, um die 6xHis-tagged Protein an der Ni-Agarose langsam und fest zu binden. Die Mischung (aus Zell-Lysat und Ni-Agarose) wurde in einem 50 ml Colum eingeführt und für 5 min. auf 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (**Fraktion 1**) wurde für SDS-Analyse bei –80 °C gelagert. Die endogene Proteine mit Histidin, die an den Ni-NAT-Gruppen gebunden sind, werden mit der Lösung (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris.Cl und 8 M Urea, pH 6.3 mit HCL einstellen) 2 mal ausgewaschen, und nach der Zentrifugation wurde der Überstand für SDS-Analyse aufbewahrt. Das zweifache Eluieren wurde mit dem gleichen

Waschpuffer (pH 5.9 und pH 4.5) durchgeführt. Für die Kontrolle der Proteinreinheit wurden etwa 3 µg Proteinmenge der gesammelten Fraktionen auf 10 % SDS-Gel aufgetrennt, anschließend die Proteine mit der Methode nach Coomassie gefärbt. Die Abbildung 43 zeigt genauer diese Reinheit der einzelnen Fraktionen.

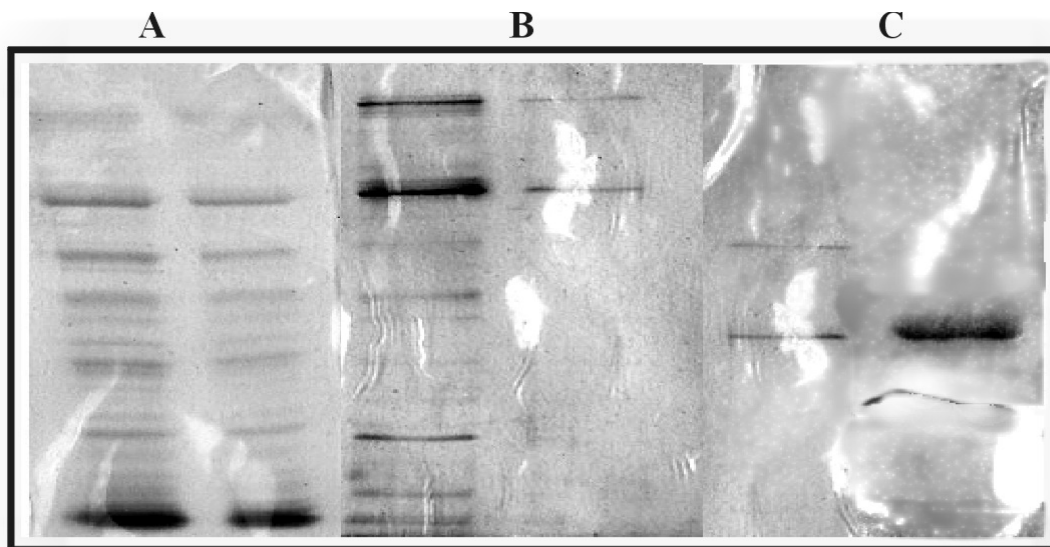


Abbildung 43: denaturierende Reinigung der exprimierten Aromatase, (A) Proben der Zell-Lysat und Fraktion-1, (B) Proben der beiden Wasch-Schritten, (C) Proben der beiden Eluat.

Schließlich wurde die erhältlichen 820 µg (Probenvolumen von 2.5 ml) Proteinmenge zu der Firma (**Mo Bi Tec**) geliefert. Erst zwei Wochen nach der Injektion in einem Kaninchen wurde etwa 20 ml Serum aus dem Kaninchen abgenommen. Im Laufe von noch weiteren 8 Wochen wurden alle 2 Wochen etwa 20 ml Serum abgenommen. Nach der 10. Woche kann kein Aromatase-Antikörper in dem des Tieres mehr gebildet werden. Schließlich wurde der Antikörper aus dem Serum chromatographisch gereinigt.

Zusammenfassung

Die 2-DE-Technik wurde in der Mitte der 70er Jahre von O'Farrelle und Klose vorgestellt, die schon damals die Inhalte ganzer Zellen unter denaturierenden Bedingungen in hunderte bzw. tausende Proteinspots auftrennen konnten. Mangelnde Reproduzierbarkeit und fehlende Auswertungsmöglichkeiten verhinderten jedoch zu diesem Zeitpunkt eine breite Anwendung und damit größeres Interesse an der Methode. In den 80er Jahren erreichte die Methode mit der Einführung immobilisierter pH-Gradienten und der MALDI-Massenspektrometrie einen entscheidenden Wendepunkt. Seitdem hat die hochauflösende 2-DE ihre Leistungsfähigkeit und herausragende Rolle in der Proteinanalytik in den Gebieten der Biochemie, Molekularbiologie, Pharmazie, Medizin, etc. bewiesen. Seit dem Ende der 80er Jahre wird die Methode aufgrund der Möglichkeit der gleichzeitigen Proteinidentifizierung und Quantifizierung auch zunehmend in der Krebsforschung in der Suche nach neuen Markerproteinen eingesetzt.

Das Uterusgewebe ist ein Organ, das während der reproduktiven Phase im Leben einer Frau ständig zyklisch verlaufenden physiologischen Änderungen unterworfen ist. Neben den hormonabhängigen physiologischen Veränderungen spielen auch hormonabhängige Erkrankungen, wie das Leiomyom des Uterus, eine wesentliche Rolle für die Gesundheit der Frau. Das Leiomyom, ein gutartiger monoklonaler Tumor aus den glatten Muskelzellen des menschlichen Uterus, ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen in der westlichen Welt, über deren Ursachen trotz intensiver Forschung nach wie vor fast nichts bekannt ist. Die Veränderung der Struktur und des funktionellen Verhaltens des Uterusgewebes durch diese Erkrankung ist mit der abnormen Expression vieler Proteine verbunden. Die 2-DE-Technik eignet sich in hervorragender Weise zur Untersuchung derartiger Abweichungen.

Im ersten Teil meiner Dissertation befasste ich mich mit der Methodenetablierung der 2-DE und ihrer Reproduzierbarkeit im speziellen Fall des Uterusgewebes.

Der Zellaufschluss der Probe, insbesondere aus harten Geweben, bildet einen zentralen Punkt in der Erarbeitung der Methodik der 2-DE, da ein hohes Risiko besteht, einen großen Teil der Proteine schon während der ersten Probenbearbeitung zu verlieren. In der vorliegenden Dissertation wurde eine neue Aufschlussmethode für die Aufarbeitung des zähen Muskelgewebes ohne größere Proteinverluste entwickelt, indem das Uterusgewebe zunächst mechanisch (Ultra-Turrax) und anschließend mit Ultraschall homogenisiert wird.

Die Solubilisierung der Proteinprobe bildet den zweiten wichtigen Punkt der 2-DE-Methodik. Die Solubilisierung während der Proteinextraktion und des Eintritts der Proteinprobe in die fokussierende Gel-Matrix, die aufgetragene Proteinmenge, die Fokussierungsparameter und die zweite Dimension wurde so optimiert, dass die Proteinauflösung eine konstant hohe Qualität auf den Gelen erreichte und damit eine semiquantitative Auswertbarkeit gesichert wurde. Bezüglich der Reproduzierbarkeit der Methode wurden die methodeninhärenten Probleme wie Gelfärbung, Auswertungsverfahren und Probenpräparation untersucht. Die Methodvalidierung bezüglich der Gelfärbung zeigte, inwieweit die Auswertung, insbesondere bei schwachen Spots, beeinflusst werden kann. Die Reproduzierbarkeit des Spotvolumens (quantitative Spotdaten) wird hingegen durch die Probenpräparation aufgrund der Bestimmung der mittleren RSD-Werte, nicht extrem stark beeinflusst. Die Abweichung der RSD-Werte nach der Spotnormalisierung wurde mit 17 % als gering betrachtet. Im allgemeinen wurde die angewendete 2-DE-Technik für die Proteinanalyse des Uterus für gut reproduzierbar gefunden.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde die Bestimmung der Haus-Keeping-Proteine (HKP) der uterinen Gewebe durchgeführt. Mittels differentieller Proteomanalyse wurden darüber hinaus der Uterus myomatosus und die Proteinmuster der verschiedenen Gewebeschichten untersucht.

Die Bestimmung der HKP lieferte die Grundlage einer gewebetypischen Proteindatenbank und erlaubt es außerdem, über die Gele ein Koordinationssystem zu legen, mit dem nachfolgende Proteinidentifizierungen erleichtert werden können. In dieser Arbeit konnten von 60 als HKP festgelegten Spots 48 Spots tatsächlich identifiziert werden.

Das subseröse Myometrium (SS-Gewebe) ist jener Teil der Uterusmuskulatur, dessen hauptsächliche Funktion das Aufbringen der Gebärfähigkeit ist und der die Hauptmasse des Myometriums bildet. Die Auswertung der 2-DE-Gele aller Patientenproben ergab keinen signifikanten Unterschied (bezüglich Zyklusphase oder Grunderkrankung) zwischen den Proteinen der SS-Gewebeprobe untereinander. Beim SS-Gewebe wurde im Vergleich zu Endometrium und vor allem auch zum SE-Gewebe eine besonders starke Expression von GAP-DH gefunden, welche im SE-Gewebe und Endometrium nicht bzw. kaum nachweisbar war. Statt dessen konnten wir in den beiden Schichten zwei andere Modifikationen der GAP-DH identifizieren. Die einzelnen Gewebeschichten zeigten auch eine deutliche Abweichung in der durchschnittlichen Menge der exprimierten Spots (Endometrium = 1300, SE-Gewebe = 1700, SS-Gewebe = 2100).

Als thematischer Schwerpunkt der Dissertation wurden die Abweichungen der Proteinexpression im Fall des Uterus myomatosus, einer der häufigsten Erkrankungen des inneren weiblichen Genitales, im Vergleich zu einem Kollektiv ohne muskuläre Pathologie des Uterus untersucht. Aus den Gelen der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt 14 Proteinspots aus den Patientenproben ermittelt und identifiziert werden, die im Vergleich zu den Gesunden eine deutlich abweichende Expressionsmuster zeigten. Die Analyse der 2-DE von Patientenproben ergab gegenüber einer schwachen Expression bei den Vergleichsproben eine Überexpression von Prohibitin (PHB1), α 2-Aktin und Growth Faktor Rezeptorprotein (GFRP) im Endometrium bzw. im darunter liegenden subendometrialen Myometrium und eine hohe Expression im Tumorgewebe (Myomgewebe). Weiters zeigte die 2-DE-Analyse bei Patientenproben eine Downregulation von

zwei Proteinen (β 4-Proteasom und Fibrinogen) im Gegensatz zur Expression bei den Gesunden.

Die analytischen Ergebnisse aus Tumorgeweben verglichen mit den SE- und SS-Geweben derselben Patientinnen zeigten eine deutliche Expression von einigen Proteinen (Desmin, F-Actin, Transaldolase, Thioredoxin-Peroxidase und mutative Glutathion-Transferase), deren Expression in den morphologisch unauffälligen Geweben aller Schichten des Uterus nicht zu beobachten war.

Literaturverzeichnis

- 1- Tiselius, A., Trans.Faraday Soc. 1937, 33. (531-546)
- 2- Celis, J.E und Bravo, R., Academic Press, Orlando 1984
- 3- Dunn, M.J., Radola, B.J., VCH Verlag, Weinheim 1987, Vol. 1, pp. 1-110 (Review)
- 4- Endler, A.T und Hanash, S., VCH Verlag Weinheim 1989
- 5- Macko, V. und Stegemann, H., Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 1969, 350. pp. 917-919
- 6- Dale, G. und Latner, H.L, Clin.Chem.Acta. 1969, 24. pp. 61-68
- 7- O' Farrell, P.H., J.Biol.Chem. 1975, 250. pp. 4007-40021
- 8- Klose, J., Humangenetik, 1975, 26. pp. 231-243
- 9- Anderson, N.G. und Anderson, L., Clin.Chem. 1982, 28. pp. 739-748
- 10- Righetti, P.G und Drysdale, J.W., Ann.N.Y. Acad.Sci. 1973, 209. pp. 163-186
- 11- Chrambach, A., Doerr, P., Finlayson, G.R., Miles, L.E.M., Acad.Sci.1973, 209. pp. 44-69
- 12- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G, Görg, A. und Westermeier, R. J.Biochem.Biophys.Methods 1982, 6. pp. 317-339
- 13- Görg, A., Poster, W. und Günther, S., Electrophoresis 1988, 9. pp.531-546
- 14- Görg, A., Postel, W., Günther, S., Weser, J., Hanash, S., Elctrophoresis 1988, 9. pp. 37-46
- 15- Righrtti, P.G., Sevier Press., Amsterdam, New Yourk, Oxford 1983
- 16- Görg, A, Postel, W., Weser, J., Patutschnick, W., Am.J.Hum.Genet. 1985, 37, pp. 922-930

- 17- Miller, M.J., Chrambach, A., Dunn, M.J., Rolado, B.J., *Electrophoresis* 1989, 3, pp. 182-217
- 18- Dunn, M.J., Bryce, C.F.A., IRL Press., Oxford, pp. 215-242
- 19- Wallin, E., Von Heijne, G., *Port. Sci.* 1998, 7, pp. 1029-1038
- 20- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Nelissen, B., Goffeau, A., *FEBS Lett.* 1998, 430, pp. 116-125
- 21- Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T., *Electrophoresis* 2000, 21, pp. 1054-1070
- 22- Horst, M.N., Basha, M.M., Baumbach, G.A., Mansfield, E.H., *Anal. Biochem.* 1980, 102, pp. 399-408
- 23- Wilson, D., Hall, M.E., Stone, G.C., Rubin, R.W., *Anal. Biochem.* 1977, 83, pp. 33-44
- 24- Perdew, G.H., Schaup, H.W., Selivonchick, D.P., *Anal. Biochem.* 1983, 135, pp. 453-455
- 25- Rubin, R.W., Milikowski, C., *Biochem. Biophys. Acta.* 1978, 509, pp. 100-110
- 26- Righetti, P.G., Gelfi, C., Bossi, M.L., Boschetti, E., *Electrophoresis* 1987, 8, pp. 62-70
- 27- Rabilloud, T., Valette, C., Lawrence, J.J., *Electrophoresis* 1994, 15, pp. 1552-1558
- 28- Adessi, C., Miege, Ch., Albrieux, Ca., Rabilloud, T., *Elektrophoresis* 1997, 18, pp. 127-135
- 29- Charron, D.J., McDevitt, H.O., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, pp. 6567-6571
- 30- Kyte, J., Doolittle, R.F., *J. Mol. Biol.* 1982, 157, pp. 105-132
- 31- Bairoch, A., Apweiler, R., *Nucleic. Acids Res.* 1997, 25, pp. 31-36
- 32- Navarette, R., Serrano, R., *Biochem. Biophys. Acta.* 1983, 728, pp. 403-408
- 33- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., Lunardi, J., *Electrophoresis* 1997, 18, pp.307-316

- 34- Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquie, D., Fuchs, A., Kieffer, S., *Electrophoresis* 1998, 19, pp. 1901-1909
- 35- Rabilloud, T., Blisnick, T., Luche, S., Lunardi, J., Braun-Breton, C., *Electrophoresis* 1999, 20, pp. 3603-3610
- 36- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Burland, V., Riley, M., Glasner, J.D., *Science* 1997, 277, pp. 1453-1474
- 37- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Williams, K.L., Gooley, A.A., *Electrophoresis* 1999, 20, pp. 701-704
- 38- Dunn, M.J., Burghes, A.H., *Electrophoresis* 1983, 4, pp. 97-116
- 39- Gianazza, E., Rabilloud, T., Quaglia, L., Astrua-Testori, S., Osio, L., Grazioli, G., Righetti, P.G., *Anal. Biochem.* 1987, 165, pp. 247-257
- 40- Rabilloud, T., Gianazza, E., Catto, N., Righetti, P.G., *Anal. Biochem.* 1990, 94-102
- 41- Holloway, P.J., Arundel, P.H., *Anal. Biochem.* 1988, 172, pp. 8-15
- 42- Witzmann, F., Jarnot, B., Parker, D., *Electrophoresis* 1991, 12, pp. 687-688
- 43- Clare Mills, E.N., Freedmann, R.B., *Biochem. Biophys. Acta* 1983, 734, pp. 160-167
- 44- Satta, D., Schapira, G., Chafey, P., Righetti, P.G., Wahrmann, J.P., *J. Chromatogr.* 1984, 299, pp. 57-72
- 45- Gyenes, T., Gyenes, E., *Anal. Biochem.* 1987, 165, pp. 155-160
- 46- Predew, G.H., Schaup, H.W., Selivonchick, D.P., *Anal. Biochem.* 1983, 135, pp. 453-455
- 47- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W., *Electrophoresis* 1999, 20, pp. 712-717
- 48- Leyendecker, G., Kunz, G., Herberitz, M., Beil, D., Huppert, P., Mall, G., *Reproduktionsmedizin* 1999, 15, pp. 356-371
- 49- Romanini, C., Chard, T., Grudzinskas, J.G., *Hum. Reprod.* 1994, pp. 337-355 (Rev.)

- 50-Findlay JK., Salamonsen LA., Cherny RA., *Reproduktiv Biol.* 1990, 12, pp. 182-205
- 51-Gerschenson LE., Conner EA., Jang J., Anderson M., *Life Sci.* 1979, 24, pp. 1337
- 52-Eklom P., *FASEB J.* 1989, 3, pp. 2141
- 53-Blaustein A., Springer New York 1982, 2, pp. 235
- 54-Tabibzadeh S., *Semin Reprod Endocrinol.* 1995, 13, pp. 133
- 55-Wetzstein,R., *Arch. Gynecol.* 1965, 202, pp. 1-13
- 56-Werth, R., Grusdew, W., *Arch.Gynäkol.* 1998, 55, pp. 325-409
- 57-Noe, M., Kunz, G., Herbertz, M., Mall, G., Leyendecker, *Hum.Reprod.* 1999, 14, pp. 190-197
- 58-Leyendecker, G., Kunz, G., Noe, M., Herberz, M., *Hum.Reprod.* 1998, 4, pp. 752-762
- 59-Garcia, E., Bouchard, P:, De-Brux, J., Berdah, J., Frydman, R., Schaison, G., Milgrom, E., Perrot-Applanat, M., *J.Clin. Endocrinol.Metab.* 1988, 67, pp. 80-87
- 60-Lessey, B.A., Killiam, A.SP., Metzger, D.A., Haney, A.F., Greene, G.L., McLucas,B., *J. Am Assoc.Gynecol. Laparosc.* 1994, 1, pp. 21-29
- 61-Snijders, M., De-Goij, A.F., Baerts, M.C.J., Rousch, M.M., Koudstaal, J., Bosman, F.T:, *J. Repod. Fert* 1992, 94, pp. 363-371
- 62-Amso, N.N., Crow, J., Shaw, R.W., *Hum. Reprod.* 1994, 9, pp. 1027-1037
- 63-Shiozawa, T., Nakayama, T., Fujii, S., *Mol. Hum. Reprod.* 1996, 2, pp. 742-745
- 64-Katzenellenbogen Bs., Bhakoo HS., Ferguson ER., Lan NC., Tatti T., *Recent Progr.Hormone Res.* 1979, 35, pp. 292-300
- 65-Kraus WL., Katzenellenbogen BS., *Endocrinology* 1993, 132, 2371-2379
- 66-Roberts DK., Walker NJ., Lavia LA., *Am J. Obstet Gynecol.*1988, 158, pp. 854-861

- 67-Kunz, G., Noe, M., Herbertz, M., Leyendecker, G., Hum. Reprod. Update 1998, 4, pp. 647-654
- 68- Clarke Cl., Sutherland RL., Endocrinology 1991, 11, pp. 266
- 69- Pfahl, M., Endocr. Rev. 1993, 14, pp. 889
- 70- Kastner, P., Krust, A., Turcutte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., J. EMBO. 1990, 9, pp. 1603
- 71- Bamberger AM., Bamberer CM., Schulte HM., Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie 1996, (Abstrakt)
- 72- Tabibzadeh S., Endocrinol. Rev. 1991, 12, pp. 272
- 73- Stewart, E.A., the Lancet 2001, 27, Vol. 357, pp. 293-298
- 74- Fountoulakis M., Roche Ltd., Phamac.Resea., Electrophoresis 2001, 22, pp. 1593-1602
- 75- Gerding, J.T., Biochem. Biophys. Acta. 1971, 243, pp. 374-399
- 76- Galante, E., Garavaggio, T., Biochem. Biophys. Acta. 1976, 442, pp. 309-319
- 77- Heizmann CW., Arnold EM., Keunzle CC., J.Biol.Chem. 1980, 255, pp. 11504-11511
- 78- North MJ., Beynon RJ., Bond JS., Practical Approach. IRL Press-. Oxford 1989, pp. 105-124
- 79- Rabilloud T., Electrophoresis 1998, 19, pp. 758-760
- 80- Herskovits TT., Jaillet H., Gadegbeku B., J.Biol.Chem. 1970, 245, pp. 4544-4550
- 81- Santoni, V., Rabilloud, T., Aumas, P., Kieffer, S., Rooquie, D., Electrophoresis, 1999, 20, pp. 705-711
- 82- Görg, A., Fawcett, J.S., Chrambach, A., Electrophoresis, 1988, 2, pp. 1-43
- 83- Schratzenholz, A., Methoden der Proteomforschung, Spektrum, akad. Verlag, 2001
- 84- Laemmli U.K., Nature 1970, 227, pp. 680-685

- 85- Voss T., Haberl P., Boehringer-Ingelheim, Electrophoresis 2000, 21, pp. 3345-3350
- 86- Lorenz R.J., Grungbegriffe der Biometrie, 4 Auflage 1996
- 87- Fujii, S., Konishi, I., Mori, T., Vich. Archiv. Pathol. Anato. 19??, 414, pp. 105-112
- 88- Byrjalsen, I., Mose Larsen, P., Fey, S.J., Chrestiansen, C., Mol. Hum. Rep. 1995, 10, pp. 2760-2766
- 89- Christiansen J., Houen G., Electrophoresis 1992, 13, pp. 179-183
- 90- Towbin H., Stachlin T., Grodon J., Proc.Natl.Acad.Sci., 1979, 76, pp. 4350-4354
- 91- Wuttke W., Jarry H., Reproduktionmedizin 1999, 15, pp. 405-409
- 92- Bryant H.U., Dere W.H., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1998, 217, pp. 45-52
- 93- Coates, P.J., Jamieson, D.J., Smart, K., Prescott, A.R., Hall, P.A., Curr. Biol. 1997, 7, pp. 607-610
- 94- Woodlock, T.J., Bethlenny, G., Segel, G.B., Blood Cell Mol.Dis. 2001, 27, pp. 27-34
- 95- Ikonen, E., Fiedler, K., Parton, R.G., Simons, K., FEBS Lett. 1995, 358, pp. 273-277
- 96- Steglich, G., Neupert, W., Langer, T., Mol.Cell.Biol. 1999, 19, pp. 3435-3451
- 97- Saraste, M., Science 1999, 283, 1488-1492
- 98- Berger, K.H., Yaffe, M.P., Mol.Cell.Biol. 1998, 18, pp. 4043-4052
- 99- Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, Sh., Bharat, S., Chellapan, S., J. Biol. Chem 2003, 278 (48), pp. 74853-74861
- 100- Wang, S., Nath, N., Adlam, M., Chellappan, S., Oncogene 1999, 18, pp. 7447-7460
- 101- Delage-Mourreux, R., Martini, P.G., Choi, I., Kraichely, D.M., Hoeksema, J., Katzenellenbogen, B., J. Biolo. Chem. 2000, 275, pp. 35848-35856

- 102- Montano, M.M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P., Proc. Natl. Acad. Sci. 1999, 96, pp. 6947-6952
- 103- Thompson, W.E., Sanbuissho, A., Lee, G.Y., Anderson, E., J. Reprod. Fertil. 1997, 109, pp. 337-348
- 104- Thompson, W.E., Powell, J.M., Whittaker, J.A., Sredaran, R., Thomas, K.H., Anat. Rec. 1999, 256, pp. 40-48
- 105- Kitawaki, J., Kusuki, I., Koshiha, H., Tsukamoto, K., Fushiki, S., Fertil Steril. 1999, 72 (6), pp. 1100-1106
- 106- Leo, G.J., Nijtmans, De-Jong, L., Sanz, M.A., Coates, P.J., Berden, J.A., Back, J.W., J.EMBO. 2000, 19 (11), pp. 2444-2454
- 107- Takaaki, S., Takashi, S., KRn-Ichii, T., Hiroko, S., Keiko, O., Genomics 1993, 17, pp. 762-764
- 108- Cohen, O., Schindel, B., Homburg, R., Hum. Reprod. 1998, 13, pp. 1945-1960
- 109- Shahara F.I., Nieman L.K., Am J Obstet Gynecol. 1995; 173, pp. 814-819
- 110- Lund, P.K., Cut. 1998, 42, pp. 320-322
- 111- Dixon, D., He, H., Hasemann, J.K., Environ Health Perspect. 2000, 108, (5), pp. 795-802
- 112- Chrysis D, Zhang J, Underwood LE, Growth Horm. IGF Res. 2002, 12(6), pp. 434-41
- 113- Ohm, T.; Wegner, A., Biochim. Biophys. Acta. 1994, 1208, pp. 8-14
- 114- Kasprzak, A.A., Biochemistry 1994, 33, pp. 12456-12462
- 115- Bremer, A., Aebe, U.; Curr. Opin. Cell Biol. 1992, 4, pp. 20-26
- 116- Holmes, K.C., Popp, D., Gehbard, W., Kabsch, W., Nature 1990, 347, pp. 44-49
- 117- Li Zl, Lilienbaum,A., Butler-Browne, G., Paulin, D., Gene 1989, 78, pp. 243-254

- 118- Viega-Pequignot, E., Li ZL, Dutrillaux, B., Apiou, F., Paulin, D.,
Hum. Genet. 1998, 83, pp. 33-36
- 119- Fuchs, E., Weber, K., Annu. Rev. Biochem. 1994, 63, pp. 345-
382
- 120- Goebel, HH. Fardeau, M., Neuromusc. Diso. 1996, 6, pp. 162-168
- 121- Chou, R.G., Stromer, M.H., Robson, R.M., Huiatt, T.W., Cell
Motil. Cytoskeleton 1994, 29, pp. 204-214
- 122- Djabali, K., Nechaud, B., Landon, F., Portier, M.M., J. Cell Sci.
1997, 110, pp. 2759-2769
- 123- Andrea, K., Martin, J., Arch. Patho. Labo. Medic. 2003, 126 (10),
pp. 1179-1183
- 124- Jensen, M.L., Jensen, O.M., Michalski, W., J. Cutan. Pathol.
1996, 23, pp. 458-463
- 125- Ramagli, L.S., Rodriguez, L.V., Electrophoresis 1985, 6, pp.559-
563
- 126- Blum, H., Beier, H., Gross, J., Electrophoresis 1987, 8, pp. 93-99
- 127- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Electrophoresis
1988, 9, pp. 255-262
- 128- Chevallet, M., Procaccio, V., Rabilloud, T., Anal. Biochem. 1997,
72, pp. 69-72
- 129- Kyshe-Anderson, J., J. Biochem. Biophys. 1984, 10, pp. 203-209
- 130- Moeremans, M., Daneels, G., DE Mey, J., Anal. Biochem 1985,
145, pp. 315-321
- 131- Haycock, J.W., anal. Biochem. 1993, 208, pp397-399

Materialien

Probenvorbereitung: Uterusgewebe (AKH. Wien, Österreich)/ Schwingmühle MM 200 (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Germany)/ Ultra-Turrax / Ultra-Schalpistole HD 200 (Bandlin GmbH, Berlin, Germany)/ Zentrifuge (Sigma BioSciences, Saint Louis, USA)

Lysepuffer: Harnstoff (analytic grade) und CHAPS (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)/ Tris (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)/ PMSF, TPCK und TLCK (Roch Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)/ Millipore-Anlage (Millipore GmbH, Germany)

Proteinbesimmung (Bradford): Coomassie G-250 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)/ Orthophosphatsäure und Ethanol 98% (Carl Roth GmbH, Germany)

2D-Gelelektrophorese: Thioharnstoff (analytic grade), Glycerol, Bromphenolblau, Acrylamid und Bisacrylamid (research grade). Agarose (research grade), JAA, DTT (research grade), Parafin-ÖL, Triton X-100, Tween 20 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)/ Glycin (Potipure \geq 99%), Glycerin (Potipure \geq 99%), Tris für Puffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)/ IPG-Streifen, IPG-Puffer, IPG-Phor, Strip-Holder (Amersham pharmacia Biotec, Freiburg, Germany)/ PROTEAN[®] II Elektrophoresekammer für SDS-Gele (Großformat), PROTEAN[®] III Elektrophoresekammer für SDS-Gele (Kleinformat), PowerPac 1000 (Stromversorger), Kühler, Gel-Gießstand, Gradientenmischer, Densitometer GS-710, PDQuest-6.2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)/ SDS (research grade), APS, TEMED, vergeltet Ethanol, Essigsäure, Natriumthiosulfat, Natriumcarbonat, Formaldehyd, Silbernitrat, EDTA, β -Mercaptoethanol (Merck KG-aA, Darmstadt, Germany)/ TCEP, TBP (Sigma BioSciences, Saint Louis, USA)/ BOA-Markerproteine (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Germany)

Western Blot: mouse monoclonale Antikörper gegen ER α (HC-20), ER β (N-19), PR (C-20), western Blotting Secondary Antikörper anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, Berlin, Germany)/ ECL-Reagenzien (Amersham Pharmacia Biotec, Germany)/ Wattmann-Papier (LGW GmbH, Würzburg, Germany)/ PVDF-Membran (Gereiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Germany)/ Westernblot-Apparatur, Filmkassette, Filmplatten (Bio-Rad Laboratories GmbH, Germany)

Proteinverdauung: Acetonitril (HPCL grade), Ammonium Bicarbonat, Kaliumchlorid, Ameisensäure (Carl Roth, Karlsruhe, Germany)/ Trypsin „sequencing grade“ (Roch Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)/ TFA, (Sigma BioSciences, Saint Louis, USA)/ HCCA (Fluka, Germany)/ MALDI-Target, MALDI-TOF-MS (Voyager STR), Soft Ware für Bearbeitung der Peptidspektren (Applied Biosystem, Framingham, USA)

Antikörperherstellung: pAX-Plasmid, pEG-His1-Plasmid (Mo Bi Tec. Göttingen, Germany)/ Ni-NTA, DH-5 α (Ecoli-Stammzelle), LB-Medium (Novargen, Nottingham, Ireland)/ Ultra-Zentrifuge RC. S8 Plus (Kendro Laboratory, USA).

Lebenslauf

Name: Masree
Vorname: Mohammed
Geburtsdatum: 12.03.1968
Geburtsort: Gazastreifen/Palästina
Staatangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

1974-1980 Grundschole im Gazastreifen
1980-1983 Realschole im Gazastreifen
1983-1986 Abitur mit der Endnote „2.1“
01/1988 Besuch der deutschen Sprachschule in Darmstadt
1988-1989 Besuch des Studienkollegs in Münster/NWF

Studium

1990-1991 Studium der Chemie für 2 Semester
1991-1997 Studium der Biologie an der Johan-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt
07/1997 Abschluss der Diplomprüfung mit Hauptfach Biochemie
1997-1998 Diplomarbeit an Uni-Klinik (Institut für Kardiovaskuläre Physiologie) der Johan-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt
1999-2004 Promotionsstudium am Fachbereich Pharmazie, Institut für pharmazeutische Chemie, an der Johan-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt