

Aus dem Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Lill
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Identifizierung und Charakterisierung
von peripheren Membranproteinen der Zymogengranula des
exokrinen Pankreas der Ratte
durch subgranuläre Proteomanalyse**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Heike Borta (geb. Rolink) aus Münster/Westfalen

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 11.10.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. Michael Schrader

Korreferent: Prof. Dr. Alfred Völkl

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung in den sekretorischen Weg	1
1.2 Transport im sekretorischen Weg	4
1.2.1 Translokation sekretorischer Proteine über die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER)	4
1.2.2 Transport sekretorischer Proteine vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und innerhalb des Golgi-Apparats	5
1.2.3 Proteinsortierung im TGN	6
1.3 Das Pankreas als Sekretionsmodell	7
1.4 Pathologische Veränderungen des Pankreas: Akute und chronische Pankreatitis	9
1.5 Zymogengranulabiogenese im exokrinen Pankreas	11
1.6 Sortierung sekretorischer Proteine in Zymogengranula: Das Modell der submembranösen Matrix	15
1.7 Zymogengranulamembran-assoziierte Proteine und ihre Funktion	19
1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	24
2. Material	26
2.1 Geräte	26
2.2 Chemikalien	28
2.3 Plasmide	31
2.4 Antibiotika	32
2.5 Primer und Nukleotidsequenzen	32
2.6 Molekularbiologische Reagenzien und Kits	35
2.7 Antikörper	36
2.8 Biochemische Reagenzien und Kits	37
2.9 Organismen	38
2.10 Verbrauchsmaterial	38
2.11 Zellkultur	38
2.12 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	39
3. Methoden	42
3.1 Biochemische Methoden	42
3.1.1 Zellfraktionierung	42
3.1.1a Isolierung von Zymogengranula aus Rattenpankreasgewebe	42
3.1.1b Subfraktionierung der Zymogengranula in Inhalts- und Membranfraktionen	43
3.1.1c Herstellung eines Bicarbonat-Extrakts („Wash“-Fraktion) aus ZGM	43
3.1.1d Herstellung einer Mikrosomen-angereicherten Fraktion	44
3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford	44
3.1.3 Proteinfällungen	45
3.1.3a Proteinfällung mit Trichloressigsäure	45

Inhaltsverzeichnis

3.1.3b	Proteinfällung nach Wessel	45
3.1.3c	Proteinfällung mit dem <i>ProteoExtract Protein Precipitation Kit</i> (Firma Calbiochem)	46
3.1.4	2D-Gelelektrophorese	47
3.1.4a	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	47
3.1.4b	Equilibrierung der <i>Immobiline DryStrips</i> für die SDS-PAGE	52
3.1.4c	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.1.5	Färbeprotokolle für Coomassie- und Silberfärbungen	56
3.1.5a	Coomassie-Färbeprotokoll 1	58
3.1.5b	Coomassie-Färbeprotokoll 2	58
3.1.5c	Coomassie-Färbeprotokoll 3: Färbung von SDS-Gelen mit Rutheniumrot und Coomassie G250	58
3.1.5d	Coomassie-Färbeprotokoll 4	59
3.1.5e	Silber-Färbeprotokoll 1 (Anschlussfärbung für Coomassie- Färbeprotokoll 4)	60
3.1.5f	Silber-Färbeprotokoll 2	60
3.1.5g	Silber-Färbeprotokoll 3	61
3.1.5h	Färbung von SDS-Gelen mit <i>Sypro Ruby Protein Gel Stain</i>	61
3.1.6	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen mittels MALDI-MS und MALDI-MSMS	61
3.1.7	Immunoblotanalyse	69
3.1.7a	Antikörperinkubation der Blots	70
3.1.8	Herstellung eines Lysats aus Zungengewebe der Ratte zur Verwendung in der SDS-PAGE und Immunoblotanalyse	71
3.1.9	Färbung von Glykoproteinen der <i>Wash</i> -Fraktion im SDS-Gel oder nach Blotten auf Nitrocellulose	72
3.1.9a	Färbung von Glykoproteinen im SDS-Gel mit dem <i>Glycoprofile III Fluorescent Glycoprotein Detection Kit</i> (Firma Sigma Aldrich)	72
3.1.9b	Färbung von Glykoproteinen im SDS-Gel mit dem <i>Multiplexed Proteomics Glycoprotein Gel Stain Kit</i> (Firma Molecular Probes)	73
3.1.9c	Färbung von Glykoproteinen nach Blotten auf Nitrocellulose mit dem <i>DIG Glycan Detection Kit</i> (Firma Roche)	76
3.1.10	Deglykosylierung von N-glykosylierten Glykoproteinen mit PNGase F	77
3.2	Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Methoden	78
3.2.1	Anfertigung von Kryoschnitten von Rattenpankreasgewebe	78
3.2.2	Immunfluoreszenz an Kryoschnitten	79
3.2.3	Elektronenmikroskopie	79
3.2.3a	Einbettung in Lowicryl – K4M	80
3.2.3b	Einbettung in Epon	81

3.3 Molekularbiologische Methoden	82
3.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben mit dem <i>RNeasy Protect Mini Kit</i> (Fa. QIAgen)	82
3.2 Reverse Transkription	83
3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	84
3.3.4 Klonierung der <i>Rat Mast Cell Protease 1</i> (Chymase) mittels <i>TOPO TA-Cloning</i>	87
3.3.5 Restriktionsverdau	88
3.3.6 Gelelektrophoretische DNA-Analyse	90
3.3.7 Gelextraktion von DNA	91
3.3.8 DNA-Fällung mit Ethanol	91
3.3.9 Ligation	92
3.3.10 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	93
3.3.11 Chemische Transformation von Bakterien	94
3.3.12 Plasmidisolierung aus Bakterien	94
3.3.13 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	95
3.4 Zellkultur und Immunfluoreszenzen	96
3.4.1 Kultur und Passagieren von COS7- und AR42J-Zellen	96
3.4.2 Präparation von Matrigel	97
3.4.3 Stimulation der AR42J-Zellen mit Dexamethason	98
3.4.4 Einfrieren von Zellen	98
3.4.5 Transfektion von Säugerzellen	99
3.4.5.a Transfektion von COS7-Zellen mit Polyethylenimin (PEI)	99
3.4.5.b Transfektion von AR42J-Zellen durch Elektroporation	99
3.4.6 Immunfluoreszenz an COS7- und AR42J-Zellen	100
3.4.7 Morphologische Auswertung	102
3.4.8 Präparation von Zellpellets aus AR42J-Zellen zur RNA-Gewinnung	102
3.4.9 Herstellung von Zellysaten aus AR42J-Zellen zur Verwendung im Immunoblot	102
4. Ergebnisse	104
4.1 Die Zymogengranula des exokrinen Pankreas männlicher Wistar-Ratten können als reine Organellenfraktion isoliert und in Inhalts- und Membranfraktionen mit spezifischer Proteinzusammensetzung fraktioniert werden	104
4.2 Die peripheren Membranproteine der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas (<i>Wash</i> -Fraktion) lassen sich nach Auftrennung in der 2D-Gelelektrophorese in eine saure und eine basische Proteingruppe unterteilen	108
4.3 Die saure Gruppe der <i>Wash</i> -Fraktion beinhaltet viele glykosylierte Proteine	113

Inhaltsverzeichnis

4.4	Viele Proteine der <i>Wash</i> -Fraktion der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas konnten durch MALDI-MS- und MALDI-MSMS-Analysen identifiziert werden	114
4.5	Zwei periphere Membranproteine der Zymogengranula, das Syncollin und das ZG16p, können in der <i>Wash</i> -Fraktion der Zymogengranula über MALDI-MS identifiziert und über spezifische Antikörper im 2D-Immunoblot nachgewiesen werden	131
4.6	Immunoblotstudien zur Carboxyesterlipase (CEL) und RNase A	133
4.6.1	CEL und RNase A können nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung und Immunoblotting in der <i>Wash</i> -Fraktion der Zymogengranula detektiert werden	133
4.6.2	Sowohl die Carboxyesterlipase als auch die RNase A können in der <i>Wash</i> -Fraktion detektiert werden, zeigen aber eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der vier verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen	136
4.7	Studien zur Regulation des mRNA-Levels und der Lokalisation der Chymase im exokrinen Rattenpankreas	138
4.7.1	Durch die MALDI-Analyse wird ein basischer Proteinspot als mastzellspezifische Chymase identifiziert, der auch im 2DImmunoblot durch einen anti-Chymase-Antikörper detektiert werden kann	138
4.7.2	Die Chymase findet sich im Fraktionenblot der vier verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen hauptsächlich in den Membranfraktionen der Zymogengranula	139
4.7.3	Der Chymase-mRNA-Level ist in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas von Foy-305-gefütterten Ratten erhöht	142
4.7.4	Die Chymase wird in AR42J-Zellen nicht exprimiert	145
4.7.5	Die Chymase lässt sich histologisch im exokrinen Rattenpankreasgewebe nachweisen	147
4.7.6	Die Chymase kann in der Elektronenmikroskopie mit Hilfe des Ziege-anti-Chymase-Antikörpers und Protein-A-Gold-Partikeln von 15nm in den Zymogengranula der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas lokalisiert werden	149
4.7.7	Um die Chymase in AR42J-Zellen exprimieren und ihr <i>Targeting</i> und ihre Lokalisation untersuchen zu können, wurde die cDNA der Chymase (<i>Rat mast cell protease 1</i> , RMCP-1) in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert	151

Inhaltsverzeichnis

4.7.8	Die Chymase wird nach Transfektion eines RMCP-1/pcDNA3-Konstrukts in AR42J-Zellen exprimiert und lässt sich in perinukleären Kompartimenten und sekretorischen Granula Dexamethason-stimulierter AR42J-Zellen mittels Immunfluoreszenz nachweisen	153
4.8	Studien zur Regulation des mRNA-Levels und der Lokalisation der Peptidyl-Prolyl-cis/trans- Isomerase B im exokrinen Pankreas der Ratte	155
4.8.1	Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B wird im Immunoblot nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung als basischer Spot in der <i>Wash</i> -Fraktion identifiziert	155
4.8.2	Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase kann im Gegensatz zu anderen ER-ständigen Proteinen in den Zymogengranulasubfraktionen detektiert werden und findet sich dort ausschließlich in den Membranfraktionen	156
4.8.3	Der mRNA-Level der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B kann im Rattenpankreas durch Fütterung der Tiere mit dem Proteaseinhibitor Foy-305 induziert werden	159
4.8.4	Der mRNA-Level der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B wird in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen nur gering induziert	160
4.8.5	Immunoblots von Zellysaten aus unstimulierten sowie Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen zeigen keine deutliche Expressionsstimulation der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B	162
4.8.6	Die PPIB kolokalisiert in AR42J-Zellen mit perinukleären Kompartimenten, nicht aber mit Zymogengranula	164
5. Diskussion		166
5.1	Innerhalb der <i>Wash</i> -Fraktion der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas können viele Proteine über MALDI-MS und MALDI-MSMS identifiziert werden, darunter einige für Zymogengranula bisher unbekannte Proteine	167
5.2	Stellen die Inhaltsproteine der Zymogengranula und die mitochondrialen Proteine eine „Verunreinigung“ der <i>Wash</i> -Fraktion dar oder handelt es sich tatsächlich um membranassoziierte Proteine der Zymogengranula?	171
5.3	Einige Proteine der <i>Wash</i> -Fraktion der Zymogengranula konnten trotz mehrfacher Analyse nicht identifiziert werden, möglicherweise verursacht durch potentielle posttranslationale Modifikationen, die das Peptidmuster beeinflussen	173
5.4	Die Mastzell-spezifische Protease Chymase kann durch MALDI-Analyse eindeutig als Protein der Zymogengranula des exokrinen Pankreas der Ratte identifiziert werden und lässt sich ähnlich den sekretorischen Proteinen regulieren	174

Inhaltsverzeichnis

5.5	Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (Cyclophilin B; PPIB) wird spezifisch im exokrinen Pankreas der Ratte exprimiert und lässt sich ähnlich den sekretorischen Proteinen regulieren	179
5.6	Auch die RNase A zeigt neben ihrer Lokalisation im Inhalt der Zymogengranula eine deutliche Membranassoziation, die vermutlich durch die Interaktion mit Proteoglykanen vermittelt wird	186
5.7	CEL und lipidspaltende Enzyme: Mögliche Assoziationen lipidbindender Enzyme mit Zymogengranulamembranen durch Interaktionen mit Lipidmikrodomänen der Zymogengranulamembranen oder Proteoglykanen der submembranösen Matrix	187
5.8	Die charakterisierten Proteine der <i>Wash</i> -Fraktion (Chymase, PPIB, RNase A, CEL) assoziieren potentiell mit Proteoglykanen: Stärkung der Hypothese der submembranösen Matrix und mögliche Funktionen der charakterisierten Proteine bei der Anbindung der Proteinaggregate an die Zymogengranulamembran sowie bei der Protektion vor vorzeitiger Aktivierung der Zymogene und Autolyse	192
5.9	Einige mit der submembranösen Matrix der Zymogengranula assoziierte Proteine erfüllen möglicherweise protektive Aufgaben und schützen das empfindliche Pankreas so gegen Infektionen	193
5.10	Ausblick auf folgende Experimente	195
	6. Zusammenfassung	196
	7. Literaturverzeichnis	199
	8. Anhang	220
8.1	Abkürzungsverzeichnis	220
8.2	Lebenslauf	224
8.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer	225
8.4	Danksagung	226
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung (mit Publikationsliste)	227

1. Einleitung

1.1 Einführung in den sekretorischen Weg

Das Genom eukaryontischer Zellen kodiert für viele tausend Proteine mit unterschiedlichen Funktionen und Bestimmungsorten. Einige Proteine verbleiben in den synthetisierenden Zellen und erfüllen dort spezifische Aufgaben zur Erhaltung der Zellfunktionalität, andere Proteine werden von darauf spezialisierten Zelltypen in die Umgebung der Zellen sezerniert. Man unterscheidet hier zwischen endokriner Sekretion, die die Sekretion von Proteinen in das Blut darstellt, und exokriner Sekretion, bei der die spezialisierten Zellen ihr Sekret auf innere Oberflächen/ Gangsysteme sezernieren. Das Pankreas vereint beide Funktionen, der endokrine Anteil besteht aus den Langerhans-Inseln und sezerniert Hormone (1.3), der exokrine Anteil bildet die Verdauungsenzyme, die über ein Gangsystem in den Dünndarm transportiert werden.

Um die diversen Sekretionsmechanismen regulieren zu können, sind spezifische Reaktionsräume innerhalb der Zellen notwendig. Eukaryontische Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben, die sie gegen ihre Umgebung abgrenzt (Lodish et al., 2000). Zusätzlich besitzen sie ausgedehnte interne Membransysteme, die spezifische Kompartimente innerhalb der Zelle gegen das Cytosol abgrenzen. Die verschiedenen Kompartimente zeichnen sich durch eine distinkte Protein- und Enzymzusammensetzung sowie ein spezielles ionisches Milieu aus, wodurch innerhalb der Zelle verschiedene spezifische Reaktionsräume geschaffen werden (Lodish et al., 2000). Zur Aufrechterhaltung der Kompartimentspezifität müssen die von der Zelle synthetisierten Proteine selektiv zum entsprechenden Zielkompartiment transportiert werden und dort verbleiben. Dieser Transport erfolgt zwischen verschiedenen Zellorganellen/Zellkompartimenten über Transportvesikel. Innerhalb eines Zellverbandes sind Zellen häufig polarisiert, d.h. es lassen sich zwei verschiedene Bereiche der Plasmamembran voneinander abgrenzen, ein apikaler und ein basolateraler Bereich. Beide unterscheiden sich hinsichtlich der Lipid- und Proteinzusammensetzung sowie ihrer Funktion. Während der basolaterale Anteil die Interaktion zwischen benachbarten Zellen vermittelt, übernimmt die apikale Membran andere spezifische Aufgaben (wie z.B. die

regulierte Sekretion von Zymogenen in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas). Auch die Zellorganellen haben in polarisierten Zellen eine spezifische Topologie, die durch das Zytoskelett vermittelt wird. Die Zellpolarität ist essentiell für die Funktionalität der jeweiligen Zelle.

Abgesehen von einigen mitochondrialen Proteinen sowie manchen Proteinen in Chloroplasten werden die Proteine der Zelle von nukleärer DNA kodiert, von Ribosomen synthetisiert und nachfolgend durch verschiedene Sortierungssignale und Sortierungsprozesse zu ihrem Wirkungsort transportiert. Proteine, die in der Zelle verbleiben, werden vollständig an cytosolischen Ribosomen translatiert und posttranslational zu ihrem Zielkompartiment dirigiert (abgesehen von lysosomalen Proteinen), sekretorische Proteine werden kotranslational in das raue endoplasmatische Retikulum und von dort zum Golgi-Apparat transportiert, in beiden Kompartimenten modifiziert und nachfolgend exocytotiert (Lodish et al., 2000).

Der Sekretionsmechanismus eukaryontischer Zellen ist hoch konserviert (Bennett und Scheller, 1993) und unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Sekretionsmechanismen, der konstitutiven Sekretion, durch die Proteine kontinuierlich und ohne bestimmten Stimulus in Transportvesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort sezerniert werden (Ponnambalam und Baldwin, 2003), und der regulierten Sekretion, bei der Proteine in sekretorischen Granula gespeichert, zur Plasmamembran transportiert und erst auf einen bestimmten Stimulus hin sezerniert werden (Burgoyne und Morgan, 2003). Konstitutiv sezernierte Proteine sind zum Beispiel Anteile der extrazellulären Matrix, reguliert sezernierte Proteine sind Verdauungsenzyme, Hormone und Neurotransmitter. Der die Exozytose auslösende Reiz während der regulierten Sekretion kann sowohl hormoneller als auch neuronaler Natur sein und wird über *second messenger* in das Zellinnere vermittelt. Konstitutive Sekretion erfolgt in allen sekretorisch aktiven Zellen, regulierte Sekretion findet nur in einigen spezialisierten Zelltypen wie den Azinuszellen des exokrinen Pankreas parallel zur konstitutiven Sekretion statt.

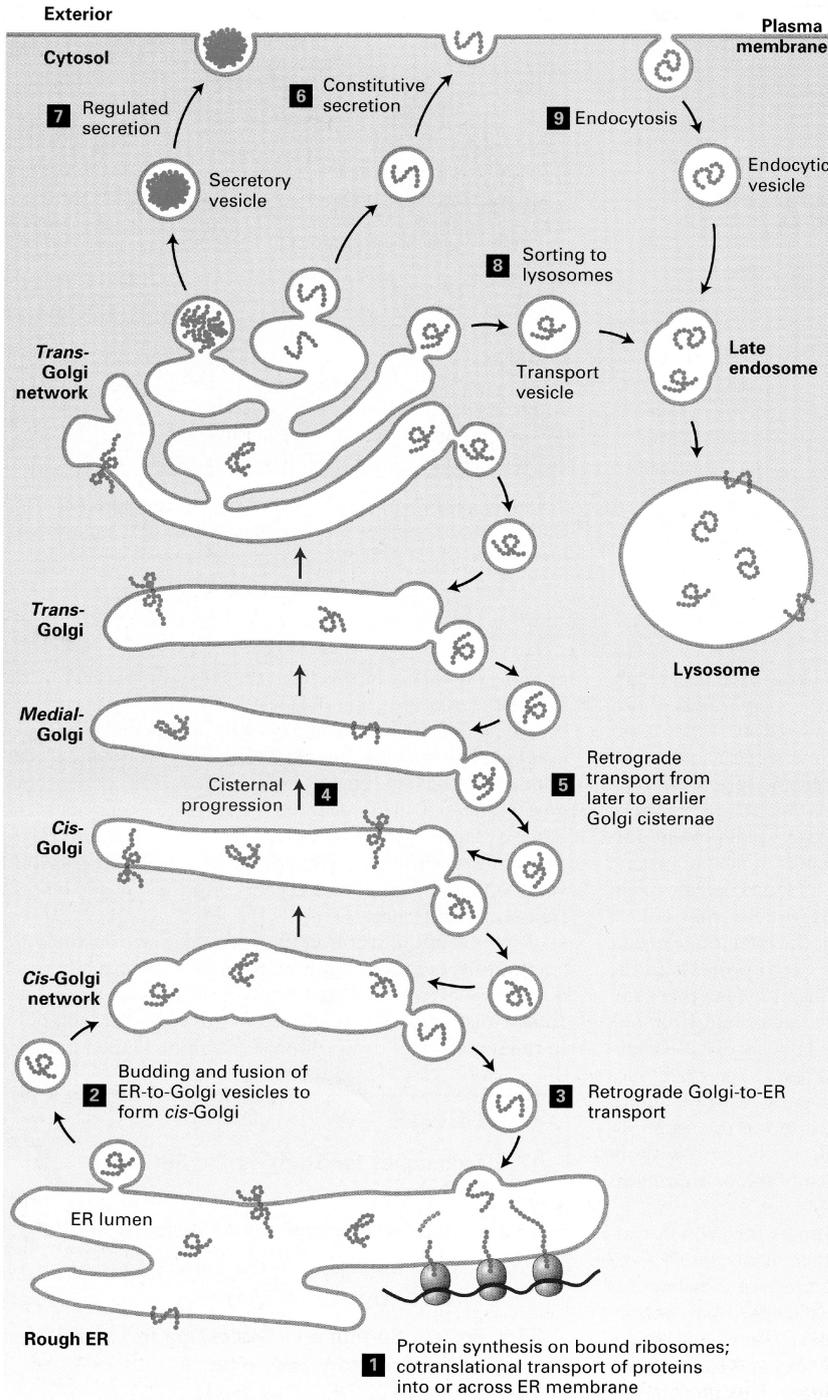


Abb. 1.1:

Darstellung des Proteintransports im sekretorischen Weg (entnommen aus Lodish et al., 2004)

1.2 Transport im sekretorischen Weg

1.2.1 Translokation sekretorischer Proteine über die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER)

Sekretorische Proteine werden kotranslational in das Lumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) transportiert. Dies wird über eine N-terminale ER-Signalsequenz vermittelt, die aus positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren besteht. Die Signalsequenz wird während der Proteintranslation am freien Ribosom von einem cytosolischen Ribonukleoproteinpartikel (SRP, signal recognition particle) erkannt, der mit einem SRP-Rezeptor an der ER-Membran interagiert und so den Komplex aus mRNA, Ribosom, SRP und entstehendem Protein an die ER-Membran koppelt (Wild et al., 2004). GTP-abhängig wird dieser Komplex dann auf einen sogenannten Translokonkomplex übertragen, der den Transport der entstehenden Polypeptidkette in das Lumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums vermittelt. Kleinere sekretorische Proteine können auch posttranslational in das Lumen des rERs transportiert werden. Dabei spielen cytosolische Chaperone eine wichtige Rolle, die die Proteine in einer ungefalteten Form halten und so den Durchtritt durch bestimmte Poren in der ER-Membran ermöglichen (Lodish et al., 2000; Rapoport et al., 1996).

Im Lumen des ER wirken verschiedene Proteine an der korrekten Faltung der Proteine mit, u.a. BiP, ein Chaperon der Hsp70-Familie, die Protein-Disulfid-Isomerase, die die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysiert, Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, die die Rotation von Polypeptiden um Peptidyl-Prolyl-Bindungen erleichtern, sowie die Lektine Calnexin und Calretikulin, die Zuckerketten an den entstehenden Proteinen binden und die Proteinfaltung unterstützen. Nur korrekt gefaltete Proteine können das endoplasmatische Retikulum in Richtung Golgi-Apparat verlassen. Die Zusammenlagerung von Proteinen zu Proteinkomplexen kann sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat bzw. intermediären Kompartimenten erfolgen (Tatu et al., 1995).

Proteine, die in das ER transportiert werden, können kotranslational glykosyliert werden. Dabei werden vorgefertigte Oligosaccharidbäume N-glykosidisch mit dem Protein verknüpft und anschließend im Golgi-Apparat weiter modifiziert.

Der Transport der so translozierten Proteine vom ER zum Golgi-Apparat wird durch Transportvesikel vermittelt.

1.2.2 Transport sekretorischer Proteine vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und innerhalb des Golgi-Apparats

Der retrograde und anterograde Transport zwischen ER und Golgi-Apparat sowie der Proteintransport innerhalb der Golgi-Zisternen und der Transport zur Zelloberfläche erfolgen über Transportvesikel, die in Zyklen von Vesikelabschnürung und Vesikelfusion Proteine von Lumen zu Lumen bzw. von Membran zu Membran transportieren. Die Transportvesikel werden als *coated vesicles* bezeichnet, da sie auf der cytosolischen Membranseite einen Proteinbelag tragen, der GTP-abhängig durch Polymerisation von verschiedenen Proteinuntereinheiten entsteht (Lodish et al., 2000; Rothman und Orci, 1992).

Der Proteintransport zwischen ER und Golgi-Apparat verläuft in beide Richtungen. Der anterograde Transport erfolgt über COPII-ummantelte Vesikel (Gürkan et al., 2006), die sich vom ER abschnüren und zum ERGIC (ER-Golgi-intermediate compartment) verschmelzen, welches an Mikrotubuli transportiert und dann durch Reifungsprozesse zur cis-Golgi-Zisterne wird. Der retrograde Proteintransport innerhalb verschiedener Golgi-Zisternen sowie vom Golgi-Apparat zum ER wird durch COPI-ummantelte Vesikel vermittelt (McMahon und Mills, 2004; Bethune et al., 2006). Er ist notwendig, um die spezifischen Proteinzusammensetzungen der unterschiedlichen Kompartimente aufrecht zu erhalten, da jedes ordentlich gefaltete luminal Proteine ohne spezifisches Signal in Transportvesikel verpackt und transportiert werden kann. Auch müssen manche ER-residente Proteine zunächst im Golgi-Apparat modifiziert und danach in das ER zurücktransportiert werden, um ihre Funktion ausüben zu können. Sowohl für luminal Proteine als auch Transmembranproteine existieren spezifische Aminosäuresequenzen, die den Rücktransport ermöglichen (Pelham, 1990; Teasdale und Jackson, 1996).

Der Golgi-Apparat besteht aus einer Ansammlung flacher, membranumhüllter Zisternen, die mit Vesikeln assoziiert sind, die den Proteintransport zwischen den einzelnen Zisternen vermitteln (Lodish et al., 2000). Dem ER zugewandt ist

die cis- oder Bildungszisterne, zur Plasmamembran hin findet sich die trans- oder Reifungszisterne. Beide Seiten sind eng an besondere Kompartimente angeschlossen, die aus einem Netzwerk verbundener Röhren und Zisternen bestehen, dem cis-Golgi-Netzwerk (CGN) und dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Mellman und Simons, 1992). Beide Netzwerke sind für Sortierungsprozesse verantwortlich, das CGN für die Weiterleitung sekretorischer Proteine durch den Golgi-Apparat und die Rückführung ER-residenter Proteine zum endoplasmatischen Retikulum, das TGN für die Sortierung von Proteinen in Lysosomen, sekretorische Vesikel oder zur Zelloberfläche.

Ein alternatives Modell beschreibt die Reifung der Golgi-Zisternen. Dabei sollen sich Transportvesikel vom ER abschnüren und homotypisch zum ERGIC verschmelzen. Mehrere ERGICs verschmelzen dann zu einer neuen cis-Golgi-Zisterne, welche durch Reifung alle Golgi-Stufen bis zum TGN durchläuft, indem nicht-sekretorisches Material wie Golgi-Enzyme in Transportvesikeln retrograd transportiert wird (Glick und Malhotra, 1999). Ein drittes Modell postuliert dynamische Tubuli, die zwischen den einzelnen Zisternen gebildet werden können, über die dann der Transport erfolgt. Für alle Modelle finden sich Hinweise *in vivo* als auch *in vitro*, so dass letztendlich vermutlich eine Kombination aller drei Modelle existiert (Altan-Bonnet, 2004).

1.2.3 Proteinsortierung im TGN

Alle Proteine, die nicht als ständige Bestandteile im Golgi-Apparat verbleiben, werden im TGN entsprechend ihres Bestimmungsortes sortiert (Rodriguez-Boulan und Musch; 2005). Lysosomale Proteine werden durch Bindung an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und unter Beteiligung von Clathrin in Transportvesikel sortiert, die zu den späten Endosomen transportiert werden, aus denen sich später die Lysosomen bilden; lysosomale Transmembranproteine besitzen eine spezifische Aminosäuresequenz, die sie zu den Lysosomen dirigiert (Lodish et al., 2000). Konstitutiv sezernierte Proteine wie zum Beispiel Proteoglykane benötigen anscheinend kein spezifisches Sortierungssignal. Jedes Protein, das über das ER und durch den Golgi-Apparat transportiert wird und weder in Lysosomen noch in sekretorische Vesikel sortiert wird, gelangt automatisch ohne Beteiligung von Clathrin zur Zelloberfläche. Dies trifft für alle nicht polarisierten Zellen zu, polarisierte Zellen

müssen etwas kompliziertere Mechanismen entwickeln, um konstitutiv sezernierte Proteine entweder zur apikalen oder basolateralen Membran zu sortieren. Mögliche Mechanismen sind hier die gezielte Sortierung sowie selektive Retention der jeweiligen Proteine an ihrem Bestimmungsort (Yeaman et al., 1999; Matter, 2000). Vermutlich tragen hierzu auch Prozesse bei, die durch Lipidmikrodomänen und deren Gruppierung durch Oligomerisierung von Raftbestandteilen vermittelt werden (Schuck und Simons, 2004).

Die Speicherung von Proteinen in sekretorischen Vesikeln ist essentiell in Zellen, die bei Bedarf ihre Sekretproteine schnell ausschleusen müssen. Sekretorische Vesikel schnüren sich unter Beteiligung von Clathrin am TGN ab, werden unterhalb der Plasmamembran gespeichert und geben ihren Inhalt als Antwort auf extrazelluläre Stimuli durch Exozytose an die Umgebung der Zelle ab. Der genaue Prozess der Bildung dieser sekretorischen Vesikel soll an späterer Stelle (1.5) erläutert werden. Clathrin besteht aus drei schweren (180kDa) und drei leichten Ketten (35-40kDa), die zusammen die Form eines Triskelions ergeben (McMahon und Mills, 2004). Die Polymerisation dieser Anteile auf der cytosolischen Membranseite des TGN, die durch spezielle Adapterproteine GTP-abhängig vermittelt wird, führt zu einem polygonalen Netzwerk mit einer intrinsischen Wölbung, was die Bildung lysosomaler Transportvesikel sowie anteilig auch der sekretorischen Vesikel unterstützt.

1.3 Das Pankreas als Sekretionsmodell

Das Pankreas ist eine in zahlreiche Läppchen gegliederte Drüse, die sowohl exokrin als auch endokrin sezerniert. Den endokrinen Anteil bilden die sogenannten Langerhans-Inseln, die etwa 1,5% des Gesamtvolumens des Pankreas einnehmen und in Form von kompakten Zellgruppen innerhalb des exokrinen Gewebes verteilt sind. Hier werden die Hormone Insulin und Glukagon, die in den Kohlenhydratstoffwechsel eingreifen, sowie Somatostatin und pankreatisches Polypeptid jeweils von einem speziellen Zelltyp produziert und bei Bedarf in die Blutbahn sezerniert (Junqueira und Carneiro, 1996).

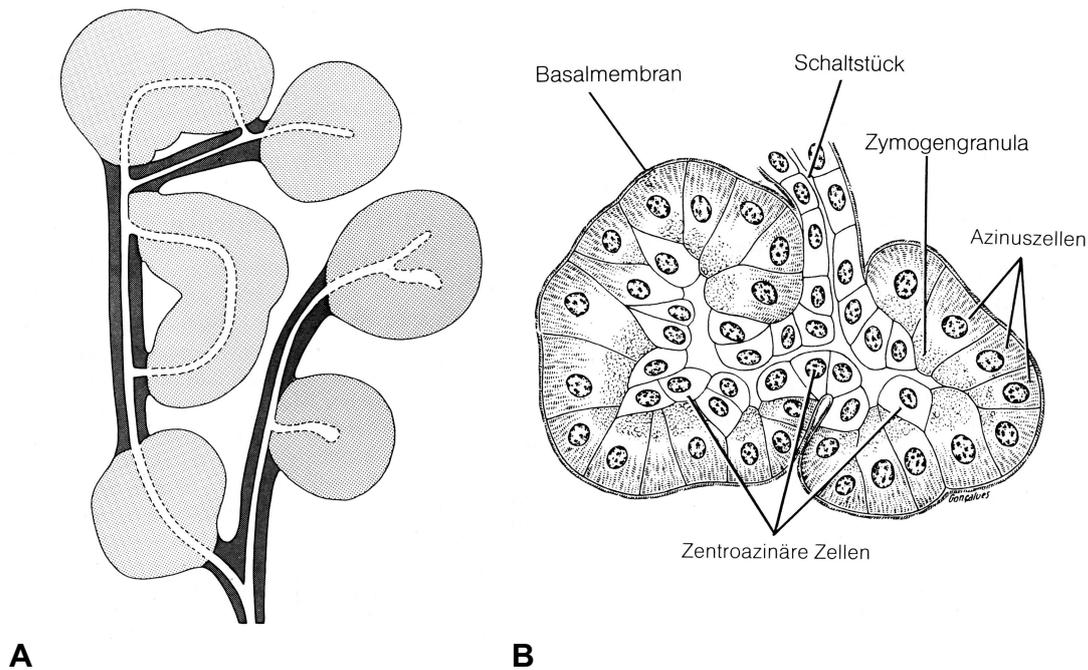


Abb. 1.2: (A) Schematische Darstellung des exokrinen Pankreas; (B) Darstellung eines Pankreasazinus; die Azinuszellen synthetisieren und sezernieren die Verdauungsenzyme (entnommen aus Junqueira et al., 1996)

Der exokrine Anteil des Pankreas ist schon seit mehreren Jahrzehnten ein Modellsystem zur Erforschung intrazellulärer Transportprozesse und der Sekretion von Proteinen (Palade, 1975). Die hier gewonnenen Ergebnisse ließen sich auf andere sekretorische Systeme übertragen, wodurch das Pankreas ein beliebtes Modellsystem zur Erforschung der Mechanismen von Proteinsortierung und Proteinsekretion darstellt. Das exokrine Pankreas ist nach dem Prinzip einer verzweigten tubuloazinösen Drüse aufgebaut und besteht aus Drüsenendstücken, sog. Azini, und Drüsenausführungsgängen (Abb. 1.2; Junqueira und Carneiro, 1996). Die Azini bestehen aus 20 – 30 polarisierten serösen Drüsenzellen, die auf einer Basalmembran verankert sind und mit ihrem apikalen Pol das Azinulumen umgeben. Sie zeigen alle Charakteristika proteinsezernierender Zellen. Dazu gehört ein basal liegendes stark entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum sowie ein im Verhältnis stark entwickelter supranukleär gelegener Golgi-Apparat und apikal gelagerte Sekretgranula. Diese Sekretgranula enthalten hauptsächlich die inaktiven Vorstufen der vom Pankreas sezernierten Verdauungsenzyme, die Zymogene, weshalb sie auch als Zymogengranula bezeichnet werden. Durch neuronale bzw. hormonelle Stimulation (Acetylcholin bzw. Cholezystokinin) wird die

exozytotische Freisetzung der Zymogene eingeleitet. Dabei löst Cholezystokinin eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade aus, die sowohl über cAMP als auch über die Aktivierung der Phospholipase C und dadurch gebildetes Inositol-1,4,5-Triphosphat Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern in das Cytosol freisetzt (Lee et al., 2005).

1.4 Pathologische Veränderungen des Pankreas: Akute und chronische Pankreatitis

Akute und chronische Entzündungen des Pankreas sind relativ häufig auftretende Erkrankungen mit Lethalitätsraten zwischen 5% (milde Formen) und 70% (schwere Formen mit Infektionen). Sie entstehen durch die Aktivierung der produzierten Verdauungsenzyme innerhalb des Organs, was zum teilweisen Selbstverdau des Organs und zum Übertritt der Enzyme in die Blutbahn führen kann (Weber und Adler, 2001). Man kann zwei Formen der Pankreatitis unterscheiden, eine akute Form, nach der sich das Pankreas erholt, und eine chronische Variante. Die akute Pankreatitis kann sowohl ödematös als auch hämorrhagisch sein. Bei einem ödematösen Verlauf kommt es zu einer Schwellung des Organs und kleineren Nekrosen im umgebenden Fettgewebe, während bei der hämorrhagischen Variante Nekrosen innerhalb des Pankreasgewebes sowie Einblutungen auftreten, weshalb man diesen Krankheitsverlauf aufgrund seines fulminanten Krankheitsbildes auch als Pankreasapoplexie bezeichnet. Die chronische Form der Pankreatitis kann aus einer akuten Pankreatitis entstehen, kann aber auch genetisch bedingt sein (Hahn und Riemann, 1996).

In den meisten Fällen sind Gallensteine die Ursache für die Entstehung einer Pankreatitis, die zu einem Rückstau der Verdauungssäfte in das Pankreas führen. Auch Alkoholabusus sowie Fettstoffwechselstörungen und eine idiopathische Genese spielen eine Rolle, von geringerer Bedeutung sind Nebenwirkungen von Medikamenten oder Virusinfektionen (z.B. Mumps) (Bornman und Beckingham, 2001).

Über die molekularen Ursachen, die zur Entstehung einer Pankreatitis führen, ist momentan nur wenig bekannt. Verschiedene Hypothesen sehen in einer Aktivierung des Trypsinogens (durch Autokatalyse, Mutationen innerhalb des

Trypsinogen-Genen oder Genen von Trypsinogeninhibitoren sowie katalytische Aktivierung durch die lysosomale Hydrolase Cathepsin B) den auslösenden Moment für die Entstehung einer Pankreatitis (Whitcomb et al., 1996; Witt et al., 2000; Steer und Meldolesi, 1987; Lindkvist et al., 2006). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es während einer Pankreatitis zu Störungen der regulierten Sekretion von Zymogenen sowie unspezifischen Fusionsprozessen der Sekretgranula in den Azinuszellen kommt und dass sich diese Vorgänge durch Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration induzieren lassen (Raraty et al., 2000). Neuere Untersuchungen weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass Gallensäuren die Calciumfreisetzung sowohl aus dem endoplasmatischen Retikulum als auch anderen intrazellulären Calciumspeichern wie auch Zymogengranula über eine Aktivierung von Inositoltriphosphat-Rezeptoren sowie Ryanodin-Rezeptoren induzieren (Gerasimenko et al., 2006). Innerhalb der Zymogengranula werden anscheinend Ca^{2+} -Ionen gegen Kaliumionen ausgetauscht, was zu einer Störung der Zymogenkondensation führen und damit eine vorzeitige Aktivierung der Zymogene begünstigen kann (Yang et al., 2007). In einem Modell einer Caerulein-induzierten Pankreatitis konnte weiterhin gezeigt werden, dass es hier zu Veränderungen in der Proteinprozessierung kommt, was unter anderem die Glykosylierung sekretorischer Proteine betrifft. Veränderungen im Glykosylierungsmuster und der Sulfatierung von Glykoproteinen können zu Problemen bei der Kondensation der sekretorischen Proteine sowie zu instabilen Zymogengranula führen und somit möglicherweise eine vorzeitige Zymogenaktivierung und Freisetzung ins Cytoplasma begünstigen (De Lisle, 2005). Um die derzeit begrenzten Therapiemöglichkeiten zu erweitern, die sich auf diätische Kost sowie auf entzündungshemmende und schmerzlindernde Medikation beschränken, und präventiv das Pankreas gegen Entzündungen zu schützen, ist ein besseres Verständnis der zellulären Vorgänge im exokrinen Pankreas notwendig.

1.5 Zymogengranulabiogenese im exokrinen Pankreas

Die Zymogengranula werden von den Azinuszellen des exokrinen Pankreas gebildet und unterhalb der apikalen Plasmamembran gespeichert, bis sie aufgrund eines externen hormonellen oder neuronalen Stimulus ihren Inhalt exozytotisch in das Gangsystem des exokrinen Pankreas freisetzen. Sie enthalten 15-20 verschiedene hydrolytische Enzyme und Proenzyme, darunter Endo- und Exoproteasen, Lipasen, Glykosidasen und Nukleasen (Freedman und Scheele, 1993). Viele dieser Enzyme gehören zur Klasse der Serinproteasen bzw. Serinesterasen, für deren Aktivität ein Serin im aktiven Zentrum essentiell ist. Die meisten der in den Zymogengranula gespeicherten Proteine werden in einer inaktiven Proform (Zymogen) sezerniert und erst im Darmlumen durch Enterokinase und Trypsin proteolytisch aktiviert.

Die Membran der Zymogengranula besteht überwiegend aus Lipiden (96% des Trockengewichts), dabei stellen Sphingomyelin und Cholesterol den Hauptanteil (Gorelick und Jamieson, 1981). Membranproteine machen nur einen geringen Prozentsatz an der Gesamtmenge der Zymogengranulaproteine aus, wobei den in das Lumen der Zymogengranula gerichteten peripheren und integralen Membranproteinen vermutlich eine große Bedeutung bei der Aggregation der Zymogengranulainhaltsproteine sowie deren Interaktion mit der Zymogengranulamembran zukommt. Proteine, die mit der cytosolischen Membranseite der Zymogengranula assoziiert sind, spielen eine Rolle bei der Steuerung der Granula zur apikalen Plasmamembran und der Membranfusion. Es existieren verschiedene Modelle, wie sekretorische Proteine in Vesikel sortiert werden. Dazu gehören das „*sorting by entry*“ und „*sorting by retention*“ (Borgonovo et al., 2006). Das Modell des „*Sorting by entry*“ beinhaltet, dass sekretorische Proteine durch das im TGN herrschende Milieu selektiv aggregieren, „*Sorting for retention*“ bezeichnet den Prozeß der selektiven Entfernung nicht-sekretorischer Proteine aus den aggregierten Protein-*Clustern*. Beide Prozesse schließen sich nicht aus, sondern können sich ergänzen.

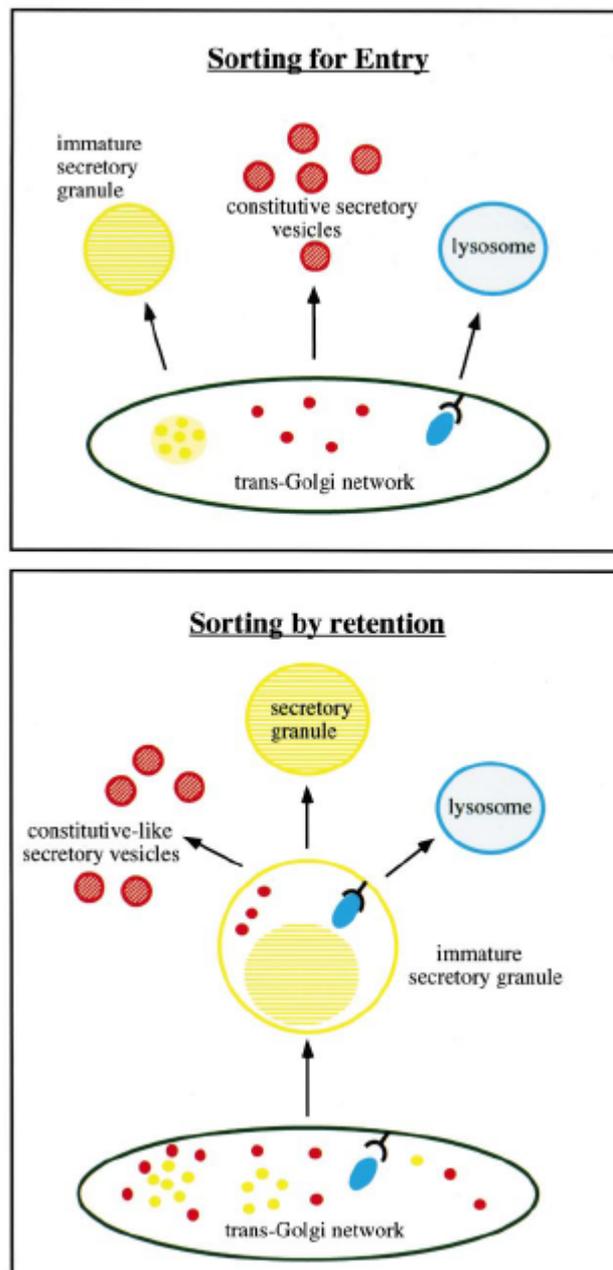


Abb. 1.3:

Darstellung zweier möglicher Modelle der Proteinsortierung im TGN (entnommen aus Tooze et al., 1998)

Die Bildung der Zymogengranula erfolgt am TGN und erfordert im Wesentlichen zwei Sortierungsschritte, durch die reguliert sezernierte Zymogene von konstitutiv sezernierten sowie lysosomalen Proteinen getrennt werden. Zunächst tritt eine selektive Kondensation der reguliert sezernierten Proteine ein, die abhängig ist von dem im TGN herrschenden leicht sauren pH-Wert (Colomer et al., 1996; Dartsch et al., 1998; Castle und Castle, 1998; Thiele und Huttner, 1998a) und der erhöhten Konzentration von Ca^{2+} -Ionen (Chanat und Huttner, 1991). Diese Proteinaggregate interagieren dann mit bestimmten Bereichen der TGN-Membran und schnüren sich ohne Beteiligung von Adapter- oder Hüllproteinen als unreife sekretorische Granula ab (Rindler, 1992; Tooze,

1998; Thiele und Huttner, 1998b). Es gibt Hinweise, dass die Komplexbildung der sekretorischen Proteine schon im ER beginnt und dass diese kleineren Proteinkomplexe dann im TGN zu sogenannten „dense cores“ aggregieren (Kleene et al., 1999), d.h. die initiale Bildung der Komplexe ist nicht pH-abhängig, die Bildung größerer Aggregate wird aber durch die Absenkung des pH-Werts im TGN gefördert. Die Komplexbildung sekretorischer Proteine innerhalb des endoplasmatischen Retikulums erleichtert so die Zymogensortierung und verhindert möglicherweise die vorzeitige Aktivierung der Zymogene in intrazellulären Kompartimenten. Helferproteine tragen im ER zu einer korrekten Faltung und Modifikation der sekretorischen Proteine bei und werden teilweise im Komplex mit diesen transportiert (Kleizen und Braakman, 2004). Studien zum Granulainhaltsprotein ZG29p und dessen Interaktion mit Amylase deuten an, dass Linkerproteine die Bildung von Proteinaggregaten sowie die Anbindung von Proteinen/Proteinaggregaten an die Membran der Granula vermitteln (Kleene et al., 2000). Dikeakos und Reudelhuber (2007) beschreiben die funktionelle Einteilung von Proteinen, die in kondensierende sekretorische Granula sortiert werden, in drei unterschiedliche Gruppen; dazu gehören Proteine, die mit der Granulamembran interagieren, sowie sekretorische Proteine, die Komplexe miteinander sowie mit prozessierenden Proteinen bilden. Dabei scheint für verschiedene Proteine mehr als ein Sortierungssignal zu existieren (Dikeakos und Reudelhuber, 2007). Nicht-reguliert sezernierte Proteine werden aus den unreifen sekretorischen Vesikeln durch Abschnürung kleinerer Clathrin-besetzter Vesikel entfernt, was zur Reifung der Zymogengranula führt (Castle, 1990), die im Vergleich zu sekretorischen Granula neuroendokriner Zellen mit einem Durchmesser von ca. 1µm sehr groß sind. Die Zymogengranula werden dann in Abhängigkeit des Mikrotubuli- und Aktincytoskeletts zur apikalen Plasmamembran transportiert (Ueda et al., 2000; Valentijn et al., 2000) und entleeren dort aufgrund eines hormonellen oder nervalen Reizes und der daraus resultierenden erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ihren Inhalt exozytotisch in das Gangsystem des exokrinen Pankreas (Williams, 2001), wobei sie vermutlich an bestimmten permanenten Strukturen der Plasmamembran, dem „Porosom“, andocken, dort zeitweise mit der Plasmamembran fusionieren (Jeftinija, 2006) und aufgrund des erhöhten intravesikulären Drucks nach „*Vesicle swelling*“ ihren Inhalt

freisetzen. Die Granula fusionieren stoßweise mit der Membran, es kommt zu homotypischen Fusionen der Zymogengranula, die durch Syntaxin 3 auf der Granulamembran vermittelt werden (Hansen et al., 1999). Dabei fusionieren Zymogengranula sequenziell mit anderen Zymogengranula, die schon mit der Plasmamembran fusioniert sind und den Kontakt zum Azinusbinnenraum aufrechterhalten (Pickett und Edwardson, 2006). Im Gegensatz dazu kommt es u.a. in neuroendokrinen Zellen zunächst zu homotypischen Fusionen der sekretorischen Granula und anschließend zur Fusion dieser mit der Plasmamembran.

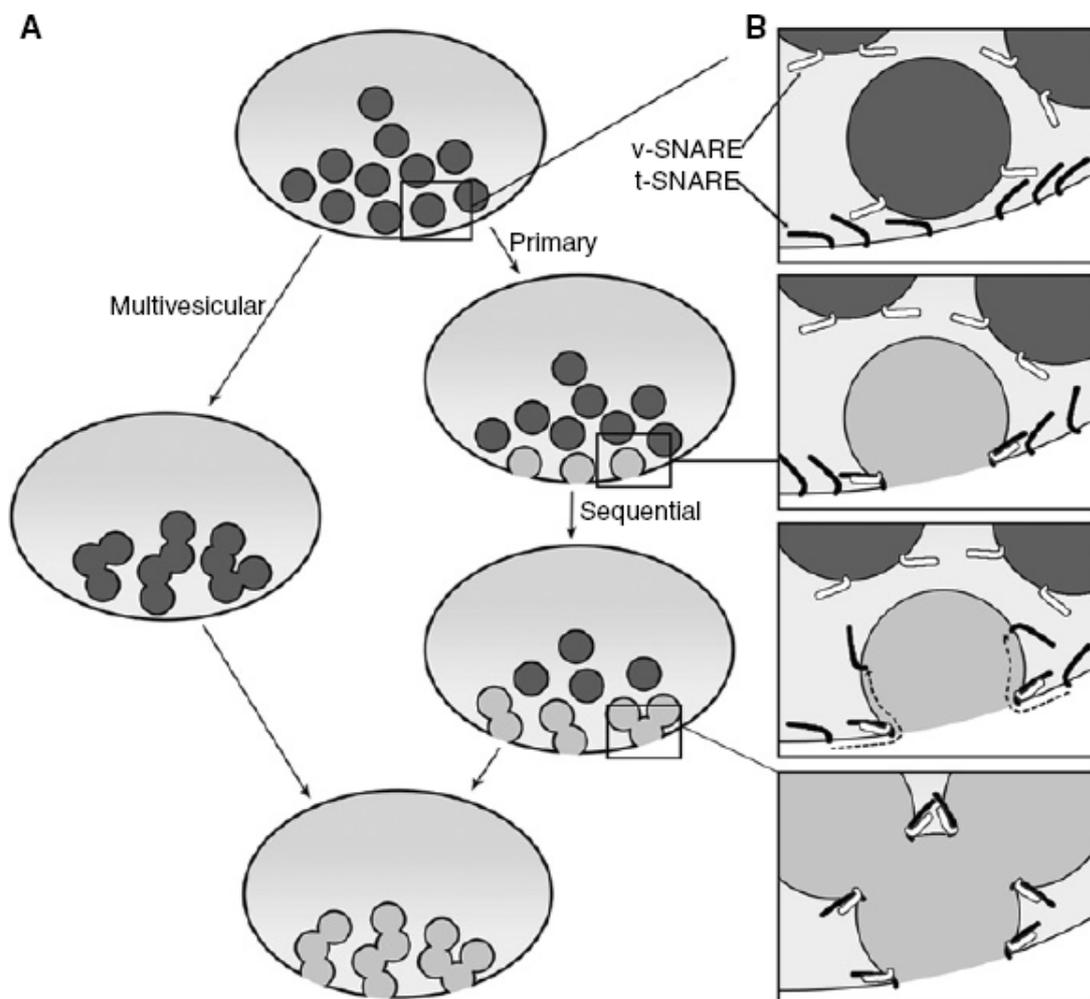


Abb. 1.4: (A) Darstellung der exozytotischen Fusionsprozesse von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran der sekretorischen Zelle. Zymogengranula des exokrinen Pankreas fusionieren sequenziell mit schon mit der Plasmamembran fusionierten Zymogengranula. In anderen Zelltypen wie u.a. neuroendokrinen Zellen kommt es zunächst zu homotypischen Fusionen der sekretorischen Granula untereinander und anschließend mit der Plasmamembran (hier als *multivesicular* bezeichnet). (B) Darstellung der SNARE-vermittelten Membranfusion (entnommen aus Pickett et al., 2006).

Die mehrere Minuten anhaltende Fusion der Zymogengranula mit der Plasmamembran wird vermutlich durch ein Netzwerk aus Aktin ermöglicht (Williams, 2006; Nemoto et al., 2004). Das durch die Fusion und Exozytose der Granula zeitweise in die Plasmamembran integrierte Membranmaterial wird über Clathrin-besetzte Vesikel endocytisiert und wiederverwertet. Durch den im Gangsystem herrschenden alkalischen pH-Wert werden die sezernierten Proteine solubilisiert (Freedman und Scheele, 1994).

1.6 Sortierung sekretorischer Proteine in Zymogengranula: Das Modell der submembranösen Matrix

Der molekulare Mechanismus der Interaktion der Proteinaggregate mit der Membran des TGN ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Zwar werden Rezeptoren für einige sekretorische Proteine wie die Amylase postuliert, allerdings ist es allein aufgrund der Größe der entstehenden Proteinaggregate und der geringen Anzahl an Membranproteinen in den Zymogengranula sehr unwahrscheinlich, dass jedes Protein einen eigenen Rezeptor bindet.

Im exokrinen Pankreas der Maus wird Muclin, ein stark glykosyliertes und sulfatiertes Membranprotein, als potentieller Rezeptor für die Sortierung der aggregierten Zymogene in sekretorische Vesikel angesehen (Boulatnikov und De Lisle, 2004). Muclin wird im TGN sulfatiert und soll durch elektrostatische Wechselwirkungen an die Zymogene binden, die unter den im TGN herrschenden Bedingungen aggregieren und durch den leicht sauren pH-Wert potentiell positive Ladungen tragen. Es wird vermutet, dass diese Wechselwirkungen zwischen Muclin und den Zymogenaggregaten für die Sortierung der Zymogene in sekretorische Vesikel verantwortlich sein könnten. Mögliche Hinweise darauf ergeben sich aus Experimenten in AR42J-Zellen, in denen die Expression von pro-Muclin die Bildung funktioneller reguliert sekretorischer Granula induzieren können soll (De Lisle et al., 2005).

Die von Scheele et al. postulierte (Scheele et al., 1994) und auch von unserer Arbeitsgruppe angenommene Hypothese beinhaltet eine submembranöse Matrix in den Zymogengranula (der Ratte), die für die Form und Stabilität der Zymogengranula notwendig ist (Schrader, 2004). Sie vermittelt die Proteinsortierung und Granulabiogenese und setzt sich aus GP2-Tetrameren

und sulfatierten Proteoglykanen sowie weiteren assoziierten Proteinen zusammen (Schmidt et al., 2000).

Sulfatierte Proteoglykane bilden das Grundgerüst der submembranösen Matrix (Schmidt et al., 2000; Schmidt et al., 2001), an das andere periphere Proteine assoziiert sind (Kleene et al., 1999). Dazu gehören das Lektin ZG16p sowie das Syncollin, das mit GP2 interagiert (Kalus et al., 2002). Experimente mit einem Carbonatextrakt der Granulamembranen ermittelten außerdem das ZG46p (Chen et al., 1997) sowie verschiedene unbekannte saure und basische Proteine als peripher an die Zymogengranulamembran assoziierte Komponenten. Diese wurden in einem *Condensation-Sorting-Assay* als sulfatierte Proteoglykane und Glycin-reiche Glykoproteine identifiziert, die in vitro eine Bindung aggregierter Zymogene an die Granulamembran vermitteln können (Schmidt et al., 2000; Schmidt et al., 2001). Sulfatierte Proteoglykane finden sich in vielen verschiedenen intrazellulären Kompartimenten, besonders aber in sekretorischen Granula neurosekretorischer Zellen und bestimmten Zellen des Immunsystems (Prydz und Dalen, 2000). Frühe Radioaktivexperimente, die die Inkorporation von $^{35}\text{SO}_4$ in Pankreasläppchen des Meerschweinchens untersuchten, wiesen sulfatierte Proteoglykane in den Zymogengranula der Azinuszellen und im Sekret innerhalb der Pankreasgänge nach (Tartakoff et al., 1975; Reggio und Palade, 1978). Scheele et al. (1994) zeigten, dass 90% der radioaktiv markierten sulfatierten Proteoglykane in pankreatischen Azinuszellen der Ratte mit Zymogengranulamembranen assoziiert vorliegen und 70% der markierten Proteoglykane sich durch Carbonatbehandlung und basischen pH-Wert von der Zymogengranulamembran entfernen lassen, während GP2 über seinen GPI-Anker mit der Zymogengranulamembran assoziiert bleibt. Sulfatierte Proteoglykane übernehmen vermutlich durch ihre negativen Ladungen eine wichtige Rolle bei der Verpackung basischer Proteine in sekretorische Granula (Matsumoto et al., 1995). Außerdem scheinen sie für eine normale Granulabildung notwendig zu sein (Forsberg und Kjellen, 2001). Teilweise üben sie auch eine Funktion in der Proteaseregulation nach der Exozytose aus (Pejler und Sadler, 1999). Neueste Studien, die Zymogengranulaproteine basierend auf einem Kombinationsansatz aus Liquid-Chromatographie und Massenspektrometrie identifizierten, konnten verschiedene Proteoglykane

innerhalb der Zymogengranulafraktion identifizieren, dazu gehören u.a. das Glypican-4-Heparansulfat-Proteoglykan, Proteoglykan-2 und das Syndecan 4 (Rindler et al., 2007).

Die submembranöse Matrix ist assoziiert mit Lipidmikrodomänen, sog. lipid rafts, die sich durch hohe Konzentrationen von Cholesterol und Sphingolipiden auszeichnen (Schmidt et al., 2001). Cholesteroldepletion und damit Zerstörung der Raft-Strukturen führt zu einer Inhibition der Granulabildung (Schmidt et al., 2001) sowie zu einer Fehlsortierung von Zymogenen in den konstitutiven Sekretionsweg (Kalus et al., 2002; Schmidt et al., 2001). *Knockout*-Mausmodelle, die sich durch die funktionelle Abwesenheit der beiden letzten Enzyme der Cholesterolsynthese auszeichnen, zeigen eine deutliche Reduktion in der Anzahl von sekretorischen Granula in Pankreas, Hypophyse und Nebenniere (Gondre-Lewis et al., 2006). Desweiteren zeigen viele der vorhandenen sekretorischen Granula im exokrinen Pankreas eine anormale Morphologie sowie eine reduzierte regulierte Sekretion, die durch Zugabe von exogenem Cholesterol wieder hergestellt werden kann. Der Einbau von Cholesterolvorläufern in künstliche Membranen führt verglichen mit Cholesterol zu einer erniedrigten Krümmungsstabilität sowie intrinsischen Wölbungen der Membranen, was eine essenzielle Rolle von Cholesterol bei der Granulagenese unterstreicht (Gondre-Lewis et al., 2006).

Die Membranproteine der Zymogengranula interagieren auf unterschiedliche Weise mit den Lipid-Mikrodomänen. Für GP2 ist eine Interaktion mit der Membran durch seinen GPI-Anker offensichtlich. ZG16p bindet vermutlich über seine Lektin-Domäne direkt an Glykoproteine der Lipid-Mikrodomänen oder indirekt durch eine Assoziation an die sulfatierten Proteoglykane (Kleene et al., 1999a). Syncollin interagiert mit der Granulamembran durch seine Wechselwirkungen mit Cholesterol, das in den Lipid-Mikrodomänen angereichert ist (Kalus et al., 2002), sowie durch eine Interaktion mit GP2. GP2 vermittelt vermutlich die Anbindung der Proteoglykanmatrix an die Membran, was durch Inhibierungsexperimente mit YW 3548 oder Mannosamin deutlich wurde. Der Einsatz dieser Substanzen führt zu einer Inhibierung der GPI-Anker-Synthese und nachfolgend zu Störungen des Proteintransports und der Granulabildung (Schmidt et al., 2001). Allerdings muss GP2 nicht allein für die Assoziation der Matrix mit der Membran verantwortlich sein. Diese Experimente

verdeutlichen aber, dass die Verankerung der Matrix an der Zymogengranulamembran für die Verpackung der sekretorischen Proteine von Bedeutung ist (Kleene et al., 1999a) und dass Lipid-Mikrodomänen und mit diesen assoziierte sulfatierte Proteoglykane der submembranösen Matrix zusammen dazu beitragen können, dass es zur Ausstülpung der Membran und anschließend zur Granulabildung im Trans-Golgi-Netzwerk kommt (Huttner und Zimmerberg, 2001). Die Matrix scheint also einerseits als submembranöses Netzwerk zur Anheftung der Zymogene durch elektrostatische Wechselwirkungen als eine Art Sortierungsplattform oder „Sortierungsrezeptor“ zu dienen, andererseits auch als mechanisches Hilfsmittel zur Ausbildung einer Membranauswölbung am TGN sowie der Stabilisierung der Granulastruktur. Dies könnte die mangelnde Beteiligung von *Coat*-Proteinen in der Granulabiogenese erklären.

Die Matrix wird während der Exozytose gemeinsam mit den sekretorischen Proteinaggregaten sezerniert (Freedman et al., 1998a; Freedman et al., 1998b); $^{35}\text{SO}_4$ -Experimente wiesen Proteoglykane nicht nur in den Zymogengranula sondern auch im Gangsystem des exokrinen Pankreas nach, so dass auch diese Matrixkomponenten vermutlich sezerniert werden (Tartakoff et al., 1975; Reggio und Palade, 1978). Durch die Erhöhung des pH-Wertes im Azinusbereich kommt es zur Dekondensation der Zymogenaggregate und über das Gangsystem des Pankreas zum Transport der Verdauungsenzyme in den Dünndarm. Einige mit der Matrix assoziierte Membranproteine der Zymogengranula werden ebenfalls sezerniert, dazu gehören Syncollin, ZG16p sowie GP2.

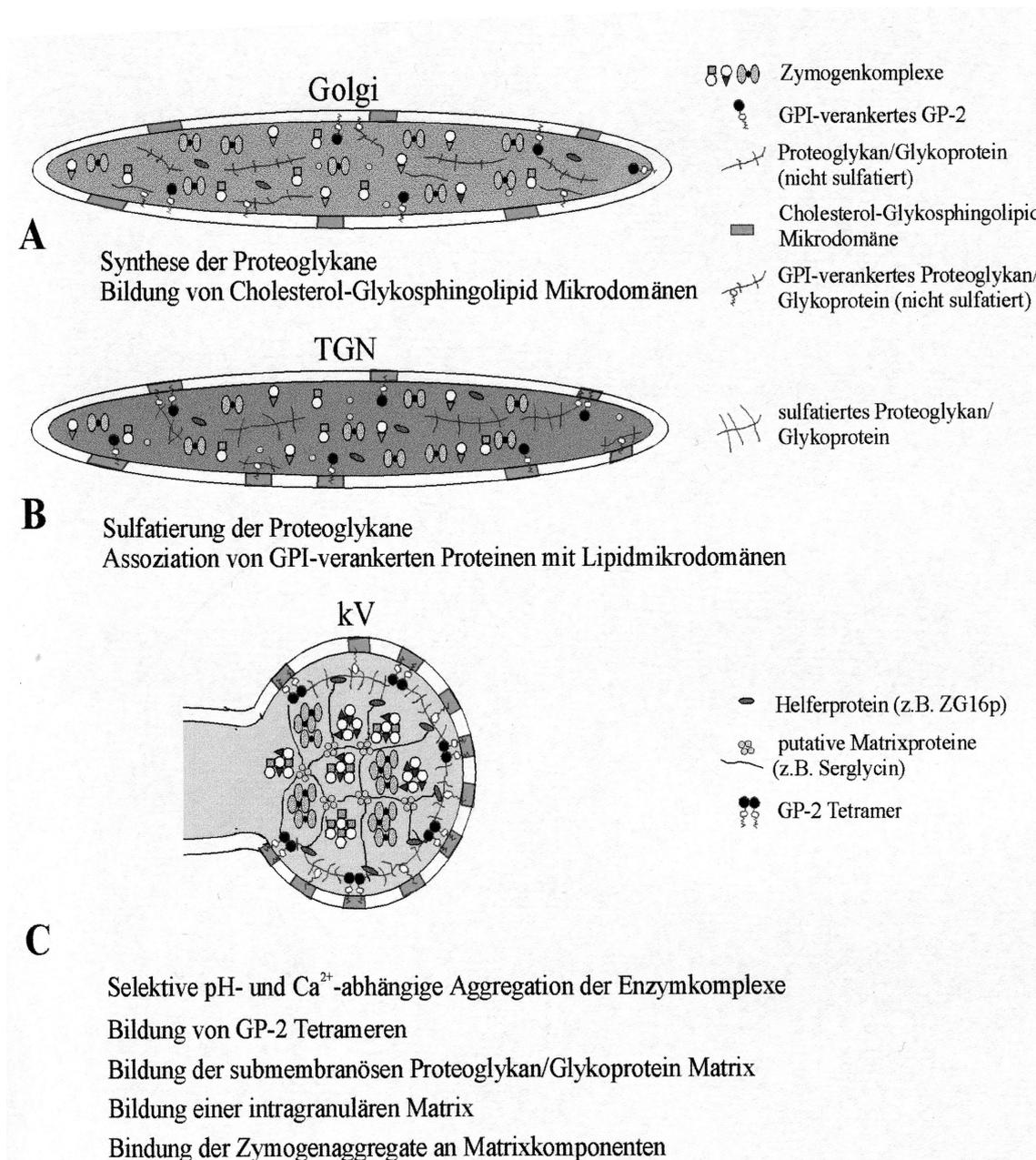


Abb. 1.5: Der Prozess der Zymogengranulabildung am Trans-Golgi-Netzwerk (entnommen aus Schmidt et al., 2001)

1.7 Zymogengranulamembran-assoziierte Proteine und ihre Funktion

In den letzten Jahren wurden verschiedene Proteine identifiziert, die mit den Lipidmikrodomänen und der submembranösen Matrix der Zymogengranula assoziiert sind (Wagner und Williams, 1994). Dazu gehören das Glykoprotein GP2, welches das Hauptprotein der Zymogengranulamembranen darstellt, GP3 (eine Lipase), das Lektin ZG16p, Syncollin sowie Syntaxin 3 und Synaptobrevin 2.

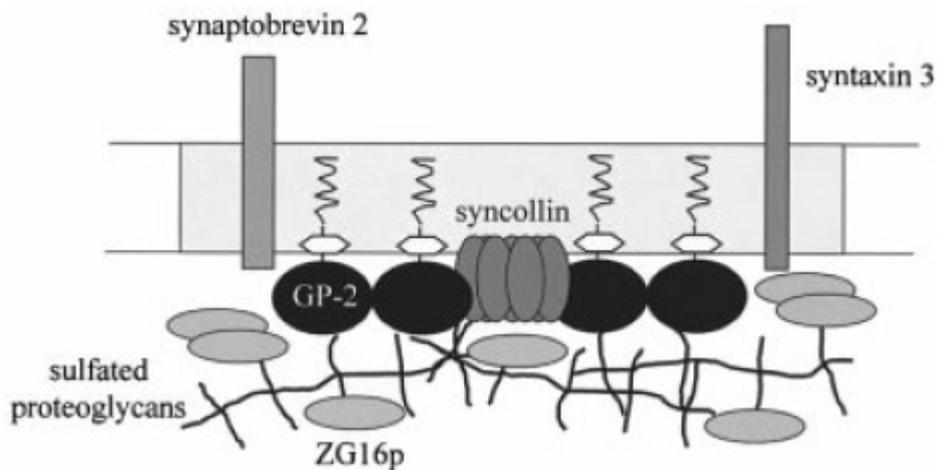


Abb. 1.6: Die submembranöse Matrix in Zymogengranula (entnommen aus Kalus et al., 2002).

GP2 wird über einen GPI-Anker an die Membran der Zymogengranula gebunden, existiert aber auch in löslicher Form (Fukuoka et al., 1991); verantwortlich sind hier vermutlich enzymatische Prozesse, durch die der GPI-Anker des Proteins abgespalten wird. Nach der Fusion der Granula mit der Plasmamembran wird GP2 durch Abspaltung des GPI-Ankers in das Lumen des Pankreasganges sezerniert (Freeman et al., 1998). Zunächst wurde angenommen, dass GP2 als Hauptprotein der Zymogengranulamembran als eine Art Sortase agiert, indem es als Rezeptor für die Proteinaggregate dient. Dies wurde aber von Dittie und Kern widerlegt (Dittie und Kern, 1992), da Zymogengranula sich im embryonalen Pankreas auch in Abwesenheit von GP2 bilden können. Auch GP2-knockout-Mäuse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Prozessierung oder Sekretion der Zymogene (Yu et al., 2004). Dies spricht gegen eine direkte Sortase-Funktion von GP2, schließt aber die Beteiligung an Granulabildung und apikaler Sortierung nicht aus (Schmidt et al., 2001; Yu et al. 2004). So spricht einiges für eine Beteiligung von GP2 bei der Regulation der Sekretion und der Signaltransduktion (Freedman et al., 1998). Darüberhinaus könnte GP2 nach der Sekretion weitere Funktionen ausüben, die potentiell protektiven Charakter haben. Anlass zu dieser Vermutung geben Studien über ein GP2-Homolog, das Uromodulin. Uromodulin wird im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife exprimiert und in den Urin sezerniert. Dieses Protein stellt das Hauptprotein im Urin dar und soll eine protektive Funktion ausüben (Scheele et al., 1994). Studien mit Uromodulin-

defizienten Mäusen zeigen eine anatomisch unauffällige Niere, Knockout-Tiere zeigen aber im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine signifikant verminderte Kreatinin-Clearance sowie verminderte mRNA-Level von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Renin (Bachmann et al., 2005). Vermutlich interagiert Uromodulin in der Henle-Schleife mit Transportproteinen, die u.a. für den Transport von Wasser und Ionen zuständig sind. Außerdem konkurriert das Protein mit Bakterien um Bindungsstellen an bestimmten urothelialen Zelloberflächenrezeptoren wie den Uroplakinen (Pak et al., 2001), wodurch ihm eine protektive Funktion zugeschrieben wird. Weiter scheint Uromodulin ein löslicher Rezeptor für Bakterien zu sein und trägt vermutlich zu einer effizienten Entfernung dieser Bakterien aus dem Urogenitaltrakt bei (Bates et al., 2004; Mo et al., 2004).

Ein weiteres membranassoziertes Protein der Zymogengranula ist das Syncollin (Edwardson et al., 1997). Ähnlich dem GP2 scheinen auch für das Syncollin zwei verschiedene Varianten zu existieren, eine im Granulalumen und eine membranassoziierte Form (Kalus et al., 2002). Als peripheres Membranprotein an der Innenseite der Zymogengranula lokalisiert bindet Syncollin in Form von Homooligomeren direkt an GP2 (Hodel et al., 2001; Kalus et al., 2002). Die Bindung von Syncollin an die Granulamembran wird aber nicht ausschließlich über GP2 vermittelt, sondern auch durch direkte Interaktion mit Cholesterol. Unter Cholesteroldepletion lässt sich Syncollin von der Granulamembran lösen, ferner lassen sich Cholesterol und Syncollin koimmunopräzipitieren (Hodel et al., 2001). Aufgrund seiner Neigung zur Bildung von Homooligomeren wird dem Syncollin die Fähigkeit zur Porenbildung zugeschrieben (Geisse et al., 2002). Dies bleibt nachzuweisen, würde dem Protein aber eine mögliche Rolle bei der Signaltransduktion und der Regulation von Granulagenese und Exozytose zuweisen. Weitere Hinweise darauf geben Studien, in denen Syncollin in endokrinen und neuroendokrinen Zellen exprimiert wurde (Wäsle et al., 2004; Hays et al., 2005). Hier konnte gezeigt werden, dass Syncollin die regulierte Sekretion inhibiert, eventuell durch die Permeabilisierung und dadurch die Reduktion sekretorischer Vesikel. Die Expressionslevel von Syncollin variieren mit dem Futterverhalten untersuchter Tiere, so dass eine Involvierung in die Sekretionsmechanismen von Verdauungsenzymen nahe liegt (Tan und Hooi, 2000). Syncollin-knockout-Mäuse zeigten gegenüber dem Wildtyp eine Hypertrophie des Pankreas sowie erhöhte Amylasewerte (Wäsle et al., 2005).

Die stimulierte Amylasefreisetzung aus Pankreasläppchen der Knockout-Tiere war gegenüber den Wildtypmäußen um 45% reduziert, außerdem verzögerte sich der Transport neu synthetisierter Zymogene. Dies lässt auf einen Defekt der pankreatischen Sekretion in Syncollin-Knockout-Tieren schließen. Desweiteren zeigten *Two-photon-imaging*-Verfahren eine um 50% reduzierte Anzahl exozytotischer Vorgänge im Vergleich von Knockout- und Wildtypmäusen, die anscheinend auf einen Verlust sekundärer Fusionen von Zymogengranula mit schon mit der Plasmamembran fusionierten Granula zurückzuführen ist. Diese Daten lassen den Schluß zu, dass Syncollin eine wichtige Rolle bei der Exozytose in den pankreatischen Azinuszellen spielt (Wäsle et al., 2005). Weitere Studien zeigten, dass Syncollin-Knockout-Tiere eher zur Ausprägung einer hormon-induzierten Pankreatitis (Antonin et al., 2002) neigen, außerdem ist die Zeitspanne, in der sich das Organ regeneriert, verlängert. Auch diese Beobachtungen weisen Syncollin eine mögliche Rolle bei der Regulation der Exozytose zu.

Neben dem Pankreas exprimieren auch Colon, Milz und Parotis (Tan und Hooi, 2000) sowie die Enterozyten des Dünndarms und neutrophile Granulozyten das Syncollin (Bach et al., 2006). Durch die Expression des Syncollins in Zellen des Immunsystems kommt ihm möglicherweise nicht nur eine Funktion bei der Exozytose sondern ebenfalls eine protektive Funktion zu, die auch im Pankreas und Dünndarm von Bedeutung bei der Abwehr von Pathogenen sein könnte.

ZG16p ist ein kleines basisches Lektin, das außer im Pankreas ebenfalls im Duodenum und Colon exprimiert wird (Cronshagen et al., 1994) und zur Dimerbildung neigt (Kleene et al., 1999; Kalus et al., 2002). Es ist mit der luminalen Seite der Zymogengranulamembran assoziiert, wobei die Assoziation mit der Zymogengranulamembran vermutlich über seine Lektin-Domäne durch die Anbindung an raft-assoziierte Glykoproteine oder Proteoglykane vermittelt wird (Schmidt et al., 2001). ZG16p könnte als Adapter zwischen der Membran und ihrer submembranösen Matrix und den kondensierten Proteinaggregaten agieren (Kleene et al., 1999), da es u.a. mit dem Proteoglykan Serglycin interagiert (Biederbick et al., 2003). Desweiteren wird dem Protein eine Rolle bei der Granulafusion mit der Plasmamembran und der Aktivierung von Ionenkanälen in der Membran der Zymogengranula zugeschrieben (Thevenod, 2002).

In der Granulamembran wurden bisher einige Ionenkanäle identifiziert, dazu gehören ein Ca^{2+} -aktivierbarer Anionenkanal, Cl^- - und K^+ -Kanäle, IP_3 -induzierbare Ca^{2+} -Kanäle sowie eine H^+ -ATPase, die für die Absenkung des pH-Werts im TGN verantwortlich sein soll (Thevenod, 2002). Auch finden sich Aquoporine in der Membran der Zymogengranula, sie gehören zu einer Familie kleiner, hydrophober integraler Membranproteine, die die Membran durchlässig machen für Wasser und kleinere Verbindungen (Cho et al., 2002; Sugiya und Matsuki, 2006). Speziell fand man Aquaporin 1 in der Membran der Zymogengranula, ihm kommt eine Rolle bei der Regulation des Granulavolumens und somit eine Beteiligung an der Exozytose der Zymogengranula zu.

Weitere Membranproteine wurden von Chen et al. (2006) mittels eines experimentellen Ansatzes einer Kombination aus 2D-Gelelektrophorese sowie 2D-Liquid-Chromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie identifiziert. Dabei wurden Zymogengranulamembranen verwendet, die zuvor mit Kaliumbromid und Carbonat gewaschen worden waren und deshalb nur integrale Membranproteine enthalten sollten. Trotzdem finden sich in der Analyse dieser Proteinfraction sowohl integrale Membranproteine (Protonenpumpen und spannungsabhängige Ionenkanäle) als auch andere Zymogengranulaproteine. Dazu gehören auch einige als Inhaltskomponenten der Zymogengranula bekannte Proteine (u.a. Amylase sowie Enzyme des Lipidstoffwechsels) sowie periphere Membranproteine der submembranösen Matrix (z.B. Syncollin) und andere. Möglicherweise zeugt dies von einer starken Anbindung der Inhalts- und Matrixkomponenten an die Zymogengranulamembran. Auch Berkane et al. (2007) identifizierten verschiedene Zymogengranulamembran-assoziierte Proteine über ihre Assoziation zu Lipid-Mikrodomänen. Auch hier wurden massenspektrometrische Methoden sowie eine Kombination aus Liquid-Chromatographie und Massenspektrometrie zur Analyse verwendet, wodurch einige Daten von Chen et al. (2006) bestätigt wurden. Außerdem publizierten Rindler et al. (2007) basierend auf einem Kombinationsansatz aus Liquid-Chromatographie und Tandemmassenspektrometrie Zymogengranulaproteine der verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen. Dazu gehören u.a. GTP-bindende Proteine, Transmembranproteine, Ionenkanäle und

Transportproteine. Sie beschreiben einige Proteine wie die Phosphodiesterase und die Carboxypeptidase D aufgrund von Immunfluoreszenzstudien als neu identifizierte Membranproteine der Zymogengranula.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fraktion der peripheren Membranproteine der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas näher untersucht. Dabei wurden zwei Proteine identifiziert und näher charakterisiert, die zuvor noch nicht als Zymogengranula-assoziierte Proteine beschrieben wurden.

1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Bisher sind nur sehr wenige Membranproteine der Zymogengranula des exokrinen Pankreas identifiziert und molekular charakterisiert worden (Wagner und Williams, 1994). Den peripheren Komponenten, insbesondere an der Innenseite der Granulamembran (Granulamatrix) kommt vermutlich eine entscheidende Bedeutung bei der Sortierung und Verpackung der reguliert sezernierten Proteine in Zymogengranula zu. Fehler bei der korrekten Sortierung und Verpackung können zu pathophysiologischen Veränderungen des Pankreas führen (z. B. bei einer akuten Pankreatitis; Weber und Adler, 2001). Die weitere Identifizierung und molekulare Charakterisierung dieser Komponenten ist deshalb sowohl von zellbiologischer als auch klinischer Relevanz.

1. Anreicherung und Identifizierung peripherer Membranproteine der Zymogengranula des exokrinen Pankreas der Ratte

Ziel im ersten Teil der vorliegenden Arbeit war es, die peripheren Membranproteine der Zymogengranula (Proteine der sog. *Wash*-Fraktion) des exokrinen Pankreas der Ratte anzureichern und zu identifizieren. Dazu wurde ein experimenteller Ansatz gewählt und von mir etabliert, der Granulasubfraktionierung, isoelektrische Fokussierung, 2D-gelelektrophoretische Methoden sowie MALDI-MS- und MALDI-MSMS-Analysen kombinierte.

2. Verifizierung der Lokalisation und Charakterisierung ausgewählter peripherer Granulaproteine

Ziel im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit war es, die Lokalisation ausgewählter, identifizierter Proteine durch zell- und molekularbiologische

Methoden zu verifizieren und weiter zu charakterisieren, um Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten.

2. Material

2.1 Geräte

Zentrifugen

- Avanti Centrifuge J-20 XP mit den Rotoren JA-25.50 und JLA-16.250 (Beckman Coulter, Fullerton/USA)
- Tischzentrifuge Biofuge pico/ fresco (Heraeus Instruments, Hanau)
- Tischzentrifuge BHG Hermle Z230 (Hermle Labortechnik, Wehingen)
- Tischultrazentrifuge Optima™ TL mit Rotor TLA 120.1 (Beckman, München)
- Tischkühlzentrifuge Modell RT 6000D mit den Rotoren A500 und H1000B (Dupont Company, Wilmington, Delaware, USA)
- Ultrazentrifuge Modell Sorvall Combi Plus mit dem Rotor SW50.1 (Dupont Company, Wilmington, Delaware, USA)

Schüttler und Inkubatoren

- Brutschrank für Bakterienkulturen (Memmert, Schwabach)
- Schüttelinkubator für Bakterienkulturen innova 4300 (New Brunswick Scientific, Edison/USA)
- Brutschrank IG150 für Zellkultur (Jouan, Unterhachingen)
- Wippe (Eigenbau, Werkstatt der Universität Marburg)
- Überkopfschüttler Modell REAX2 (Heidolph, Heidelberg)
- Horizontalschüttler Unimax 1010 (Heidolph, Heidelberg)
- Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Optische Geräte

- Spektralphotometer Cadas 100 (DrLange, Düsseldorf)
- Mikroskop BX61 (Olympus, Hamburg)
- Kamera F-View Soft Imaging System (Olympus, Hamburg)
- Mikroskop Wilovert S (Helmut Hund, Wetzlar)
- Chemilux Imager (Intas)
- Photometer Ultrospec 100 pro (GE Healthcare, München)
- Elektronenmikroskop EM 109 (Zeiss)

Elektrophorese- und Blotting-Aparaturen, Netzgeräte

- Minigelapparatur für PAGE inklusive Zubehör (Keutz, Reiskirchen)
- Hoefer SE 600 Ruby standard duel cooled gel electrophoresis unit inklusive Zubehör (Glasplatten, Gießstand, Sandwichgel-Platten, Dummy-Platte) (GE Healthcare, München)
- Trans-Blot SD semi-dry Transfer Cell (BioRad, München)

- Flachbettkammern für Agarosegele Modelle B2 und B1A (Owl Separation Systems, Portsmouth/USA)
- Electrophoresis Power Supply EPS 600 (Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Electrophoresis Power Supply (Gibco BRL, Eggenstein)

Heizblöcke

- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
- Labtherm (Liebisch, Bielefeld)
- Ori-Block OB-1 (Techne, Jahnsdorf)

Zubehör für die isoelektrische Fokussierung

- Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (GE Healthcare, München)
- Stripholder 11cm (GE Healthcare, München)
- Stripholder 7cm (GE Healthcare, München)
- IPG DryStrips 7cm, pH 3-10 (GE Healthcare, München)
- IPG DryStrips 11cm, pH 3-11 (GE Healthcare, München)
- IPG Buffer pH 3-11NL (GE Healthcare, München)
- DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare, München)
- IPGphor Strip Holder Cleaning Solution (GE Healthcare, München)

Zubehör für die MALDI-TOF Massenspektrometrie

- Bruker Daltonics UltraflexTM Massenspektrometer und entsprechende Software (Bruker Daltonics, Rheinstetten)
- MTP 384 massive Target T (Bruker Daltonics, Rheinstetten)
- ZipTip C₁₈(standard bed) pipette tips for Sample preparation (Millipore, Eschborn)
- Trypsin Gold (Promega, Mannheim)
- Matrix α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (Bruker Daltonics, Rheinstetten)
- Peptidmix II (Bruker Daltonics, Rheinstetten)

Sonstiges

- Wasserbad/Kühlung RM3 Thermo Temp (MGW Lauda)
- Progene Thermal Cycler (Techne, Burlington/USA)
- UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen)
- Magnetrührer Ikamag Reo (Ika Werke, Staufen)
- CyberScan pH 510 (Eutech Instruments, Nijkerk/NL)
- Mikrowelle R-5150 (Sharp, Hamburg)
- Präzisionswaage APX-1502 (Denver Instrument, Göttingen)
- Analysewaage SBC 22 (ScalTec Instrument, Göttingen)
- Reinstwasser-System Clear (SG Wasseraufbereitung und Regeneration, Hamburg)
- EasyjecT Plus (peqLab Biotechnologie, Erlangen)

- Wasserbad (GFL, Burgwedel)
- Autoklav (Fritz Gössner, Hamburg)
- Pipettierhilfe Modell Vacu-Petus (Bender & Hobein, Zürich/Schweiz)
- Sterilbank für Zellkultur Antair BSK
- Sterilbank für Bakterienkultur FASTER BHA-48
- pH-Meter Modell pH 522 (WTW, Weilheim)
- Mörser und Pistill
- Speed-Vac-Konzentrator (Savant Instruments Inc., Farmingdale)
- Thomas-Homogenisator mit Getriebemotor (Fa. H.A.Thomas, Philadelphia, Fa. Heidolph, Heidelberg)
- Folienschweißgerät Vacupack 2 Plus Typ 381 (Krupps)
- Absaugpumpe (KMF Neuberger Laboport)
- Cryostat Leitz 1720 Digital
- X-Ray Filmkassette 24 x 30cm (Rego)
- Zentrifugenröhrchen 50ml (Nalgene)
- Zentrifugenbecher 250ml (Beckman, München)

2.2 Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid – RotiphoreseGel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Ammoniumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumcarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Aqua injectabilia	Braun Melsungen
BactoAgar	Difco, Detroit/USA
Bacto-Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
BactoTrypton	MP Biomedicals, Illkirch/Frankreich
Beem-Kapseln	Plano, Wetzlar
Bleicitrat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CHAPS	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Dextrose	Merck, Darmstadt
DMF	Serva, Heidelberg

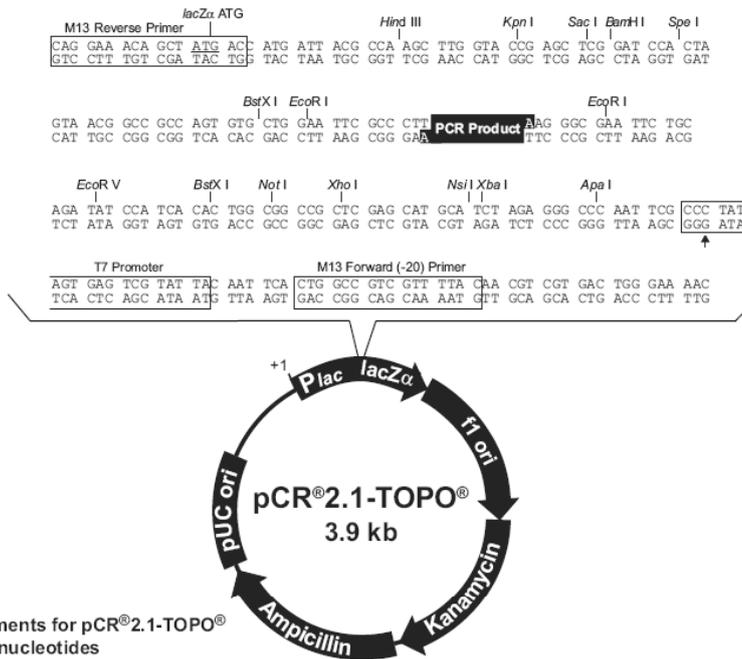
<u>Produkt</u>	<u>Bezugsquelle</u>
DMSO	Serva, Heidelberg
Drystrip Cover Fluid Plusone	Pharmacia, Freiburg
DTT, Dithiothreitol high purity	Gerbu, Gaiberg
EDTA, Ethylendiamintetraacetic Säure/Salz	Sigma-Aldrich, St Luis/USA
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Foetal Bovine Serum Gold (FCS)	PAA Laboratories, Pasching/Österreich
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Halotan	Merck, Darmstadt
HCL	Merck, Darmstadt
HEPES	Serva, Heidelberg
H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St Luis/USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumcarbonat	Sigma-Aldrich, St. Luis/USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumferrocyanid	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
K4M	Polyscience Ltd., Eppenheim
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
MES	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylsäure	Serva, Heidelberg
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

<u>Produkt</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Natriumtartrat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PEI	Sigma-Aldrich, St Luis/USA
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Rutheniumrot	M. Isslinger, Univ. Heidelberg
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS, Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, St Luis/USA
Silbernitrat	Applichem, Darmstadt
Tanninsäure	Merck, Darmstadt
Temed	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Triflouressigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Uranylacetat	Serva, Heidelberg
Urea plus one	GE Healthcare, München

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (St. Louis/ USA), Serva (Heidelberg) oder Plano (Wetzlar) bezogen.

2.3 Plasmide

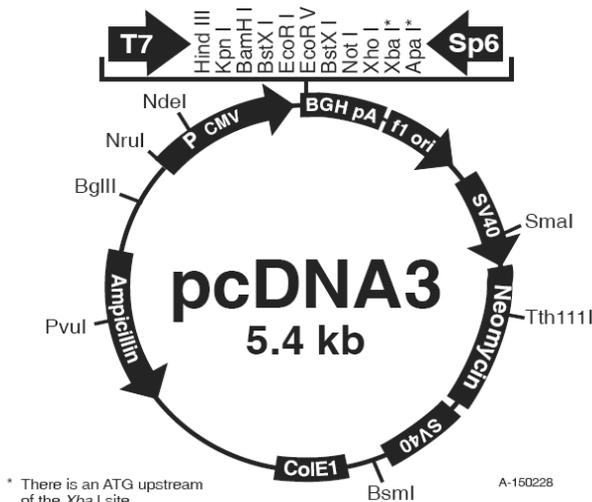
pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

- LacZ_α fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe)



* There is an ATG upstream of the Xba I site.

Comments for pcDNA3:

- 5446 nucleotides
- CMV promoter: bases 209-863
- T7 promoter: bases 864-882
- Polylinker: bases 889-994
- Sp6 promoter: bases 999-1016
- BGH poly A: bases 1018-1249
- SV40 promoter: bases 1790-2115
- SV40 origin of replication: bases 1984-2069
- Neomycin ORF: bases 2151-2945
- SV40 poly A: bases 3000-3372
- ColE1 origin: bases 3632-4305
- Ampicillin ORF: bases 4450-5310

2.4 Antibiotika

- § Ampicillin 50mg/ml (Boeringer, Mannheim)
- § Kanamycin 25mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA)
- § Penicillin/Streptomycin 100x (10mg/ml) (PAA Laboratories, Pasching/Österreich)

2.5 Primer und Nukleotidsequenzen

Chymase up (PCR-Kontrollprimer)	5`gtttctgtgacccgccaatt 3`
Chymase down (PCR-Kontrollprimer)	5`ttaatccagggcacatatggg 3`
GAPDH 1	5`acgacccttcattgacc 3`
GAPDH 2	5`ccagtgagctcccgttcagc 3`
RMCP-1 up/ BamHI (Klonierungsprimer)	5`tggatccatgcaggcctactattcc 3`
RMCP-1 down/ EcoRI (Klonierungsprimer)	5`tgaattcctagctggagactctgac 3`
Amylase pcr up (PCR-Kontrollprimer)	5`gccttctggatctgcactc 3`
Amylase pcr down (PCR-Kontrollprimer)	5`agtgcttgacaaagccagt 3`
PPIB up (PCR-Kontrollprimer)	5`tccgtgtcttcttttctgct 3`
PPIB down (PCR-Kontrollprimer)	5`gttctccacctccgtacca 3`
Tryptase β up (PCR-Kontrollprimer)	5`gaataaggctgacccaaca 3`
Tryptase β down (PCR-Kontrollprimer)	5`ctggggacatagcggtaga 3`

Die Primer wurden von der Firma MWG–Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Sie wurden in der PCR zur Expressionskontrolle verwendet, RMCP-1-Primer wurden zur Klonierung der Chymase (*Rat mast cell protease 1*) eingesetzt. Die Bindungsstellen der Primer sind nachfolgend in den jeweiligen Sequenzen markiert.

Nukleotidsequenzen und Bindungsstellen der Primer (rot: Startcodon, blau: Stoppcodon, orange: up-Primer, grün: down-Primer)

Nukleotidequenz RMCP-1 (rat mast cell protease 1/ Chymase precursor) Quelle: Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov) U67915 (unterstrichen: Klonierungsprimer für RMCP-1)

```

1 tccaggctgc accactggca acaaaaaatg caggccctac tattcctgat ggctcttctc
61 ttgccttctg gagctggagc tgaggagatt atcgggtggtg tggagtctag accacactcc
121 cgtccttaca tggccatct ggagatcacc actgagagag gttacaaggc cacctgtggt
181 gggttcttg tgaccgcca atttgtgatg actgccgcac actgtaaggg aagagaaacc
241 actgttacc tggaggtca tgatgtgagc aagacagaat ccacacagca gaagataaaa
301 gtcgaaaaac aaattgttca cccaaattat aacttctatt ccaatctcca tgatatcatg
361 ttactgaagc tcaaaagaa agccaagggtg actcctgctg tggatgtaat tccctgcct
421 cagccctctg actttctcaa gcttggaag atgtgccggg cagctggctg ggggcaact
481 ggagtgacaa aaccaacctc aaataactg agggaggtga aacagagaat catggataaa
541 gaggcctgta aaaactattt tcattataac tataactcc aggtctgcgt gggcagtcca

```

601 agaaagataa gatcagcata taaggagac tccggaggac cactagtgtg tgctggggtg
 661 gcccatggtta ttgtatctta tggacgtgga gatgcaaagc ccctgcagt cttcacccga
 721 atctcccat atgtgccctg gattaataa gtcataaagg gcaaggatct gaccagcctg
 781 agtctgcacg agtcagagtc tccaagctag agaactctt tgataccct tgggatcaac
 841 aaagcctgtc ccagcctgt cacctgctt tccatacct gtcccagcc tgcccccaac
 901 ttgccccag cccatccca gctgtcca agcctgtccc taggatgatc tacaataac
 961 acaagtctgt ggtgatggt tgtccctgt aaagcactc aataagaca taacctca

Länge des amplifizierten Fragments unter Verwendung der PCR-Kontrollprimer: **564bp**

Länge des amplifizierten Fragments unter Verwendung der Klonierungsprimer: **783bp**

Nukleotidsequenz Amylase 2 (pankreatisch), Ratte

Quelle: Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov) NM_031502

1 acaactcaa agcaaatgaa gttcgttctg ctgcttccc tcattgggtt ctgctgggct
 61 caatatgacc cacacactgc gtagggagg actgctattg tccacctgtt cgagtggcgc
 121 tgggctgata ttgccaagga atgtgagcgg tacttagcac ctaagggtt tggaggggtg
 181 caggctctc cacccaatga aaatattata attaataatc catcaaggcc ttggtgggaa
 241 agatatcaac caatcagcta caaaattgc tcaaggctg gaaatgaaa tgaattcaaa
 301 gacatgtgta cgagggtcaa caatgttggg gtccggattt atgtggatgc tgcattaat
 361 cacatgtgtg gctcgggcaa tagtcagga acacacagta cctgtggaag ttacttcaat
 421 cctaataaca gggaattctc agcagtcca tactctgctt ggtatttaa cgataataa
 481 tgaatggag aaattaata ctacaatgat gccaatcagg tcagaaattg tcgtctgtct
 541 ggcttctgg atctgcact cgataaagat tatgtcga ccaaggtggc tgactatag
 601 aacaatctca ttgacattgg ttagcaggg ttcagactg atgtgctaa gcacatgtg
 661 cctggagaca taaaggcagt ttggacaaa ctacataatc taaatacaaa atggttctc
 721 caaggaagca gaccttcat ttccaagag gtcattgatc ttggtgtgta agcaattaa
 781 gtagtgagt acttggaaa tggccgctg acagaattca agtatggtgc aaaactggc
 841 acagttatc gcaaatggaa tggagagaag atgtctact taaagaactg gggagaaggt
 901 tggggtttg tgctactga cagagccctt gtgttggg acaacatga caatcagca
 961 ggacatggtg ctggaggagc atccatctg acattctggg atgctagaat gtataaatg
 1021 gcagttggat ttatgtggc tcatcctat ggattacca gagtaatgc aagtaccga
 1081 aggacaagaa attccagaa tggaaaagat gtgaatgact ggattggacc acctaatac
 1141 aatggagtaa caaaagaagt gaccattaat ccagacacta ctgtggcaa tgactgggtc
 1201 tgtgaacatc gatggcgtca aatcaggaac atggttcct tcaggaatgt agtcaacggt
 1261 cagcctttg caaactggtg ggataatggc agcaaccaag tggcttttag cagaggaaac
 1321 agaggattca ttgtcttaa caatgatgac tgggcttgt caagcactct acagactgt
 1381 ctctctgctg gcacactg tgatgcatt tcaggagata aagtcaatgg caattgcact
 1441 ggacttaaag taaatgttg cagtatggc aaagctact tctctattag taactctgt
 1501 gaagacccat ctattgcaat ccattccgac tcaaagttg aagagtcaaa taaagagat
 1561 ttagattcag cacc

Länge des durch PCR amplifizierten Fragments: **827bp**

Nukleotidsequenz Peptidylprolyl-isomerase B (PIIB), Ratte**Quelle: Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov) BC061971**

1 cgtgaccgct cttgctgctg ccggtggatg ctgcgctct cggagcgcaa tatgaaggtg
61 ctcttcgccc cgcacctcat cgtgggctcc gttgtctcc tttgctgcc tggaccctcc
121 gtggccaacg ataagaagaa gggacctaaa gtcacagtca aggtatactt tgattccaa
181 attggagacg aacctgtagg acgagtgacc tttggactct ttgaaagac tgttccaaaa
241 acagtggata atttgtagc ctagctaca ggagagaaag gatttgcta taagaacagc
301 aagttccatc gtgcatcaa ggactcatg atccagggtg gagactcac caggggagat
361 ggcacaggag gaaagagcat ctatggtgag cgctcccag atgagaactt caagctgaag
421 cactatgggc ccgatgggt gagcatggcc aatgcaggca aagacaccaa tggctcccag
481 ttctcataa ctacagtcaa gacctcctgg ctagacggca agcacgtgtt ttcggcaaa
541 gttctggaag gcatggatg ggtacggaag gttgagaaca ccaagacgga cagccgggac
601 aagcccctga aggatgtgat cattgtagac tgtggcaaga tcgaagtga gaaaccctt
661 gccattgcca aggagtagag agagcctcgg ggacctcatc cctctaaaca gctgtctgtg
721 cgggtctgt cgattccctc acaggtgaaa gcagccagtc acaaggctct gtgcggctct
781 ggctccagt ctccatccg acggggtggc cacaccctc acattccaca ggcctgatt
841 ttatataaaa ctctaccaa tgctgatcaa taaagaagtg ggtttttta taaaaaaaaa
901 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
961 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Länge des durch PCR amplifizierten Fragments: **492bp****Nukleotidsequenz Tryptase α/β -1, Ratte****Quelle: Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov) NM_019322**

1 tagagaagat caaagacagc tgaggatgac tctcccagag cctccgacat ctgagtgtg
61 cgctgaagca gtagtgccaa gccactagag acctcaagct cctggaatgg acctaccctc
121 ctgctccctg gttctggct tattctgac accacaacct gttggccta gccagcctc
181 acctccaacc gggcccgtac tactactgt gtccgatg tgaagctgct gctgtgaca
241 ctgctctcc tgtccagct ggtgcacgca gccctagtc tagctatgcc acgagagggc
301 attgtggggg gacaggaggc gtctgggaac aagtggcctt ggcaggtgag cctgctgtc
361 aatgacacct actggatgca tttctcggc ggctccctca tccaccaca gtgggtgctc
421 actgcggcac actgtgtggg accgaataag gctgaccca acaagctcag ggtacagctt
481 cgtaagcagt atctctatta tcatgaccac ctgctgaccg tgagccagat catctcac
541 cctgacttct acatgcccc ggatggggca gacattgcc tgctgaaact cactaacct
601 gtgaacatta ccagcaatgt ccactgtc tcctgcctc ccgctcaga gacctcccc
661 tcaggacat tgtgctgggt gacaggctgg ggtaacatca acaatgatg aagcctgcca
721 ccgccattc ctttgagga ggtgcaagt cccattgtg aaaaccgct ctgtgactg
781 aagatcaca aaggtctcaa cacaggtgac aacgtccaca ttgtccgta cgacatgctg
841 tgtgctgga atgaaggaca tgactctgc cagggcgact ccggaggacc tctgtctgc

901 aaggttgaag atacctggct gcaggcaggt gttgtgagct ggggtgaggg ctgcgcacag
961 cccaacaggc ctggcatcta cactcgggtc acctattacc tggactggat ctaccgctat
1021 gtccccaagt actctgagt tgcattcagg gtagacctctg ttgttccaa catgctgctt
1081 tctgcctccc tgcttcctg ctcccagcc tgagcccaa ctctgctcta cctgagcccc
1141 tgaccacttg tgcctccc gctcaggtag ccacactgta caggcagcca ctctgctatg
1201 gctcaataaa atgcataaa gcaaaaaaaaa aaaaa

Länge des durch PCR amplifizierten Fragments: **586bp**

2.6 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

- § RNeasy Protect Mini Kit (QIAgen, Hilden)
- § Reverse Transkriptase MMLV mit entsprechendem 10x Reaktionspuffer (Stratagene, La Jolla/USA)
- § Oligo-dT-Primer (Stratagene, La Jolla/USA)
- § RNase-Block (40U/μl) (Stratagene, La Jolla/USA)
- § dNTPs, je 100nM (Invitrogen, Karlsruhe)
- § Taq-Polymerase (5U/μl) mit entsprechenden 10x Reaktionspuffer (New England Biolabs, Frankfurt)
- § QIAquick Gelextraction Kit (QIAgen, Hilden)
- § TOPO TA Cloning (Invitrogen, Karlsruhe)
- § Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot)
- § Orange Loading Dye Solution, 6x (Fermentas, St. Leon-Rot)
- § T4-Ligase (400U/μl) mit entsprechenden 10x Reaktionspuffer (New England Biolabs, Frankfurt)
- § Restriktionsendonukleasen BamHI (10U/μl) und EcoRI (10U/μl) (Fermentas, St. Leon-Rot)
- § QIAprep Miniprep Kit (QIAgen, Hilden)
- § Jetstar Plasmid Purification System (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen)

2.7 Antikörper**Primärantikörper gegen Proteine aus der Ratte (Ausnahme Trypsase β -1)**

Name	Bezugsquelle	Verdünnung im Westernblot	Verdünnung in der Immunfluoreszenz	Verdünnung in Histologie und EM
Maus-anti-Syncollin 87.1	Dr. M. Edwardson, Cambridge, UK	1:1000		
Kaninchen-anti-ZG16 N1d1	Cronshagen, Inst. für Zytobiologie und Zytopathologie, Marburg, 1994	1:1000		
Maus-anti-GP2 4AS9	A. Lowe, Stanford University, USA	1:1000		
Kaninchen-anti-Carboxypeptidase	Rockland Immunochemicals, USA	1:2000	1:800	1:1000 (Histologie)
Schaf-anti-Chymotrypsinogen	Eigene Herstellung, Inst. für Zytobiologie und Zytopathologie		1:400	
Maus-anti-Tubulin DM1A	Sigma-Aldrich, St.Louis/USA	1:1000		
Kaninchen-anti-Amylase A8273	Sigma-Aldrich, St.Louis/USA	1:000		
Kaninchen-anti-Matrix SA2425	Eigene Herstellung, Inst. für Zytobiologie und Zytopathologie	1:1500		
Kaninchen-anti-Cyclophilin B (Peptidyl-Prolyl-Isomerase B, PPIB)	Abcam, UK	1:000	1:600	
Ziege-anti-Maus- Trypsase β -1	R&D Systems	1:1000		
Ziege-anti-Chymase (RMCP1)	LB Schwartz, Dep. Of Internal Medicine, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA	1:000	1:100	1:100 (EM)
Schaf-anti-RMCP1	Hugh R. Miller, University of Edinburgh, UK			1:100 in der Histologie
Kaninchen-anti-RNase A	Sigma-Aldrich, St.Louis/USA	1:1000		
Kaninchen-anti-PDI R-707	HD Söling, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen	1:2000	1:500	
Maus-anti-BiP	BD Diagnostics	1:1000		
Huhn-anti-CEL (4S-Ig)	Eurogentec, Belgien	1:70		

Sekundärantikörper

Name	Bezugsquelle	Verdünnung im Westernblot	Verdünnung in der Immunfluoreszenz	Verdünnung in Histologie und Elektronenmikroskopie
Esel-anti-Schaf-IgG-TRITC	Dianova, Heidelberg		1:400	
Esel-anti-Ziege-IgG-TRITC	Dianova, Heidelberg		1:100	1:100
Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488	MoBiTec, Göttingen		1:500	1:600
Ziege-anti-Maus-IgG-HRP	Bio Rad, Richmond/USA	1:2000		
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP	Bio Rad, Richmond/USA	1:2000		
Esel-anti-Ziege-IgG-HRP	Dianova, Heidelberg	1:2000		
Kaninchen-anti-Huhn-IgG-HRP	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA	1:2000		
Protein-A-Gold 15nm und 10nm	Plano, Wetzlar	1:60 bzw. 1:70		EM
Hoechst-Farbstoff	Polyscience, Inc. Warrington, PA			1:2000 in der Histologie

2.8 Biochemische Reagenzien und Kits

- Proteoextract Protein Precipitation Kit (Calbiochem, Bad Soden)
- Proteaseinhibitor Foy-305 (Sanol-Schwarz, Monheim)
- Proteaseinhibitor Trasylol (Bayer, Leverkusen)
- Proteaseinhibitor PMSF (Merck, Darmstadt)
- PNGase F (New England Biolabs, Frankfurt)
- Benchmark Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
- Rainbow Molecular Weight Marker Full Range (GE Healthcare, München)
- Biorad Proteinassay (Bio Rad, München)
- Glycoprofile III Fluorescent Glycoprotein Detection Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA)
- Multiplexed Proteomics Glycoprotein Gel Stain Kit (Molecular Probes, Karlsruhe)
- DIG Glycan Detection Kit (Roche, Mannheim)
- Coomassie Ready-to-use (Bio Rad, München)
- ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System (GE Healthcare, München)

2.9 Organismen

- Wistar Ratten männlich, 200g (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld)
- Eukaryontische Zelllinie AR42J (ATCC, Rockville/USA)
- Eukaryontische Zelllinie COS7-Zellen (ATCC, Rockville/USA)
- DH5α E.coli Bakterien (Gibco BRL, Karlsruhe)

2.10 Verbrauchsmaterial

- Protan Nitrocellulose Transfer Membran (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl (Greiner bio-one, Kremsmünster/Österreich)
- Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml (Eppendorf, Hamburg)
- Spritze BD Plastipak 1ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA)
- Kanüle BD Microlance 3, 20G 1 ½ `` Nr.1, 0,5 x 40mm (Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA)
- Hyperfilm ECL (GE Healthcare, München)
- Whatmanpapier (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Dialyseschlauch MWCO 10 kDa (Roth, Karlsruhe)
- 15ml Reaktionsgefäße (Greiner bio-one, Kremsmünster/Österreich)
- 50ml Reaktionsgefäße (Greiner bio-one, Kremsmünster/Österreich)
- Disposable Scalpel No.22 (Feather)
- Deckgläser, 18mm (Menzel-Gläser, Braunschweig)
- Objektträger, 76x26mm (Menzel-Gläser, Braunschweig)
- Zellkulturschalen 6cm und 10cm (Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA)
- Faltenfilter 320mm (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Sterilfilter FP Point 2_S, 0,2µm (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Sterilpipetten, 5ml und 10ml (Greiner bio-one, Kremsmünster/Österreich)
- Bakterienröhrchen, 14ml (Greiner bio-one, Kremsmünster/Österreich)
- Elektroporationsküvetten, 4mm gap (Molecular Bio Products, San Diego/USA)

2.11 Zellkultur

- DMEM high Glucose (PAA Laboratories, Pasching/Österreich)
- Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Pasching/Österreich)
- Dexamethason (Hexal, Holzkirchen)
- PEI (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA)
- Foetal Bovine Serum Gold (FCS) (PAA Laboratories, Pasching/Österreich)
- Penicillin/Streptomycin 100x (PAA Laboratories, Pasching/Österreich)
- Matrigel (eigene Herstellung)

2.12 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Homopuffer

250mM Saccharose

5mM MES, pH 6,25

0,1mM MgSO₄

0,25% Trasylol

0,01mM FOY-305

0,1mM PMSF

Rehydratisierungspuffer für Immobiline DryStrips

12g Harnstoff (Urea)

0,5g CHAPS

125µl IPG Puffer (gleicher pH-Bereich wie verwendeter IPG DryStrip)

50µl 1% Bromphenolblaulösung

ad 25ml dH₂O

vor Gebrauch 4µl 1M DTT pro 200µl Puffer zusetzen

SDS-Equilibrationpuffer für Immobiline DryStrips

72,1g Harnstoff (Urea)

10ml 1,5M Tris-HCL pH 8,8

69ml Glycerol (87%)

4g SDS

400µl 1% Bromphenolblaulösung

ad 200ml dH₂O

Für den ersten Equilibrierungsschritt werden dem Puffer 75mg DTT pro 7,5ml Puffer zugesetzt, für den zweiten Equilibrierungsschritt 187,5mg Iodacetamid pro 7,5ml Puffer.

Sealing-Agarose für Immobiline DryStrips

25mM Tris-Base

192mM Glycin

0,1% (w/v) SDS

0,5% Agarose in dem Puffer lösen und 0,0002% Bromphenolblau zusetzen. In 2ml-Aliquots lagern und vor Gebrauch bei 100°C im Heizblock aufkochen.

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris/Base

190 mM Glycin

0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

4 x SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970)

160 mM Tris/HCl, pH 6,8
140 mM SDS
20% (v/v) Glycerin
0,1% (w/v) Bromphenolblau
40 mg/ml Dithioerythriol (DTT)
5% (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch)

Sammelgel für SDS-PAGE-Minigele

1,66ml 30% Polyacrylamidlösung
1,25ml 1M Tris-HCl pH 6,8
50 μ l 20% (w/v) SDS
6,85ml dH₂O
10 μ l TEMED
80 μ l 10% (w/v) APS

12,5% Trenngel für SDS-PAGE (10ml)

4,17ml 30% Polyacrylamidlösung
1,86ml 2M Tris.HCl pH 8,8
50 μ l 20% (w/v) SDS
3,89ml dH₂O
5 μ l TEMED
30 μ l 10% (w/v) APS

Für große 2D-Gele wurden 40ml Lösung pro Gel angesetzt, für Minigele 10ml pro Gel.

1x PBS (phosphat buffered saline)

140 mM NaCl
2,5 mM KCl
6,5 mM Na₂HPO₄
1,5 mM K₂HPO₄
pH 7,35

Blotto

5% Blotto (Milchpulver) in 1x PBS

Blotpuffer

48 mM Tris/HCl
39 mM Glycin
0,4% (w/v) SDS
20% (v/v) Methanol

Elektroporationspuffer HBS (hepes buffered saline)

0,5 g Hepes

0,8 g NaCl

0,037 g KCl

0,01 g Na₂HPO₄

0,108 g Dextrose

ad 100ml ddH₂O, pH 7,15

DMEM-High-Glucose-Medium für AR42J- und COS7-Zellen

plus

10% (v/v) FCS

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

Mowiol

12 g Mowiol 4-88

40 ml PBS, pH 7,3

über Nacht rühren lassen

20 ml Glycerin

über Nacht rühren lassen

Zentrifugation: 1h, 15.000rpm, 4°C

Überstand mit 1 Spatelspitze NaN₃ (Natriumazid) versetzen

Lichtgeschützt bei 4°C lagern, vor der Verwendung 3:1 mit N-Propyl-Gallat versetzen.

50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)

40 mM Tris/Base

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

pH 8,0

LB-Medium

1% (w/v) BactoTrypton

0,5% (w/v) Bacto-yeast-extract

1% (w/v) NaCl

keine pH-Einstellung, autoklavieren, Antibiotikum nach Abkühlen zugeben

LB – Agar

LB-Medium plus 1% (w/v) Bacto-Agar

3. Methoden

3.1 Biochemische Methoden

3.1.1 Zellfraktionierung

Für die Zellfraktionierung von Rattenpankreasgewebe wurden männliche *Wistar*-Ratten der Firma Charles River Wiga GmbH mit einem Gewicht von ca. 200-230g verwendet. Die Ratten erhielten die Standarddiät Altromin C1000 der Firma Altromin GmbH und außerdem Wasser ad libidum. 18 Stunden vor der Gewebeentnahme wurden die Tiere gefastet, um eine Anreicherung der Zymogengranula im exokrinen Anteil des Pankreas zu gewährleisten.

3.1.1a Isolierung von Zymogengranula aus Rattenpankreasgewebe

Die Ratten wurden mittels eines Inhalationsnarkotikums (Halotan) kurz narkotisiert, um sie dann durch Dekapitation zu töten und zu entbluten. Nach Eröffnung des Bauchraums wurde das Pankreas freipräpariert, in eiskühlem 1x PBS gewaschen und von Fremdgewebe (Fett, Lymphgewebe) befreit. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten auf Eis und unter Verwendung geeigneter Proteaseinhibitoren(2.8).

Das entnommene Organ wurde zunächst in 1ml eiskaltem Homogenisationspuffer mit einer Schere zerkleinert und dann in 10ml des gleichen Puffers mit einem Potterhomogenisator homogenisiert. Dies erfolgte bei 2500rpm durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen des Homogenisationsgefäßes gegen das rotierende Teflonpistill. Das entstandene Homogenat wurde bei 4°C und 500g für 10min in der Kühlzentrifuge (Modell RT 6000D, Dupont Company, Wilmington, Delaware, USA) zentrifugiert, um Zellkerne und Zelltrümmer zu sedimentieren. Dieses Sediment (S1) wurde auf Eis aufbewahrt und der Überstand nochmals hochtouriger bei 2000g 10min zentrifugiert. Das resultierende Pellet besteht aus einer weißen Schicht von Zymogengranula, das von einer braunen Mitochondrienschicht überlagert wird. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde dieser letzte Zentrifugationsschritt mit dem entstandenen Überstand nochmals wiederholt. Im Anschluss wurde der Überstand wieder mit Sediment 1 vereinigt und der Zyklus aus Homogenisation und Zentrifugationsschritten wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Die braune Mitochondrienschicht wurde mit Homogenisationspuffer (2.12) vorsichtig von den Zymogengranula abgewaschen und gesammelt. Die gesammelten Zymogengranula wurden vereinigt und die Fraktionen bei 2000g und 4°C 20min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen bzw. im Folgenden für die Gewinnung einer Mikrosomenangereicherten Fraktion verwendet. Die Mitochondrien der Pellets wurden mit Homogenisationspuffer abgewaschen und ebenfalls verworfen. Die Zymogengranula wurden je nach Größe des Pellets in 8-10ml HEPES-Puffer (50mM, pH 8) resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

3.1.1b Subfraktionierung der Zymogengranula in Inhalts- und Membranfraktionen

Durch den basischen pH-Wert des HEPES-Puffers sowie das Einfrieren und schonende Auftauen der Zymogengranula kommt es zur Lyse der Granula, die daraufhin ihren Inhalt freisetzen. Um diese Inhaltsproteine (Zymogengranulainhalt, ZGI) von der Membranfraktion (Zymogengranulamembranen, ZGM) der Granula zu trennen, wurde die Probe für 30min bei 4°C und 100000g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Beckman Tischultrazentrifuge Optima™ TL). Der Überstand entspricht dem Zymogengranulainhalt, die Zymogengranulamembranen bilden das Pellet, welches in HEPES-Puffer resuspendiert wurde. Beide Fraktionen wurden bei minus 20°C gelagert.

3.1.1c Herstellung eines Bicarbonat-Extrakts („Wash“-Fraktion) aus ZGM

Um von der Gesamtmembranfraktion periphere Membranproteine abzulösen, wurden in HEPES-Puffer (50mM, pH 8) resuspendierte Zymogengranulamembranen mit einem äquivalenten Volumen NaCO₃-Puffer (0,3M, pH 11,5) versetzt. Der Ansatz wurde 2h auf Eis inkubiert und währenddessen mehrmals kurz geschwenkt. Durch Zentrifugation des Ansatzes bei 4°C und 100000g für 30min wurden die Membranen sedimentiert, während die peripheren Membranproteine nun im Überstand vorlagen. Das Pellet (gewaschene Zymogengranulamembranen, gZGM) wurde in HEPES-Puffer resuspendiert und alle Fraktionen bei -20°C gelagert.

3.1.1d Herstellung einer Mikrosomen-angereicherten Fraktion

Für einige Experimente wurde eine Mikrosomen-angereicherte Fraktion als Kontrollprobe benötigt, um eine Verunreinigung der Zymogengranulafraktion durch Anteile von endoplasmatischem Retikulum auszuschließen. Dazu wurde der Überstand, der bei der Sedimentierung der Zymogengranula (3.1.1a) und Mitochondrien entstand, eine Stunde bei 100000g und 4°C in der Ultrazentrifuge pelletiert (Beckman Tischultrazentrifuge Optima™ TL). Das Mikrosomen-angereicherte Pellet wurde in HEPES-Puffer (50mM, pH 8) resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976)

Bei der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsspektrum im sauren Milieu von 465nm ohne gebundenes Protein auf 595nm mit gebundenem Protein. Dies resultiert vermutlich aus der Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfatform aufgrund einer Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Farbstoff bindet dabei recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen, wobei der Wechselwirkung mit Arginin eine große Bedeutung zukommt.

Die Zunahme der Absorption ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung und kann durch Messung der optischen Dichte mittels eines Photometers bestimmt werden. Der Bradford-Assay ist der sensitivste und zugleich einfachste Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Außerdem ist seine Toleranz gegenüber vielen Substanzen – vor allem Reduktionsmitteln – größer als bei Lowry- oder BCA-Assays. Allerdings ist dieser Test sehr störanfällig für Substanzen, die das Absorptionsspektrum von Coomassie G250 beeinflussen, wie z.B. Detergenzien. Außerdem neigt diese Bestimmungsmethode zu erheblichen Differenzen in den resultierenden Absorptionskoeffizienten bei gleicher eingesetzter Proteinkonzentration, so dass die Subjektivität dieses Tests einen Nachteil gegenüber anderen darstellt. Die Bestimmung des Proteingehalts in den verwendeten Proteinproben wurde mit dem Proteinassay der Firma BioRad nach Angaben des Herstellers unter Verwendung einer BSA-Eichreihe durchgeführt. Dazu wurden sowohl die

Proteinproben als auch das BSA der Eichreihe in 0,1N NaOH auf ein Endvolumen von je 100µl verdünnt. Anschließend wurde das Reagenz des Proteinassays 1:5 in dH₂O verdünnt und je 1ml dieser Lösung mit den Proteinlösungen inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 15min, anschließend wurde über eine photometrische Messung die optische Dichte der jeweiligen Ansätze bei 595nm bestimmt. Die ermittelten Werte der BSA-Proben wurden zur Erstellung einer Eichgerade verwendet, die im Anschluss zur Bestimmung der Proteinkonzentration der eingesetzten Proteinproben diente. Dabei wurde die ermittelte optische Dichte gegen die eingesetzte BSA-Menge graphisch aufgetragen.

3.1.3 Proteinfällungen

3.1.3a Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Die zu fällende Proteinprobe wurde 1:1 (v/v) mit 20%iger, kalter Trichloressigsäure gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch 5min bei 13000rpm bei 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das entstandene Pellet wurde dreimal mit 5%iger Trichloressigsäure bei gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet sehr vorsichtig mit etwas dH₂O gewaschen, so dass das Pellet nicht in Lösung ging, eventuelle überschüssige Trichloressigsäure aber entfernt werden konnte. Dies spielt vor allem für die isoelektrische Fokussierung (3.1.4) eine Rolle, da eine zu saure Probe zu einer unvollständigen Auftrennung der Proteine im sauren pH-Bereich des pH-Gradienten führt. Waschschritte mit Aceton oder Neutralisationsversuche mit 0,1N NaOH brachten kein zufriedenstellendes Ergebnis.

Das entstandene Proteinpellet wurde für die isoelektrische Fokussierung in Rehydrierungspuffer (2.12) resuspendiert.

3.1.3b Proteinfällung nach Wessel

Die Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel und Flügge, 1984) dient der Reinigung und Ankonzentrierung von Proteinen in Lösung. Die zu fällende Proteinlösung wurde mit 4 Volumenanteilen Methanol und 1 Volumenanteil

Chloroform gemischt. Anschließend wurden 3 Volumenanteile dH₂O zugesetzt, der Ansatz gut gemischt und bei 13000rpm bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die weißliche feste Interphase, die das Protein bzw. Proteingemisch enthält, und die untere organische Phase wurden nochmals mit 3 Volumenanteilen Methanol gemischt. Nach einer Zentrifugation von 3min bei 13000rpm wurde das entstandene Proteinpellet an der Luft getrocknet und anschließend in SDS-Ladepuffer (2.12) resuspendiert.

3.1.3c Proteinfällung mit dem *ProteoExtract Protein Precipitation Kit* (Firma Calbiochem)

Die zu fällende Proteinprobe wurde mit 4 Volumen des Präzipitationsreagenz (-20°C) gut gemischt und je nach Verdünnungsgrad der Probe 20min–60min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine 10min bei Raumtemperatur und 13000rpm in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde dann mit 500µl Waschlösung (im Kit enthalten; -20°C) gewaschen und für 2min bei 13000rpm erneut pelletiert. Dieser Waschschrift wurde nach Abnahme des Überstands nochmals wiederholt. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Für die anschließende Verwendung der Probe für die isoelektrische Fokussierung wurde eine Trocknungszeit von 1h empfohlen. Danach wurde das Pellet in 200µl Rehydratisierungspuffer (2.12) aufgenommen und nach Empfehlung des Herstellers 1h unter Rotation bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden unlösliche Komponenten kurz abzentrifugiert und die Probe im Anschluss wie beschrieben (3.1.4) für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Diese Methode wurde in Zusammenhang mit den durchgeführten Deglykosylierungsstudien (3.1.10) eingesetzt, um Probleme, die durch eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure und eine eventuell daraus resultierende zu saure Proteinfraction entstehen könnten, zu vermeiden.

3.1.4 2D-Gelelektrophorese (Lottspeich und Zorbas, 1998; Görg, 2004)

Die 2D-Gelelektrophorese wird zur Analyse komplexer Proteingemische aus Zellen, Geweben oder anderen biologischen Proben verwendet. Mittels dieser Methode werden Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Eigenschaften in zwei aufeinander folgenden Schritten getrennt.

Die erste Dimension ist die isoelektrische Fokussierung (IEF). Dabei werden Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI) aufgetrennt. Die zweite Dimension ist die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese), durch die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Jeder Spot im resultierenden Gel korrespondiert potentiell mit einem einzelnen Protein der Ausgangsprobe. Tausende von Proteinen können so aufgetrennt werden und es können Informationen über den isoelektrischen Punkt, das Molekulargewicht und die Menge des jeweiligen Proteins gewonnen werden. Außerdem können unbekannte Proteine unter Verwendung dieser Methode identifiziert werden.

3.1.4a Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Theoretische Einführung:

Die isoelektrische Fokussierung ist eine elektrophoretische Methode, die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punkts (pI) auftrennt. Proteine sind amphotere Moleküle, die je nach dem pH-Wert des sie umgebenden Milieus entweder eine positive, eine negative oder gar keine Nettoladung tragen. Die Nettoladung entspricht der Summe aller Ladungen der Aminosäureseitenketten sowie der Amino- und Carboxytermini des Proteins. Der isoelektrische Punkt entspricht dem pH-Wert, an dem die Nettoladung des Proteins gleich Null ist. Proteine sind positiv geladen bei pH-Werten, die unterhalb ihres pI liegen, und negativ geladen bei pH-Werten oberhalb ihres eigenen pI. Trägt man die Nettoladung des Proteins gegen den pH-Wert des umgebenden Milieus auf, so schneidet die resultierende Kurve die X-Achse am isoelektrischen Punkt des Proteins.

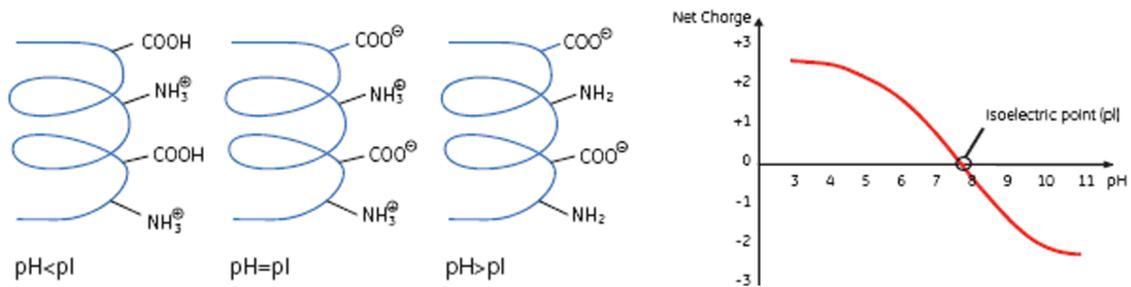


Abb. 3.1: Darstellung der Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenden Milieus (entnommen aus Görg, 2004; 2D-Electrophoresis: Principles and Methods (User Manual GE Healthcare))

Entscheidend für die isoelektrische Fokussierung ist das Vorhandensein eines pH-Gradienten. Proteine wandern in einem pH-Gradienten unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes an die Position im Gradienten, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Proteine mit positiver Nettoladung wandern zur Kathode, wobei ihre positive Nettoladung immer geringer wird, je näher sie dem pH-Wert kommen, der ihrem pI entspricht. Umgekehrt wandern Proteine mit negativer Nettoladung zur Anode, bis sie den pH-Wert, der ihrem pI entspricht, erreichen und ihre Nettoladung gleich Null ist. Entfernen sich Proteine von ihrem pI, erhalten sie automatisch wieder eine Nettoladung, wodurch sie im elektrischen Feld wieder an den pH-Wert entsprechend ihres pI zurückgeführt werden. Daraus resultiert der fokussierende Effekt dieser Methode, durch die Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt konzentriert werden. Dies erlaubt es, auch Proteine mit nur geringfügigen Unterschieden in ihrer Ladungsverteilung einzeln aufzutrennen.

Die Güte der Auftrennung wird beeinflusst von der Spanne des pH-Gradienten und der elektrischen Feldstärke; die isoelektrische Fokussierung wird daher bei hohen Voltzahlen (über 1000V) durchgeführt. Haben die Proteine ihre endgültige Position erreicht, führt dies zu einer nur noch geringen Ionenwanderung, weshalb der finale Stromfluß sehr gering ist (im Mikroampere-Bereich).

Die beste Auftrennung eines Proteingemisches erfolgt unter denaturierenden Bedingungen. Eine vollständige Denaturierung der Proteine erreicht man durch Einsatz von Harnstoff, Detergenzien und reduzierenden Verbindungen. Diese Mischung stellt sicher, dass die Proteine in nur einer Konformation vorliegen

und nicht aggregieren, wodurch molekulare Interaktionen zwischen den Proteinen minimiert werden.

Harnstoff wird sowohl in der ersten als auch der zweiten Dimension als neutrales denaturierendes Agens eingesetzt. Der Einsatz von Thioharnstoff soll vor allem bei der Auftrennung von Membranproteinen zu noch besseren Ergebnissen führen. Nichtionische oder zwitterionische Detergenzien sollen die Proteine bestmöglich solubilisieren und hydrophobe Wechselwirkungen minimieren. Am effektivsten für eine Reihe von Proteinen scheint hier CHAPS (2%-4%) zu sein. SDS löst Proteine zwar effektiv, ist aber aufgrund seiner Komplexbildung mit Proteinen nur bedingt und nicht als einziges Detergenz einzusetzen. Als Reduktionsmittel wird zumeist DTT eingesetzt, durch welches Disulfidbrücken aufgebrochen werden sollen. Um die Proteinsolubilisierung weiter zu erhöhen, können dem Probenpuffer außerdem Trägerampholyte bzw. IPG-Buffer (Ampholyte-enthaltende Puffer) zugesetzt werden, um Wechselwirkungen aufgrund der geladenen Anteile der Proteine zu unterbinden.

In den Anfängen wurde die isoelektrische Fokussierung in zylindrischen Polyacrylamidgelen in Glasröhrchen durchgeführt, basierend auf einem durch Trägerampholyte gebildeten pH-Gradienten. Trägerampholyte sind kleine, lösliche, amphotere Verbindungen mit einer hohen Pufferkapazität im Bereich ihres pI . Im elektrischen Feld wandern die Ampholyte mit der höchsten negativen Nettoladung zur Anode, die mit der höchsten positiven Nettoladung zur Kathode. Alle anderen Ampholyte verteilen sich zwischen diesen Extremen entsprechend ihres pI und puffern die Umgebung des entsprechenden pH-Werts, wodurch ein kontinuierlicher pH-Gradient geschaffen wird. Da diese Methode einige Limitierungen und Probleme aufwarf, die mit Eigenschaften der Trägerampholyte zusammenhingen, wurden immobilisierte pH-Gradienten entwickelt (IPG), in denen ein Gradient saurer und basischer Puffergruppen (*Imobiline*) kovalent mit einem Polyacrylamidgel verknüpft wurde. Außerdem wurden diese Gelstreifen (*Imobiline DryStrips*; GE Healthcare) auf einer Folie fixiert und getrocknet. Für die erste Dimension muß der Streifen dann in der entsprechenden Lösung rehydriert werden.

Die Verwendung immobilisierter pH-Gradienten hat einige Vorteile gegenüber dem ursprünglichen System:

- Einfache Handhabung, keine Arbeiten mit toxischen Materialien (Acrylamidmonomere)
- Die fixierende Folie schützt das Gel vor Beschädigung
- Erweiterung des nutzbaren pH-Bereichs, sehr saure und sehr basische Proteine können besser separiert werden
- Höhere Proteinladekapazität
- Höhere Reproduzierbarkeit

Durchführung der isoelektrischen Fokussierung mit Ettan IPGphor II System:

Für die isoelektrische Fokussierung mit dem Ettan IPGphor II System (GE Healthcare) wurde die Proteinprobe im Verhältnis 1:1 mit 20%iger TCA gefällt (3.1.3a) und anschließend in Rehydratisierungspuffer (2.12) resuspendiert (125µl für 7cm-IPG-Strips; 200µl für 11cm-IPG-Strips). Danach wurde der Ansatz wie in Abbildung 3.2 gezeigt in ein Teflonschiffchen (11cm bzw. 7cm) überführt und das pH-Gradientengel aufgebracht. Wichtig ist hier, dass keine Luftblasen entstehen, die sonst das Einwandern der Proben sowie die Fokussierung beeinträchtigen würden. Außerdem muß genau darauf geachtet werden, keine Verunreinigungen in die Probe bzw. auf den Streifen aufzubringen, da diese unweigerlich mit einwandern und zu Problemen bei der Fokussierung oder im späteren 2D-Gel zu Artefakten führen können. Deshalb sollte immer mit Handschuhen sowie autoklavierten Materialien gearbeitet werden. Da während der isoelektrischen Fokussierung viel Wärme frei wird, wurde der Gelstreifen zum Schutz vor Verdunstung der Probe mit *Cover Fluid* überschichtet. Zu beachten ist auch, dass der Gelstreifen an beiden Seiten des Teflonschiffchen Kontakt zur Elektrode haben muß, um den Aufbau eines elektrischen Feldes zu gewährleisten.

Verwendet wurden hauptsächlich Streifen von 7cm Länge (pH 3-10) für eine anschließende Auftrennung der Proteine in Minigelen oder 11cm Länge (pH 3 – 11) für größere Gele (Streifen mit sauren oder basischen pH-Bereichen wurden ebenfalls getestet, brachten aber keine Verbesserung des Ergebnisses). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 100µg der *Wash*-Fraktion in 125µl Rehydratisierungspuffer für Minigele (IPG *DryStrips* 7cm pH 3-10) bzw. 300µg der *Wash*fraktion in 200µl Rehydratisierungspuffer für große Gele (ca. 14x14 cm; IPG *DryStrips* 11cm pH 3-11). Die Streifen von 7cm Länge wurde zur

Qualitätskontrolle der *Wash*-Fraktion (3.1.1c) benutzt, die Streifen von 11cm Länge dienen der Generierung von präparativen 2D-Gelen und anschließender Identifizierung der Proteinspots mittels MALDI-TOF (3.1.6).

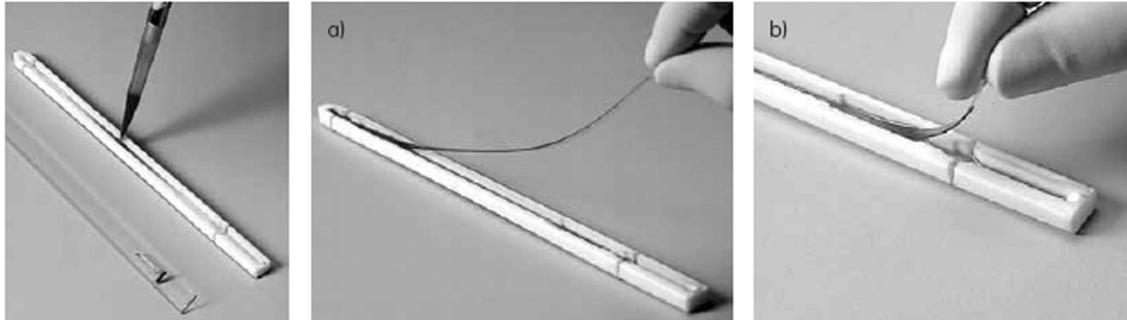


Abb.3.2: Die Probe wird in der Mitte des Teflonschiffchen aufgebracht und der Streifen luftblasenfrei (evtl. mit Hilfe einer Pinzette) aufgelegt, wobei am sauren Ende begonnen wird (entnommen aus Görg, 2004 (2D-Electrophoresis: Principles and Methods (GE Healthcare)))

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur nach folgenden Programmen:

Verwendete <i>Strips</i>	Angelegte Spannung (Volt)	Dauer (Stunden)
7cm pH 3-10	50V	Mind. 10h
	500V	0,5h
	1000V	0,5h
	5000V	1:40h
11cm pH 3-11	50V	Mind. 10h
	500V	1h
	1000V	1h
	8000V	1:50h

Die Stromstärke betrug 50 μ A, die Rehydratisierungszeit konnte entsprechend der Versuchsplanung variabel gehandhabt werden, sollte aber eine Dauer von 10h nicht unterschreiten, um eine ausreichende Quellung und Probeneinwanderung in den Streifen zu gewährleisten. Rehydratisierungszeiten länger als 16h sind ebenfalls zu vermeiden, da die Wahrscheinlichkeit für eine Degradation der Probenproteine steigt.

Es wurde der Programmmodus „*Step-and-Hold*“ gewählt, d.h. die Änderung der Voltzahl erfolgte sprunghaft.

Der Erfolg der Auftrennung lässt sich anhand des Probenfarbstoffs erkennen. Das im Auftragspuffer enthaltene Bromphenolblau separiert sich während der Fokussierung in eine blassblaue und eine grüne Farbstoffbande, wobei sich die blaue zur Kathode und die grüne zur Anode bewegt. Die Fokussierung ist erfolgreich, wenn die grüne Bande sich im Bereich der Anodenelektrode befindet. Probleme bei der Auftrennung entstanden vor allem durch einen zu sauren pH-Wert des Auftragspuffers, hervorgerufen durch Reste von Trichloressigsäure nach der Proteinfällung.

Nach erfolgreicher isoelektrischer Fokussierung wurden die *Imobiline DryStrips* für die SDS-Gelelektrophorese (2. Dimension) equilibriert.

3.1.4b Equilibrierung der *Imobiline DryStrips* für die SDS-PAGE

Der Equilibrierungsschritt ermöglicht den Proteinen den Übergang in das SDS-Gel und die anschließende molekulargewichtsspezifische Auftrennung. Die Equilibrierung erfolgte in 2 Schritten von je 15min, wobei der Equilibrierungspuffer (2.12) im ersten Schritt DTT als Reduktionsmittel enthielt, im zweiten Schritt wurde DTT durch Iodacetamid ersetzt. Der pH-Wert des Puffers hält den *Imobiline DryStrip* in einem pH-Bereich, der für die Elektrophorese geeignet ist, Harnstoff und Glycerol reduzieren den Effekt der Elektroendosmose durch Erhöhung der Viskosität des Puffers. DTT erhält die denaturierten Proteine in ihrer reduzierten Form, SDS denaturiert die Proteine und bildet SDS-Proteinkomplexe. Das im zweiten Equilibrierungsschritt verwendete Iodacetamid alkyliert Thiolgruppen von Proteinen und verbliebenes DTT. Dadurch wird die Reoxidation der Proteine während der Elektrophorese und eine eventuelle Bildung von Artefakten verhindert.

Nach der Equilibrierung wurden die Streifen luftblasenfrei auf das SDS-Gel aufgebracht und in *Sealing-Agarose* (2.12) eingegossen. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung.(3.1.4c).

3.1.4c SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Theoretische Einführung:

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Acrylamidpolymere, die über

N`N`-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden, bilden die Matrix dieser Gele. Für die Dichte des Netzes ist die Konzentration der Acrylamidmonomere sowie die Intensität der Quervernetzung ausschlaggebend. Durch den Zerfall von Ammoniumpersulfat (APS) in Radikale wird Tetramethylethylen-diamin (TEMED) aktiviert, wodurch die Acrylamidpolymerisation eingeleitet wird. Die Polymerisationseffektivität ist neben der Acrylamidkonzentration desweiteren abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert, der Katalysatorkonzentration (APS/TEMED) sowie der Konzentration und Art eventueller Zusatzstoffe. Sauerstoff führt zum Kettenabbruch, weshalb Polyacrylamidgele meist in vertikalen Apparaturen gegossen werden, um die Sauerstoffaufnahme zu minimieren. Grundsätzlich sollten Polyacrylamidgele erst einen Tag nach ihrer Herstellung verwendet werden, da es zu einer langsamen Nachpolymerisation kommt.

Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet Proteine zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit einem konstanten Ladung-zu-Masse-Verhältnis. Es denaturiert die Proteine und geht nichtkovalente Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen der Proteine ein, wodurch Wechselwirkungen der Proteine untereinander verhindert werden. Durch den Ausgleich der Ladungsunterschiede zwischen den Proteinen werden die Voraussetzungen für eine molekulargewichtsspezifische Auftrennung der Proteine geschaffen. Alle Proteine tragen negative Ladungen und können so nach Anlegen eines elektrischen Feldes allein in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht im Gel aufgetrennt werden.

Es wurde ein diskontinuierliches Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem (Laemmli, 1970) verwendet. Dabei liegt der pH-Wert des Sammelgels bei 6,8, der des Trenngels bei 8,8. Da der pH-Wert des Sammelgels nahe am isoelektrischen Punkt des im Laufpuffer vorhandenen Glycins liegt, hat dieses zu Beginn der Elektrophorese eine niedrige elektrophoretische Mobilität (Folge-Ion), wohingegen die Chlorid-Ionen der Gelpuffer eine hohe Mobilität aufweisen (Leit-Ion). Bei Auftrag der Proteinproben auf das weitporige Sammelgel liegt deren Mobilität zwischen der des Glycins und der der Chlorid-Ionen. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes beginnen alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit zu wandern (Isotachophorese). Keines der Ionen kann aufgrund seiner Mobilität schneller oder langsamer als die anderen wandern, da sonst eine Lücke

zwischen den Ionen entstehen würde. Daraus ergibt sich, dass sich die Proteine in einem Feldstärkegradienten befinden, der während der Wanderung der Proteine im Sammelgel zu einer Stapelung der Proteine entsprechend ihrer Mobilität führt. Dadurch kommt es zur Aufkonzentrierung der Proben vor dem Eintritt in das engporige Trenngel und nachfolgend zu schärferen Proteinbanden. Die Porengröße des Trenngels führt zu einem Reibungswiderstand, der die Proteinprobe, nicht aber das Glycin betrifft, welches ungehindert in das Trenngel eintritt und die Proteine „überholt“. Dadurch befinden sich die Proteine dann in einem homogenen Puffer, wodurch der Stapeleffekt aufgelöst wird und die Proteine sich entsprechend ihres Molekulargewichts auftrennen können.

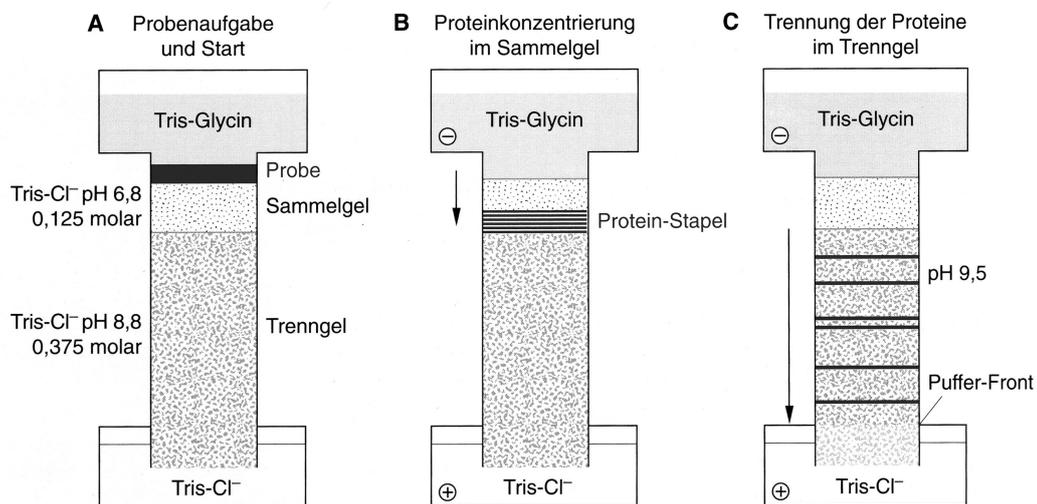


Abb. 3.3: Darstellung der im Text beschriebenen Mechanismen bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (entnommen aus Lottspeich und Zorbas, 1998)

Durchführung:

Es wurden SDS-Gele von 12,5% Polyacrylamid (2.12) verwendet. Zu Beginn wurde das Zubehör mit Ethanol rückstandsfrei gesäubert und nach dem Zusammenbau der Gießapparatur das Trenngel gegossen. Dabei wurde die Gellösung mit einer 0,1%igen SDS-Lösung überschichtet, um eine gerade Gelfront zu erzeugen. Außerdem wurde dadurch der Einfluß von Sauerstoff auf die Gelpolymerisation minimiert. Isopropanol wurde nicht zur Überschichtung benutzt, um v.a. bei der 2D-Gelelektrophorese Probleme durch eventuelle Alkoholrückstände zu vermeiden.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurde nur ein Trenngel gegossen, da die isoeletrische Fokussierung in immobilisierten pH-Gradienten erfolgte (3.1.4a), die nach erfolgreicher Fokussierung auf das Trenngel aufgebracht wurden. Minigele wurden nach der Polymerisation des Trenngels mit einem Sammelgel überschichtet (2.12), in das durch Einhängen eines Taschenkamms Auftragstaschen für die zu analysierenden Proteinproben eingefügt wurden. Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer (2.12) aufgenommen und bei 95°C 5min erhitzt. Dies führte zusammen mit im Puffer enthaltenen Reduktionsmitteln (DTT und β -Mercaptoethanol) zur Denaturierung der Proteine. Anschließend wurde das Probengemisch auf das Sammelgel aufgetragen und in 1x SDS-Laufpuffer (2.12) bei einer angelegten Spannung von 80 Volt gefahren, bis die Lauffront die Grenze zum Trenngel erreichte. Dann wurden die Proteine bei einer Spannung von 130 Volt aufgetrennt.

Bei 2D-Gelen wurden die immobilisierten pH-Gradientengele luftblasenfrei auf das Trenngel aufgebracht und in Agarose eingegossen (2.12). Die durch isoeletrische Fokussierung (3.1.4a) getrennten Proteine liefen bei einer Spannung von 90 Volt langsam aus dem Gelstreifen in das Trenngel ein, um dann bei einer Spannung von 230 Volt aufgetrennt zu werden. Teilweise wurden die Gele dabei durch die angeschlossene Kühleinheit (Wasserbad/Kühlung RM3 Thermo Temp (MGW Lauda)) gekühlt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde in jedem Fall ein Proteinstandard aufgetragen (*Benchmark protein ladder* für nachfolgend gefärbte Gele bzw. *Rainbow Molecular Weight Marker Full Range* als *prestained marker* für Western Blots). Die Proben wurden so lange aufgetrennt, bis die Lauffront aus dem Gel herauswanderte.

Minigele dienten der Analyse der spezifischen Verteilung verschiedener in der *Wash*-Fraktion identifizierter Zymogengranulaproteine (Chymase, PPIB, RNAse A, CEL) innerhalb der verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen (ZGI, ZGM, gZGM und *Wash*). Die Auftragsmenge betrug hier zwischen 10 μ g und 50 μ g pro Spur in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Protein. Außerdem wurden Minigele benutzt, um die hergestellten *Wash*-Fraktionen auf ihre Qualität zu testen. Dazu wurden 100 μ g *Wash* mittels isoelektrischer Fokussierung (3.1.4a) auf 7cm *IPG DryStrips* pH 3-10 aufgetrennt, danach auf einem 12,5%igen Minigel (ohne Sammelgel) aufgetrennt und anschließend auf

Nitrocellulose geblottet (3.1.7). Über einen gegen die *Wash*-Fraktion gerichteten Antikörper (anti-Matrix-Antikörper; 2.7) wurde dann die Qualität der *Wash*-Fraktion (anhand der Darstellung der Gruppe der sauren Proteine) überprüft. Auf großen (14x14cm) 2D-Gelen wurden je 300µg der *Wash*-Fraktion nach erfolgter isoelektrischer Fokussierung (3.1.4a) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärbung der Proteine wurden diese aus den SDS-Gelen ausgestochen und über MALDI-MS näher analysiert (3.1.6). Außerdem wurden große 2D-Gele geblottet, um über MALDI-MS sowie MALDI-MSMS identifizierte Proteine der *Wash*-Fraktion durch spezifische Antikörper nachzuweisen (3.1.7).

3.1.5 Färbeprotokolle für Coomassie – und Silberfärbungen

Theoretische Einführung (Lottspeich und Zorbas, 1998; Rehm, 2002):

Zur Optimierung der Anfärbung der Proteinspots in 2D-Gelen wurden verschiedene Coomassie- und Silberfärbungen ausgetestet.

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, für den die untere Nachweisgrenze für Proteine je nach Färbeprotokoll und Farbstoffbindefähigkeit der Proteine bei 30-400ng Protein liegt. Zunächst werden die Proteinspots in den SDS-Gelen durch Säure fixiert (z.B. Essigsäure), im einfachsten Fall ist der Fixierlösung der Farbstoff schon zugesetzt, so dass die SDS-Gele gleichzeitig fixiert und gefärbt werden. Coomassie Brilliant Blue **G250** kann in saurem Milieu in Gegenwart von Ammoniumsulfat Mikropräzipitate bilden, was eine kolloidale Färbung möglich macht. Dies bezieht sich nur auf Coomassie **G250**, nicht aber auf Coomassie Brilliant Blue **R250**. Aufgrund der mit der kolloidalen Färbung assoziierten niedrigen Konzentration an freiem Farbstoff ist die Hintergrundfärbung in den SDS-Gelen minimal. Das Ammoniumsulfat führt zu einer Stärkung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Protein und somit zu einer höheren Sensitivität der Färbung. Außerdem erhöht sich die Sensitivität mit sinkendem Alkoholgehalt in der Färbelösung.

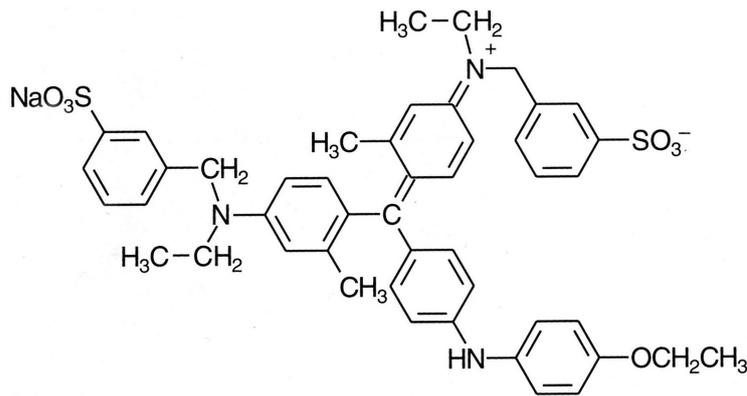


Abb. 3.4:

Coomassie G250 (entnommen aus
Lottspeich und Zorbas, 1998)

Bei Proteinmengen über 1 µg ist die Coomassiefärbung die Methode der Wahl, darunter sollte aufgrund der höheren Sensitivität die Silberfärbung angewendet werden, deren Nachweisgrenze je nach Protokoll bei 5 ng (Merril et al. 1981) bis zu 100 pg (Heukeshoven und Dernick 1988) liegt. Auch hier existieren verschiedene Protokolle. Allen gemein ist die Reduktion von Silberionen zu Silber, das sich als schwarzer Niederschlag im Bereich der Proteinspots ablagert. Die Proteine werden zunächst mittels einer Säure (Essigsäure, Trichloressigsäure) im SDS-Gel fixiert und dann in einer Silbernitratlösung inkubiert. Die Silberionen bilden Komplexe mit Seitenketten der Proteine, wobei einige funktionelle Gruppen sowie die Peptidbindungen die Reduktion einzelner Silberionen zu Silberkeimen initiieren. Alkalisches Formaldehyd reduziert dann die Silberionen der Komplexe zu metallischem Silber, wobei die genauen Mechanismen dieser Reaktion nicht bekannt sind. Ein Reduktionsschritt mit Thiosulfat erhöht die Sensitivität weiter. In der Nähe der Silberkeime findet diese Reaktion bedeutend schneller statt als in anderen Bereichen des SDS-Gels, wodurch sich die Proteinspots schneller braun bis schwarz verfärben als der Rest des SDS-Gels. Durch eine deutliche Veränderung des pH-Werts, die meist durch den Einsatz verdünnter Essigsäure erreicht wird, wird die ansonsten fortlaufende Reaktion abgestoppt.

Aufgrund der Empfindlichkeit der Reaktion muß auf größtmögliche Sauberkeit während der Durchführung geachtet werden, da Verunreinigungen zu hohem Hintergrund oder Artefakten führen können.

Durchführung:

Präparative 2D-Gele, auf denen je 300 µg der *Wash*-Fraktion nach erfolgter isoeletrischer Fokussierung (3.1.4a) aufgetrennt wurden, wurden mit verschiedenen Färbemethoden angefärbt, um das Proteinmuster zu analysieren und anschließend die aufgetrennten Proteine über MALDI-MS (3.1.6) zu

identifizieren. Alle aufgeführten Färbeprotokolle sind kompatibel mit massenspektrometrischen Analyseverfahren.

3.1.5a Coomassie-Färbeprotokoll 1

Das SDS-Gel wurde 1h in 10% Essigsäure/ 30% Ethanol fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit Coomassie G250, indem 0,15g Coomassie G250 in 146ml dH₂O gelöst wurden und das Gel 30min in der Lösung inkubiert wurde. Dann wurden 3,75ml (Endkonzentration 1,5%) Perchlorsäure (60%) zugesetzt und das SDS-Gel weitere 60min in der Färbelösung inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Entfärben des Gels in 2,5% (v/v) Perchlorsäure entfernt und das Gel über Nacht in 1% Essigsäure gewaschen.

3.1.5b Coomassie-Färbeprotokoll 2

Es wurde eine *Ready-to-use*-Coomassiefärbelösung der Firma Biorad verwendet und die Färbung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.5c Coomassie-Färbeprotokoll 3: Färbung von SDS-Gelen mit Rutheniumrot und Coomassie G250

Die Fixierung der SDS-Gele erfolgte über Nacht in 10% Essigsäure/ 30% Ethanol. Anschließend wurden die SDS-Gele 4x 30min in 20% Ethanol gewaschen, um die Essigsäure quantitativ zu entfernen, da Säuren die Fluoreszenz des Chelats stark beeinträchtigen. Anschließend erfolgte die Färbung der SDS-Gele in 20% Ethanol/ 100nM–200nM Ruthenium-Chelat (freundlich von Herrn Dr. Markus Isslinger, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt) für 3–6h. Nach 2 Waschschritten von je 10min in dH₂O konnte der Farbstoff über einen Laserscanner (Typhoon Trio, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) detektiert werden bzw. es folgte die Färbung mit Coomassie G250, wobei die vorangegangene Färbung mit Rutheniumrot einen verstärkenden Effekt auf die Coomassiefärbung haben soll. Die SDS-Gele wurden dazu 2x 30min in 30% Ethanol/ 2% (v/v) Phosphorsäure und anschließend 3x 20min in 2% Phosphorsäure inkubiert. Nach einer

Inkubation von 30min in 2% Phosphorsäure/ 18% Ethanol/ 15% (w/v) Ammoniumsulfat wurde 1% einer zuvor hergestellten Coomassie G250-Lösung zugesetzt. Bei diesem Färbeschritt ist die Herstellung der Lösungen von Bedeutung: Für einen Liter Färbelösung wurden 500ml dH₂O unter Rühren zunächst mit 20ml Phosphorsäure (85%) und nachfolgend 150g Ammoniumsulfat gemischt. Nach vollständiger Auflösung des Ammoniumsulfats wurde mit dH₂O auf 820ml aufgefüllt und unter weiterem Rühren wurden 180ml Ethanol zugesetzt. Für die Coomassielösung wurden 2g Coomassie G250 in 100ml heißem dH₂O 30min unter Rühren gelöst. Nach Abkühlen und Zusatz von 0,2g/l Natriumazid kann die Lösung bei Raumtemperatur gelagert werden. Die SDS-Gele wurden in der Coomassielösung 24h – 72h inkubiert und anschließend zur Entfernung einer eventuell auftretenden Hintergrundfärbung in dH₂O gewaschen. Auch die Lagerung der Gele erfolgte in dH₂O, da Zusatz von Alkohol zur Entfärbung der Gele führt.

3.1.5d Coomassie-Färbeprotokoll 4

Die SDS-Gele wurden 2h bei Raumtemperatur (unter Wechseln des Puffers nach 1h) oder über Nacht in 150ml 50% Ethanol/ 3% (v/v) Phosphorsäure fixiert. Anschließend erfolgten 3 Waschschrte von je 30min mit Leitungswasser, woran sich die Inkubation in der Färbelösung anschloß. Dafür wurden zunächst 25,5g Ammoniumsulfat in 86ml dH₂O gelöst, danach 3ml Phosphorsäure zugesetzt und anschließend langsam unter Rühren 51ml Methanol untergemischt. Der Färbelösung wurden nach einer Inkubationszeit von 1h auf dem SDS-Gel 100mg Coomassie Brilliant Blue G250 unter Schütteln zugesetzt. Die SDS-Gele wurden 4 Tage in der Coomassielösung inkubiert. Die Färbung wurde sowohl einzeln als auch in Kombination mit einem geeigneten Silber-Färbeprotokoll (3.1.5e; Silber-Färbeprotokoll 1) eingesetzt, wobei dann die vorangegangene Coomassiefärbung einen verstärkenden Effekt auf die Silberfärbung hatte.

3.1.5e Silber-Färbeprotokoll 1 (Anschlussfärbung für Coomassie-Färbeprotokoll 4)

Die SDS-Gele wurden 2h in 50% Methanol/ 12% Essigsäure/ 0,05% (v/v) Formaldehyd (37%) fixiert, bei vorheriger Coomassiefärbung (nach Protokoll 4 (Selon Anderson et al.)), verkürzte sich die Fixierzeit auf 1h. Anschließend wurden die Gele 3x 20min in 50% Methanol gewaschen. Danach wurden die Proteine durch eine zweiminütige Inkubation in einer 0,02%igen Natriumthiosulfatlösung reduziert, überschüssiges Reduktionsmittel wurde durch 3 anschließende Waschschrte von 3min in dH₂O entfernt. Die Silbernitratlösung (0,2% Silbernitrat/ 0,076% (v/v) Formaldehyd (37%)) wurde bei 4°C gekühlt und das Formaldehyd erst direkt vor der Benutzung zugesetzt, bevor dann die SDS-Gele darin für 20min bis 30min inkubiert wurden. Vor der Entwicklung in 6% Kaliumcarbonat/ 0,05% Formaldehyd/ 0,00004% Natriumthiosulfat wurden die SDS-Gele kurz für 2x 1min in dH₂O gewaschen. Die Entwicklung wurde bis zum gewünschten Ergebnis fortgeführt (was einige Minuten dauern kann) und anschließend durch Abgießen der Entwicklerlösung und Inkubation in 50% Methanol/ 12% Essigsäure abgestoppt. Gelagert wurden die SDS-Gele dann in 0,1% Essigsäure bei 4°C.

3.1.5f Silber-Färbeprotokoll 2

Die Fixierung der SDS-Gele erfolgte in 2 Schritten für je mindestens 15min in 10% Essigsäure/ 40% Ethanol. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30-60min in 34% Ethanol/ 0,2% Natriumthiosulfat/ 0,68% Natriumacetat. Dann wurden die Gele 4x 5min in dH₂O gewaschen und nachfolgend in 0,25% Silbernitrat für 20min unter Lichtausschluss inkubiert. Nach 2 Waschschrten von je 1min in dH₂O wurden die SDS-Gele in 2,5% Natriumcarbonat/ 0,04% Formaldehyd für 0,5-4min entwickelt, anschließend wurde die Reaktion 10min in 1,46% EDTA-Lösung abgestoppt. Gelagert wurden die Gele dann 1% Essigsäure/ 15% Ethanol bei 4°C.

3.1.5g Silber-Färbeprotokoll 3 (adaptiert von Shevchenko et al., 1996)

Die SDS-Gele wurden 30min oder über Nacht in 50% Ethanol /10% Essigsäure fixiert. Es folgte eine Inkubation von 15min in 30% Ethanol, daran schlossen sich 3 Waschschrte von je 5min in dH₂O an. Im Anschluss daran wurden die Gele für 1,5min in 0,02% Natriumthiosulfat inkubiert und nachfolgend 3x 30sec in dH₂O gewaschen. Weiterführend wurden die SDS-Gele 25min in 0,2% Silbernitratlösung inkubiert und anschließend 3x 30sec in dH₂O gewaschen. Die Entwicklung der SDS-Gele erfolgte in 6% Natriumcarbonat/ 0,0004% Natriumthiosulfat/ 0,05% Formaldehyd so lange, bis das gewünschte Ergebnis erreicht wurde. Abgestoppt wurde die Reaktion in 6% Essigsäure für 10min, danach wurden die Gele 4x 15min in dH₂O gewaschen.

3.1.5h Färbung von SDS-Gelen mit *Sypro Ruby Protein Gel Stain*

Für diese Färbung wurde das *Sypro Ruby Protein Gel Stain Kit* der Firma Molecular Probes verwendet. Diese Methode wird im Zusammenhang mit der Färbung von Glykoproteinen näher erläutert (3.1.9b).

3.1.6 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen mittels MALDI-MS (Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation-Massenspektrometrie) und MALDI-MSMS (Lottspeich und Zorbas, 1998; Rehm, 2002)

Theoretische Einführung:

Mit Hilfe der Massenspektrometrie können Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum dargestellt werden. Dabei können unterschiedlichste Substanzklassen untersucht werden. Grundsätzlich besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, in der aus einer Substanzquelle ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird, einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis auftrennt, und einem Detektor, der den Ionenstrom misst. Als Ergebnis ergibt sich ein Massenspektrum, in dem die relativen Häufigkeiten der Ionen gegen ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgetragen sind.

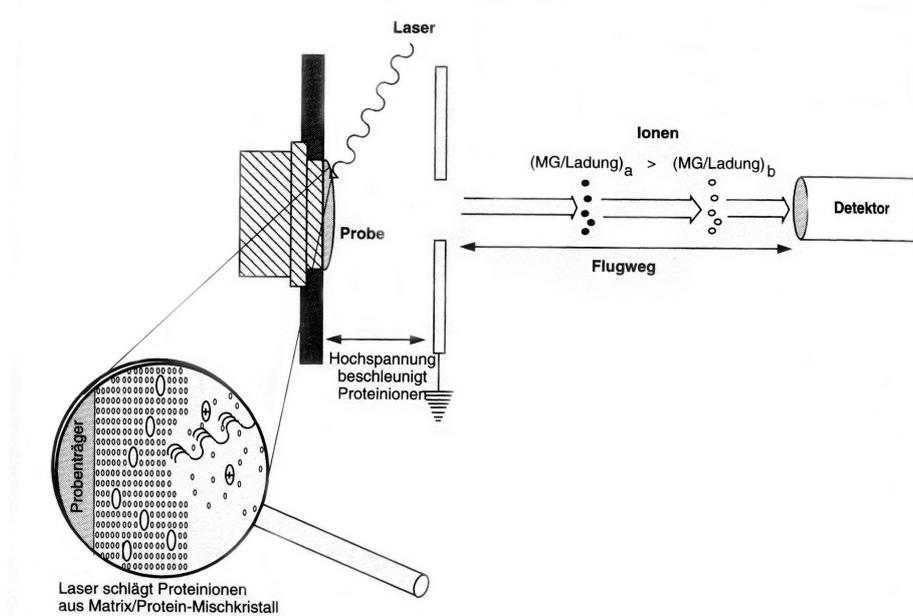


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise eines Massenspektrometers (entnommen aus Rehm, 2002)

Die Ionisierung der zu analysierenden Moleküle kann durch die Aufnahme oder den Verlust eines Elektrons erfolgen, in diesem Fall handelt es sich um den Verlust von Elektronen durch den Beschuss der Probensubstanz mit Photonen (Laserdesorption/Ionisierung, LDI). Für polare, nicht flüchtige Moleküle eignet sich besonders die Ionisierung aus der festen Phase heraus unter Verwendung der **Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation (MALDI)**. Der Nachweis der Analytionen kann über verschiedene Analysatoren und entsprechende Detektoren erfolgen, in diesem Fall erfolgte die Trennung der Ionen nach ihrer Flugzeit in einem Messrohr in Verbindung mit einer gepulsten Ionenerzeugung (*time-of-flight-(TOF-)* Instrumente). Die Genauigkeit der Messergebnisse lässt zum Beispiel bei bekannter Aminosäuresequenz eines Proteins aus der Berechnung der Differenz der theoretischen Masse und der tatsächlich bestimmten Masse Rückschlüsse auf posttranslationale Modifikationen des Proteins zu. Auch kann man nach proteolytischer Spaltung von Proteinen durch massenspektrometrische Fragmentierungstechniken direkte Informationen über die Aminosäuresequenz der generierten Peptidprodukte erhalten. Für die Peptidanalytik liegt die Empfindlichkeit der heutigen massenspektrometrischen Verfahren im Femtomolbereich und darunter, so dass sie sensitiver als die klassische Methode (Edman-Sequenzierung mit optischer Detektion) sind.

Bei der **Matrix-assistierten Laserdesorption/Ionisation (MALDI)** werden die Analytmoleküle in eine Matrix (hier α -Cyano-4-Hydroxymizsäure) eingebettet, welche aus kleinen organischen Molekülen besteht, die sich durch eine hohe Absorption der eingestrahlten Laserwellenlänge (π -Elektronensystem) sowie eine Säurefunktion auszeichnet. Dadurch kommt es zu deutlich erhöhten Intensitäten der Analytmolekülonen gegenüber Analysen ohne verwendete Matrix. Die Matrix spielt eine Rolle bei der Ionisation der Analytprobe, außerdem werden Fragmentationen in den Massenspektren durch den Einsatz einer geeigneten Matrix auf ein Minimum reduziert. Erst durch diese schonende Ionisierungsmethode, die von M. Karas und F. Hillenkamp entwickelt wurde, wurde es möglich, Proteine als intakte Moleküle zu analysieren.

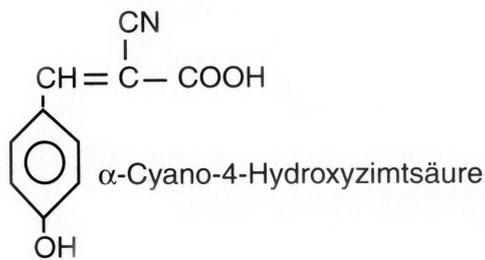


Abb. 3.6:

α -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure (entnommen aus Rehm, 2002)

Zunächst muß die zu analysierende Probe entsalzt werden, was über verschiedene Varianten der *reversed-phase-Chromatographie* erreicht wird (in diesem Fall durch Verwendung von *ZipTip pipette tips*, Millipore). Als flüssige Phasen dienen hier Säuren wie Trifluoressigsäure (TFA) und organische Lösungsmittel wie Acetonitril, die gleichzeitig auch als Lösungsmittel für verschiedene Matrices verwendet werden.

Wird ein Gemisch aus der zu analysierenden Probe und einer geeigneten Matrix auf ein entsprechendes metallisches *Target* (Probeneller) aufgetragen, so kommt es nach Trocknung des Gemischs (*dried droplet method*) zu einer Kokristallisation von Probe und Matrix. Als Lösungsmittel werden meist organische Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol eingesetzt. Durch den Einbau der Analytmoleküle in das Kristallgitter der Matrix werden Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen aufgehoben. Der Einbau der Analytprobe in das Kristallgitter der Matrix stellt die Voraussetzung für die anschließende Laserdesorption/Ionisation dar, wobei die kristalline Probenoberfläche im Hochvakuum einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt wird. Die in den

Matrixmolekülen (π -Elektronensystem) gespeicherte Anregungsenergie wird auf das gesamte Festkörpergitter verteilt und führt so zu einer starken Störung und Ausdehnung desselben, wodurch sich ein Teil der Festkörperphase explosionsartig auflöst und dadurch sowohl Matrix- als auch Probenmoleküle in die Gasphase überführt. In diesem Fall wurde für die Laserdesorption/Ionisation ein Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337nm und einer Pulsdauer von 3ns bei einer Wiederholungsrate von 50Hz eingesetzt. Durch eine probennahe Elektrode werden die erzeugten Ionen im Flugzeitanalysator in Richtung des Detektors auf eine kinetische Energie von einigen Kiloelektronenvolt beschleunigt. Nach dem Verlassen des elektrostatischen Feldes trennen sich die Ionen in einer feldfreien Driftstrecke entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses auf, da Ionen mit Unterschieden in diesem Verhältnis bei gleicher kinetischer Energie auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt werden. Bei bekannter Beschleunigungsspannung, der Flugstrecke der Ionen und der dafür von jedem Ion benötigten Flugzeit lässt sich nachfolgend das Masse-zu-Ladungsverhältnis berechnen:

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U \quad E_{\text{kin}}: \text{ kinetische Energie}$$

m: Masse des Ions

v: Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke

z: Ladungszahl

e: Elementarladung

U: Beschleunigungsspannung

Die Geschwindigkeit v ergibt sich aus dem Quotienten der Flugstrecke des Ions und der dafür benötigten Zeit:

$$v = L/t$$

L: Flugstrecke des Ions

t: Benötigte Flugzeit

Durch Einsetzen dieser Formel in die erste und Umformung nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) ergibt sich:

$$m/z = t^2/L^2 \cdot 2 \cdot e \cdot U$$

Damit lässt sich durch Messen der Flugzeit die Masse des entsprechenden Moleküls berechnen.

Die Detektion der Ionen erfolgt meist durch einen Sekundärelektronenvervielfacher mit vorgeschalteter Konversionsdynode, an welcher ein der Polarität der Ionen entgegengesetztes Potential von bis zu 10kV anliegt. Treffen die Ionen auf der Konversionsdynode auf, so wird ein Sekundärionenstrom erzeugt, es kommt zu einer Elektronenkaskade. Das letztendlich entstehende Signal wird digitalisiert, in einen Computer eingelesen und mit entsprechenden Datenverarbeitungsprogrammen kalibriert und analysiert.

Peptide werden meist als einfach geladene Molekülionen in den MALDI-Spektren detektiert, bei größeren Molekülen können aber auch mehrfach geladene monomere Ionen in den Spektren auftreten. Das einfach geladene Molekülion kann aber meistens leicht identifiziert werden, da es die größte Signalintensität im Spektrum liefert und zwischen den einzelnen Isotopen entsprechend große Massenabstände liegen.

Die Massenspektrometrie dient nicht nur der Bestimmung der Masse von Molekülen, sondern kann auch zur Identifizierung von Proteinen dienen. Die Spektren, sogenannte Massenfingerabdrücke/ *Mass finger prints*, die sich nach einem proteolytischen Abbau von Proteinen in der MALDI-MS-Analyse ergeben, können nach entsprechender Bearbeitung mit geeigneten Softwareprogrammen zur Identifizierung der analysierten Proteine beitragen, indem sie mit geeigneten Proteindatenbanken verglichen werden. Dabei müssen Modifikationen der Proteine – soweit sie bekannt sind – berücksichtigt werden. Mit Hilfe der MALDI-MSMS kann die Aminosäuresequenz bestimmter Peptide eines Spektrums näher analysiert werden und dann im Anschluss ebenfalls mit einer Datenbank verglichen und zur Proteinidentifizierung genutzt werden, falls die MALDI-MS keine eindeutige Identifizierung ermöglichte. Die MALDI-MSMS stellt dabei einen zweiten Analyseschritt im Anschluss an die MALDI-MS dar, in dem einzelne Peptide eines Spektrums auf ihre Aminosäurezusammensetzung hin analysiert werden. Dabei können verschiedene Mechanismen ausgenutzt

werden (*Post source decay, Laser induced dissociation, Collision induced dissociation*).

Posttranslationale Modifikationen der Proteine wie Glykosylierungen können die MALDI-Analyse behindern, da beispielsweise Schnittstellen für die verwendeten Proteasen aufgrund der Verzuckerungen nicht zugänglich sind. Dies führt zu veränderten Peptidspektren und damit zu Problemen bei der Proteinidentifizierung, da keine entsprechenden Übereinstimmungen der Spektren im Vergleich mit Proteindatenbanken gefunden werden können.

Durchführung:

Die über 2D-Gelelektrophorese (3.1.4) aufgetrennten Proteine der *Wash*-Fraktion (3.1.1c) wurden im Anschluss massenspektrometrisch analysiert und identifiziert. Dazu wurden die Proteinspots aus dem Gel ausgestochen, entfärbt und die Proteine durch Trypsin im Gelspot verdaut. Anschließend wurden die Peptide aus den Gelspots eluiert, entsalzt und zusammen mit einer MALDI-geeigneten Matrix als Kokristall auf ein entsprechendes Target aufgetragen. Mit Hilfe eines Massenspektrometers wurden dann proteinspezifische Peptidspektren erstellt, die im Vergleich mit Proteindatenbanken dann zur Identifizierung der Proteine genutzt wurden.

Wichtig für die Aufreinigung der Peptide ist, dass sehr sauber gearbeitet wird, um Verunreinigungen der Probe und damit Verfälschungen des Spektrums und Probleme bei der Proteinanalyse zu vermeiden. Kontaminationen durch Hautschuppen u.ä. sollten durch das Tragen geeigneter Schutzkleidung (Handschuhe etc.) vermieden werden, alle verwendeten Geräte (Pipetten, Spatel) sowie der Arbeitsplatz werden mit Alkohol gereinigt und Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße werden aus neuen Beuteln unautoklaviert entnommen, um Kontaminationen durch Metallionen zu vermeiden, welche durch den Autoklavierprozess an den Plastikwaren haften und so zu Problemen bei der massenspektrometrischen Analyse führen können. Auch sollten alle verwendeten Lösungen hochrein sein und möglichst nur durch Ineinandergießen gemischt werden. Die Verwendung von Glaspipetten wird nicht empfohlen.

Zunächst wurden die Proteinspots mit Hilfe einer Pipettenspitze (1000µl) aus den SDS-Gelen ausgestochen und in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Silbergefärbte Spots (3.1.5e) wurden durch Zugabe von 50µl einer 1:1

Mischung von 30mM Kaliumferrocyanid und 100mM Natriumthiosulfat entfärbt, die Inkubation erfolgte bis zur völligen Entfärbung der Spots. Anschließend wurden die Spots nach Abnahme des Überstandes 3x mit 200µl dH₂O gewaschen und im Folgenden in 50µl 200mM Ammoniumbicarbonat 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in 200µl dH₂O wurden die Spots dann in 50µl 50% Acetonitril inkubiert, bis eine weißliche Färbung der Spots eintrat. Danach wurde der Überstand entfernt und die Spots bei offenem Deckel der Reaktionsgefäße ca. 1,5h bei 37°C im Inkubator getrocknet. Um die Proteine in Peptide zu spalten, wurden dann je 10µl Trypsin (Verdünnung 1:100 in 50mM Ammoniumbicarbonat) zu den Spots gegeben und diese im geschlossenen Reaktionsgefäß über Nacht bei 37°C inkubiert.

Coomassiegefärbte Spots (3.1.5d) wurden ausschließlich in 500µl 0,5% Ammoniumcarbonat/ 50% Acetonitril unter Rotieren und bei Raumtemperatur bis zur Entfärbung der Spots inkubiert. Bei starker Anfärbung wurde die Lösung mehrmals ausgetauscht. Nach der völligen Entfärbung der Spots wurden diese dann wie beschrieben getrocknet und über Nacht verdaut.

Am zweiten Tag wurde überschüssige Trypsinlösung, die nicht von den Gelspots aufgesogen wurde, entfernt und die Spots wurden in 25µl 50% Acetonitril/ 0,1% TFA 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Entfernen überschüssigen Trypsins ist wichtig, da es sonst zu stärkeren Kontaminationen des eigentlichen Peptidgemisches mit Trypsinfragmenten kommt, die durch die Autolyse des Trypsins entstehen und sich ebenfalls später im Spektrum darstellen. Nach der entsprechenden Inkubationszeit (30min) wurden die 25µl 50% Acetonitril/ 0,1% TFA mit den darin eluierten Proteinen in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und verbliebene Peptide erneut in nun 10µl 50% Acetonitril/ 0,1% TFA wie beschrieben aus den Spots eluiert. Beide Eluatfraktionen wurden vereinigt und anschließend in der speed-vac unter Vakuum und Wärmeeinfluß auf ein Volumen von ca. 15µl eingeeengt, wobei das Acetonitril als flüchtige organische Verbindung verdampfte. War die Probe komplett eingedampft, wurde sie in 0,1% TFA resuspendiert. Acetonitril sollte hier nicht verwendet werden, da es die Bindung der Peptide an die Säulenmatrix der *ZipTips* verhindert. Während der Einengung der Proben wurde die Matrix präpariert, wobei eine Spatelspitze der Matrix (α -Cyano-4-Hydroxymizsäure) in 1ml 0,1% TFA/ Acetonitril (100%) (im Verhältnis 2:1

gemischt) aufgenommen und 5min auf dem Vortex gemischt wurde. Überschüssige, nicht resuspendierte Matrix wurde dann durch Zentrifugation bei 13000rpm für 5min pelletiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Matrixlösung in Aliquots von 20µl/Spot aufgeteilt. Anschließend wurden die *ZipTips* equilibriert, indem zunächst 3x 10µl 50% Acetonitril und danach 3x 10µl 0,1% TFA aufgezogen und wieder verworfen wurden. Im Anschluss wurde das Peptidgemisch ca. 10x durch die *ZipTips* aufgezogen, um die Bindung der Peptide an die Säulenmatrix zu gewährleisten. Anschließend wurde die Säule mit 1x 10µl 0,1% TFA gewaschen und danach wurde die Matrixlösung so aufgezogen, dass der Flüssigkeitsspiegel ungefähr in der Mitte zwischen Säulenmatrix und oberem Limit der *ZipTips* stand. Durch das in der Matrixlösung enthaltene Acetonitril wurden die Peptide von der Säule eluiert und konnten zusammen mit der Matrix auf das *Target* aufgebracht werden. Nach Trocknung der Proben wurden die Kokristalle aus Matrix und Peptiden durch MALDI-MS im Bruker Daltonics UltraflexTM Massenspektrometer analysiert. Dabei wurden die Spektren im *reflectron- positive*-Modus mittels einer gepulsten Ionenerzeugung von durchschnittlich 100 Laserschüssen erstellt. Eine externe Kalibrierung erfolgte im Vorfeld durch spezifische Referenzpeptide (Peptidmix II, Bruker Daltonics). Desweiteren wurden die Peptidspektren intern unter Berücksichtigung der durch Autolyse entstandenen Trypsinpeaks (842.5100Da, 2211.1046Da) kalibriert. Die monoisotopen Massen wurden mit der BiotooolsTM- und FlexAnalysisTM-Software bestimmt und bearbeitet und anschließend in das Mascotprogramm (www.matrixscience.com) übertragen, um damit die NCBI-Proteindatenbank nach möglichen Übereinstimmungen zu durchsuchen. Als mögliche Proteinmodifikationen wurden dabei u.a. die Oxidierung von Methioninresten sowie Cysteincarbamidomethylierung angegeben, außerdem wurde eine ungeschnittene Trypsinschnittstelle zugestanden. Eine Massengenauigkeit von 50ppm oder besser wurde in allen Fällen angegeben. Proteinspektren mit keinem oder nicht eindeutigen Ergebnis wurde im Folgenden durch MALDI-MSMS näher analysiert, wobei gezielt für bestimmte *Peaks* der LIFTTM-Modus genutzt wurde, um i-, a-, b- and y-Ionen zu erhalten. Die Massen der fragmentierten Ionen wurden in das Mascot-Programm übertragen und unter bestimmten Parametern (Peptidmassentoleranz von 100ppm, MSMS-Toleranz

von 0,7 Da and 2 unbeachteten Schnittstellen, Modifikationen identisch mit denen für die MALDI-MS) analysiert.

Diese Arbeiten wurden unter Mithilfe von Frau Dr. Delphine Delacour (Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg) und Herrn Dr. Julius Nyalwidhe (AG Prof. Dr. Lingelbach, Institut für Biologie, Philipps-Universität Marburg) sowie Herrn Dr. Jürgen Adamkiewicz (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

3.1.7 Immunoblotanalyse (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981)

Beim Immunoblotting werden die zuvor in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Membran transferiert und dort immobilisiert. Dabei bleibt die lokale Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Es existieren verschiedene Arten von Blotting-Membranen. In diesem Fall wurde Nitrocellulose verwendet, welche die Proteine aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen bindet, d.h. die Proteine binden nicht kovalent und können so gegebenenfalls wieder von der Membran isoliert werden. Um die Proteinbindungsstellen der Membran zu aktivieren, setzt man dem Blotpuffer Methanol zu. Außerdem führt Methanol zur Schwächung der Wechselwirkungen zwischen SDS und Protein und begünstigt so die hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine mit der Blotmembran.

Im Anschluss kann der Blot dann durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern zur Identifizierung bestimmter Proteine genutzt werden. Dabei ist der Erstantikörper spezifisch für das zu detektierende Protein, der Zweitantikörper ist spezifisch für den Erstantikörper, d.h. er erkennt spezifisch die Fc-Domäne der Antikörper, die in einer bestimmten Spezies erzeugt wurden. Der Zweitantikörper hat das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, welches ein Substrat – hier eine Chemilumineszenzlösung (ECL *enhanced chemiluminescence*) – so umsetzt, dass Photonen entstehen, die dann einen Röntgenfilm belichten und so Proteinbanden auf dem Blot sichtbar machen können.

Die Immunoblots wurden nach dem Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt (Elektroblotting). Dafür wurden die Nitrocellulosemembran

(Schleicher & Schüll; Dassel) und zwei 3mm Whatmanpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel) passend zur Gelgröße zurechtgeschnitten und in Blotpuffer (2.12) getränkt. Ein Stapel aus 3mm Whatmanpapier, Membran, SDS-Gel und wieder Whatmanpapier wurde gebildet und in die Blotkammer gelegt, wobei Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen ausgestrichen wurden, um den Proteintransfer nicht zu stören. Der Transfer der Proteine erfolgte für 40min bei einer angelegten Spannung von 12V. Die Proteine wandern in Richtung der Anode.

Es wurden sowohl Minigele als auch große 2D-Gele (ca. 14x14cm) geblottet. Immunoblots der Minigele dienten einerseits der Identifizierung verschiedener Zymogengranulaproteine (RNase A, CEL, Chymase, PPIB) in den verschiedenen Granulasubfraktionen unter Verwendung spezifischer Primärantikörper (2.7), andererseits der Qualitätskontrolle der *Wash*-Fraktion mittels eines anti-Matrix-Antikörpers (2.7). Dazu wurden für Fraktionenblots zwischen 10 und 50µg der jeweiligen Granulasubfraktionen aufgetragen, für die Qualitätskontrolle der *Wash*-Fraktion wurden in der isoelektrischen Fokussierung (3.1.4a) 100µg aufgetrennt. Immunoblots von großen (ca. 14x14cm) 2D-Gelen dienten der Verifizierung der MALDI-MS-Analyse durch den Nachweis der identifizierten Proteine (RNase A, CEL, Chymase, PPIB) in der *Wash*-Fraktion unter Verwendung spezifischer Antikörper. Außerdem wurden Glykoproteine der *Wash*-Fraktion durch die Verwendung von Glykoprotein-färbenden Reagenzien (3.1.9) an Immunoblots nachgewiesen. Dabei wurden in der vorangegangenen 2D-Gelelektrophorese (3.1.4) je 300µg der *Wash*-Fraktion auf großen (14x14cm) 2D-Gelen aufgetrennt und nach Immunoblotting entsprechend analysiert.

3.1.7a Antikörperinkubation der Blots

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Blotmembran zu verhindern, wurde die Membran zunächst 1h bei Raumtemperatur mit 5% Magermilchpulver in 1x PBS abgeblockt. Für die Detektion des zu identifizierenden Proteins wurde die Membran über Nacht bei 4°C (oder 1,5h bei Raumtemperatur) mit dem proteinspezifischen Erstantikörper inkubiert, wobei auf eine gleichmäßige Benetzung des Blots mit der Antikörperlösung zu achten ist. Anschließend wurde die Membran 3x 10min mit 1x PBS gewaschen, um ungebundenen

Antikörper zu entfernen, und etwa 1h bei Raumtemperatur mit einem geeigneten Zweitantikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in den aufgeführten Verdünnungen (in 1x PBS) eingesetzt (2.7).

Nach erneutem Waschen erfolgte der Nachweis mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL), wobei die beiden Reaktionslösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und dann auf den Blot gegeben wurden. Die Meerrettichperoxidase oxidiert das in der ECL-Lösung 1 enthaltene Luminol, welches dadurch in einen angeregten Zustand versetzt wird. Bei der Rückkehr auf das Normalpotential werden Photonen frei, die über einen Röntgenfilm detektiert werden können. Die in ECL-Lösung 2 (Enhancer) enthaltenen Phenole verstärken diese Nachweisreaktion. Die Expositionszeit des Films variierte zwischen 0,5min und 10min, lag meistens aber bei 3min. Der belichtete Röntgenfilm wurde dann entwickelt und fixiert.

Die densitometrische Auswertung der Bandenintensität von Immunoblots erfolgte mit der „Gel Pro Analyzer“-Software. Unterschiede in der geladenen Proteinmenge wurden durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors in den weiteren Berechnungen berücksichtigt.

3.1.8 Herstellung eines Lysats aus Zungengewebe der Ratte zur Verwendung in der SDS-PAGE und Immunoblotanalyse

Das in flüssigem Stickstoff gefrorene Rattenzungengewebe wurde unter ununterbrochener Kühlung durch flüssigen Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert und anschließend in SDS-Probenpuffer ((2.12) inklusive DTT und β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Danach wurde die Probe mehrmals aufgeköcht und eingefroren sowie mehrmals durch eine Spritze mit einer 20G-Kanüle gezogen, wodurch es zur Homogenisation der Probe und Zelllyse kam. Eventuell verbliebene Zelltrümmer wurden kurz abzentrifugiert, der Überstand wurde gesammelt. Ein Teil des Überstandes wurde wesselgefällt, das Pellet anschließend in SDS-Probenpuffer (2.12) resuspendiert und die Proteinkonzentration mittels des Proteinassays der Firma Biorad (2.8) bestimmt. Anschließend wurde die Probe zur SDS-PAGE (3.1.4c) und anschließender Immunoblotanalyse (3.1.7) verwendet. Diese Probe diente als Positivkontrolle für Immunoblots von Zymogengranulasubfraktionen, die auf das

Vorhandensein und die Verteilung der Rattenproteine Chymase (RMCP-1) und β 1-Tryptase untersucht wurden.

3.1.9 Färbung von Glykoproteinen der *Wash*-Fraktion im SDS-Gel oder nach Blotten auf Nitrocellulose

Um die Proteine der *Wash*-Fraktion näher zu charakterisieren und postranslationale Modifikationen der Proteine zu analysieren, wurden verschiedene Kits verwendet, die Glykoproteine entweder direkt im SDS-Gel oder nach Blotten auf Nitrocellulose anfärben. Dazu wurden die Proteine wie beschrieben (3.1.4) 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet (3.1.7). Im Anschluss daran wurden die nachfolgend aufgeführten Methoden ausgetestet.

3.1.9a Färbung von Glykoproteinen im SDS-Gel mit dem *Glycoprofile III Fluorescent Glycoprotein Detection Kit* (Firma Sigma Aldrich)

Das Prinzip dieses Kits liegt in der Oxidierung von Zuckern zu Aldehyden durch Perjodat und die anschließende Reaktion dieser Aldehyde mit einem hydrazingekoppelten Farbstoff zu einem fluoreszierenden Konjugat. So sollen Glykoproteine spezifisch und sensitiv im SDS-Gel dargestellt werden können. Gegenüber der klassischen Anfärbung von Glykoproteinen mit PAS (*Periodic Acid/Schiff-Reagenz*) mit einer Nachweisgrenze von 25ng-100ng Carbohydrat liegt die Nachweisgrenze dieser Reaktion bei 5ng-25ng und besitzt somit eine deutliche höhere Sensitivität.

Das zu färbende SDS-Gel wurde 1h bei Raumtemperatur in 3% Essigsäure/50% Methanol unter leichtem Schütteln fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung verworfen und das SDS-Gel 2x 30min mit dH₂O gewaschen. Dann wurde das im Kit enthaltene Oxidationsreagenz 1:10 mit dH₂O verdünnt und im Anschluss wurde das Gel 20min unter leichtem Schütteln in der Oxidationslösung inkubiert. Der Oxidationsschritt und alle folgenden Reaktionsschritte wurde unter Ausschluss von Licht durchgeführt. Nach der Oxidation wurde das SDS-Gel 5min in dH₂O gewaschen und im Anschluss daran für 60–90min in der Färbelösung inkubiert, wobei die mitgelieferte

Stocklösung zuvor 1:100 im entsprechenden Puffer verdünnt wurde. Längere Färbezeiten erhöhen den Hintergrund und sind deshalb nicht zu empfehlen. Es folgten wiederum 2 Waschschriffe von je 30min in dH₂O, danach konnten die glykosylierten Proteine als gelbliche Spots mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Chemilux Imager) bei einer emittierten Wellenlänge von 312nm im Gel sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurde nachfolgend eine Coomassiefärbung durchgeführt (3.1.5d), um alle Proteine sichtbar zu machen und die Spezifität der Glykoproteinfärbung festzustellen.

3.1.9b Färbung von Glykoproteinen im SDS-Gel mit dem *Multiplexed Proteomics Glycoprotein Gel Stain Kit* (Firma Molecular Probes)

Diese Technik ermöglicht die Färbung von Glykoproteinen und der gesamten Proteinfraction in ein und demselben SDS-Gel und ist außerdem kompatibel mit massenspektrometrischen Analysen. Es werden ein sogenannter *Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Stain* und ein hoch sensitiver *Sypro Ruby Protein Gel Stain* kombiniert, wobei durch *ProQ Emerald 300* nur die Glykoproteine angefärbt werden, *Sypro Ruby* dagegen alle aufgetrennten Proteine anfärbt.

(1) Glykostain mit *ProQ-Emerald 300*

Der Glykoprotein-*Stain* basiert darauf, dass cis-Glykole durch Perjodat zu Dialdehyden oxidiert werden und im Anschluss ein hydrazid-basierter Farbstoff unter Wasserausschluss so mit den Aldehydgruppen reagiert, dass eine kovalente Bindung zwischen Farbreagenz und Zuckergruppen entsteht. Durch Anregung mit UV-Licht werden diese Verbindungen dann als deutlich grün-fluoreszierende Signale sichtbar. Glykoproteine können so im SDS-Gel sichtbar gemacht werden, wobei die Nachweisgrenze dabei bei 0,5ng Glykoprotein pro Bande oder Spot liegt und damit bis zu 50-fach höher ist als bei anderen Reaktionen. Allerdings variiert die Nachweisgrenze in Abhängigkeit von der Art und Ausprägung der Verzuckerung des entsprechenden Proteins.

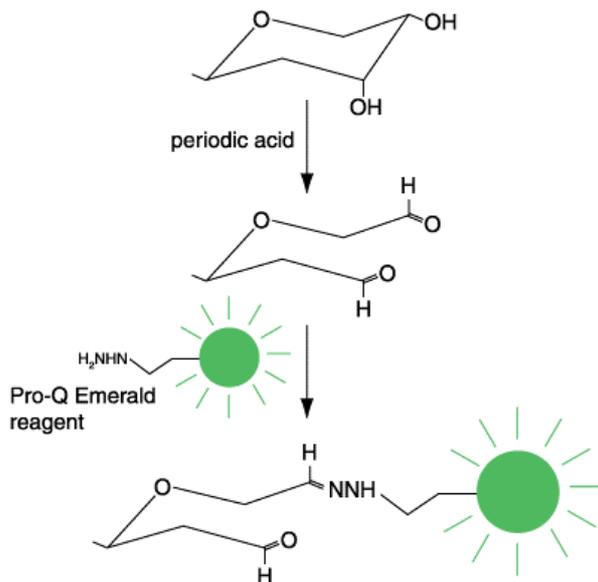


Abb. 3.7:

Prinzip des Pro-Q Emerald Glykostains (entnommen aus dem Manual des Kits)

Das zu färbende SDS-Gel wurde 2x 45min in 50% Methanol/ 5% Essigsäure bei Raumtemperatur und unter Schütteln fixiert, anschließend wurde das Gel 2x 15min in 3% Essigsäure unter Schütteln gewaschen. Die Erneuerung des Fixans und die Waschschrte dienen dazu, SDS restlos aus dem Gel zu entfernen, da zurückbleibendes SDS die Qualität des *Glykostains* mindert.

Im Folgenden wurde das Gel in 1%Perjodat/ 3% Essigsäure 1h unter leichtem Schütteln inkubiert, wodurch die Zuckergruppen der Glykoproteine wie beschrieben oxidiert wurden. Nach diesem Oxidationsschritt wurde das Gel 4x 15min in 3% Essigsäure gewaschen, um verbliebene Oxidanzien zu entfernen, da auch diese Rückstände mit der Färbelösung interferieren und so die Güte der Färbung beeinträchtigen können.

Im Anschluss an die diversen Waschschrte wurde das Gel unter Ausschluss von Licht 2,5h in der Färbelösung (Komponenten *ProQ-Emerald 300* und *Staining Buffer* sind im Kit enthalten, Lösung wurde nach Protokoll unter Zusatz von Dimethylformamid (DMF) angesetzt) inkubiert, eine Färbung über Nacht wird nicht empfohlen. Durch 2 weitere Waschschrte von je 15min in 3% Essigsäure wurde überschüssige Färbelösung entfernt und eine Anfärbung des Hintergrundes minimiert. Glykosylierte Proteine wurden mittels UV-Licht detektiert. Das Anregungsmaximum für *ProQ Emerald 300* liegt bei 280nm, das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 530nm .

(2) Gesamtproteinfärbung mit *Sypro Ruby Protein Gel Stain*

Im Anschluss an die Färbung der Glykoproteine und deren Dokumentation wurde dasselbe SDS-Gel mit dem *Sypro Ruby Protein Gel Stain* gefärbt, um alle aufgetrennten Proteine ungeachtet ihrer Modifikationen anzufärben. Die Färbung lässt sich auch ohne vorherigen *Glykostain* zur Anfärbung von Proteinen im SDS-Gel verwenden und wurde parallel zu verschiedenen Coomassie- und Silberfärbungen als alternative Färbung ausgetestet.

Sypro Ruby Protein Gel Stain färbt hochsensitiv verschiedene Arten von Proteinen, auch jene, die ansonsten schwierig anzufärben sind. Die Methode ist kompatibel mit massenspektrometrischen Analysen und anderen proteinanalytischen Verfahren. *Sypro Ruby* bindet im SDS-Gel an SDS-Protein-Komplexe und macht sie nach Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge (zwei Anregungswellenlängen: ~ 300nm oder ~ 480nm) als orange leuchtende Banden bzw. Spots sichtbar.

Alternativ zur Analyse mittels eines UV-Tisches kann auch ein Laserscanner (hier: Typhoon Trio, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) verwendet werden. Die Sensitivität dieser Färbemethode liegt im Bereich der einer Silberfärbung, manchmal auch höher. Große Vorteile dieser Methode liegen auch darin, dass sie sich mit verschiedenen anderen Färbemethoden (z.B. für Glyko- oder Phosphoproteine) kombinieren lässt und einfach und schnell durchführbar ist.

Durchführung

Das zu färbende SDS-Gel wurde unter leichtem Schütteln 2x 30min in 40% Methanol/ 10% Trichloressigsäure fixiert, wobei das Fixans zwischen beiden Schritten erneuert wurde. Dieser Fixierungsschritt entfiel, wenn *Sypro Ruby* als Proteinfärbung im Anschluss an eine vorangegangene Färbung eingesetzt wurde (z.B. *Glykostain* mit *ProQ Emerald 300*). Stattdessen wurde das Gel dann 2x 5min in dH₂O gewaschen. Anschließend wurde das SDS-Gel in der Färbelösung (*ready-to-use*; im Kit enthalten) über Nacht bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln unter Lichtausschluss inkubiert. Um eine Hintergrundfärbung zu minimieren, wurde das SDS-Gel in eine neue, saubere Schale überführt und 30min in 10% Methanol/ 7% Essigsäure gewaschen. Um korrosive Schäden an UV-Tisch oder Laserscanner (hier: Typhoon Trio, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) zu verhindern, wurde

das SDS-Gel im Anschluss 2x 5min in dH₂O gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Analyse.

3.1.9c Färbung von Glykoproteinen nach Blotten auf Nitrocellulose mit dem *DIG Glycan Detection Kit* (Firma Roche)

Die Zuckergruppen von Glykokonjugaten werden bei diesem Prinzip durch milde Perjodatbehandlung zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese Aldehydgruppen binden dann kovalent über eine Hydrazidgruppe an Digoxigenin, welches über Digoxigenin-spezifische, an alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper gebunden werden kann. Die gebundene alkalische Phosphatase setzt dann ein geeignetes Substrat (NBT/X-Phosphat, Roche) zu einem Farbstoff um, der sich auf dem Immunoblot niederschlägt und so indirekt die Position von Glykoproteinen markiert.

Es wurde Protokoll B der Vorschrift verwendet. Alle Reaktionsschritte wurden unter leichtem Schütteln und bei Raumtemperatur durchgeführt (mit Ausnahme der Färbereaktion, bei der nicht geschüttelt werden sollte).

Durchführung:

Zunächst wurden 300µg einer *Wash*-Fraktion mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender SDS-PAGE (3.1.4) aufgetrennt und durch Elektroblothing auf Nitrocellulose transferiert (3.1.7). Der Blot wurde im Anschluss zunächst in 1x Phosphatpuffer (50mM Kaliumphosphat, 150mM NaCl, pH 6,5) gewaschen, dann erfolgte die Oxidationsreaktion mit 10mM Natriumperjodat in 100mM Natriumacetatpuffer pH 5,5 für 20min. Anschließend wurde der Blot 3x 10min in 1x Phosphatpuffer gewaschen und nachfolgend 1h mit dem Digoxigeninkonstrukt inkubiert (DIG-3-0-succinyl-ε-aminocaprinsäurehydrazid in Natriumacetatpuffer pH 5,5; im Kit enthalten und nach Angaben des Herstellers eingesetzt). Im Folgenden wurde der Blot 3x mit 1x TBS (0,05M Tris-HCl, 0,15M NaCl, pH 7,5) gewaschen; TBS stört die Digoxigenin-Markierung und wird deshalb in den vorangegangenen Schritten durch Phosphatpuffer ersetzt. Daran anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen für den nachfolgenden anti-Digoxigenin-Antikörper durch eine 30minütige Inkubation des Blots in der Blockierungslösung (im Kit enthalten, 1:10 in 1x TBS verdünnt) abgeblockt. Danach wurde der Blot 3x 10min mit 1x

TBS gewaschen und im Anschluss 1h in der Antikörperlösung (10µl Konjugat (im Kit enthalten) pro 10ml 1x TBS) inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten von je 10min mit 1x TBS erfolgte die Färbereaktion ohne Schütteln in Tris-Puffer (0,1M Tris-HCl (pH 9,5), 0,05M MgCl₂, 0,1M NaCl) mit NBT/X-phosphat-Lösung (200µl NBT/X-Phosphat-Lösung pro 10ml Tris-Puffer). Dabei bildete sich innerhalb einiger Minuten ein grau-schwarzer Niederschlag auf dem Blot. Die Reaktion wurde anschließend durch Waschen des Blots in dH₂O abgestoppt, der Blot auf Papiertüchern getrocknet und das Ergebnis dokumentiert.

3.1.10 Deglykosylierung von N-glykosylierten Glykoproteinen mit PNGase F

Um die mit dem *DIG Glycan Detektion Kit* identifizierten Glykoproteine näher zu charakterisieren und Probleme dieser Proteingruppe bei der massenspektrometrischen Analyse zu beseitigen (die sich so äußerten, dass für manche Proteinspots trotz guter Spektren kein Protein identifiziert werden konnte), wurde die *Wash*-Fraktion mit PNGase F verdaut, um N-glykosidisch gebundene Zucker von den Proteinen abzuspalten. Dazu wurde rekombinante PNGase F aus *Flavobacterium meningosepticum* verwendet, eine Amidase, die das Zuckergerüst zwischen dem innersten N-Acetylglucosaminmolekül und dem Asparaginrest der Polypeptidkette spaltet.

Durchführung

600µg einer *Wash*-Fraktion wurden für den Verdau eingesetzt und entweder mit dem *Protein Extract Kit* der Firma Calbiochem (3.1.3c) oder mit TCA (3.1.3a) gefällt. Das Pellet wurde in 400µl 1x *Glycoprotein Denaturing Buffer* (5% SDS, 0,4M DTT; im Kit enthalten) resuspendiert und 10min bei 100°C inkubiert. Anschließend wurden je 1/10 Volumen 10x *Reaction Buffer* (0,5M Natriumphosphat pH 7,5) und 10% NP40 (im Kit enthalten; je 40µl) zugesetzt und danach der Ansatz in 2 gleiche Teile geteilt. Ein Teil diente als Negativkontrolle und wurde genauso weiterbehandelt wie der eigentliche Versuchsansatz, enthielt aber kein Enzym. Der zweite Ansatz wurde mit 5µl PNGase F versetzt und beide Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Als weitere Kontrolle diente das Glykoprotein Transferrin (entnommen aus dem

DIG Glycan Detektion Kit), welches ebenfalls in zwei parallelen Ansätzen (mit und ohne PNGase, je 50µg Transferrin pro Ansatz) untersucht wurde, um die Funktionalität des Enzyms nachzuweisen.

Im weiteren Verlauf wurden die Ansätze der *Wash*-Fraktionen wie beschrieben über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.1.4), anschließend geblottet (3.1.7) und mit dem DIG Glycan Detektion Kit (3.1.9c) in Bezug auf Veränderungen im Proteinmuster (z.B. Molekulargewichtsverschiebungen) untersucht. Die Transferrinansätze wurden in der zweiten Dimension als Kontrolle am Rand des Gels aufgetragen.

3.2 Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Methoden

3.2.1 Anfertigung von Kryoschnitten von Rattenpankreasgewebe

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurde Rattenpankreasgewebe post mortem entnommen und direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die Einfrierdauer muß hierbei möglichst kurz gehalten werden, um Gefrierartefakten vorzubeugen. Dazu wird zunächst ein Behälter mit Isopentan in den Stickstoffbehälter eingehängt, wobei das Isopentan sich verfestigt. Bei Zugabe des Gewebes nimmt das Isopentan die Wärme des Gewebes auf und verflüssigt sich wieder, wodurch die Bildung einer Gasphase vermieden wird, die das Eindringen des Stickstoffs in das Gewebe behindern und so die Einfrierzeit verlängern würde. Somit kann der Stickstoff das Gewebe schnell durchdringen und die Bildung von Eiskristallen oder anderen Artefakten wird vermieden. Das eingefrorene Gewebe kann dann bei -80°C gelagert werden.

Die gefrorenen Gewebe wurden auf Korkplättchen aufgefroren. Anschließend wurden mit Hilfe eines Kryostaten Gefrierschnitte (ca. 5µm dick) von den Geweben angefertigt, die mit Aceton bzw. Paraformaldehyd fixiert (10min, 4°C) und anschließend bei -20°C aufbewahrt wurden. Diese Schnitte wurden dann für die Immunfluoreszenz eingesetzt. Diese Arbeiten wurden unter besonderer Mithilfe von Frau Waltraud Ackermann am Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

3.2.2 Immunfluoreszenz an Kryoschnitten

Für die Immunfluoreszenz wurden die fixierten Kryoschnitte aufgetaut, 10min mit 0,2% TritonX100 permeabilisiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Dann wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 1% BSA (in 1x PBS) 20min bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit zwei Erstantikörpern koinkubiert, einem Schaf-anti-Chymase-Antikörper in der Verdünnung 1:100 und einem Kaninchen-anti-Carboxypeptidase-Antikörper in der Verdünnung 1:1000. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1,5h . Danach wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen mit 1x PBS entfernt. Daran anschließend erfolgte die Inkubation mit den geeigneten fluoreszierenden Zweitantikörpern Esel-anti-Schaf-TRITC (Verdünnung 1:100 in 1x PBS) und Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488 (Verdünnung 1:600 in 1x PBS) für 50min bei Raumtemperatur. An manchen Schnitten wurde zusätzlich eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff in einer Verdünnung von 1:2000 für 5min bei Raumtemperatur durchgeführt (nicht gezeigt). Nach Waschen der Schnitte in 1x PBS und dH₂O wurden die Schnitte mit Mowiol/n-propyl-Gallat auf Objektträger übertragen. Die Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und bei 4°C dunkel gelagert.

Diese Arbeiten wurden unter Mithilfe von Frau Waltraud Ackermann am Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

3.2.3 Elektronenmikroskopie (Lottspeich und Sorbas, 1998)

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Präparaten wird die extrem kurze Wellenlänge von Elektronen und die damit verbundene hohe Auflösungsfähigkeit entsprechender Mikroskope benutzt. Die Elektronen durchstrahlen das Objekt und werden dann zur Abbildung des Objekts genutzt, ähnlich dem Einsatz von Licht in der Lichtmikroskopie. Für den Einsatz von Elektronen benötigt man eine aufwendige Apparatur. Wichtig ist unter anderem der Aufbau eines Vakuums im Gerät, damit die mittlere freie Wellenlänge der Elektronen groß genug wird und es nach dem Objektdurchgang nicht zu einer Ablenkung der Elektronen aufgrund von Interaktionen mit Gasmolekülen kommt. Zudem ist bei dieser Methode eine adäquate Probenaufbereitung (Fixieren, Entwässern, Einbetten, Kontrastieren) sehr wichtig, um

Trocknungsartefakte zu vermeiden, die durch das im Gerät herrschende Vakuum entstehen können. Für die Elektronenmikroskopie werden die Gewebe in Kunstharz eingebettet und Ultradünnschnitte mit einer Dicke von $\leq 70\text{nm}$ hergestellt, damit die Elektronen die Schnitte gut durchdringen können. Als Objektträger für die Schnitte dienen spezielle Kupfernetze.

3.2.3a Einbettung in Lowicryl – K4M zur Immuno-Elektronenmikroskopie

Diese Einbettungsmethode in Lowicryl–K4M (Polyscience Ltd., Eppenheim) hat den Vorteil, dass die Antigenstrukturen der Proteine besser erhalten bleiben als bei der Einbettung in Epon. Die Membranstruktur wird außerdem durch den Einsatz von Tannin verstärkt. Uranylacetat wird hier erst nach der Immunolokalisation der gesuchten Proteine eingesetzt, um die Bindungsstellen für die verwendeten Antikörper zu erhalten.

Die Gewebe von Rattenpankreas und Rattenzunge wurden nach der Entnahme fixiert. Dazu wurde das Zungengewebe 2h bei Raumtemperatur in 1% (w/v) Glutaraldehyd inkubiert, das Pankreasgewebe wurde zunächst 2h in 2% PFA und im Anschluss daran 1h in 0,1% Glutaraldehyd fixiert. Daran anschließend wurden die Gewebe 3x 10min mit Cacodylatpuffer (0,1M Dimethylarsinsäure-Natriumsalz pH 7,35) gewaschen. Im Folgenden wurden die Gewebe in 1% (v/v) Tanninsäure/0,05M Cacodylatpuffer 1h bei Raumtemperatur inkubiert, dann erneut in Cacodylatpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100%) für jeweils 2x 10min entwässert. Die Proben wurden dann in 100% Ethanol/K4M im Verhältnis 1:1 für 15min inkubiert, gefolgt von 2x 30min in K4M und einer anschließenden Inkubation in K4M bei 4°C über Nacht. Danach wurden die so behandelten Gewebeproben in Beem–Kapseln gegeben, diese mit K4M gefüllt und bei –20°C 72h unter UV–Licht zur Polymerisation des Harzes inkubiert. Im Anschluss wurden von den Präparaten Ultradünnschnitte hergestellt, die auf Kupfernetze aufgebracht und anschließend immunhistochemisch gefärbt wurden. Dabei wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 1% BSA (in 1x PBS) für 30min abgesättigt und anschließend der Ziege-anti-Chymase-Antikörper (2.7) in einer Verdünnung von 1:100 (in 0,5% (w/v) BSA/1x PBS) 1h bei Raumtemperatur auf beiden Gewebetypen eingesetzt, um die Chymase (RMCP-1) in den Zymogengranula des Rattenpankreas und den Mastzellgranula der Zunge zu lokalisieren, wobei die Zungenschnitte als Positivkontrolle für das

Pankreasexperiment dienen. Danach wurden die Schnitte in dH₂O gewaschen und im Anschluss 1h mit Protein A-Gold (1:60 15nm Protein A-Gold in 0,5% (w/v) BSA/1x PBS) inkubiert, danach gewaschen und getrocknet. Nachfolgend wurden die Schnitte dann mit Uranylacetat (0,3% (w/v) Uranylacetat in 50mM Maleatpuffer pH 5) 5min inkubiert, in dH₂O gewaschen und mit Bleicitrat (1,33g P(NO₃)₂ plus 1,76g Na₃(C₆H₅O₇)x 2H₂O, ad 30ml dH₂O; plus 8ml 1N NaOH, ad 50ml dH₂O) kontrastiert. Nach dem Trocknen der Schnitte erfolgte die elektronenmikroskopische Auswertung.

Die Aufarbeitung der Proben und die Durchführung der Elektronenmikroskopie wurden unter besonderer Mithilfe von Frau Brigitte Agricola am Institut für Zellbiologie und Zellpathologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

3.2.3b Einbettung in Epon mit anschließender Immunlokalisation

Rattenpankreasgewebe wurde nach der Entnahme 2h in ITO-Fixans (2,5% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd, 0,05% Pikrinsäure, 0,1M Dimethylarsinsäure-Natriumsalz pH 7,35) fixiert. Danach wurde das Gewebe 3x mit Cacodylatpuffer (0,1M Dimethylarsinsäure-Natriumsalz pH 7,35) gewaschen und anschließend in Osmiumtetroxid (1% (w/v) OsO₄, 1,5% (w/v) Kaliumhexacyanoferrat) ein zweites Mal 1h bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei Waschschritten in dH₂O erfolgte die Blockkontrastierung mit Uranylacetat (0,3% (w/v) Uranylacetat, 50mM Maleatpuffer pH 5) für 1h bei 4°C. Im Anschluss daran wurden die Proben durch Zugabe eines äquivalenten Volumens 50% Ethanol für 10min, kurze Abzentrifugation und anschließende Inkubation der Probe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100%; je 10min) entwässert. Danach erfolgte die Behandlung mit Propylenoxid für 2x 10min, anschließend 1h mit Propylenoxid/Epon (1:1) (Epon: 62ml Glycidether, 100ml 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (Lösung A); 100ml Glycidether, 89ml Methyladicanhydrid (Lösung B); A und B 1:1 mischen; 0,2ml Lösung C (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol) auf 10ml Mischung AB) und danach über Nacht in Epon. Die Proben wurden daran anschließend in Gelatine kapseln gegeben, diese mit Epon gefüllt und bei 60°C für 48h auspolymerisiert. Vom eingebetteten Gewebe wurden Ultradünnschnitte angefertigt und auf Kupfernetze aufgebracht. Für die Immunlokalisation wurden

die Schnitte 5min in 10% H₂O₂ (v/v) angeätzt, in dH₂O gewaschen und unspezifische Antikörperbindungsstellen 30min mit 1% BSA /w/v) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Anti-ZG16p-Antikörper (2.7) für 1h. Nach dem Waschen in dH₂O wurden die Schnitte mit Protein-A-Gold-Partikeln (10nm) 1h inkubiert und nach einem weiteren Waschschrift getrocknet. Am folgenden Tag wurden sie dann mit Bleicitrat (1,33g P(NO₃)₂ plus 1,76g Na₃(C₆H₅O₇)x 2H₂O, ad 30ml dH₂O; plus 8ml 1N NaOH, ad 50ml dH₂O) kontrastiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben mit dem *RNeasy Protect Mini Kit* (Fa. QIAgen)

Mit Hilfe des *RNeasy Protect Mini Kits* (Fa. QIAgen) wurde Gesamt-RNA aus AR42J-Zellen sowie aus Rattenpankreasgewebe (von gefasteten und Foy-gefütteten Ratten) und Rattenzungengewebe isoliert. Die Zellen und das Gewebe wurden entweder nach Gewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Nutzung bei -80°C gelagert oder sofort zur RNA-Gewinnung genutzt.

Das Kit basiert darauf, dass Zellen bzw. Gewebe in einem Guanidinisothiocyanat-Puffer lysiert und homogenisiert werden, der RNAsen inaktiviert. Durch Zugabe von Ethanol werden geeignete Bedingungen geschaffen, um die RNA an die spezielle Silika-Säulenmatrix zu binden. Die Matrix bindet RNA-Moleküle, die eine Größe von mehr als 200bp besitzen, so dass es trotz der Isolation von Gesamtzell-RNA zu einer selektiven Anreicherung von mRNA kommt, da viele RNA-Moleküle (rRNA,tRNA) durch diese Größenbeschränkung selektiv ausgeschlossen werden. Eventuelle Kontaminationen werden nach Bindung der RNA an die Membran durch geeignete Waschpuffer entfernt, anschließend wird die RNA in Wasser eluiert.

Zu Beginn wurden der Arbeitsplatz sowie sämtliche benutzte Geräte mit Ethanol gereinigt. Mörser und Pistill sowie benutzte Spatel wurden sterilisiert bzw. mit 3% H₂O₂ RNasefrei gemacht. Spitzen und Reaktionsgefäße wurden stets frisch autoklaviert. Das Gewebe wurde nach Angaben des Herstellers mit Mörser und

Pistill unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert, in Lysispuffer aufgenommen und mit Hilfe einer Spritze mit einer 20G-Kanüle durch mehrfaches Aufziehen lysiert und homogenisiert. Bei Zellpellets entfiel das Zerkleinern im Mörser. Anschließend wurde das Protokoll entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Elution der RNA mit DEPC-Wasser in zwei Durchgängen von je 30µl erfolgte. Die Bestimmung der RNA-Konzentration im Eluat erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260nm. Die gewonnene RNA wurde benutzt, um durch reverse Transkription (3.3.2) cDNA-Banken der entsprechenden Gewebe zu gewinnen, die dann nachfolgend in der PCR und teilweise zur Klonierung der Chymase (RMCP-1) (3.3.3) verwendet wurden.

3.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription synthetisiert eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die reverse Transkriptase, einen DNA-Strang, der komplementär zu einem vorhandenen mRNA-Strang ist. Diese Polymerase wurde erstmals in Viren entdeckt und nachfolgend aus diesen isoliert. Man unterscheidet reverse Transkriptasen aus dem *avian myoblastosis virus* (AMV-RT) und dem *moloney murine leukimea virus* (MMLV-RT), wobei die AMV-RT sowohl RNA- als auch DNA-abhängig DNA synthetisiert, die MMLV-RT dagegen eine rein RNA-abhängige Polymerase darstellt. Die Enzyme unterscheiden sich ein wenig in der optimalen Arbeitstemperatur sowie der intrinsischen RNase-H-Aktivität. Beides ist bei MMLV-RT niedriger bzw. geringer ausgeprägt, was einerseits zu Problemen bei der Auflösung sekundärer Strukturen in der *Template*-RNA führen kann, andererseits aber aufgrund der geringeren RNase-Aktivität längere cDNA-Transkripte möglich macht.

Die bei der Reaktion entstehende DNA wird als cDNA (complementary DNA) bezeichnet, die im Gegensatz zur genomischen DNA keine Introns, sondern nur noch kodierende Sequenzen enthält. cDNA eignet sich deshalb sehr gut zur Klonierung eines Gens, da man sie als Vorlage bei einer PCR verwenden kann. Außerdem kann die vorhandene mRNA für ein bestimmtes Protein auch quantitativ erfasst werden, da die Anzahl von Kopien des betreffenden cDNA-Moleküls der Anzahl an Kopien der entsprechenden mRNA proportional ist.

Als Primer wird ein Oligo-dT-Konstrukt verwendet, das an den komplementären Poly-A-Anhang am 3'-Ende der mRNA bindet und so den Synthesestartpunkt festlegt.

Durchführung

Die reverse Transkription wurde mit isolierter RNA aus Pankreasgewebe gefasteter sowie Foy-gefütterter Ratten, RNA aus Rattenzungengewebe sowie RNA aus AR42J-Zellpellets durchgeführt und die cDNA anschließend für die PCR (3.3.3) verwendet.

Reaktionsansatz: 5µg isolierte RNA
1µl reverse Transkriptase (MMLV-RT)
1,25µl Oligo-dT-Primer
0,6µl dNTPs (400nM)
3µl 10x Reaktionspuffer (enthält MgCl₂)
1µl RNase Block
ad 30µl DEPC-H₂O

Alle Arbeitsgeräte sowie der Arbeitsplatz wurden vor Beginn gründlich mit Ethanol gereinigt und es wurden nur frisch autoklavierte Spitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Die Reaktion erfolgte 10min bei Raumtemperatur, anschließend 60–90min unter leichtem Schütteln bei 42°C im Thermoblock und wurde dann durch Inkubation bei 99°C für 5min abgestoppt. Anschließend wurde die synthetisierte cDNA auf Eis gelagert und später bei –20°C eingefroren.

3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Theoretische Einführung

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird eine bestimmte DNA-Sequenz mit Hilfe spezifischer Primer gezielt amplifiziert. Primer sind synthetisch hergestellte einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von 18-35bp, die unter geeigneten Bedingungen an komplementäre einzelsträngige DNA-Sequenzen binden können. Indem man zwei Primer so wählt, dass jeweils einer an das 3'-Ende eines der beiden komplementären DNA-Einzelstränge binden

kann, lässt sich mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase die zwischen beiden Primern liegende DNA-Sequenz gezielt amplifizieren. Neben der Festlegung der zu amplifizierenden Sequenz dienen die Primer der Polymerase auch als Bindungsstelle an die DNA, da das Enzym prinzipiell nur vorhandene doppelsträngige DNA in 5`-3`-Richtung verlängert und somit eine kurze Sequenz doppelsträngiger DNA mit einer freien 3`-OH-Gruppe als Startpunkt benötigt.

Zusätzlich zur Polymerase und den reaktionsspezifischen Primern werden zur Durchführung der Reaktion geeignete Pufferbedingungen für die Polymerase, Desoxyribonukleotide zur Verlängerung der DNA sowie das zu amplifizierende *Template* benötigt. Durch Veränderung der Salzkonzentrationen im Reaktionspuffer sowie geeignete Zusätze kann die Ausbeute an amplifizierter DNA optimiert werden. So beeinflusst $MgCl_2$ sowohl die Enzymaktivität als auch das *Primerannealing* u.a.. Zusätze wie DMSO können die Amplifikation GC-reicher Regionen verbessern, Glycin kann die Reaktion beschleunigen. Detergenzien in der *Template*-DNA sollten vermieden werden, da sie die Reaktion hemmen.

Die eigentliche Reaktion erfolgt in einem *Thermocycler*, der die verschiedenen Reaktionsschritte – Denaturierung des DNA-Doppelstranges, *Primerannealing* und Elongation der DNA-Sequenz – in der gewünschten Zyklenzahl durchführt. Die Wiederholung der verschiedenen Reaktionsschritte führt zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz. Die Denaturierung von DNA ist ein schneller Prozess, der schon bei Temperaturen von 70°C einsetzt, normalerweise aber bei 94°C erfolgt, um die Denaturierungszeit möglichst kurz und damit Schäden an Polymerase, *Template* und Nukleotiden möglichst gering zu halten. Abhängig von der eingesetzten Polymerase kann diese Temperatur auch noch graduell erhöht werden. Die *Annealingtemperatur* richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer, die von der Nukleotidzusammensetzung des Primers und seiner Sequenz abhängt, und ist somit reaktionsspezifisch. Da die Schmelztemperatur nur angibt, bei welcher Temperatur 50% des Primers nicht mehr an das *Template* binden, nicht aber, wann der Primer zuverlässig hybridisiert, sollte die *Annealingtemperatur* ca. 5 – 10°C unterhalb der Schmelztemperatur gewählt werden. Die Elongationstemperatur ist enzymespezifisch, sie beträgt meist 72°C

oder 68°C. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz, üblicherweise 0,5 – 1min/kb, bei Taq-Polymerasen bzw. 2min/kb bei Proofreading-Polymerasen.

Zur Überprüfung der PCR wird der Reaktionsansatz auf ein horizontales Agarosegel (3.3.6) aufgetragen, wobei die Prozentigkeit des Gels in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente ausgewählt wird. Die DNA kann gegebenenfalls aus dem Gel extrahiert und für weitere Experimente genutzt werden.

Durchführung

PCR von Chymase und Tryptase β 1 (sowie Amylase und GAPDH als Kontrollen):

<u>Versuchsansatz:</u>	2 bzw. 5 μ l <i>Template</i> cDNA 0,5 μ l up-Primer 0,5 μ l down-Primer 5 μ l 10x Polymerasepuffer 1 μ l dNTPs (400nM) 1 μ l Taq-Polymerase ad 50 μ l dH ₂ O	<u>Programm:</u>	94°C 1min 94°C 30sec 53°C 30sec } x24 72°C 1min 72°C 5min 4°C Pause
------------------------	--	------------------	--

PCR Chymase (RMCP-1) zur Klonierung in pcr2.1 TOPO:

<u>Versuchsansatz:</u>	5 μ l cDNA (Rattenzunge) 0,5 μ l up-Primer 0,5 μ l down-Primer 5 μ l 10x Polymerasepuffer 1 μ l dNTPs (400nM) 1 μ l Taq-Polymerase ad 50 μ l dH ₂ O	<u>Programm:</u>	94°C 1min 94°C 30sec 53°C 30sec } x29 72°C 2min 72°C 5min 4°C Pause
------------------------	--	------------------	--

PCR von PPIB (Peptidyl-Prolyl-Isomerase B) (sowie Amylase und GAPDH als Kontrollen):

<u>Versuchsansatz:</u>	2 bzw. 5µl <i>Template</i> cDNA 0,5µl up-Primer 0,5µl down-Primer 5µl 10x Polymerasepuffer 1µl dNTPs (400nM) 1µl Taq-Polymerase ad 50µl dH ₂ O	<u>Programm:</u>	94°C 1min 94°C 30sec 51°C 30sec } x24 72°C 90sec } 72°C 5min 4°C Pause
------------------------	---	------------------	---

Als Primer wurden die in (2.5) angegebenen Oligonukleotide verwendet. Es wurden verschiedene Ansätze mit cDNA-*Templates* aus unterschiedlichen Geweben (Pankreas gefasteter und Foy-gefütterter Ratten, Rattenzungengewebe, AR42J-Zellen nach Dexamethasonstimulierung und unstimuliert) verwendet. Dabei wurden für die GAPDH-Kontrollen, die als Ladekontrolle dienten, jeweils nur 2µl *Template*-cDNA eingesetzt. Die Amylase-PCR diente als Kontrollfraktion dafür, ob die jeweilige mRNA der entsprechenden Proteine im Pankreas nach Foy-Fütterung der Ratten bzw. Dexamethasonstimulation von AR42J-Zellen hochreguliert wurde. Die PCR für Trypsin β1 diente als Kontrolle für die spezifische Expression der Chymase (*rat mast cell protease 1*, RMCP-1) in den Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas. Die aus Zungengewebe mittels der Primer *RMCP-1 up* und *RMCP-1 down* amplifizierte Chymase (RMCP-1) wurde zur Klonierung in den Vektor pcr 2.1 TOPO (2.3) durch TOPO TA Klonierung (3.3.4) verwendet. Die Länge der durch die spezifischen Primer resultierenden DNA-Fragmente ist im Materialteil dieser Arbeit (2.5) dargestellt.

3.3.4 Klonierung der *Rat Mast Cell Protease 1* (Chymase) mittels *TOPO-TA-Cloning*

Die Klonierung der Chymase wurde mit dem *TOPO-Cloning Kit* der Firma Invitrogen durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf DNA-

Topoisomerase I, deren biologische Aufgabe das Schneiden und Religieren von DNA während der Replikation ist. Dabei erkennt die Vaccinia-Virus-Topoisomerase I spezifische pentamere Sequenzen der DNA (5`C/T CCTT 3`) und bindet an die Phosphatgruppe des 3`-Thymidins. Die Topoisomerase schneidet dann einen DNA-Strang und ermöglicht der DNA damit eine Entwindung. Nach erfolgter Replikation werden die DNA-Bruchstellen religiert und das Enzym trennt sich wieder von der DNA. Um die Ligationsfähigkeit der Topoisomerase zu nutzen, werden die TOPO- Vektoren liniarisiert und an jeder 3`-Phosphatgruppe kovalent mit der Topoisomerase verknüpft. Es entstehen überhängende DNA-Einzelstränge, gebildet aus einem Thymidinrest. DNA-Fragmente mit komplementären Adenin-Überhängen können nun durch die Topoisomerase mit dem Vektor ligiert werden. Diese Adenin-Überhänge entstehen, wenn DNA mit Hilfe einer Taq-Polymerase amplifiziert wird, da Taq-Polymerasen eine *Template*-unabhängige terminale Transferaseaktivität besitzen.

Durchführung

Reaktionsansatz: 0,5 –4µl des PCR-Produkts (nach Gelelution (3.3.7))
1µl Salzlösung (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂)
dH₂O ad 5µl
1µl pcr2.1 TOPO-Vektor

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 5min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden DH5 α -Bakterien wie beschrieben chemisch transformiert (3.3.11) und auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausgestrichen.

3.3.5 Restriktionsverdau

Theoretische Einführung

Zum Schneiden doppelsträngiger DNA werden Restriktionsendonucleasen verwendet. Restriktionsendonucleasen sind Enzyme, die ursprünglich aus Bakterien stammen. Sie schneiden DNA an einer spezifischen, durch die Sequenz definierten Stelle. In Bakterien dienen sie innerhalb eines Restriktions-Modifikations-Systems dem Schutz vor Phagen-DNA, da letztere nicht an der betreffenden Stelle methyliert ist und abgebaut wird. Restriktionsenzyme

erkennen meist pallindromische Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren und zerschneiden die DNA innerhalb dieser Sequenz an charakteristischen Positionen. Die Enzyme verursachen entweder sogenannte „*sticky ends*“, bei denen kurze überstehende Einzelstrangabschnitte entstehen, oder „*blunt ends*“, glatte Schnittstellen ohne Einzelstrangüberhänge. Verfügen zwei DNA-Fragmente über komplementäre Schnittstellen, so können sie durch eine Ligase kovalent verknüpft werden und gegebenenfalls in vorgegebener Reihenfolge in einen Expressionsvektor integriert werden.

Mittels PCR kann an eine DNA-Sequenz mit Hilfe der Primer eine spezifische Schnittstelle angehängt werden. Für 5'- und 3'-Ende sollten möglichst unterschiedliche Restriktionsschnittstellen gewählt werden, um die Integration eines DNA-Fragments in einen Expressionsvektor in der gewünschten Reihenfolge zu gewährleisten. Es ist darauf zu achten, dass sich die gewählten Schnittstellen auch in der *Multiple Cloning Site* des Expressionsvektors befinden, nicht aber in der kodierenden DNA-Sequenz. Neben dem präparativen Restriktionsverdau, der u.a. der Klonierung von DNA-Sequenzen dient, kann diese Methode auch qualitativ genutzt werden, um die Insertion einer bestimmten DNA-Sequenz zu überprüfen.

Für den Restriktionsverdau wird neben den Enzymen und der zu schneidenden *Template*-DNA ein geeigneter Reaktionspuffer benötigt. Für jedes Enzym existieren optimierte Reaktionspuffer. Soll die *Template*-DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden, so muss ein Reaktionspuffer gefunden werden, in dem beide Enzyme zu einem hohen Prozentsatz aktiv sein können. Ist dies nicht möglich, so muss die DNA sequenziell zuerst mit dem einen und anschließend mit dem anderen Enzym verdaut werden, wobei zwischen den beiden Reaktionen umgepuffert werden muss (z.B. durch Ethanol-fällung (3.3.8) oder unter Verwendung des *Gelextraction Kits* (3.3.7) der Firma QIAgen).

Eine Unit eines Restriktionsenzym ist definiert als Enzymmenge, die in einer Stunde ein Mikrogramm DNA schneidet. Der Verdau erfolgt von einigen Ausnahmen abgesehen bei 37°C.

Nach dem Restriktionsverdau kann die DNA über ein präparatives Agarosegel (3.3.6) aufgereinigt, extrahiert (3.3.7), mit anderen DNA-Fragmenten wie

Expressionsvektoren ligiert (3.3.9) und im Anschluss in Bakterien transformiert (3.3.11) werden.

Durchführung

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Chymase (RMCP-1) nach der Klonierung in den pcr 2.1 TOPO Vektor (2.3) aus diesem herausgeschnitten und mit einem in gleicher Weise geschnittenen pcDNA3-Vektor ligiert (2.3; 3.3.9). Anschließend wurde das RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt in DH5 α -Bakterien transformiert (3.3.11) und über Mini- und Maxipräparation (3.3.12) aufgereinigt. Das Konstrukt wurde im Folgenden zur Transfektion von AR42J-Zellen (3.4.5b) benutzt.

Versuchsansatz: 10 μ l RMCP-1/pcr 2.1 TOPO-Minipräparation bzw. 5 μ l pcDNA3
1 μ l BamHI (10u/ μ l)
1 μ l EcoRI (10u/ μ l)
4 μ l Tango-Reaktionspuffer (2x Endkonzentration)
ad 20 μ l dH₂O

Die Ansätze wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und im Anschluss auf einem präparativen Agarosegel (3.3.6) aufgetrennt. Die RMCP-1- und pcDNA3-Fragmente wurden aus dem Gel eluiert (3.3.7) und anschließend miteinander ligiert (3.3.9).

3.3.6 Gelelektrophoretische DNA - Analyse

Die durch PCR oder Restriktionsverdau entstandenen DNA-Moleküle wurden sowohl zu präparativen als auch analytischen Zwecken auf ein horizontales Agarosegel aufgetragen. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen durch Entfernen des Agaropektins hergestellt wird. Durch Aufkochen in einem geeigneten Puffer wird die Agarose gelöst und geliert beim Abkühlen, wobei sich Doppelhelices in relativ dicken Fäden zusammenlagern. Diese Struktur verleiht dem Gel eine hohe Stabilität bei gleichzeitig relativ großen Porendurchmessern.

Bei der Agarosegelelektrophorese wird das unterschiedliche Wanderungsverhalten von negativ geladener DNA, das von der Größe und Konformation der DNA-Moleküle, der angelegten Spannung, dem verwendeten Laufpuffer und der Porengröße des Agarosegels abhängig ist, zur Auftrennung

der DNA-Fragmente im elektrischen Feld genutzt. Standardmäßig wurden 1%ige Agarosegele verwendet, für nachfolgende Gelextraktionen wurde die Agarosekonzentration auf 0,8% reduziert.

Durchführung

Die Agarose (1g/100ml) wurde in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlen der Agaroselösung wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 5µg/100ml) zugefügt und die Gellösung luftblasenfrei in eine vorbereitete Agarosegelkammer gegossen. Anschließend wurde ein Taschenkamm mit geeigneter Taschenzahl eingehängt. Nach der Polymerisation der Agarose wurde das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelaparatur eingesetzt, der Kamm wurde gezogen und die DNA-Proben in Ladepuffer (2.12) aufgenommen und aufgetragen. Zusätzlich wurde zum Größenvergleich ein DNA-Standard (2.6) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden bei einer Spannung von 100V im elektrischen Feld aufgetrennt, die Analyse des Gels erfolgte über UV-Licht, welches die DNA aufgrund des in die Basen der DNA interkalierten Ethidiumbromids sichtbar macht. Mit Hilfe einer Digitalkamera (2.1) wurde das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Für die quantitative PCR wurden die Signalintensitäten densitometrisch ausgewertet, dazu wurde die „Gel Pro Analyzer“-Software verwendet. Unterschiede in der Signalintensität der GAPDH-cDNA-Banden wurden durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors in der Berechnung der Induktion der mRNA-Level berücksichtigt.

3.3.7 Gelextraktion von DNA

Um die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu isolieren, wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des *QIAquick Gelextraction Kit* (Firma QIAgen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert. Das gleiche Kit kann auch genutzt werden, um Restriktionsansätze zu entsalzen.

3.3.8 DNA-Fällung mit Ethanol

DNA bildet in Gegenwart monovalenter Kationen in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation pelletiert werden kann.

Die zu fällende DNA wurde mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 sowie 3 Volumen eiskaltem Ethanol (100%) gemischt und mindestens 1h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation der Probe für 10min bei 13000rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 4 Volumen Ethanol (70%) gewaschen, um eventuell kopräzipitiertes Salz zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einem geeigneten Puffer resuspendiert.

3.3.9 Ligation

Während der Ligation werden mittels des Enzyms T4-Ligase (2.6) verschiedene durch einen Restriktionsverdau entstandene DNA-Moleküle kovalent miteinander verknüpft. Dies dient hauptsächlich der Insertion eines DNA-Fragments in einen Expressionsvektor. Das molekulare Verhältnis von Vektor zu Insert kann unterschiedlich sein, sinnvoll ist es, das Insert im Überschuß von 5:1 einzusetzen. Hierbei ist nicht die Masse, sondern die Anzahl an Molekülen entscheidend. Die einzusetzenden Mengen lassen sich nach folgender Formel berechnen:

$$M_I = (\text{Ratio} \times M_V \times L_I) / L_V$$

M_I : Masse des Inserts in ng

M_V : Masse des Vektors in ng

L_I : Länge des Inserts in kb

L_V : Länge des Vektors in kb

Ratio : molares Verhältnis von Vektor zu Insert

Durchführung

Für die Reaktion wurden T4-Ligase und T4-Ligasepuffer (Endkonzentration 1x), die entsprechenden Mengen von Vektor und Insert sowie eventuell dH_2O zum Volumenausgleich eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 16°C über Nacht. Alternativ sind Inkubationen bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 Stunden möglich.

Durch Ligation wurden das klonierte RMCP-1-Fragment (2.5) nach Restriktionsverdau (3.3.5) in den Vektor pcDNA3 integriert. Die Ligation erfolgte

bei 16°C über Nacht (3.3.9), anschließend wurde das Konstrukt in chemisch kompetente DH5 α -Bakterien transformiert (3.3.11).

Ligationsansatz: 28 μ l (Gesamteluat) RMCP-1

7 μ l pcDNA3 Vektoreluat

4 μ l 10x Ligasepuffer

1 μ l T4-Ligase

3.3.10 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmiden oder ligierten Insert-Vektor-Konstrukten werden diese in Bakterien eingebracht. Diese Bakterien müssen spezielle Eigenschaften bezüglich ihrer Membranstruktur aufweisen, die es ihnen ermöglicht, DNA-Moleküle aufzunehmen. Dazu müssen die Bakterien aufnahmebereit, d.h. kompetent gemacht werden. Man unterscheidet chemisch kompetente und elektrokompetente Zellen, wobei hier nur auf die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien eingegangen wird.

Die Aufnahmebereitschaft chemisch kompetenter, käuflich erworbener DH5 α -Bakterien (Derivat des *E. coli*-Stamms K12 (DH5 α ; GIBCO-BRL, Karlsruhe), dem bestimmte Pathogenitätsgene wie Adhäsions- und Invasionsfaktoren fehlen) sollte durch nachfolgendes Protokoll erhöht werden.

Durchführung

5ml einer DH5 α -Übernachtskultur wurden in 500ml LB-Medium überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert (etwa 2h bis 3h), bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm etwa $OD_{600nm} = 0,4$ betrug. Die Bakterienkultur wurde für 15min auf Eis gekühlt und danach bei 3000rpm und 4°C für 15min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40ml eiskaltem 0,1M CaCl₂ resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3000rpm, 4°C, 14min) wurden die Zellen in 20ml kaltem 0,1M CaCl₂ aufgenommen und mit 20% (v/v) Glycerol versetzt. Nach zweistündiger Inkubation auf Eis (Quellvorgang) wurden Aliquots von je 100 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.11 Chemische Transformation von Bakterien

Bei der chemischen Transformation lagert sich das Plasmid an die Membran der kompetenten Bakterien an und wird dann durch einen Hitzeschock aufgenommen. 100µl kompetente *E. coli* wurden mit Plasmid-DNA gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90sec bei 42°C und anschließend erneuter kurzer Inkubation auf Eis wurden 700µl LB-Medium hinzugegeben und der Transformationsansatz 1h bei 37°C inkubiert (Erholungsphase). Die Zellen wurden anschließend pelletiert (3min, 5000g), in ca. 50µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Als Kontrolle diente eine Probe ohne DNA bzw. mit verdautem, nicht ligiertem Vektor. Am nächsten Tag konnten dann von den Kolonien Mini-Kulturen angeimpft werden. Nach Minipräparation (3.3.12) der Plasmidkonstrukte wurden diese über einen analytischen Restriktionsverdau (3.3.5) charakterisiert. Die LB-Platten wurden bei 4°C gelagert.

DH5α-Bakterien wurden so mit einem RMCP-1/pcr 2.1 TOPO –Konstrukt bzw. einem RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt transformiert.

3.3.12 Plasmidisolierung aus Bakterien

Zur Isolierung der DNA im kleinen Maßstab (5ml) wurde ein Minipräparationskit der Firma QIAgen verwendet. Die Präparation nach Angaben des Herstellers erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mittels NaOH/SDS. Das Detergenz SDS bringt die Phospholipid- und Proteinkomponenten der Zellmembran in Lösung und führt so zur Lyse der Zellen und zur Freisetzung des Zellinhalts, während NaOH zur Denaturierung sowohl der chromosomalen als auch der Plasmid-DNA führt. Die optimale Lysierzeit erlaubt eine maximale Ausbeute an Plasmid-DNA ohne zurückbleibende chromosomale DNA.

Die Bakterien wurden bei Raumtemperatur pelletiert und in einem Puffer mit RNase und 10mM EDTA resuspendiert. EDTA fängt zweiwertige Ionen (Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen) ab, die für die Stabilität der Membran essentiell sind. Durch Zugabe einer alkalischen SDS-Lösung wurden die Zellen wie beschrieben lysiert und die DNA denaturiert (5min). Nach Neutralisierung mit Kaliumacetat-Puffer renaturiert die kleine Plasmid-DNA. Proteine und genomische DNA fallen

mit Kaliumdodecylsulfat aus und können durch Zentrifugation entfernt werden. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über Säulchen isoliert und in 30µl dH₂O eluiert. Die so gewonnene DNA wurde für einen qualitativen Restriktionsverdau (3.3.5) benutzt.

Die Präparation von Plasmiden in größerem Maßstab erfolgte mit einem Maxipräparationskit (Jetstar, Fa. Genomed), wobei die DNA aus Kulturen von 200ml Volumen isoliert wurde. Das Prinzip entspricht dem der Minipräparation, die Aufreinigung der Plasmide erfolgt über eine Anionenaustauschersäule. Nach der Zentrifugation des denaturierten Präzipitats wurde der Überstand zusätzlich über einen Faltenfilter gesäubert. Nach der Elution wurde die DNA mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 bis 100µl dH₂O aufgenommen. Die Konzentration wurde wie beschrieben (3.3.13) bestimmt. Die gewonnene DNA wurde für die Transfektion von Säugerzellen (COS7-bzw. AR42J-Zellen) verwendet.

Mittels Mini- und Maxipräparation wurden die Chymasekonstrukte RMCP-1/ pcr 2.1 TOPO sowie RMCP-1/ pcDNA3 aus DH5α-Bakterien aufgereinigt.

3.3.13 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen beruht auf der Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm. Hier liegt das Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der Basen. Eine optische Dichte $OD_{260}=1,0$ entspricht 50µg/µl DNA bzw. 40µg/µl RNA. Die Verunreinigung durch Proteine lässt sich über das Verhältnis der optischen Dichten bei 260nm zu 280nm bestimmen, da bei 280nm das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren liegt. Bei einer sauberen Präparation sollte OD_{260}/OD_{280} für DNA bei etwa 1,8 und für RNA bei etwa 2,0 liegen.

1µl einer DNA-Maxipräparation wurde im Verhältnis 1:500 mit dH₂O verdünnt und gegen einen Leerwert im Spektralphotometer vermessen. Bei RNA-Präparationen wurden 6µl im Verhältnis 1:50 verdünnt.

3.4 Zellkultur und Immunfluoreszenzen

3.4.1 Kultur und Passagieren von COS7- und AR42J-Zellen

COS-7 Zellen und AR42J-Zellen wurden in *DMEM-High-Glucose*-Medium komplementiert mit 10% FCS kultiviert. Beide Zelllinien wachsen adhärent. AR42J-Zellen stellen eine Zelllinie aus einem transplantierbaren Tumor der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas dar, der durch Azaserin induziert wurde (Jessop et al., 1980; Logsdon, 1986). COS7-Zellen stellen eine fibroblastenähnliche Zelllinie dar, die ursprünglich aus Nierenzellen des *African Green Monkey* stammt.

Alle Arbeiten fanden unter einer Sterilbank mit sterilen bzw. autoklavierten Materialien statt. Um eine Kontamination der Zellkultur mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurden dem Medium zusätzlich die Antibiotika Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) zugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im feuchten Inkubator kultiviert. Dreimal pro Woche wurde das Zellkulturmedium gewechselt und bei entsprechender Zelldichte wurden die Zellen passagiert. Die Zellen wuchsen routinemäßig auf Zellkulturschalen von 10cm Durchmesser, für Immunfluoreszenzen wurden 6cm-Zellkulturschalen verwendet und die Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Dabei wurden die Kulturschalen für AR42J-Zellen routinemäßig mit Matrigel beschichtet (3.4.2). Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

Um die Zellen passagieren zu können, wurden diese von der Kulturschale abgelöst und verdünnt auf neue Schalen verteilt, um erstens die Zellen zu vermehren und zweitens ein Sterben der Zellen durch eine zu große Zelldichte zu verhindern. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad erwärmt. Um die Zellen von der Kulturschale zu lösen, wurden sie mit 1x PBS gewaschen und etwa 5min bei 37°C mit 2ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) inkubiert. Trypsin ist eine Protease, die hier zur Spaltung extrazellulärer Adhäsionsproteine eingesetzt wurde. EDTA ist ein Chelator zweiwertiger Kationen und komplexiert die Ca²⁺-Ionen, die für die Funktionalität von Cadherinen (Zell-Zell-Verbindungsproteine) notwendig sind. Die abgelösten Zellen wurden in 10ml Medium mit FCS aufgenommen, wobei das verwendete Trypsin durch im FCS enthaltene Proteaseinhibitoren (2.8) inaktiviert wurde, und die Zellen wurden 5min bei 500x g pelletiert. Das

entstandene Zellpellet wurde in 10ml Medium resuspendiert und die Zellen in einer 1:10 bis 1:20 Verdünnung ausgesät. Für AR42J-Zellen wurden die Zellkulturschalen mit Matrigel (1:5 in 1x PBS verdünnt) beschichtet, indem die Matrigellösung 5-10min auf neuen Zellkulturschalen inkubiert und dann wieder entfernt wurde. Sowohl überschüssiges Matrigel als auch schon verwendete beschichtete Kulturschalen können mehrmals wiederverwendet werden.

3.4.2 Präparation von Matrigel

Beim Matrigel handelt es sich um den Extrakt der extrazellulären Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors der Maus. Die Präparation erfolgt nach Kleinmann et al., 1981.

2 g EHS-Tumor wurden in 3-4 ml 3,4M NaCl/ 50mM Tris-HCl, pH 7,4 in einem Thomas-Homogenisator (Einstellungen: Stufe II, 500rpm) homogenisiert. Das Homogenat wurde in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit 80ml 3,4M NaCl/ 50mM Tris-HCl, pH 7,4 aufgefüllt und ca. 30min im Kühlraum auf einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde der Ansatz 15min bei 10000rpm bei 4°C zentrifugiert (Avanti Centrifuge J-20 XP (Beckman Coulter, Fullerton/USA)). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 80ml 3,4M NaCl/ 50mM Tris-HCl, pH 7,4 resuspendiert und erneut 30min im Kühlraum gerührt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 30ml 2M Harnstoff/ 50mM Tris-HCl pH 7,4 aufgenommen und über Nacht im Kühlraum auf einem Magnetrührer gerührt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 30min bei 10000rpm pelletiert und der Überstand gesammelt. Das Pellet wurde nochmals in 30ml 2M Harnstoff/ 50mM Tris-HCl pH 7,4 resuspendiert, 30min gerührt und schließlich nochmals 30min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem zuvor gewonnenen Überstand vereinigt und in einen Dialyseschlauch (2.10) gefüllt. Die Dialyse erfolgte für 3-4h gegen 1l 150mM NaCl/ 50mM Tris-HCl pH 7,4 im Kühlraum. Danach wurde der Puffer gewechselt und die Dialyse über Nacht fortgesetzt. Am darauffolgenden Tag wurde die Probe dem Dialyseschlauch entnommen und 20min bei 15000rpm pelletiert. Der entstandene Überstand bildet das für die Kultur von AR42J-Zellen verwendete Matrigel und muss zur Sterilisation einmalig mit 100 Gray bestrahlt werden. Dies wurde unter freundlicher Mitarbeit

von Herrn Dr. Neidel am Universitätsklinikum Marburg durchgeführt. Das Matrigel wurde zu je 2ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. Eingesetzt wurde es in einer 1:5-Verdünnung in PBS, verdünntes Matrigel wurde mehrmals wiederverwendet und bei 4°C gelagert.

3.4.3 Stimulation der AR42J-Zellen mit Dexamethason

Die Stimulation der AR42J-Zellen mit dem Glukokortikoid Dexamethason führt nach etwa 48h zu gravierenden Veränderungen in der Morphologie und Genexpression der AR42J-Zellen sowie zur Zelldifferenzierung. Alle an der Sekretion beteiligten Kompartimente vergrößern sich und die Anzahl an elektronendichten Granula nimmt zu (Logsdon et al., 1985; Swarovsky et al., 1988). Außerdem steigt die Konzentration an sekretorischen Enzymen und deren Sekretion.

Zur Stimulation der Zellen mit dem Glukokortikoid Dexamethason wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt. Danach wurde frisches erwärmtes Medium zu den Zellen gegeben, das neben FCS und den entsprechenden Antibiotika 10nM Dexamethason enthielt. Auf diese Weise wurden die Zellen 48-72h im Brutschrank bei 37°C stimuliert. Stimulierte Zellen wurden sowohl für Immunfluoreszenzen (3.4.6) als auch zur Gewinnung von Zellpellets (3.4.8) und Zelllysaten (3.4.9) benutzt. Für Immunfluoreszenzen (3.4.6) wurden die Zellen in mit Matrigel beschichteten 6cm-Kulturschalen auf Deckgläschen ausgesät und wie beschrieben stimuliert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 1x PBS gewaschen und im Folgenden mit 4% PFA 20min bei Raumtemperatur fixiert. Zur Gewinnung von stimulierten AR42J-Zellen für Zellpellets (3.4.8) oder Zelllysate (3.4.9) wurden AR42J-Zellen in mit Matrigel beschichteten 10cm-Kulturschalen ausgesät und entsprechend stimuliert. Die Zellpellets dienten der RNA-Isolierung (3.3.1), die Lysate wurden für Immunoblotanalysen (3.1.7) verwendet.

3.4.4 Einfrieren von Zellen

Um Zellen über längere Zeit lagern zu können, wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden sie in Einfrier-Medium aufgenommen, das 20% FCS und zusätzlich 10% DMSO enthielt. Je 1ml der Zellsuspension wurde

in ein Kryoröhrchen gegeben und über Nacht bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.4.5 Transfektion von Säugerzellen

3.4.5.a Transfektion von COS7-Zellen mit Polyethylenimin (PEI)

PEI ist ein kationisches Polymer, das an die negativ geladene DNA bindet. Es entsteht ein kompakter Komplex mit abgeschirmten Ladungen, der von der Zelle über Endozytose aufgenommen wird. Das PEI/DNA-Verhältnis ist für die optimale Komplexbildung entscheidend. Ein Abbau des Konstrukts wird verhindert, indem die Absenkung des pH-Werts in den Lysosomen von PEI inhibiert wird. Der darauf folgende Wassereinstrom führt zum Platzen der endosomalen Strukturen und die DNA wird in die Zelle freigesetzt.

Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion auf Deckgläschen in 6cm-Schalen ausgesät. Es wurden $10\mu\text{g}$ des zu transfizierenden DNA-Konstrukts mit $750\mu\text{l}$ einer 150mM NaCl-Lösung und $100\mu\text{l}$ PEI-Gebrauchslösung ($0,9\text{ mg/ml dH}_2\text{O}$) mit $650\mu\text{l}$ 150mM NaCl-Lösung gemischt und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der PEI-Ansatz tropfenweise zu dem DNA-Ansatz hinzugegeben und weitere 15min bei Raumtemperatur inkubiert. $495\mu\text{l}$ dieses Gemischs wurden dann zu $2,5\text{ml}$ Zellkulturmedium in der Zellkulturschale hinzugetropft und die Zellen wurden 3-6h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit $1\times$ PBS gewaschen und danach frisches Medium zugegeben. Nach 24-48h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und für die Immunfluoreszenz verwendet. COS7-Zellen wurden so mit dem klonierten RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt (2.5; 2.3) transfiziert und anschließend für die Immunfluoreszenz (3.4.6) eingesetzt.

3.4.5b Transfektion von AR42J-Zellen durch Elektroporation

Ein Nachteil bei der Elektroporation ist die geringe Überlebensrate der Zellen. Außerdem müssen die Zellen in Suspension sein, d.h. adhären wachsende Zellen müssen vor der Transfektion mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst werden. Trotzdem eignete sich für die AR42J-Zellen diese Methode gegenüber

anderen besser zur Transfektion mit Plasmid-DNA, da diese Methode eine höhere Ausbeute vitaler Zellen gewährleistete.

Das Prinzip beruht darauf, dass die Membran der Zelle während des elektrischen Pulses kurzzeitig porös wird, so dass die DNA aufgenommen werden kann.

Eine fast konfluente Schale (70%) wurde wie beim Passagieren (3.4.1) trypsinisiert, in 10ml Medium aufgenommen und 5min bei 500g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 5ml HBS-Puffer (2.12) gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieses Zellpellet wurde in 0,5ml HBS-Puffer resuspendiert und in eine 4mm Elektroporationsküvette pipettiert, in die die gewünschte DNA (10-15µg) vorgelegt wurde. Die Elektroporation der Zellen erfolgte bei 250V und 1500µF (30 bis 35ms). Anschließend wurde zügig 1ml DMEM mit FCS zugegeben, die Zellen mit dem Medium vorsichtig gemischt und anschließend in Matrigel-beschichtete 6cm-Schalen mit Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie beschrieben mit Dexamethason stimuliert (3.4.3). Nach 48-72h wurden die Zellen dann mit 4% PFA fixiert und anschließend für die Immunfluoreszenz (3.4.6) inkubiert. AR42J-Zellen wurden so mit dem RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt (2.5; 2.3) transfiziert und anschließend auf die Expression der Chymase (RMCP-1) hin untersucht.

3.4.6 Immunfluoreszenz an COS7- und AR42J-Zellen

Durch die Immunfluoreszenz können Proteine in fixierten Zellen spezifisch markiert und anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops studiert werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein nicht markierter Primärantikörper spezifisch ein Epitop des entsprechenden Proteins. Der Primärantikörper wird an seiner Fc-Domäne von einem geeigneten Sekundärantikörper gebunden, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Durch die Bindung an die gesamte Fc-Domäne des Primärantikörpers kommt es zu einer Signalverstärkung. Im Fluoreszenzmikroskop wird der gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff von Licht der geeigneten Excitationswellenlänge angeregt und emittiert daraufhin Licht seiner spezifischen Emissionswellenlänge. Die markierte Struktur erscheint in der entsprechenden Farbe. Unter Verwendung

von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Excitations- und Emissionsspektren lassen sich verschiedene Proteine gleichzeitig markieren. Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und 20min bei Raumtemperatur mit 4% (w/v) PFA (in 1xPBS pH 7,3) fixiert. PFA wirkt quervernetzend durch die Ausbildung von kovalenten Verbindungen zwischen den Proteinen der Zelle. Anschließend wurden die (Zell-)Membranen unter Einsatz von 0,2% (v/v) Triton-X-100 10min bei Raumtemperatur permeabilisiert, um die Bindung der Antikörper an die entsprechenden Epitope zu ermöglichen. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen 10min mit einer 1%igen BSA-Lösung (in 1x PBS) abgesättigt. Im Anschluss wurden die Zellen zunächst 1h mit dem entsprechenden Primärantikörper und danach nochmals 1h mit dem spezifischen fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper inkubiert (2.7). Zwischen allen Inkubationsschritten wurde 3x mit 1x PBS gewaschen. Für die Betrachtung am Mikroskop wurden die Deckgläschen mit dH₂O gewaschen und mit Hilfe von Mowiol (2.12) auf Objektträgern eingedeckelt. Mowiol wurde vorher im Verhältnis 3:1 mit n-Propyl-Gallat gemischt. Letzteres dient als Bleichschutz, um das Ausbleichen der lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern.

In der Immunfluoreszenz wurden COS7- sowie stimulierte AR42J-Zellen verwendet, die mit dem RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt (2.5; 2.3) transfiziert worden waren (3.4.5), um die Expression der Chymase (RMCP-1) in diesen Zellen zu untersuchen. Dazu wurde ein gegen das Rattenprotein gerichteter Ziege-anti-Chymase-Antikörper als Erstantikörper verwendet, als Zweitantikörper diente Esel-anti-Ziege-TRITC (2.7). Die AR42J-Zellen wurden gleichzeitig mit einem Kaninchen-anti-Carboxypeptidase-Antikörper und Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488 (2.7) als Zweitantikörper koinkubiert, um eine Kolokalisation der Chymase (RMCP-1) mit Zymogengranula der AR42J-Zellen nachzuweisen.

Außerdem wurden untransfizierte, stimulierte AR42J-Zellen verwendet, um die endogen exprimierte Peptidyl-Prolyl-Isomerase B (PPIB) in den Zymogengranula der AR42J-Zellen nachzuweisen. Dazu wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit Kaninchen-anti-PPIB-Antikörper und Schaf-anti-Chymotrypsinogen-Antikörper (2.7) als Erstantikörper durchgeführt, wobei angefärbtes Chymotrypsinogen als Markerprotein für die Zymogengranula

verwendet wurde. Als Zweitantikörper wurden Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488 und Esel-anti-Schaf-IgG-TRITC (2.7) verwendet. Zur Kontrolle der Spezifität der PPIB-Lokalisierung wurde eine Doppelimmunfluoreszenz gegen die endogen exprimierte PDI und Chymotrypsinogen an stimulierten AR42J-Zellen durchgeführt (nicht gezeigt). Die verwendeten Antikörper und die entsprechenden Verdünnung sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

3.4.7 Morphologische Auswertung

Für die morphologische Auswertung der Immunfluoreszenzen wurde das Mikroskop Olympus BX-61 sowie das 100x Objektiv verwendet. Digitalbilder wurden mit der zugehörigen Kamera (F-View) aufgenommen und mit den Programmen „analySIS pro“, „Picture Publisher“ sowie „Photoshop“ und „Corel Draw“ bearbeitet.

3.4.8 Präparation von Zellpellets aus AR42J-Zellen zur RNA-Gewinnung

Sowohl Dexamethason-stimulierte als auch unstimulierte AR42J-Zellen aus einer fast konfluenten 10cm-Kulturschale wurden wie beschrieben (3.4.1) durch Trypsin abgelöst, pelletiert und anschließend in 1x PBS gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 2ml 1x PBS resuspendiert und in 2ml-Reaktionsgefäßen pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und die entstandenen Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend bei -80°C eingefroren. Dies wurde sowohl mit Dexamethason-stimulierten Zellen als auch mit unstimulierten Zellen durchgeführt. Die Zellpellets wurden zur Gewinnung von RNA aus den entsprechenden Zellen (3.3.1) und anschließend zur cDNA-Synthese (3.3.2) und PCR (3.3.3) verwendet.

3.4.9 Herstellung von Zelllysaten aus AR42J-Zellen zur Verwendung im Immunoblot

Sowohl Dexamethason-stimulierte als auch unstimulierte AR42J-Zellen aus einer fast konfluenten 10cm-Kulturschale wurden wie beschrieben (3.4.1) durch Trypsin abgelöst, pelletiert und anschließend in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in je 500 μl Homogenisationspuffer (2.12)

resuspendiert, mit einer Spritze und 20G-Kanüle durch mehrmaliges Aufziehen der Suspension homogenisiert und lysiert und anschließend 30min im Kühlraum auf dem Rotator inkubiert. Danach wurden ungelöste Anteile kurz abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert. Im folgenden wurde der Überstand dann zur SDS-PAGE (3.1.4c) und Immunoblotanalyse (3.1.7) verwendet.

4. Ergebnisse

Die Membranproteine der Zymogengranula des exokrinen Pankreas spielen vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Sortierung und Verpackung der vom Pankreas sezernierten Verdauungsenzyme sowie bei der Granulabildung am TGN, der Exozytose, dem Granulatransport und der gerichteten Sekretion. Fehler in der Sortierung und Verpackung der Zymogene können schwerwiegende Folgen wie beispielsweise die Entwicklung einer Pankreatitis zur Folge haben (siehe 1.4). Bisher sind nur wenige Zymogengranulamembran-assoziierte Proteine identifiziert.

Schmidt et al. (2000) identifizierten basierend auf einem 2D-gelelektrophoretischen Ansatz innerhalb der Fraktion der peripheren Membranproteine der Zymogengranula (*Wash*-Fraktion) eine submembranöse Matrix bestehend aus Proteoglykanen und verschiedenen sauren und basischen Proteinen. Dazu gehören das Serpin ZG46p, GP2, das Lektin ZG16p, die Lipase, die Carboxyesterlipase sowie einige weitere bis zu diesem Zeitpunkt unidentifizierte saure und basische Proteine. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der 2D-Gelelektrophorese im Vergleich zu Schmidt et al. (2000) entscheidend verbessert und die Färbeprotokolle der SDS-Gele optimiert, was zu einem deutlich ausgeprägteren Proteinspotmuster und zur Identifizierung weiterer peripherer Membranproteine der Zymogengranula (*Wash*-Fraktion) führte. Zur Identifizierung der aufgetrennten Proteine diente dabei ein massenspektrometrischer Ansatz.

4.1 Die Zymogengranula des exokrinen Pankreas männlicher Wistar-Ratten können als reine Organellenfraktion isoliert und in Inhalts- und Membranfraktionen mit spezifischer Proteinzusammensetzung fraktioniert werden

Zur Gewinnung einer Zymogengranulafraktion wurden die Pankreata gefasteter männlicher Wistar-Ratten entnommen und homogenisiert (3.1.1a). Durch differentielle Zentrifugation konnte eine reine Zymogengranulafraktion gewonnen werden, die in Abbildung 4.1 mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (3.2.3) dargestellt ist. Man erkennt ausschließlich Zymogengranula und keine anderen Zellorganellen oder Anteile von solchen in der verwendeten Probe.

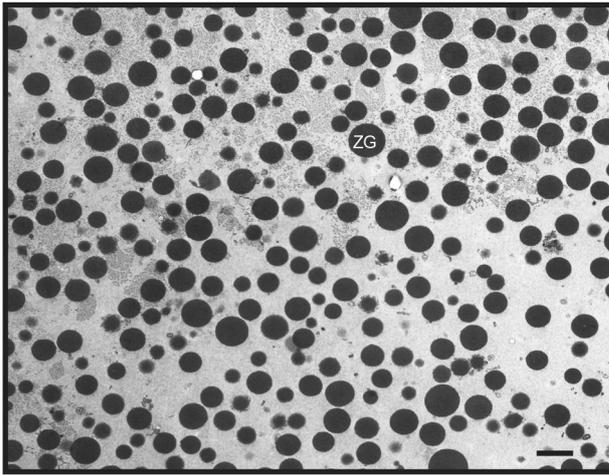


Abb. 4.1:

Elektronenmikroskopische Darstellung der präparierten intakten Zymogengranulafraktion aus Pankreata von gefasteten männlichen Wistar-Ratten. Exemplarisch ist ein Zymogengranulum markiert (ZG), der Maßstab (schwarzer Balken) entspricht 1 μm .

Die Zymogengranula wurden im Folgenden durch Resuspendierung in einem basischen Lysispuffer (50mM HEPES pH8) sowie durch Einfrieren und Auftauen schonend lysiert (3.1.1b). Danach erfolgte durch Ultrazentrifugation die Trennung in eine Inhaltsfraktion (ZGI; im Überstand) und eine Membranfraktion (ZGM, im Sediment) der Zymogengranula. Das sedimentierte Membranpellet wurde in 50mM HEPES pH 8 resuspendiert. Durch Inkubation gleicher Volumina der Membranfraktion (ZGM) und eines Carbonatpuffers (0,3M NaCO_3 pH11,5) und anschließende Ultrazentrifugation wurden die peripheren Membranproteine (*Wash*-Fraktion; im Überstand) von den Zymogengranulamembranen entfernt, während die integralen Membranproteine mit den gewaschenen Zymogengranulamembranen (gZGM) sedimentierten (3.1.1c).

Zur Kontrolle der Reinheit der einzelnen Zymogengranulasubfraktionen wurden identische Proteinmengen der vier Subfraktionen der Zymogengranula (ZGI, ZGM, gZGM, *Wash*) auf einem 12,5%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4c) und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7) (Abb.4.2). Die Immunoblots wurden sowohl mit einem Kaninchen-anti-Amylase-Antikörper sowie einem Maus-anti-GP2-Antikörper und einem Kaninchen-anti-ZG16p-Antikörper inkubiert (2.7). Amylase diente als Markerprotein für die Inhaltsfraktion (ZGI), GP2, ein GPI-verankertes Hauptmembranprotein der Zymogengranula, als Marker für die Membranfraktionen (ZGM, gZGM) und ZG16p als Markerprotein für die Fraktion der peripheren Membranproteine (*Wash*).

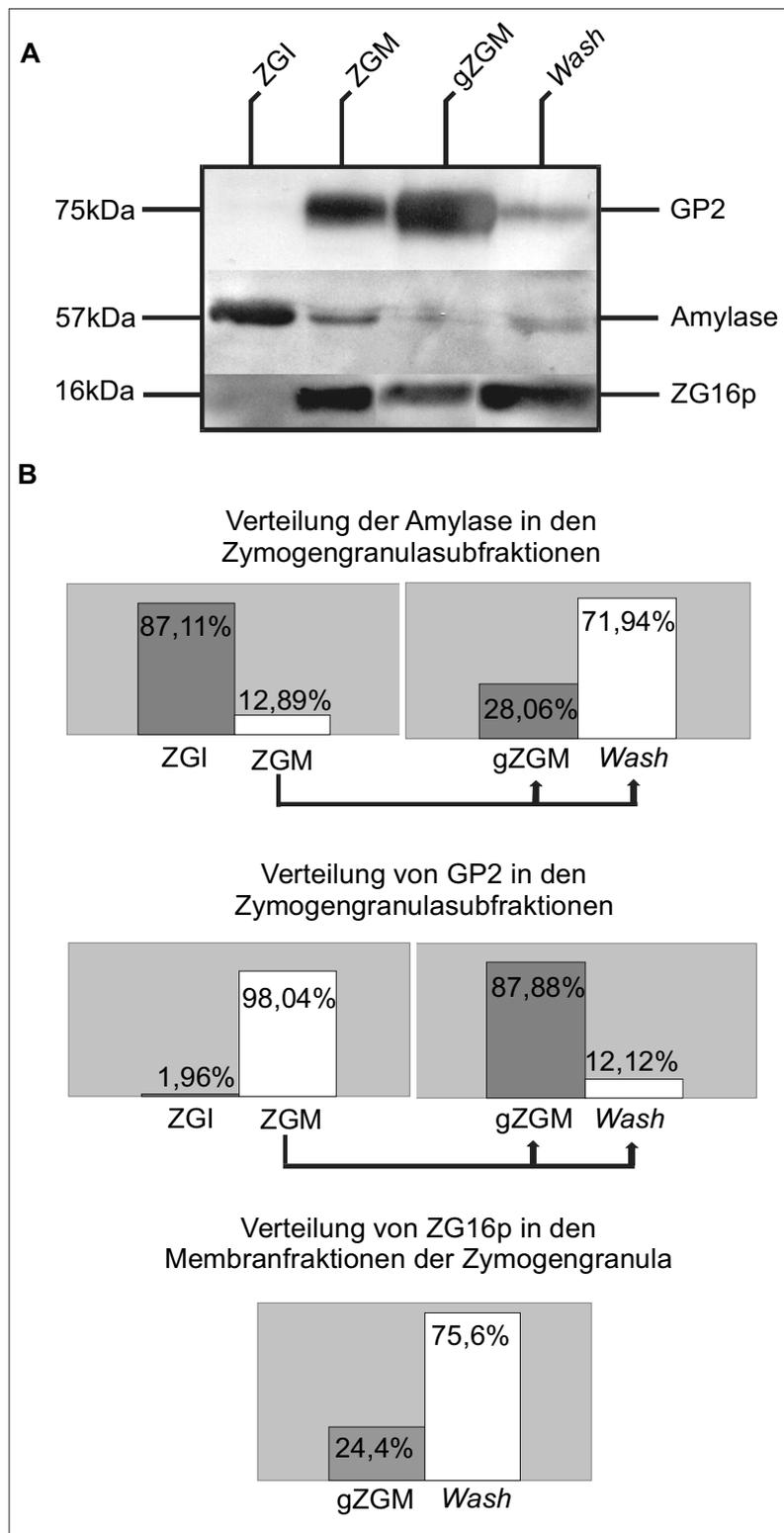


Abb. 4.2:

Kontrolle der Reinheit der Zymogengranulasubfraktionen.

(A) Pro Spur wurden je 20µg der vier verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen (ZGI, ZGM, gZGM, Wash) im 12,5%igen SDS-Minigel aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose gebロットet. Die Blots wurden mit einem Kaninchen-anti-Amylase-Antikörper (1:1000) sowie einem Maus-anti-GP2-Antikörper (1:1000) und einem Kaninchen-anti-ZG16p-Antikörper (1:1000) als Erstantikörper inkubiert, als Zweitantikörper wurden anti-Kaninchen-HRP bzw. Anti-Maus-HRP (je 1:2000) verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels ECL über Belichtung eines Röntgenfilms.

(B) Quantifizierung der Verteilung von Amylase, GP2 und ZG16p in den Zymogengranulasubfraktionen basierend auf einer densitometrischen Auswertung der verschiedenen Proteinbanden.

Die pankreatische Amylase kann im Immunoblot hauptsächlich in der Inhaltsfraktion der Zymogengranula (ZGI) detektiert werden, es zeigt sich hier eine Proteinbande mit einem für das Enzym charakteristischen Molekulargewicht von 57kDa (Abb. 4.2A). Geringere Mengen der Amylase finden sich auch in den Membranfraktionen der Zymogengranula (Abb. 4.2A).

Die densitometrische Auswertung der Intensität der dargestellten Proteinbanden zeigt, dass 87,11% der Gesamtmenge des Enzyms im Inhalt der Zymogengranula vorliegen, während nur 12,89% nach der Lyse der Zymogengranula noch membranassoziiert sind (ZGM) (Abb. 4.2B). Wird die Membranfraktion (ZGM) mit einem Carbonatpuffer (0,3M NaCO₃ pH11,5; Endkonzentration 0,15M) gewaschen, verbleiben 28,06% des membranassoziierten Anteils der Amylase an den gewaschenen Zymogengranulamembranen (gZGM), der größere Anteil von 71,94% findet sich in der *Wash*-Fraktion (*Wash*).

Für GP2 zeigt sich im Vergleich zur Amylase eine andere Verteilung. Das Protein lässt sich im Immunoblot als Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 75kDa nachweisen, was dem Molekulargewicht des glykosylierten Proteins entspricht (Abb. 4.2A). Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten ergibt, dass 98,04% der Gesamtmenge des GP2 in der Membranfraktion (ZGM) vorliegen (Abb. 4.2B). Nach Carbonatbehandlung (0,3M NaCO₃ pH11,5; Endkonzentration 0,15M) der Zymogengranulamembranen (ZGM), durch welche periphere Membranproteine von der Zymogengranulamembran entfernt werden, findet sich der Hauptanteil (87,88%) des membranassoziierten GP2 in der Fraktion der gewaschenen Zymogengranulamembranen (gZGM), ein geringerer Anteil (12,12%) befindet sich in der *Wash*-Fraktion (*Wash*).

ZG16p kann im Immunoblot als Proteinbande mit einem für das Protein spezifischen Molekulargewicht von 16kDa detektiert werden und findet sich ausschließlich in den Membranfraktionen der Zymogengranula (Abb. 4.2A). Dabei lassen sich basierend auf der densitometrischen Auswertung der Bandenintensitäten 75,6% der Gesamtmenge des Proteins nach Carbonatbehandlung in der Fraktion der peripheren Membranproteine (*Wash*) detektieren, 24,4% bleiben mit den gewaschenen Zymogengranulamembranen assoziiert (gZGM).

Diese Immunoblotkontrolle soll die relative Reinheit der einzelnen Zymogengranulasubfraktionen exemplarisch für alle weiteren in dieser Arbeit gezeigten Fraktionenblots darstellen.

4.2 Die peripheren Membranproteine der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas (*Wash*-Fraktion) lassen sich nach Auftrennung in der 2D-Gelelektrophorese in eine saure und eine basische Proteingruppe unterteilen

Die Proteine der *Wash*-Fraktion (3.1.1c) wurden sowohl nach ihrem isoelektrischen Punkt als auch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden je 300µg der *Wash*-Fraktion eingesetzt und durch isoelektrische Fokussierung mittels immobilisierter pH-Gradienten (3.1.4a), pH 3 bis pH 11 (nicht linear), und anschließende orthogonale Auftrennung in einem 12,5%igen SDS-Gel (3.1.4c) separiert. Anschließend wurden die resultierenden Proteinspots in den SDS-Gelen durch Coomassie- und Silberfärbungen unterschiedlicher Protokolle (3.1.5) sowie Sypro Ruby (3.1.9b(2)) dargestellt. Exemplarisch werden hier verschiedene SDS-Gele gezeigt, die das typische Spotmuster darstellen, das sich nach der beschriebenen Auftrennung ergibt. Die Gele wurden mit einer kombinierten Coomassie- Silberfärbung (3.1.5d und 3.1.5e) angefärbt, die sich im Vergleich zu anderen ausgetesteten Färbeprotokollen am besten zur Darstellung der aufgetrennten Proteine eignete. Abbildung 4.3 zeigt eine starke Anfärbung der Proteinspots, um möglichst alle aufgetrennten Proteine darzustellen, Abbildung 4.4 zeigt eine schwächere Anfärbung der gleichen Proteinfraction, um grundlegende Verteilungsmuster deutlich zu machen. Die in Abbildung 4.5 dargestellten SDS-Gele werden als weitere Beispiele für die reproduzierbare Auftrennung der Proteine der *Wash*-Fraktion angeführt.

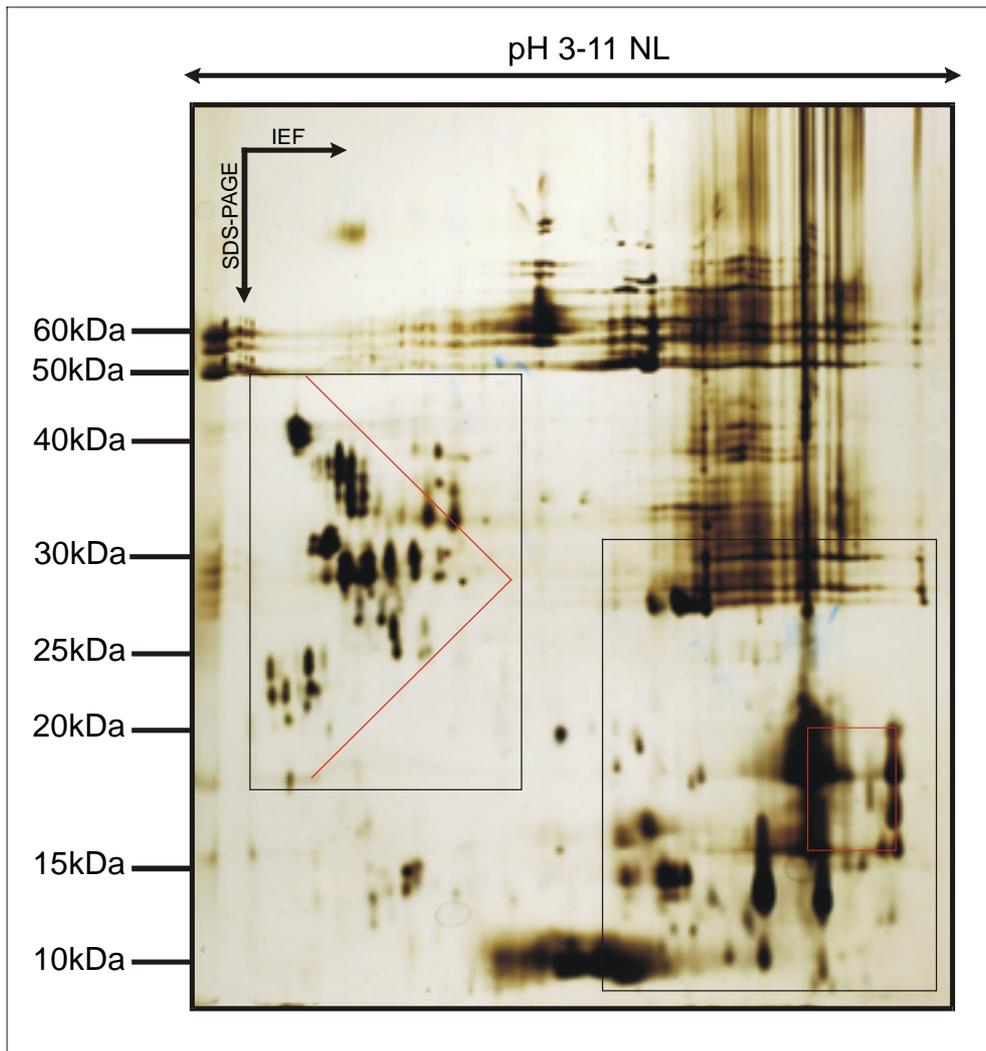


Abb. 4.3: Auftrennung von 300µg der *Wash*-Fraktion im 2D-Gel. Der verwendete nichtlineare pH-Gradient umfasste pH-Bereiche von pH 3 bis pH 11 (nicht linear), das SDS-Gel enthielt 12,5% Polyacrylamid und wurde mit einer kombinierten Coomassie-Silber-Färbung stark angefärbt. Es lassen sich eine saure Proteingruppe mit Proteinen im Molekulargewichtsbereich zwischen 20kDa und 50kDa und isoelektrischen Punkten zwischen 4 und 6 sowie eine basische Proteingruppe innerhalb eines Molekulargewichtsbereichs von 10kDa bis 30kDa und isoelektrischen Punkten zwischen 8 und 10 unterscheiden (siehe schwarze Rahmen). Rot hervorgehoben sind ein nach links geöffnetes „V“ sowie ein Rechteck, die die graphische Verteilung der Proteine der sauren und basischen Gruppe deutlich machen.

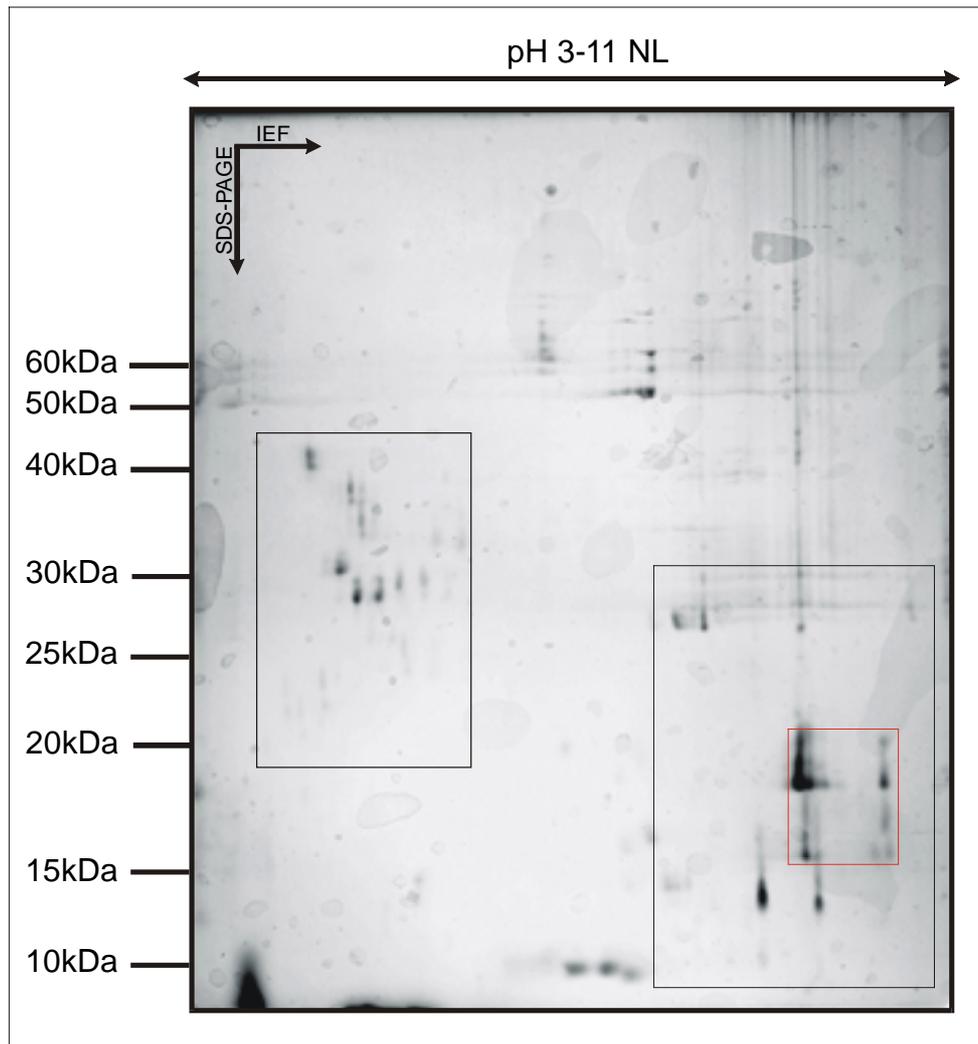


Abb. 4.4: Siehe Abb. 4.3. Rot hervorgehoben ist hier ein Rechteck, das die graphische Darstellung einiger Proteine der basischen Gruppe zeigt.

Die Abbildungen 4.3 und 4.4 lassen in der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung zwei distinkte Proteingruppen erkennen (schwarze Rahmen in Abbildung 4.3 und 4.4). Die saure Proteingruppe umfasst hauptsächlich Proteine in einem Molekulargewichtsbereich von 20kDa bis 50kDa und einem pH-Bereich der isoelektrischen Punkte von pH 4 bis pH 6. Die basische Proteingruppe beinhaltet überwiegend Proteine in einem Molekulargewichtsbereich von 10kDa bis 30kDa und isoelektrischen Punkten im pH-Bereich von pH 8 bis pH 10. Graphisch bilden die Proteine der sauren Gruppe ein nach links geöffnetes „V“ (rot hervorgehoben in Abbildung 4.3); in der basischen Gruppe fällt ein Rechteck auf, das von einigen Hauptproteinen dieser basischen Gruppe gebildet wird und sich vor allem in der schwächeren Anfärbung deutlich darstellt

(roter Kasten in Abbildung 4.3 und 4.4). Die saure und basische Proteingruppe sind charakteristisch für die 2D-gelelektrophoretische Auftrennung der *Wash*-Fraktion sowie reproduzierbar unter den verwendeten Versuchsbedingungen. Um die Reproduzierbarkeit darzustellen, zeigt Abbildung 4.5 zwei weitere 2D-Gele, in denen je 300µg der *Wash*-Fraktion über einen pH-Gradienten von pH 3-11 (nicht linear) und ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt (3.1.4) und mit der kombinierten Coomassie-Silber-Färbung (3.1.5d und 3.1.5e) dargestellt wurden.

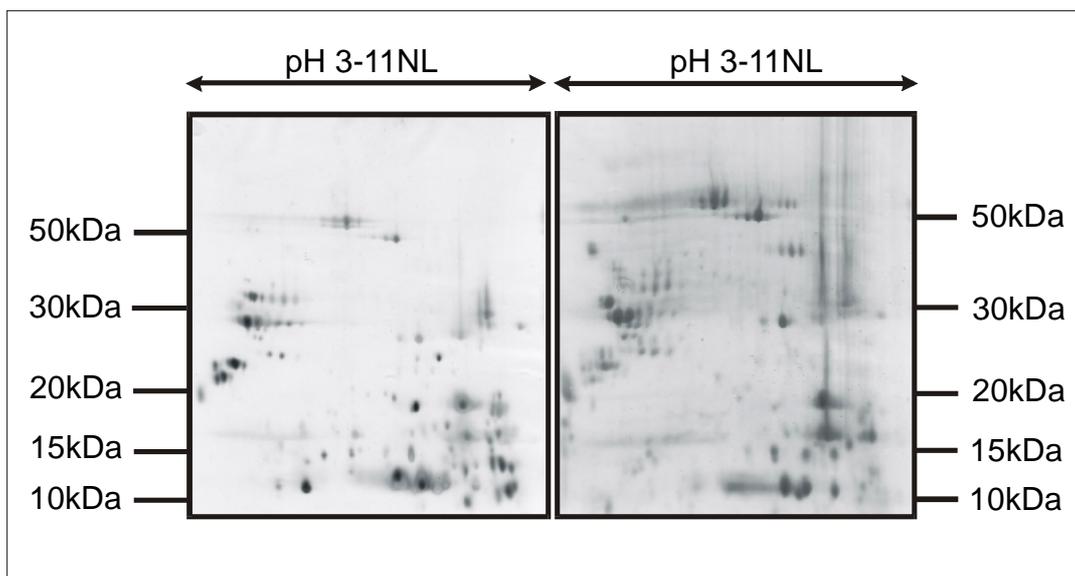


Abb. 4.5: Darstellung zweier weiterer 2D-Gele, die das reproduzierbare Proteinmuster der *Wash*-Fraktion nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung von 300µg der *Wash*-Fraktion (X-Achse: pH-Bereich 3-11NL; Y-Achse: 12,5%iges SDS-Gel) zeigen. Die Gele wurden mit einer kombinierten Coomassie-Silber-Färbung gefärbt.

Das Proteinspotmuster der *Wash*-Fraktion unterscheidet sich eindeutig von dem der Inhaltsfraktion der Zymogengranula (vgl. auch Schmidt et al., 2000). Um das charakteristische Proteinmuster der *Wash*-Fraktion im Vergleich zur Inhaltsfraktion der Zymogengranula darzustellen, zeigt Abbildung 4.6 die 2D-gelelektrophoretische Auftrennung (3.1.4) von 300µg ZGI im Vergleich zur Auftrennung von 300µg der *Wash*-Fraktion bei identischen Versuchsbedingungen (pH-Bereich 3-11NL; 12,5%iges SDS-Gel; kombinierten Coomassie-Silber-Färbung (3.1.5d und 3.1.5e)). Einige Proteine der Inhaltsfraktion (ZGI) finden sich auch in der *Wash*-Fraktion (markiert durch die schwarzen Pfeile), dazu gehören die pankreatische Amylase, kationisches Trypsin III, Chymotrypsin B sowie die RNase A. Im Gegensatz zur *Wash*-

Fraktion lassen sich aber sowohl die saure als auch die basische Proteingruppe nicht in der ZGI-Fraktion darstellen.

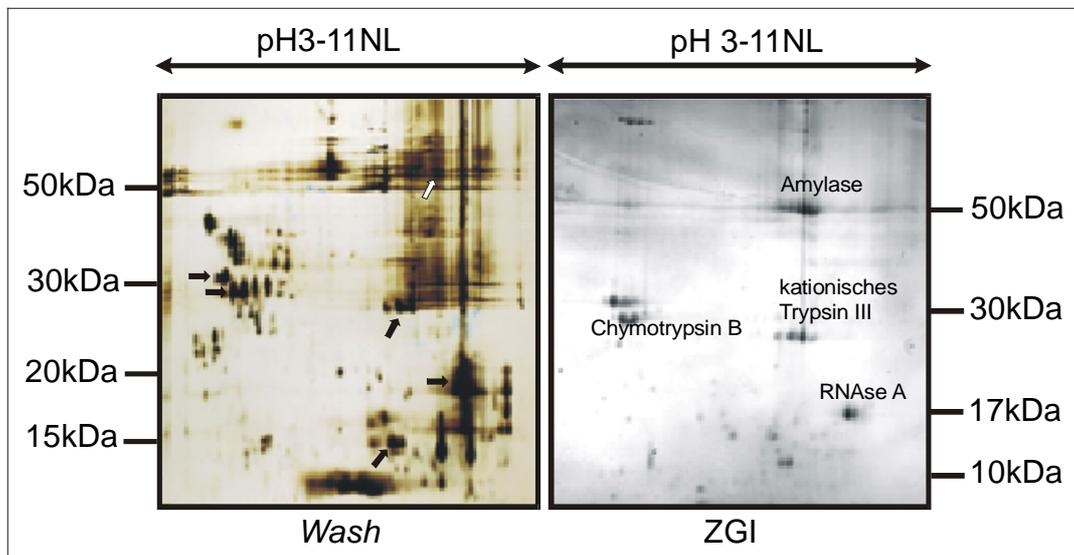


Abb. 4.6: Vergleichende Darstellung der 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung von 300µg *Wash* bzw. 300µg *ZGI*. Die Proteine beider Fraktionen wurden in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (X-Achse; pH-Gradient 3-11NL) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (Y-Achse; 12,5%iges SDS-Gel) aufgetrennt und durch eine kombinierte Coomassie-Silber-Färbung dargestellt. Schwarze und weiße Pfeile in der Abbildung der *Wash*-Fraktion weisen auf entsprechende Proteine der *ZGI*-Fraktion hin.

Im Verlauf der Versuchsreihen wurden verschiedene Versuchsbedingungen getestet, um eventuelle Verbesserungen der Auftrennung zu erreichen (nicht gezeigt). Zunächst wurde dem Rehydratisierungspuffer (2.12) Thioharnstoff zugesetzt, der zusätzlich zu dem im Rehydratisierungspuffer enthaltenen Harnstoff die Solubilisierung der Proteine verbessern sollte. Dies führte jedoch zu einer schlechteren Auftrennung der basischen Proteingruppe und wurde deshalb nicht weiter verfolgt. Weiter wurden verschiedene pH-Gradienten (pH 3–5,6 sowie pH 7–11) verwendet, um die basische und saure Gruppe besser auftrennen zu können. Dies erbrachte für keine der beiden Gruppen entscheidende Vorteile in der Auftrennung oder der nachfolgenden MALDI-Analyse. Außerdem akkumulierte die jeweils andere Hälfte der Proteinfraktion im Grenzbereich des verwendeten pH-Gradienten und stand nicht mehr zur Analyse zur Verfügung.

Auch das Färbeprotokoll wurde durch die Verwendung der kombinierten Coomassie-Silber-Färbung (3.1.5d und 3.1.5e) optimiert. Andere Protokolle

(3.1.5) brachten nicht die gewünschte Qualität oder waren bei vergleichbarem Ergebnis (Sypro Ruby; 3.1.9b(2)) aus Kostengründen sowie aufgrund der aufwendigeren Detektion weniger attraktiv.

Die Abbildungen 4.3, 4.4 und 4.5 stellen beispielhaft die reproduzierbaren und für die *Wash*-Fraktion charakteristischen Ergebnisse nach Optimierung der Versuchsbedingungen für die beschriebenen Methoden dar.

4.3 Die saure Gruppe der *Wash*-Fraktion beinhaltet viele glykosylierte Proteine

Um posttranslationale Modifikationen der aufgetrennten Proteine der *Wash*-Fraktion zu analysieren, wurde zunächst das spezifische Glykosylierungsmuster dieser Proteinfraction untersucht. Dazu wurden 300µg *Wash* 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.4.1) und anschließend auf Nitrocellulose gebロットet (3.1.7). Auf der Blotmembran wurden dann unter Verwendung des *DIG Glycan Detection Kits* (Roche, Mannheim) Glykoproteine spezifisch angefärbt und ihre Verteilung analysiert. Abbildung 4.7 zeigt das Verteilungsmuster der 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennten Glykoproteine.

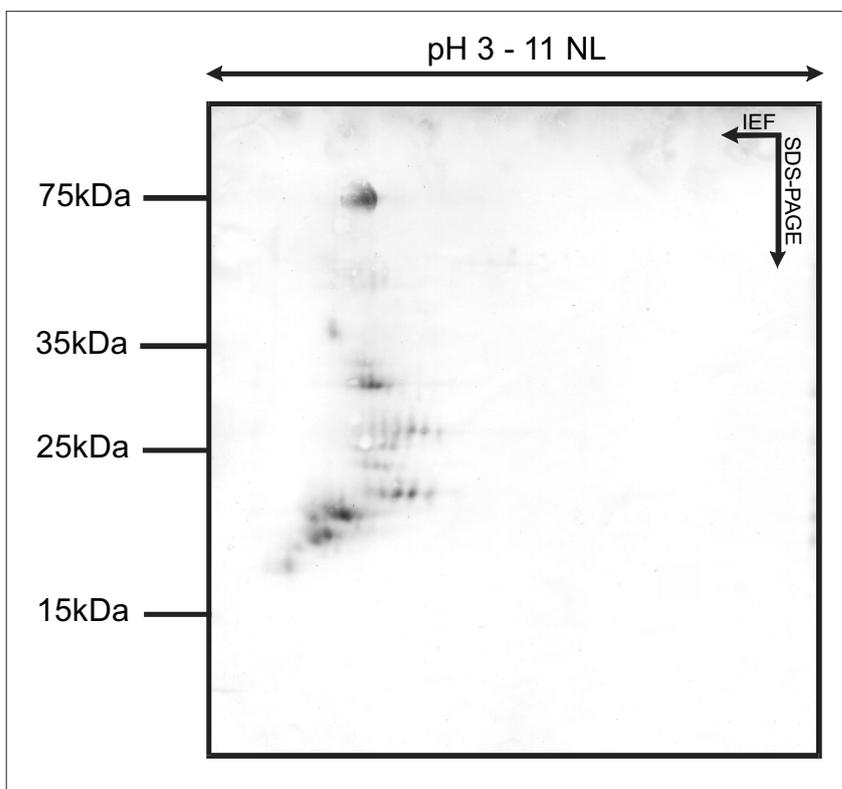


Abb. 4.7:
Anfärbung von Glykoproteinen der *Wash*-Fraktion auf Nitrocellulose. 300µg *Wash* wurden 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (pH-Bereich 3-11NL, 12,5% Polyacrylamid) und auf Nitrocellulose gebロットet. Unter Verwendung des *DIG Glycan Detection Kits* (Roche, Mannheim) wurden die Glykoproteine der *Wash*-Fraktion spezifisch auf der Blotmembran angefärbt.

Die Glykoproteinfärbung auf der Blotmembran markiert ausschließlich Proteine der sauren Gruppe der *Wash*-Fraktion in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 15kDa und 75kDa. Die Proteine der basischen Gruppe werden nicht dargestellt (Abb. 4.7). Auch andere verwendete Glykoproteinfärbeprotokolle (*Multiplex Proteomics Glycoprotein Gel Stain Kit* (Molecular Probes); 3.1.9b) ergaben ein vergleichbares Ergebnis (nicht gezeigt).

4.4 Viele Proteine der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas konnten durch MALDI-MS- und MALDI-MSMS-Analysen identifiziert werden

Um die in den 2D-Gelen dargestellten Proteine der *Wash*-Fraktion zu identifizieren, wurde ein massenspektrometrischer Versuchsansatz gewählt. Mit Hilfe der Massenspektrometrie können Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum bestimmt werden. Grundsätzlich besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, in der aus einer Probensubstanzquelle ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird, einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis auftrennt, und einem Detektor, der den Ionenstrom misst. Als Ergebnis ergibt sich ein Massenspektrum, in dem die relativen Häufigkeiten der Ionen gegen ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgetragen sind. Zur Identifizierung von Proteinen eignet sich die **Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation (MALDI)**. Das zu identifizierende Protein wird zunächst durch eine geeignete Protease (z.B. Trypsin) in proteinspezifische Peptidfragmente gespalten. Diese Peptide werden dann zusammen mit einer geeigneten Matrix (hier: α -Cyano-4-Hydroxymizsäure) auf einen Probenhalter aufgebracht und bilden dort nach Trocknung einen Ko-Kristall. Die Matrix hat eine entscheidende Funktion für die Ionisation der Peptidprobe. Durch Beschuss der Probe mit einem Laser werden die ionisierten Peptide aus dem Kristall in die Gasphase überführt und durch eine probennahe Elektrode in Richtung des Detektors beschleunigt. Im sogenannten *Time-of-flight*-Massenspektrometer errechnet das Gerät aus der Dauer der Flugzeit, die das entsprechende Peptidion benötigt, um den Detektor zu erreichen, die Masse des Ions. Ergebnis der Analyse ist ein proteinspezifisches Peptidspektrum, das die Peptide in Abhängigkeit von ihrer Masse darstellt. Mit

Hilfe dieser Massenspektren können nun geeignete Proteindatenbanken durchsucht werden und die analysierten Proteine identifiziert werden. Bei nicht eindeutigem Ergebnis können im Folgenden einzelne Peptide der gesuchten Proteine fragmentiert werden. Das Ergebnis ist eine spezifische Aminosäuresequenz, die zur Datenbankrecherche genutzt werden kann.

Durchführung:

Zur Identifizierung der Proteine der *Wash*-Fraktion wurden die angefärbten Proteinspots wie beschrieben (3.1.6) aus den 2D-Gelen ausgestochen. Nach Entfärbung der Spots und Spaltung der Proteine in proteinspezifische Peptidfragmente unter Verwendung der Serinprotease Trypsin wurden die eluierten Peptidfragmente entsalzt und massenspektrometrisch im *Time-of-flight*-Massenspektrometer analysiert. Die zugehörigen Proteine wurden durch den Vergleich der Peptidspektren mit spezifischen Datenbanken (NCBI) identifiziert (3.1.6). In Abbildung 4.8 sind die Proteinspots der basischen Proteine der *Wash*-Fraktion in einem vergrößerten Ausschnitt von Abbildung 4.3 dargestellt und fortlaufend mit Nummern von B1 bis B41 bezeichnet (siehe auch Tabelle 4.1). Abbildung 4.9 zeigt die Auftrennung der sauren Proteine der *Wash*-Fraktion in einem vergrößerten Ausschnitt von Abbildung 4.3 und die fortlaufende Bezeichnung der Proteinspots mit S1 bis S62 (siehe auch Tabelle 4.2). Insgesamt wurden 103 reproduzierbare Proteinspots mehrfach aus verschiedenen 2D-Gelen gestochen und massenspektrometrisch analysiert. Unbeschriftete Spots waren unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht immer reproduzierbar, weshalb der Fokus der Analyse auf den beschrifteten Proteinspots lag. Die ermittelten proteinspezifischen Peptidspektren wurden sowohl mittels MALDI-MS als auch einzelne Peptide mittels MALDI-MSMS analysiert. Die dadurch identifizierten Proteine sind in Tabelle 4.1 (basische Proteine) und Tabelle 4.2 (saure Proteine) dargestellt und rot hervorgehoben. Blau unterlegte Spotbezeichnungen stellen Proteinspots dar, die zwar mehrfach mittels MALDI-MS und MALDI-MSMS analysiert wurden, aber bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Dies könnte mit potentiellen posttranslationalen Modifikationen (vgl. Abb. 4.7) der Proteine in Zusammenhang stehen.

Die Aufarbeitung der Proteinproben und die MALDI-Analyse wurde unter freundlicher Mithilfe von Frau Dr. D. Delacour (AG Prof. Jacob, Institut für

Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg) sowie Herrn Dr. J. Nyalwidhe (AG Prof. Lingelbach, Institut für Biologie, Philipps-Universität Marburg) und Herrn Dr. J. Adamkiewicz (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

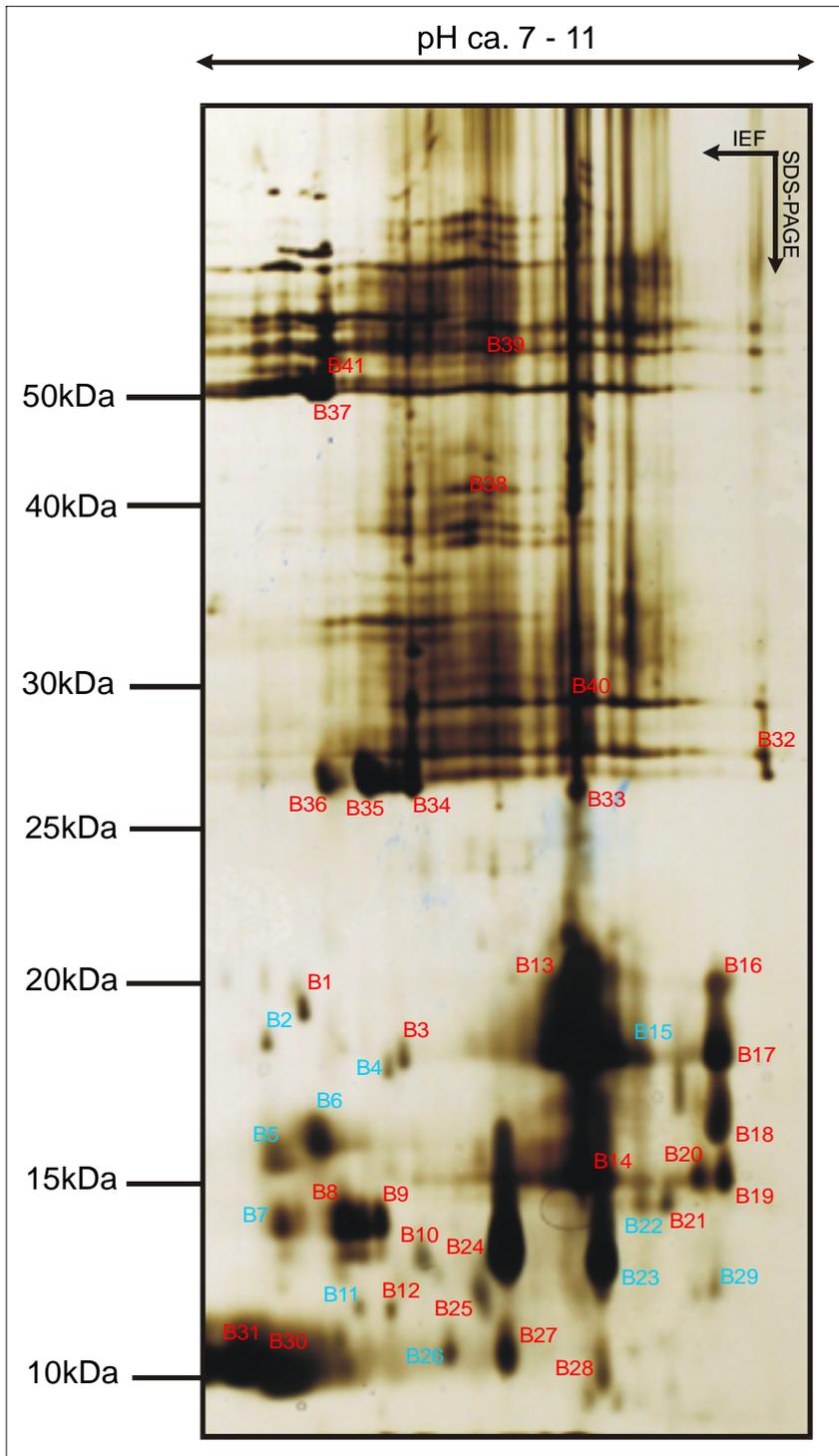


Abb. 4.8:

Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts von Abbildung 4.3, der die basischen Proteine der Wash-Fraktion nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung von 300µg Wash im pH-Gradienten (pH 3-11 NL) und SDS-PAGE (12,5%) zeigt. Alle analysierten Spots sind fortlaufend beschriftet mit B1-B41; rot: identifizierte Proteine; blau: nicht identifizierte Proteine.

Tabelle 4.1: Analyisierte basische Proteine der Wash-Fraktion (rot: identifizierte Spots; blau: nicht identifizierte Spots; gelb unterlegt: Molekulargewicht entspricht nicht dem Molekulargewicht des gestochenen Proteinspots)

Spot	Accession number (ExPASy)	Proteinbezeichnung	MW (Da)	pI	Score	Sequence Coverage	Matching Peptides	MS oder MSMS	Lokalisation, Funktion und Referenz
B1	P07882	CEL_precursor	66997	5,31	147	34%	15	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas; Inhaltsprotein, aber auch stark membranassoziiert Funktion: vom Pankreas sezerniertes Verdauungsenzym; durch Gallensäuren mit einer 7-Hydroxygruppe aktivierte Lipase; katalysiert Fett- und Vitaminabsorption und sorgt zusammen mit Lipase und Colipase für eine vollständige Verdauung der Nahrungsfette; spaltet sowohl Triacylglycerole als auch Sterylester Ref.: Kissel et al., 1989
B2		Nicht identifiziert							
B3	P07882	CEL_precursor	66997	5,31	60	2%	1	MSMS	Siehe Spot B1
B4		Nicht identifiziert							
B5		Nicht identifiziert							
B6		Nicht identifiziert							
B7		Nicht identifiziert							
B8	P00689	Pancreatic α -Amylase precursor	57140	8,34	43	1%	1	MSMS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas Funktion: Endohydrolyse von 1,4-alpha-D-glykosidischen Bindungen; bindet Calciumionen. Ref.: McDonald et al., 1980
	Q9ERK1	Calcium-modulating Cyclophilin ligand	32896	8,2	38	26%	9	MS	Lokalisation: Kolokalisation mit intrazellulären Calciumspeichern Funktion: Regulation intracellulärer Calciumlevel Ref.: Bram und Crabtree, 1994; Holloway und Bram, 1998; Lee et al., 2001
B9	P00689	Pancreatic α -Amylase precursor	57140	8,34	62	1%	1	MSMS	Siehe Spot B8
B10	P00689	Pancreatic α -Amylase precursor	57140	8,34	67				Siehe Spot B8
B11		Nicht identifiziert							
B12	P17084	Colipase precursor	12814	8,04	66				Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas, Inhaltsprotein Funktion: Cofaktor der pankreatischen Triacylglycerollipase (1:1); ermöglicht die Bindung der Lipase an Lipid-Wasser-Interphasen. Ohne Colipase wird die Lipase durch Gallensalze gehemmt Ref.: Wicker and Puigserver, 1990
B13	P00684	RNAse A	17268	8,63	62	55%	7	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas, Inhaltsprotein Funktion: Pankreatisches Verdauungsenzym; Endonuklease; katalysiert die Spaltung von RNA am 3'-Ende von Pyrimidin-Nukleotiden; Assoziation mit Proteoglykanen. Ref.: Beintema, 1983

Tabelle 4.1: Analytierte basische Proteine der Wash-Fraktion (rot: identifizierte Spots; blau: nicht identifizierte Spots; gelb unterlegt: Molekulargewicht entspricht nicht dem Molekulargewicht des gestochenen Proteinspots)

Spot	Accession number (ExPasy)	Proteinbezeichnung	MW (Da)	pI	Score	Sequence Coverage	Matching Peptides	MS oder MSMS	Lokalisation, Funktion und Referenz
B14	Q35775	Synccollin	16427	8,61	72	26%		MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas; Luminal an die Zymogengranulamembran assoziiertes Protein Funktion: potentiell porenbildend, evt. Beteiligung an Immunabwehr, wichtig für die Regulation der Exozytose Ref.: Edwardson et al., 1997
B15		Nicht identifiziert							
B16	P24368	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (Cyclophilin B)	20352	9,35	129	49%	10	MS	Lokalisation: Endoplasmatisches Retikulum Funktion: ER-ständiges Protein; fördert die Faltung der Proteine; katalysiert cis-trans-Isomerisierung; interagiert mit Proteoglykanen. Ref.: Iwai et al., 1990
B17	Q8CJD3	ZG16p	16670	9,28	47	40%	5	MS	Lokalisation: Zymogengranula; peripheres Membranprotein Funktion: Lektin; vermittelt die Anbindung von aggregierten sekretorischen Proteinen an die submembranöse Matrix der Zymogengranula; Proteoglykanassoziiert Ref.: Cronshagen et al. 1994
B18	Q8CJD3	ZG16p	16670	9,28	74	38%	4	MS	Siehe Spot B17
B19	Q8CJD3	ZG16p	16670	9,28	66				Siehe Spot B17
B20	Q8CJD3	ZG16p	16670	9,28	66				Siehe Spot B17
B21	Q8CJD3	ZG16p	16670	9,28	39				Siehe Spot B17.
	P10888	Cytochrom-c-Oxidase polypeptid IV	19559	9,45	52	34%	7	MS	Lokalisation: Teil des Cytochrom-c-Oxidasekomplexes an der inneren Mitochondrienmembran Funktion: Kern-kodierte Polypeptidkette der Cytochrom-c-Oxidase Ref.: Goto et al., 1989
B22		Nicht identifiziert							
B23		Nicht identifiziert							
B24	Q71V43	Voltage-dependent Ca ²⁺ -channel $\alpha 1E$ - fragment	13065	8,04	33	86%	29	MS	Lokalisation: Nervenzellen, Herzmuskelzellen u.a. Funktion: low-voltage-gated Calciumkanal Ref.: Piedras-Renteria et al., 1997
B25	P17084	Collipase precursor	12814	8,04	73	7%	1	MSMS	Siehe Spot B12
B26	P17084	Collipase precursor	12814	8,04	67	7%	1	MSMS	Siehe Spot B12
B27		Nicht identifiziert							
B28	P17084	Collipase precursor	12814	8,04	66				Siehe Spot B12
B29	P17084	Collipase precursor	12814	8,04	69	16%	1	MSMS	Siehe Spot B12
B29		Nicht identifiziert							

Tabelle 4.1: Analytierte basische Proteine der Wash-Fraktion (rot: identifizierte Spots; blau: nicht identifizierte Spots; gelb unterlegt: Molekulargewicht entspricht nicht dem Molekulargewicht des gestochenen Proteinspots)

Spot	Accession number (Expasy)	Proteinbezeichnung	MW (Da)	pI	Score	Sequence Coverage	Matching Peptides	MS oder MSMS	Lokalisation, Funktion und Referenz
B30	P17084	Colipase precursor	12814	8,04	42	51%	5	MS	Siehe Spot B12
B31	P17084	Colipase precursor	12814	8,04	70	7%	1	MSMS	Siehe Spot B12
B32	P09650	Chymase precursor (RMCP-1)	27992	9,54	82	45%	7	MS	Lokalisation: Mastzellgranula Funktion: Häufigste Mastzellprotease; Serinprotease; bildet vasoaktive Substanzen, baut extrazelluläre Matrix ab, reguliert Drüsenfunktionen; Proteoglykan-assoziiert Ref.: Lutzelschwab et al., 1997
B33	Q9EQZ8	Chymopasin	28116	8,56	51	40%	7	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas; sekretorisches Protein Funktion: Serin-Protease Ref.: Sogame et al., 2002
B34	P08426	Cat. Trypsin III precursor	26936	7,45	38	34%	8	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas; Inhaltsprotein Funktion: Vom Pankreas sezerniertes Verdauungsenzym; S1-Peptidase, Serinprotease; bindet 1Calciumion pro Einheit Ref.: Fletcher et al., 1987
B35	P08426	Cat. Trypsin III precursor	26936	7,45	57	29%	8	MS	Siehe Spot B34
B36	P08426	Cat. Trypsin III precursor	26936	7,45	52				Siehe Spot B34
B37	P27657	Pancreatic triacylglycerol lipase	49764	6,33	192		6	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas Funktion: Spaltet Ester von langkettigen Fettsäuren und Glycerol in Position 1 und 3, was zu 2-Monoacylglycerol und freien Fettsäuren führt. AB-Hydrolase-Familie. Ref.: Payne et al., 1994
B38	P00689	Pancreatic α -Amylase precursor	57140	8,34	78		2	MSMS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas Funktion: Endohydrolyse von 1,4-alpha-D-glykosidischen Bindungen; bindet Calciumionen. Ref.: McDonald et al., 1980
B39	P00689	Pancreatic α -Amylase precursor	57140	8,34	91		4	MSMS	Siehe Spot B38
B40	P07882	CEL precursor	66997	5,31	138		8	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas Funktion: Vom Pankreas sezerniertes Verdauungsenzym; durch Gallensäuren mit einer 7-Hydroxygruppe aktivierte Lipase; katalysiert Fett- und Vitaminabsorption und sorgt zusammen mit Lipase und Colipase für eine vollständige Verdauung der Nahrungsfette; spaltet sowohl Triacylglycerole als auch Sterylester Ref.: Kissel et al., 1989
B41	P54316	Pancreatic lipase related protein 1 precursor	52345	5,79	196		9	MSMS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas Funktion: unbekannt Ref.: Lowe, 2002

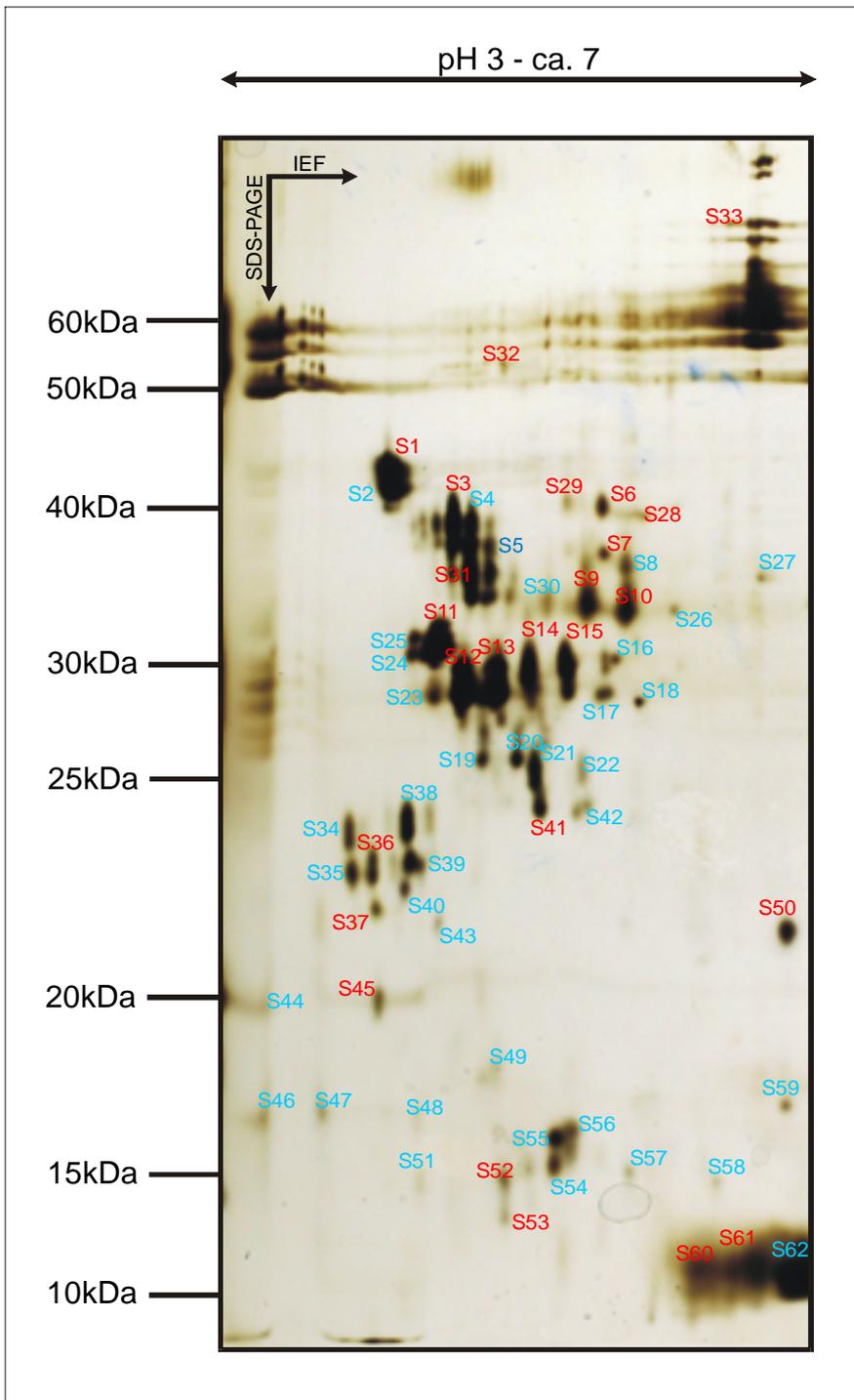


Abb. 4.9:
Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts von Abbildung 4.3, die die sauren Proteine der Wash-Fraktion nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung von 300µg Wash im pH-Gradienten (pH 3-11 NL) und SDS-PAGE (12,5%) zeigt. Alle analysierten Spots sind fortlaufend beschriftet mit S1-S62; rot: identifizierte Proteine; blau: nicht identifizierte Proteine.

Tabelle 4.2: Analyisierte saure Proteine der Wash-Fraktion (rot: identifizierte Spots; blau: nicht identifizierte Spots; gelb unterlegt: Molekulargewicht entspricht nicht dem Molekulargewicht des gestochenen Proteinspots)

Spot	Accession number (Expasy)	Proteinbezeichnung	MW (Da)	pI	Score	Sequence Coverage	Matching Peptides	MS oder MSMS	Lokalisation, Funktion und Referenz
S1	P07882	CEL precursor	66997	5,31	61				Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas; Inhaltsprotein, aber auch stark membranassoziiert Funktion: Vom Pankreas sezerniertes Verdauungsenzym; durch Gallensäuren mit einer 7-Hydroxygruppe aktivierte Lipase; katalysiert Fett- und Vitaminabsorption und sorgt zusammen mit Lipase und Colipase für eine vollständige Verdauung der Nahrungsfette; spaltet sowohl Triacylglycerole als auch Sterylester Ref.: Kissel et al., 1989
S2		Nicht identifiziert							
S3	P07882	CEL precursor	66997	5,31	22		2	MSMS	Siehe Spot S1
S4		Nicht identifiziert							
S5		Nicht identifiziert							
S6	Q9JU19	ERM-binding phospho-protein rat	38699	5,70	43				Lokalisation: Intracytoplasmatische Membranen ; peripheres Membranprotein Funktion: Verbindet Plasmamembranproteine mit Mitgliedern der Ezrin/Moesin/Radixin-Familie; Anbindung an das Aktin-Cytoskelett Ref.: Fouassier et al., 2000
S7	P54316	Pancreatic lipase related protein 1 precursor	52345	5,79	68		6	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas Funktion: unbekannt Ref.: Lowe, 2002
S8		Nicht identifiziert							
S9	P55260	Annexin A4 (ZAP36)	35717	5,31	87	41%	13	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas; peripheres Membranprotein Funktion: Zymogengranulamembran- assoziiertes Protein; Calcium/Phospholipid-bindendes Protein, das Membranfusion fördert und in die Exocytose involviert ist. Ref.: Fukuoka et al., 2002
	P55091	Chymotrypsin C	29355	5,31	76		5	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas; Inhaltsprotein Funktion: vom Pankreas sezernierte Serinprotease vom Chymotrypsin-Typ; Elastase-Subfamilie Ref.: Kang et al., 1992
S10	P55260	Annexin A4	35717	5,31	81	29%	9	MS	Siehe Spot S9
S11	P07882	CEL precursor	66997	5,31	30		2	MSMS	Siehe Spot S1

Tabelle 4.2: Analyisierte saure Proteine der Wash-Fraktion (rot: identifizierte Spots; blau: nicht identifizierte Spots; gelb unterlegt: Molekulargewicht entspricht nicht dem Molekulargewicht des gestochenen Proteinspots)

Spot	Accession number (Expsy)	Proteinbezeichnung	MW (Da)	pI	Score	Sequence Coverage	Matching Peptides	MS oder MSMS	Lokalisation, Funktion und Referenz
S12	P07338	Chymotrypsin B precursor	27849	4,9	75	41%	8	MS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas; Inhaltsprotein Funktion: Vom Pankreas sezerniertes Verdauungsenzym; Serinprotease der Peptidase S1-Familie Ref.: Bell et al., 1984 Siehe Spot S12
S13	P07338	Chymotrypsin B precursor	27849	4,9	100	5%	1	MSMS	Siehe Spot S12
S14	P07338	Chymotrypsin B precursor	27849	4,9	57	41%	8	MS	Siehe Spot S12
S15	P10719	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	51709	4,95	69				Lokalisation: innere Mitochondrienmembran Funktion: Katalytische Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase; Produktion von ATP in Gegenwart eines Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran Ref.: Garboczi et al., 1988
S16		Nicht identifiziert							
S17		Nicht identifiziert							
S18		Nicht identifiziert							
S19		Nicht identifiziert							
S20		Nicht identifiziert							
S21		Nicht identifiziert							
S22		Nicht identifiziert							
S23		Nicht identifiziert							
S24		Nicht identifiziert							
S25		Nicht identifiziert							
S26		Nicht identifiziert							
S27		Nicht identifiziert							
S28	P07882	CEL precursor	66997	5,31	38		1	MSMS	Siehe Spot S1
S29	P27657	Pancreatic triacylglycerol lipase precursor	51407	6,31	84				Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas Funktion: Spaltet Ester von langkettigen Fettsäuren und Glycerol in Position 1 und 3, was zu 2-Monoacylglycerol und freien Fettsäuren führt. AB-Hydrolase-Familie. Ref.: Payne et al., 1994
S30		Nicht identifiziert							
S31	P07882	CEL precursor	66997	5,31	69				Siehe Spot S1
S32	P10719	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	56318	5,19	100		9	MS	Siehe Spot S15
S33	P07882	CEL precursor	66997	5,31	36		1	MSMS	Siehe Spot S1
S34		Nicht identifiziert							

Tabelle 4.2: Analysierte saure Proteine der Wash-Fraktion (rot: identifizierte Spots; blau: nicht identifizierte Spots; gelb unterlegt: Molekulargewicht entspricht nicht dem Molekulargewicht des gestochenen Proteinspots)

Spot	Accession number (Expsy)	Proteinbezeichnung	MW (Da)	pI	Score	Sequence Coverage	Matching Peptides	MS oder MSMS	Lokalisation, Funktion und Referenz
S35		Nicht identifiziert							
S36	Q5U3X3	Albumin	70710	6,09	70		1	MSMS	Lokalisation: Blutplasma Funktion: Hauptprotein des Blutplasmas; transportiert Ionen sowie Hormone u.ä. und reguliert den kolloidalen osmotischen Druck des Blutes Ref.: Sargent et al., 1981
S37	Q8UHA7	Ribonuklease H	16261	7,79	84				Lokalisation: bakterielles Cytoplasma Funktion: Degradiert RNA aus RNA-DNA-Hybriden Ref.: Wood et al., 2001
S38		Nicht identifiziert							
S39		Nicht identifiziert							
S40		Nicht identifiziert							
S41	P07882	CEL precursor	66997	5,31	57				Siehe Spot S1
S42		Nicht identifiziert							
S43		Nicht identifiziert							
S44		Nicht identifiziert							
S45	P07882	CEL precursor	66997	5,31	151		12	MS	Siehe Spot S1
S46		Nicht identifiziert							
S47		Nicht identifiziert							
S48		Nicht identifiziert							
S49		Nicht identifiziert							
S50	P31399	ATP synthase D chain, mitochondrial	18678	6,21	59	48%	6	MS	Lokalisation: Nicht-enzymatische Komponente des mitochondrialen ATPase-Komplexes; exakte Funktion unbekannt Ref.: Higuti et al., 1993
S51		Nicht identifiziert							
S52	P11240	Cytochrom-c-Oxidase Polypeptid Va, mitochondrial precursor	16119	6,08	27		1	MSMS	Lokalisation: Teil des Cytochrom-c-Oxidasekomplexes an der inneren Mitochondrienmembran Funktion: Häm A-enhaltende Kette der Cytochrom-c-Oxidase (terminale Oxidase in der Elektronentransportkette) Ref.: Droste et al., 1989 Siehe Spot S52
S53	P11240	Cytochrom-c-Oxidase Polypeptid Va, mitochondrial precursor	16119	6,08	40				
S54		Nicht identifiziert							
S55		Nicht identifiziert							
S56		Nicht identifiziert							
S57		Nicht identifiziert							

Tabelle 4.2: Analysierte saure Proteine der Wash-Fraktion (rot: identifizierte Spots; blau: nicht identifizierte Spots; gelb unterlegt: Molekulargewicht entspricht nicht dem Molekulargewicht des gestochenen Proteinspots)

Spot	Accession number (Expasy)	Proteinbezeichnung	MW (Da)	pI	Score	Sequence Coverage	Matching Peptides	MS oder MSMS	Lokalisation, Funktion und Referenz
S58		Nicht identifiziert							
S59		Nicht identifiziert							
S60	P17084	Collipase precursor	12814	8,04	66	7%	1	MSMS	Lokalisation: Zymogengranula des exokrinen Pankreas Funktion: Cofaktor der pankreatischen Triacylglycerollipase (1:1); ermöglicht die Bindung der Lipase an Lipid-Wasser-Interphasen. Ohne Collipase wird die Lipase durch Gallensalze gehemmt. Ref.: Wicker and Puigserver, 1990
S61	P17084	Collipase precursor	12814	8,04	66	7%	1	MSMS	Siehe Spot S60
S62		Nicht identifiziert							

Der in Tabelle 4.1 und 4.2 aufgeführte *Score* (*Probability based Mowse Score*) ist ein Maß für die Güte der Analyse, d.h. wie wahrscheinlich es ist, dass das analysierte Protein tatsächlich dem in der Datenbank gefundenen Protein entspricht. Der *Score* entspricht $(-10 \times \log(P))$, wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass die beobachtete Übereinstimmung ein zufälliges Ereignis darstellt. *Scores* > 54 sind signifikant, für P gilt dann $P < 0,05$.

Abbildung 4.10 zeigt schematisch die Verteilung der analysierten Proteinspots sowie den Anteil identifizierter Proteine innerhalb der sauren und basischen Gruppe.

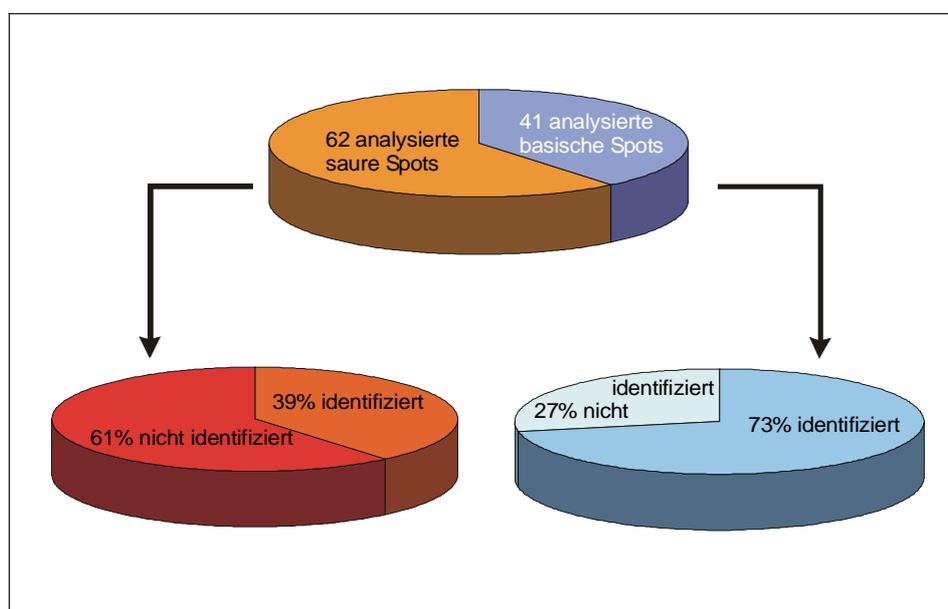


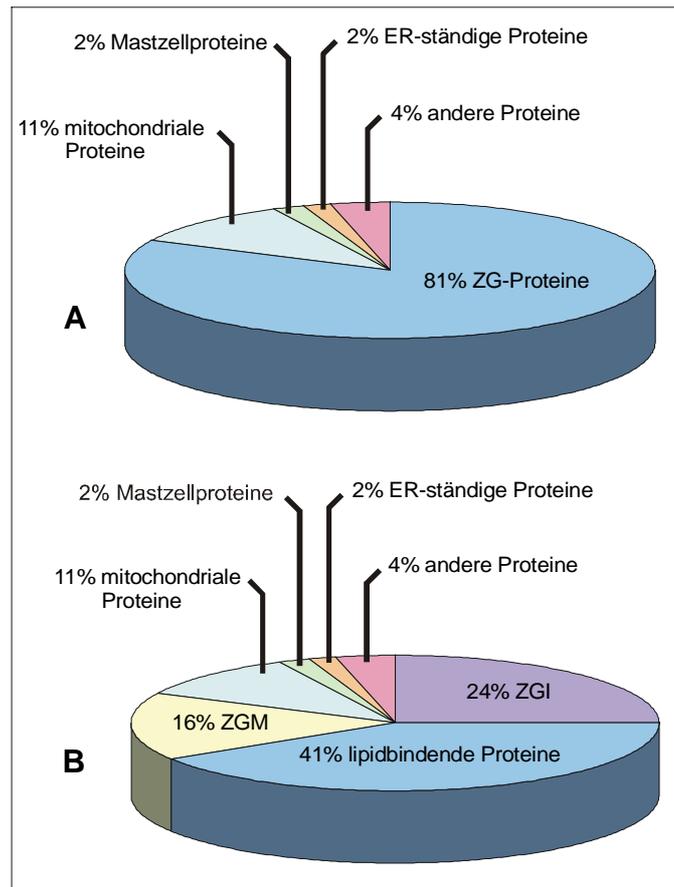
Abb. 4.10: Graphische Darstellung der Anzahl analysierter Proteinspots sowie des prozentualen Anteils identifizierter Proteine innerhalb der sauren und basischen Gruppe.

Insgesamt wurden 103 reproduzierbare Proteinspots analysiert (62 saure Proteine und 41 basische Proteine; Abb. 4.10). Es fällt auf, dass die Identifizierungsquote der sauren Proteine deutlich schlechter ausfällt als die der basischen Proteine. Während 73% der analysierten basischen Proteine auch identifiziert wurden, konnten nur 39% der sauren Proteine identifiziert werden. Dies lag in einigen wenigen Fällen an der mangelnden Güte des Spektrums, wodurch keine eindeutige Analyse möglich war. Für die meisten Proteinspots jedoch war die Qualität des Spektrums sehr gut, der Hintergrund war minimal und auch Verunreinigungen (durch Keratin o.Ä.) waren praktisch nicht zu

verzeichnen. Dennoch konnten manche Proteine auch nach mehrmaliger Analyse mittels MALDI-MS und MALDI-MSMS (3.1.6) nicht eindeutig identifiziert werden (in Tabelle 4.1 und 4.2 sowie Abb. 4.8 und 4.9 blau unterlegt dargestellt). Eventuell hängt dies mit bestimmten posttranslationalen Modifikationen der Proteine zusammen (vgl. Abb. 4.7), die einerseits Schnittstellen der verwendeten Protease teilweise unzugänglich machen könnten und somit zu einer Veränderung des Peptidspektrums führen, andererseits können Modifikationen, die an den Peptidfragmenten verbleiben, zu Problemen in der Peptidanalyse führen. Da die speziellen Modifikationen der untersuchten Proteine nicht bekannt waren, führte dies zu Problemen in der Proteinanalyse und im weiteren Verlauf der Experimente zu dem Versuch, die Modifikationen näher zu bestimmen (Abb. 4.7).

Gelb unterlegt in Tabelle 4.1 und 4.2 sind Molekulargewichtsangaben von Spots, deren im SDS-Gel erkennbares Molekulargewicht nicht mit dem theoretischen Molekulargewicht der identifizierten Proteine übereinstimmt. Dies könnte bei Spots, deren im Gel erkennbares Molekulargewicht niedriger als das theoretische Molekulargewicht ist, möglicherweise in proteolytischen Prozessen während der Präparation der Zymogengranulasubfraktionen begründet sein. Sollten proteolytische Prozesse eine Rolle spielen, so sind nicht alle Proteine in gleichem Maß davon betroffen. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die Angaben der theoretischen Molekulargewichts- und pI-Werte der neu in den Zymogengranula identifizierten Proteine Chymase (Spot B32) und Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (Spot B16) mit den aus dem SDS-Gel abzuschätzenden Werten übereinstimmen. Gleiches gilt für die näher charakterisierten Proteine Syncollin (Spot B14), ZG16p (Spot B19) und RNase A (Spot B13).

Abbildung 4.11 zeigt die prozentuale Verteilung der identifizierten Proteine auf verschiedene Zellkompartimente, in denen die identifizierten Proteine zuerst beschrieben wurden.



C: Gruppenzugehörigkeit der identifizierten Proteinspots

Lokalisation	Anzahl der Proteine	Spotbezeichnung	Prozent
<u>ZG gesamt:</u>	47		81%
ZGI	14	S9, S12, S13, S14, B8, B9, B10, B13, B33, B34, B35, B36, B38, B39	25%
ZGM	9	S6, S9, S10, B14, B17, B18, B19, B20, B21	16%
Lipidbindende Proteine	24	S1, S3, S7, S11, S28, S29, S31, S33, S41, S45, S60, S61, B1, B3, B12, B24, B25, B27, B28, B30, B31, B37, B40, B41	40%
<u>Andere Zellkompartimente gesamt:</u>	10		19%
Mitochondrien	6	S15, S32, S50, S52, S53, B21	11%
ER	1	B16	2%
Mastzellgranula	1	B32	2%
andere	2	S36, S37	4%

Abb. 4.11: (A) Darstellung der prozentualen Verteilung der identifizierten Proteinspots auf die verschiedenen Zellkompartimente, in denen sie zuerst beschrieben wurden; (B) weitere Unterteilung der Fraktion der Zymogengranula-assoziierten Proteine; (C) tabellarische Auflistung der identifizierten Proteinspots.

Betrachtet man die Verteilung der identifizierten Proteine näher (Abb. 4.11), so fallen verschiedene Aspekte auf. 81% der identifizierten Proteine wurden auch als Zymogengranula-assoziiert beschrieben. Innerhalb dieser Fraktion sind 16% membranassoziierte Proteine. Die restlichen 57% gehören zur Fraktion der Zymogengranulainhaltsproteine, wobei sich hier sehr viele lipidassoziierte Proteine finden, die mit 41% der identifizierten Proteine (im Vergleich zu 24% restliche Inhaltsproteine) den größten Anteil an dieser Fraktion bilden. 19% der identifizierten Proteine sind ursprünglich in anderen Zellkompartimenten bzw. Zelltypen beschrieben worden. So sind 11% der identifizierten Proteine mitochondrialen Ursprungs, je 2% sind ER- oder Mastzellproteine und 4% sind anderen Ursprungs (siehe Tabelle C, Abb. 4.11).

An dieser Stelle soll zunächst auf identifizierte Proteine eingegangen werden, die in Zymogengranula beschrieben wurden und der sauren Gruppe der *Wash*-Fraktion angehören (vgl. Abb. 4.3). Dazu gehören die pankreatischen Verdauungproteasen Chymotrypsin B und Chymotrypsin C (Tabelle 4.2). Die starke Präsenz dieser klassischen Inhaltsproteine der Zymogengranula, die durch die starke Anfärbung im SDS-Gel deutlich wird (Abb. 4.9), deutet entweder auf eine mangelnde Trennung der Zymogengranulasubfraktionen hin oder auf eine stärkere Assoziation dieser Enzyme mit der Granulamembran, die bei der Trennung von Zymogengranulainhalt und Zymogengranulamembranen zumindest teilweise erhalten bleibt. Eine mangelnde Subfraktionierung der Zymogengranula kann durch entsprechend durchgeführte Kontrollexperimente (vgl. 4.1; Abb. 4.2), ausgeschlossen werden.

Weitere Enzyme, die in der Gruppe der sauren Proteine der *Wash*-Fraktion identifiziert werden konnten, sind lipidspaltende Enzyme (Carboxyesterlipase (CEL), pankreatische Lipase, *Lipase-related-Protein*, Colipase). Anscheinend existiert eine stärkere Assoziation dieser Enzyme mit der Zymogengranulamembran, die durch die Lyse der Zymogengranula und die Subfraktionierung derselben in Inhalts- und Membranfraktion nicht oder nur anteilig aufgehoben wird, was vermutlich in der Affinität dieser Proteine Lipidoberflächen begründet ist. Durch Carbonatbehandlung (3.1.1c) scheinen sich diese lipidbindenden Proteine aber zumindest teilweise von der Zymogengranulamembran entfernen zu lassen und können in der untersuchten *Wash*-Fraktion identifiziert werden.

Als Vertreter der ZGM-Fraktion konnten Annexin A4 sowie das *ERM-binding-Protein* als Proteine der sauren Gruppe identifiziert werden. Annexin A4 ist ein für Zymogengranulamembranen beschriebenes Protein, welches ebenfalls Phospholipide binden kann und Aufgaben bei der Membranfusion und Exozytose übernimmt. Das *ERM-binding-Protein* kann die Anbindung seiner Bindungspartner an das Aktinzytoskelett vermitteln (für dieses Protein ergab sich allerdings kein signifikanter Score, siehe Tabelle 4.2).

Weiter können in der sauren Gruppe Proteine identifiziert werden, die normalerweise mitochondrialen Ursprungs sind, wie die β - und δ -Ketten der mitochondrialen ATP-Synthase sowie Anteile der Cytochrom-c-Oxidase, dem terminalen Komplex der Elektronentransportkette in den Mitochondrien. Hier muss an späterer Stelle diskutiert werden, ob es sich um eventuelle Verunreinigungen der Zymogengranulafraktion mit mitochondrialen Komponenten handelt, die mit der Zymogengranulapräparation zusammenhängen, oder ob diese Ergebnisse tatsächlich zu weiteren Funktionen dieser Proteine auch innerhalb der Zymogengranula hinführen.

Das in dieser Gruppe identifizierte Albumin stellt potentiell eher eine Verunreinigung aus Blutserum (Verunreinigung aus der Zymogengranulapräparation) dar, es wurde während der MALDI-Analysen nur einmal identifiziert. Auch die RNase H, eine Hydrolase, die DNA-RNA-Hybride erkennt und die enthaltene RNA abbaut, scheint eine Verunreinigung darzustellen und wurde ebenfalls nur einmal identifiziert (beide Proteine wurden in Abbildung 4.11 als „andere“ aufgeführt).

Auffällig ist, dass viele Spots der sauren Gruppe als Carboxyesterlipase (CEL, Gallensäure-aktivierte Lipase, Sterolesterase) identifiziert wurden (S1, S3, S11, S28, S31, S33, S41, S45), obwohl sie unterschiedliche isoelektrische Punkte und Molekulargewichte aufweisen. Dies setzt sich auch in der basischen Gruppe fort (Spots B1, B3, B40). Hier kann es sich um Fragmente dieser Lipase handeln oder um verschiedene, sich aber von ihrer Sequenz sehr ähnliche Proteine, deren Peptidspektren bei den Datenbankrecherchen zu diesem Ergebnis führen. 2D-Blots, die mit einem anti-CEL-Antikörper inkubiert wurden, zeigen u.a. ebenfalls eine Reaktion mit mehreren Spots der sauren und basischen Gruppe (4.6.1; Abb. 4.13).

Betrachtet man die identifizierten Proteine der basischen Gruppe, so finden sich auch hier viele Proteine, die mit Zymogengranula assoziiert sind, darunter lipidspaltende Enzyme (CEL, Lipase, Colipase), die hauptsächlich im Zymogengranulainhalt enthaltenen Serinproteasen kationisches Trypsin III und Chymopasin sowie die pankreatische Amylase, die glykosidische Bindungen spaltet. Für all diese Proteine (außer Chymopasin) gilt, dass auch hier mehrere Spots als solche identifiziert wurden, obwohl sie teilweise stark in Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt von den publizierten Werten abweichen (siehe Tabelle 4.1). Desweiteren finden sich aber auch in der basischen Gruppe einige Proteine, die schon früher eindeutig als periphere Membranproteine der Zymogengranula beschrieben wurden, wie das Syncollin (Tabelle 4.1; B14) und das Lektin ZG16p (Tabelle 4.1; B17-B21).

Innerhalb der basischen Gruppe fanden sich außerdem drei Proteine, die in dieser Proteinfraction so nicht erwartet wurden und aufgrund ihrer beschriebenen Fähigkeiten von besonderem Interesse für unsere Arbeitsgruppe sind. Dabei handelt es sich um die RNase A, eigentlich als Nuklease ein klassisches Inhaltsprotein der Zymogengranula, die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (PPIB), ein klassisches ER-ständiges Protein, das die Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum unterstützt, und die Chymase, eine Serinprotease und das Hauptgranulaprotein von Mastzellen. RNase A und Peptidyl-Prolyl-Isomerase B bilden zusammen mit ZG16p und Syncollin das charakteristische „Quadrat“, das sich im SDS-Gel in der basischen Gruppe darstellt (Abb. 4.4).

Im Folgenden wurde die Lokalisation einiger identifizierter Proteine der *Wash*-Fraktion verifiziert, dazu gehören die Chymase, die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B sowie die CEL und RNase A.

4.5 Zwei periphere Membranproteine der Zymogengranula, das Syncollin und das ZG16p, können in der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula über MALDI-MS identifiziert und über spezifische Antikörper im 2D-Immunoblot nachgewiesen werden

In der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula wurden über MALDI-MS zwei Proteine identifiziert, die bereits als periphere Membranproteine der Zymogengranula beschrieben worden sind: das Syncollin (Tabelle 4.1; Spot B14; Abb. 4.8) und das ZG16p (Tabelle 4.1; Spot B17 – B21; Abb. 4.8). Um diese Identifizierung zu verifizieren, wurden 300µg *Wash* 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4) und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7). Die Blotmembran wurde mit einem Maus-anti-Syncollin-Antikörper (1:1000) bzw. einem Kaninchen-anti-ZG16p-Antikörper (1:1000) als Erstantikörper (2.7) inkubiert und die entsprechenden Proteine wurden über geeignete HRP-gekoppelte Zweitantikörper (2.7) mittels ECL auf einem Röntgenfilm detektiert (3.1.7a).

Die Immunoblots in Abbildung 4.12 zeigen spezifische und dominante Markierungen der Proteinspots von Syncollin und ZG16p bei einem den Proteinen entsprechenden Molekulargewicht von 16kDa (vgl. Tabelle 4.1, Spots B14 und B17-B21). Syncollin und ZG16p bilden zwei Eckpunkte des charakteristischen „Quadrats“ der basischen Gruppe (vgl. Abb. 4.4), wobei ZG16p mit 9,28 einen etwas basischeren isoelektrischen Punkt besitzt als das Syncollin mit einem isoelektrischen Punkt von 8,61.

Der Blot von ZG16p (Abb.4.12B) zeigt, dass das Protein keinen einzigen distinkten Spot liefert, sondern im Bereich seines isoelektrischen Punktes einen leichten Proteinschmier verursacht, was die Identifizierung mehrerer Proteinspots aus dem 2D-Gel als ZG16p erklärt (Tabelle 1; B17 – B21). Dies liegt möglicherweise an der großen ZG16p-Proteinmenge, die aufgetrennt wurde.

Beide Proteine (ZG16p und Syncollin) sind schon in der Vergangenheit als periphere Zymogengranulamembranproteine beschrieben worden und sind in der *Wash*-Fraktion angereichert (für ZG16p in Abb. 4.2 gezeigt). Sie bestätigen durch die eindeutige Identifizierung in der MALDI-MS-Analyse die Spezifität dieser Methode.

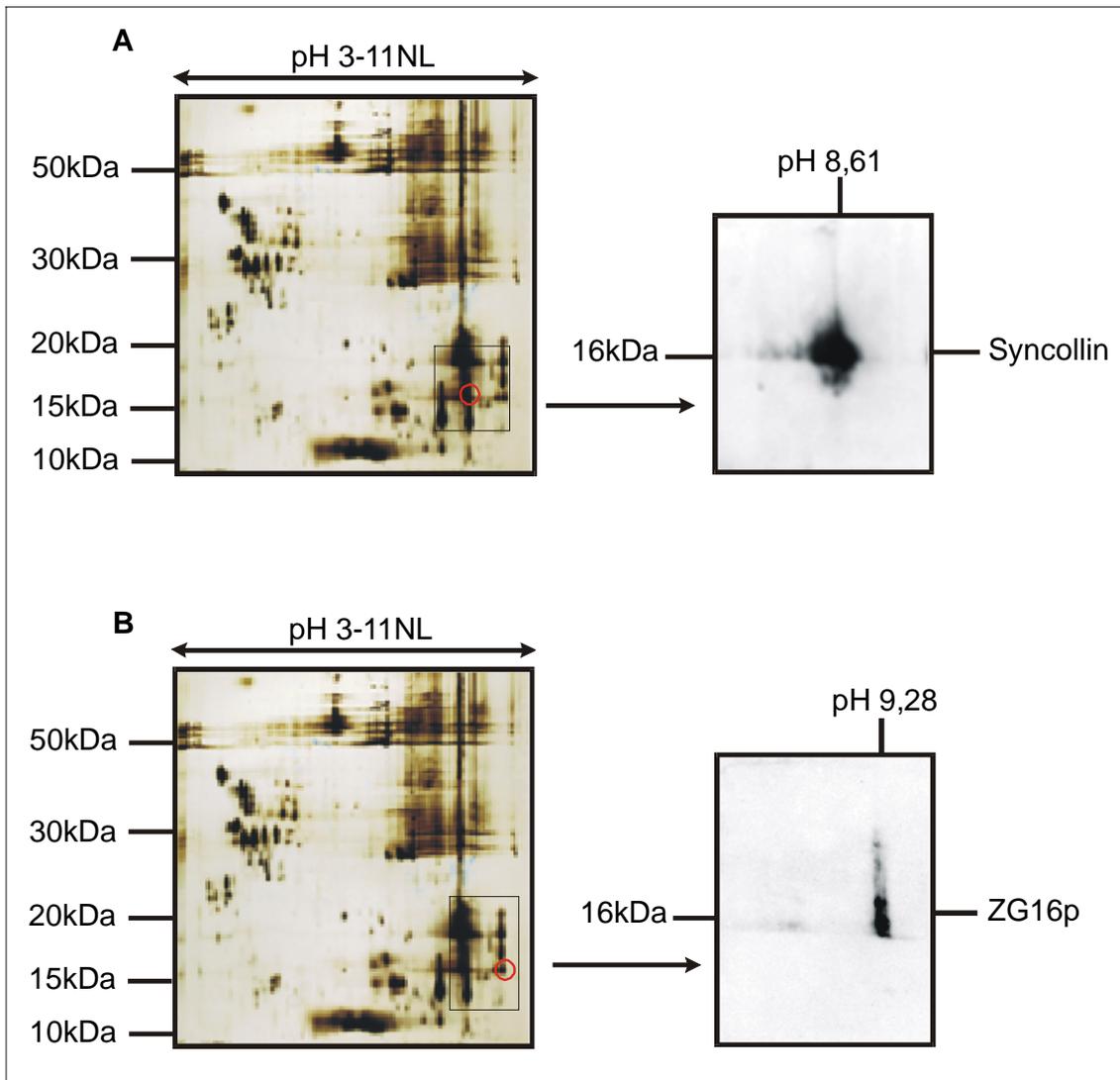


Abb. 4.12: Detektion von Syncollin (A) und ZG16p (B) im Immunoblot nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung. Je 300 μ g *Wash* wurden 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (pH-Bereich 3-11NL, 12,5% Polyacrylamid) und ein Ausschnitt des entsprechenden Gels anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Die Detektion von Syncollin und ZG16p (rote Kreise im 2D-Gel) erfolgte über proteinspezifische Erstantikörper (Maus-anti-Syncollin-Antikörper (1:1000) bzw. Kaninchen-anti-ZG16p-Antikörper (1:1000)) und entsprechende HRP-gekoppelte Zweitantikörper (1:2000). Die schwarzen Rahmen in den 2D-Gelen zeigen den jeweiligen Gelausschnitt, der geblottet und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert wurde.

Im Folgenden sollen einige Ergebnisse der MALDI-Analyse verifiziert werden. Die entsprechenden identifizierten Proteine sollen hinsichtlich ihrer Lokalisation und der Regulation ihrer mRNA-Level in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas näher untersucht werden.

4.6 Immunoblotstudien zur Carboxyesterlipase (CEL) und RNase A

4.6.1 CEL und RNase A können nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung und Immunoblotting in der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula detektiert werden

Die Carboxyesterlipase (CEL) und RNase A wurden mit Hilfe der MALDI-Analyse (3.1.6) identifiziert (siehe Tabelle 4.1 und 4.2; Spots B1, B3, B40, S1, S3, S11, S28, S31, S33, S41, S45 (CEL); B13 (RNase A)). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden 300µg der *Wash*-Fraktion 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4), auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7) und anschließend mit CEL- bzw. RNase A-spezifischen Erstantikörpern inkubiert (2.7). Die Detektion der Proteine erfolgte über spezifische HRP-gekoppelte Zweitantikörper (2.7) und anschließende Chemilumineszenz (3.1.7a).

Abbildung 4.13 zeigt das Proteinspotmuster, das sich nach Inkubation der Blotmembran mit einem anti-CEL-Antikörper ergibt. Der Immunoblot wurde mit einem Huhn-anti-CEL-Antikörper (1:70) und einem anti-Huhn-HRP-Zweitantikörper inkubiert. Nach der Chemilumineszenzreaktion werden hauptsächlich das „V“ der sauren Proteingruppe (vgl. Abb. 4.3) sowie zwei Spots im basischen Bereich auf dem Film markiert. Die schwarzen Pfeilspitzen deuten auf Proteinspots, die in der MALDI-Analyse als Carboxyesterlipase identifiziert wurden (vgl. Tabelle 4.1 und 4.2; Abbildung 4.8 und 4.9). Zusätzlich stellen sich hier noch weitere Spots dar, die durch den anti-CEL-Antikörper erkannt werden, die innerhalb des gebildeten „V“ der sauren Proteingruppe liegen. Teilweise wurden diese Spots als andere Proteine identifiziert (vgl. Abb. 4.9 und Tabelle 2: S12, S13, S14 (Chymotrypsin B)), wodurch sich die Frage ergibt, ob der Antikörper spezifisch CEL erkennt oder eventuell mit anderen (Glyko-) Proteinen kreuzreagiert. Festzuhalten ist jedoch, dass die durch MALDI-Analyse als Carboxyesterlipase identifizierten Proteinspots auch durch den CEL-spezifischen Antikörper erkannt werden und es sich somit tatsächlich um die Carboxyesterlipase handeln kann. Allerdings stellt sich die Frage, warum verschiedene Spots von unterschiedlichem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt als CEL identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich um Fragmente des Enzyms, die durch Proteolyse entstehen. Im eindimensionalen Gel erkennt der CEL-Antikörper nur in der *Wash*-Fraktion

mehrere Proteinbanden (nicht gezeigt), was für einen möglichen proteolytischen Verdau während der Carbonatbehandlung der Zymogengranulamembranen sprechen könnte.

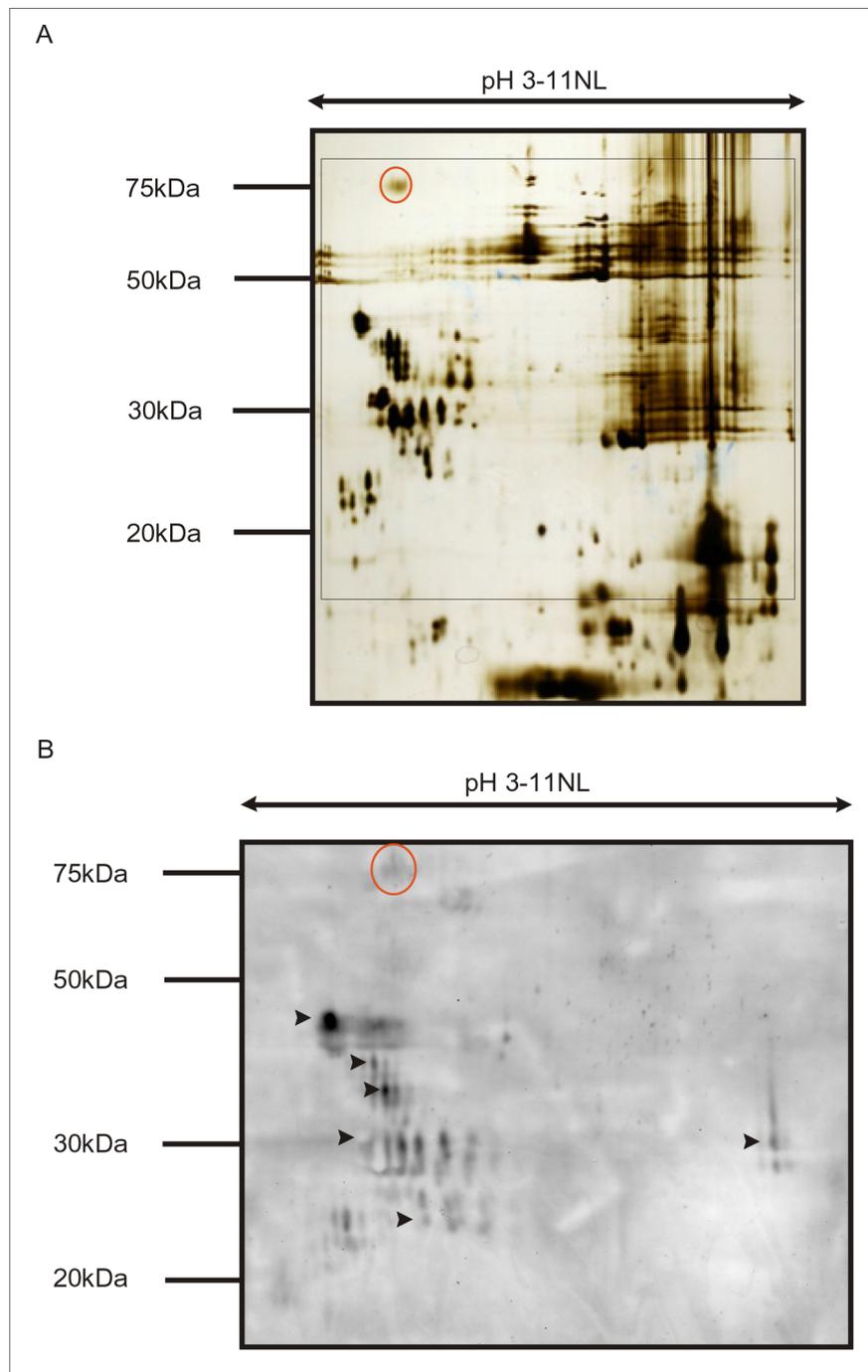


Abb. 4.13:

Detektion der Carboxylesterlipase im Immunoblot. 300µg der *Wash*-Fraktion wurden 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (pH-Bereich 3-11NL, 12,5% Polyacrylamid) und der durch den schwarzen Rahmen im Gel (A) begrenzte Bereich wurde anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Der Blot (B) wurde mit einem Huhn-anti-CEL-Antikörper (1:70) als Erstantikörper und einem anti-Huhn-HRP-Antikörper als Zweitantikörper inkubiert. Der mittels ECL belichtete Röntgenfilm zeigte die dargestellte Spotverteilung, schwarze Pfeilspitzen deuten auf Spots, die im Rahmen der MALDI-Analyse als CEL identifiziert wurden. Rote Kreise markieren in 2D-Gel und Immunoblot die potentiell echte CEL.

In ihrer Eigenschaft als lipidspaltendes Enzym erwartet man die Carboxylesterlipase eher in der Inhaltsfraktion der Zymogengranula, trotzdem lässt sich das Protein spezifisch auch in dieser Fraktion der peripheren

Membranproteine detektieren. Dies mag in der Affinität des Enzyms zu Lipidoberflächen begründet sein (siehe auch Abb. 4.15).

Auch die RNase A wurde durch MALDI-Analyse identifiziert (Spot B13; Tabelle 4.1, Abbildung 4.8) und sollte durch einen RNase-A-spezifischen Antikörper im 2D-Immunoblot identifiziert werden. Dazu wurden auch hier 300µg der *Wash*-Fraktion 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4) und nachfolgend auf Nitrocellulose (3.1.7) geblottet. Der Nachweis der RNase A erfolgte über einen Kaninchen-anti-RNase-A-Erstantikörper (1:1000) und einen anti-Kaninchen-HRP-Zweitantikörper (1:2000) (2.7). Nach der Chemilumineszenzreaktion ergab sich das in Abb. 4.14 dargestellte Ergebnis.

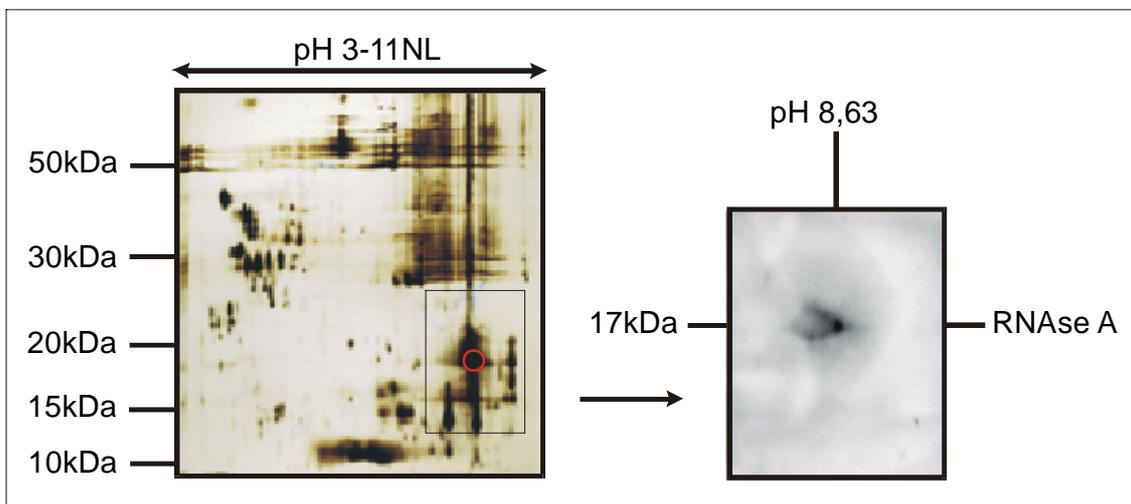


Abb. 4.14: Nachweis der RNase A im Immunoblot. 300µg *Wash* wurden 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (pH-Bereich 3-11NL, 12,5% Polyacrylamid) und der markierte Bereich (schwarzer Rahmen in Gel-Abbildung) anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Der Nachweis der RNase A (roter Kreis im 2D-Gel) erfolgte über einen Kaninchen-anti-RNase A Erstantikörper (1:1000) und einen anti-Kaninchen-HRP-Zweitantikörper (1:2000) und anschließende Chemilumineszenzreaktion.

Die RNase A kann ebenfalls durch die verwendeten Antikörper im 2D-Immunoblot identifiziert werden (Abb. 4.14) und bestätigt dadurch das Ergebnis der MALDI-Analyse. Obwohl man das Enzym in seiner Eigenschaft als Endonuklease hauptsächlich in der Inhaltsfraktion der Zymogengranula erwartet, zeigt sich vor allem im 2D-Gel (Abb. 4.3 und Abb. 4.8), dass die RNase A in dieser Fraktion der peripheren Membranproteine stark vertreten ist, erkennbar an der starken Anfärbung des Proteinspots durch die verwendete kombinierte Coomassie-Silber-Färbung (3.1.5d und 3.1.5e).

Zur Analyse der Verteilung von Carboxyesterlipase und RNase A innerhalb der verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen (ZGI, ZGM, gZGM, *Wash*) wurden im Folgenden Immunoblots (3.1.7) aller vier Zymogengranulasubfraktionen mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt und die Proteinbanden durch Chemilumineszenz dargestellt.

4.6.2 Sowohl die Carboxyesterlipase als auch die RNase A können in der *Wash*-Fraktion detektiert werden, zeigen aber eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der vier verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen

Es wurden je 20µg aller vier Zymogengranulafraktionen (ZGI, ZGM, gZGM, *Wash*) auf 12,5%igen SDS-Minigelen aufgetrennt (3.1.4c) und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7). Die Blotmembranen wurden dann mit dem Huhn-anti-CEL-Antikörper (1:70) bzw. dem Kaninchen-anti-RNase-A-Antikörper (1:1000) und spezifischen Zweitantikörpern (anti-Huhn-HRP bzw. anti-Kaninchen-HRP, beide 1:2000 (2.7)) inkubiert, um die Verteilung der Carboxyesterlipase und der RNase A in den verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen darzustellen.

Im Fraktionenblot (Abb. 4.15A) zeigt sich für die Carboxyesterlipase in allen Zymogengranulasubfraktionen ein Signal bei 75 kDa. Die CEL befindet sich einerseits im Inhalt der Zymogengranula (ZGI; 21,26%), ein größerer Anteil von 78,74% liegt membranassoziiert vor (Abb. 4.15B). Durch Carbonatbehandlung (Endkonzentration 0,15M NaCO₃) lässt sich nur ein Teil der Carboxyesterlipase von der Membran lösen (32,43%) und so in der *Wash*-Fraktion (*Wash*) detektieren, ein größerer Anteil von 67,57% verbleibt auch nach Waschen der Zymogengranulamembranen an der Membran und findet sich deshalb in der Fraktion der gewaschenen Membranen (gZGM) wieder. Dies mag in der Affinität der CEL zu Lipidoberflächen begründet sein.

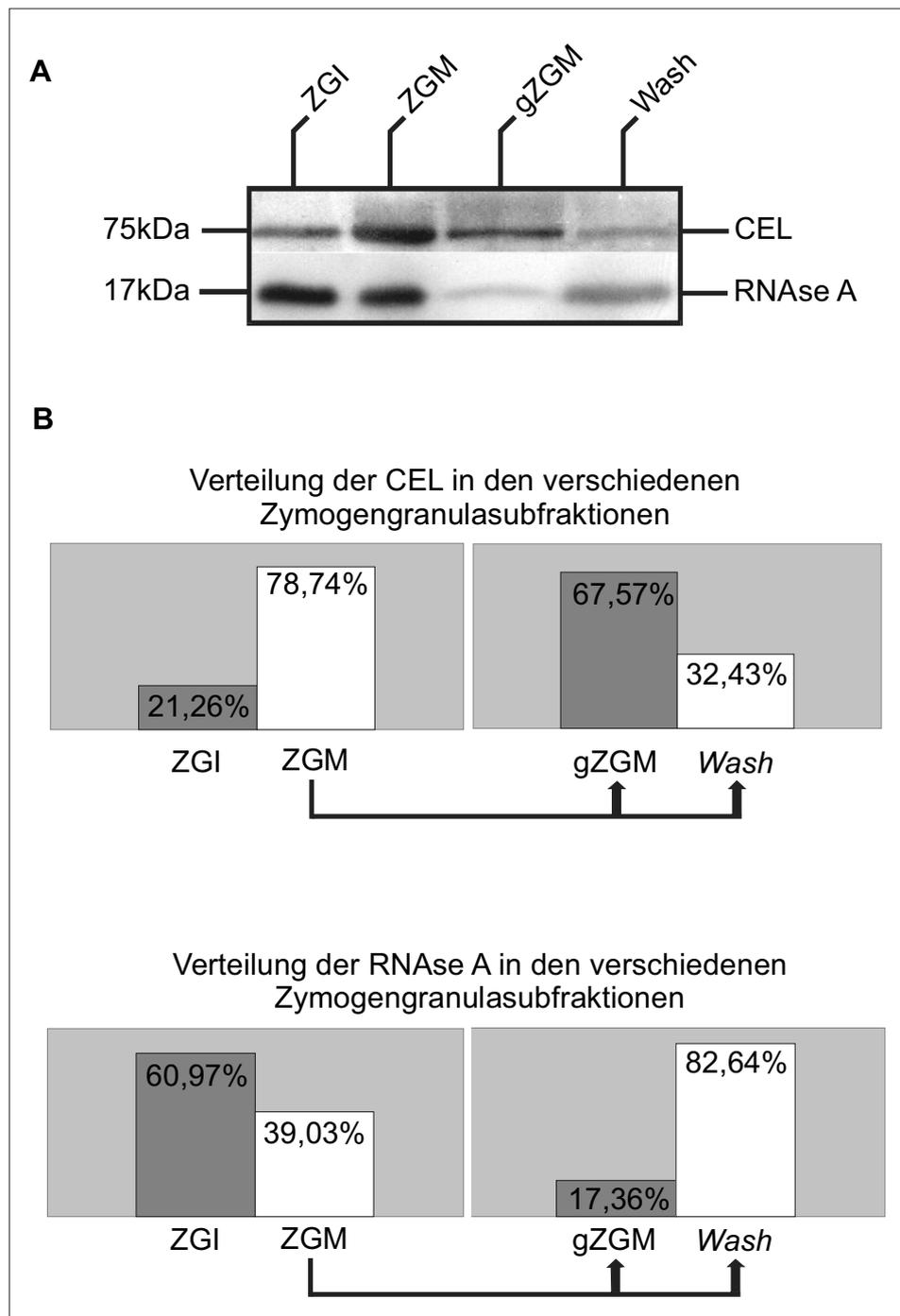


Abb. 4.15: Darstellung der Carboxyesterlipase und der RNase A in den verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen (ZGI, ZGM, gZGM, *Wash*). Es wurden je 20µg Protein der verschiedenen Granulasubfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt (12,5%iges SDS-Minigel) und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Der Immunoblot wurde mit einem Huhn-anti-CEL-Antikörper (1:70) bzw. einem Kaninchen-anti-RNase A (1:1000) und entsprechenden HRP-gekoppelten Zweitantikörpern (anti-Huhn-HRP bzw. anti-Kaninchen-HRP; je 1:2000) inkubiert und die Proteinbanden mittels ECL auf einem Röntgenfilm detektiert (A). (B) Darstellung der prozentualen Verteilung von CEL und RNase A in den Zymogengranulasubfraktionen basierend auf einer densitometrischen Auswertung der Intensität der Proteinbanden.

Die RNase A zeigt im Fraktionenblot ein anderes Verteilungsmuster als die CEL. Durch den RNase A-spezifischen Antikörper wird im Fraktionenblot (Abb. 4.15A) ein Signal bei 17kDa detektiert. Die RNase A zeigt sich als prominentes Protein der Inhaltsfraktion (ZGI; 60,97%), tritt aber mit 39,03% Anteil an der Gesamtmenge der RNase A in den Zymogengranula auch prominent in der Membranfraktion der Zymogengranula (ZGM) auf (Abb. 4.15B). Nach Carbonatbehandlung der Zymogengranulamembranen (Endkonzentration 0,15M NaCO₃) verbleibt ein geringerer Anteil des Enzyms an den gewaschenen Membranen (gZGM; 17,36%), der größere Anteil von 82,64% lässt sich abwaschen und findet sich in der *Wash*-Fraktion (*Wash*). Die Assoziation der RNase A mit Zymogengranulamembranen wird vermutlich anders als bei der CEL durch die Bindungsfähigkeit der RNase A an Proteoglykane ermöglicht (siehe auch Diskussion). An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die RNase A im Vergleich zur pankreatischen Amylase, die als Markerprotein für die Inhaltsfraktion der Zymogengranula diente (vgl. Abb. 4.2), deutlich stärker membranassoziiert vorliegt (39,03% RNase A im Vergleich zu 12,89% Amylase).

4.7 Studien zur Regulation des mRNA-Levels und der Lokalisation der Chymase im exokrinen Rattenpankreas

4.7.1 Durch die MALDI-Analyse wird ein basischer Proteinspot als mastzellspezifische Chymase identifiziert, der auch im 2D-Immunoblot durch einen anti-Chymase-Antikörper detektiert werden kann

Innerhalb der MALDI-Analyse wurde in der *Wash*-Fraktion ein Proteinspot als mastzellspezifische Chymase identifiziert (Abbildung 4.8; Tabelle 4.1, Spot B32). Dieses Protein ist bisher in Zymogengranula nicht geschrieben. Der Spot stellt sich im Vergleich zu anderen prominenten Proteinen (vgl. RNase A) nur schwach im 2D-Gel dar (vgl. Abb. 4.8). Um das Ergebnis der MALDI-Analyse für die Chymase zu bestätigen, wurden 300µg der *Wash*-Fraktion 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4) und anschließend ein Ausschnitt des SDS-Gels (siehe schwarzer Rahmen in Abb. 4.16) auf Nitrocellulose geblottet

(3.1.7). Der Blot wurde dann mit einem Ziege-anti-Chymase-Antikörper (1:1000) und nachfolgend mit einem anti-Ziege-HRP-Antikörper (1:2000) als Zweitantikörper inkubiert und das gesuchte Protein über eine Chemilumineszenzreaktion detektiert (3.1.7a).

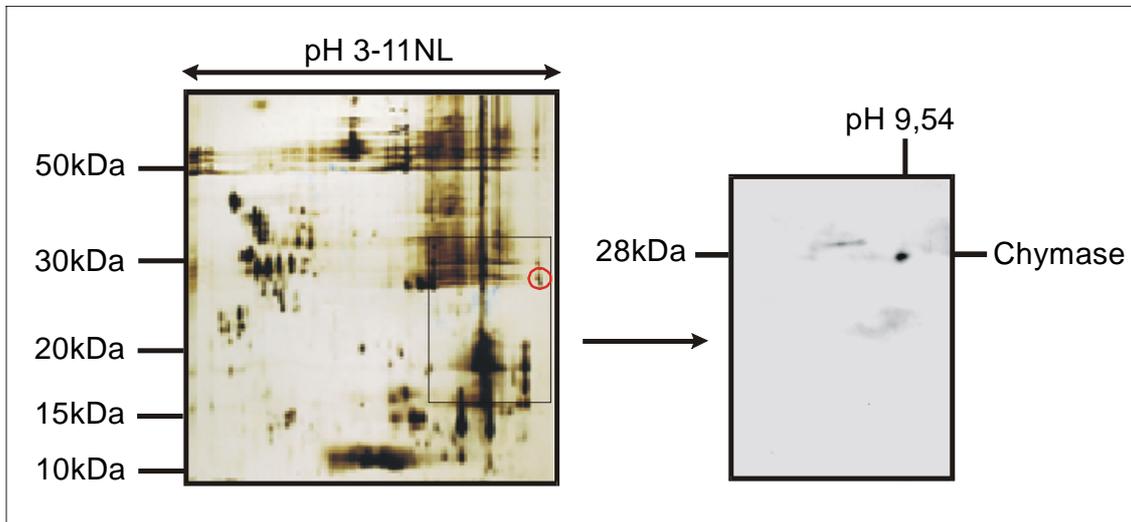


Abb. 4.16: Detektion der Chymase im Immunoblot. 300µg *Wash* wurden 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (pH-Bereich 3-11NL, 12,5% Polyacrylamid) und ein Teil des SDS-Gels (schwarzer Rahmen) anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Die Chymase (roter Kreis im 2D-Gel) wurde mit einem Ziege-anti-Chymase-Antikörper (1:1000) und einem anti-Ziege-HRP-Antikörper als Zweitantikörper (1:2000) mittels ECL-vermittelter Belichtung eines Röntgenfilms detektiert.

Die Chymase stellt sich im 2D-Immunoblot als einzelner Proteinspot mit einem für das Protein charakteristischen isoelektrischen Punkt von 9,54 und einem Molekulargewicht von 28kDa dar. Der verwendete Antikörper erkennt spezifisch diesen einen Proteinspot und bestätigt dadurch das Ergebnis der MALDI-Analyse.

4.7.2 Die Chymase findet sich im Fraktionenblot der vier verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen hauptsächlich in den Membranfraktionen der Zymogengranula

Um die Verteilung der Chymase innerhalb der Zymogengranulasubfraktionen näher zu charakterisieren, wurden je 50µg aller vier Zymogengranulasubfraktionen auf einem 12,5%igen SDS-Minigel aufgetrennt (3.1.4c) und anschließend durch ElektrobloTTing auf Nitrocellulose transferiert

(3.1.7). Im Vergleich zu den Fraktionenblots von CEL und RNase A (Abb. 4.15) wurde hier pro Gelspur eine größere Proteinmenge (50µg statt 20µg) aufgetragen, da die im gefärbten 2D-Gel erkennbare Menge an Chymaseprotein geringer zu sein scheint als die der zuvor genannten Proteine (siehe Abb. 4.3 und 4.8; Spot B32 (Chymase) im Vergleich zu Spots B13 (RNase A) und S1 (CEL)).

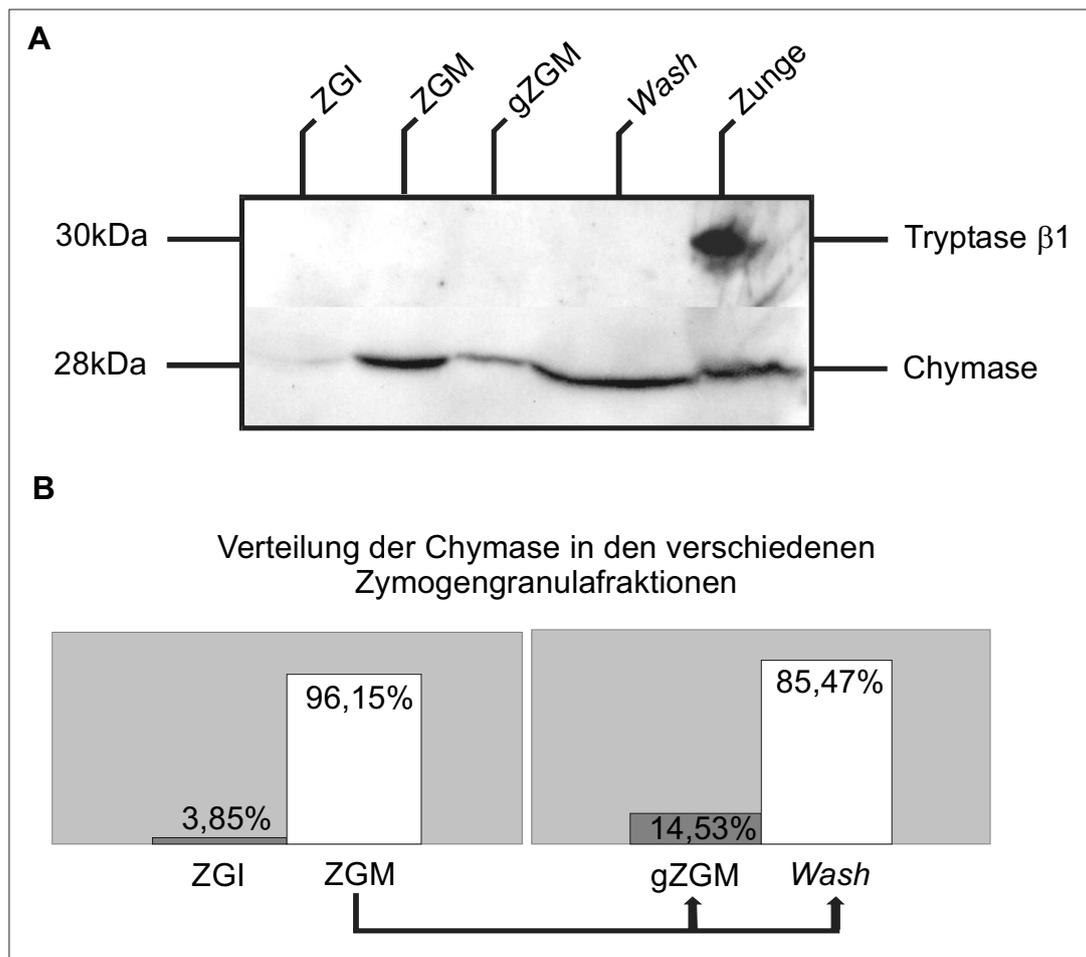


Abb.4.17: Detektion der Chymase und Tryptase-β1 in den verschiedenen Subfraktionen der Zymogengranula (ZGI, ZGM, gZGM, Wash). Je 50µg der vier Zymogengranulasubfraktionen wurden im 12,5%igen SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Die Chymase wurde über einen Ziege-anti-Chymase-Antikörper (1:1000) und einen anti-Ziege-HRP-Zweitantikörper (1:2000) mittels ECL auf einem Röntgenfilm detektiert, die Tryptase-β1 über einen Ziege-anti-Maus-Tryptase β1-Antikörper (1:1000) und einen anti-Ziege-HRP-Zweitantikörper (1:2000). Als Kontrollfraktion diente ein Lysat aus Rattenzungengewebe (Zunge) (A). (B) Darstellung der prozentualen Verteilung der Chymase in den Zymogengranulasubfraktionen basierend auf einer densitometrischen Auswertung der Intensität der Proteinbanden.

Abbildung 4.17 zeigt, dass sich die Chymase als Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 28kDa (Abb. 4.17A) fast ausschließlich in den Membranfraktionen der Zymogengranula (ZGM,96,15%) detektieren lässt, nur ein sehr geringer Anteil von 3,85% findet sich auch im Inhalt der Granula (ZGI) (Abb. 4.17B). Innerhalb der Membranfraktionen findet sich die Chymase mit 85,47% hauptsächlich im *Wash*, ein geringer Anteil von 14,53% verbleibt nach Carbonatbehandlung (3.1.1c) an den gewaschenen Membranen (gZGM). Als Positivkontrolle wurde ein Lysat aus Rattenzungengewebe (3.1.8) verwendet, da Zungengewebe reich an Mastzellen ist und die Chymase das Hauptgranulaprotein von Mastzellen darstellt. In dieser Fraktion zeigt sich unter Verwendung des Chymase-spezifischen Antikörpers ebenfalls ein deutliches Signal, das im Molekulargewicht dem in den Granulasubfraktionen lokalisierten Protein entspricht.

Um ausschließen zu können, dass es sich hier um eine Verunreinigung der Granulasubfraktionen durch Mastzellproteine handelt, die während der Zymogengranulapräparation aus Pankreas-assoziierten Mastzellen eingeschleppt wurden, wurde der Blot außerdem mit einem Antikörper gegen Tryptase β 1, einem weiteren mastzellspezifischen Granulaprotein, inkubiert.

Zur Detektion der Ratten-Tryptase β 1 wurde ein Antikörper verwendet, der gegen das Mausprotein gerichtet ist (2.7), da kommerziell kein Antikörper verfügbar ist, der das Rattenprotein erkennt. Aufgrund der hohen Homologie zwischen dem Ratten- und dem Mausprotein (nicht gezeigt) erkennt dieser Antikörper auch die Tryptase- β 1 der Ratte und wurde deshalb für die Immunoblotstudien eingesetzt. In der Kontrollfraktion des Rattenzungenlysats zeigt sich ein eindeutiges Signal für die Tryptase mit einem für das Rattenprotein erwarteten Molekulargewicht von 30kDa. In keiner der Zymogengranulasubfraktionen zeigt sich ein ähnliches Signal, im Gegensatz zur Chymase kann die Tryptase nicht in den Zymogengranula detektiert werden. Offensichtlich wird die Chymase in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas exprimiert und in Zymogengranula sortiert. Eine Verunreinigung der Granulasubfraktionen mit Mastzellproteinen kann ausgeschlossen werden, da andere mastzellspezifische Proteine wie die Tryptase- β 1 im Gegensatz zur Chymase nicht in den Zymogengranulasubfraktionen detektiert werden konnten.

4.7.3 Der Chymase-mRNA-Level ist in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas von Foy-305-gefütterten Ratten erhöht

Um die Regulation der Chymaseexpression näher zu charakterisieren, wurde die cDNA der Chymase mittels spezifischer Primer und PCR aus einer Pankreas-cDNA-Bank amplifiziert. Dabei wurde mRNA sowohl aus Pankreasgewebe von gefasteten Ratten als auch Foy-305-gefütterten Ratten isoliert (3.3.1), durch reverse Transkription in cDNA transkribiert (3.3.2) und anschließend für die PCR eingesetzt (3.3.3). Dabei sollten gleiche Mengen an cDNA (5µl pro Ansatz bzw. 2µl für die Amplifikation von GAPDH) für die PCR eingesetzt werden, um eine Aussage über die quantitative Verteilung der erzeugten cDNA-Fragmente treffen zu können. Als Positivkontrolle diente eine aus Rattenzungengewebe gewonnene cDNA-Bank, als Negativkontrolle wurde eine Versuchsreihe mit Ratten-Tryptase β 1-spezifischen Primern durchgeführt (2.5). Alle PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt (3.3.6) und analysiert.

Abbildung 4.18A zeigt ein für die Chymase spezifisches cDNA-Amplikon mit einer Größe von ca. 500bp (Abb. 4.18A ;vgl. 2.5). Im Vergleich der Ergebnisse für die verschiedenen Reaktionsansätze (cDNA-Banken aus Pankreasgewebe von Foy-305-gefütterten Ratten sowie aus Pankreasgewebe von gefasteten Ratten) lässt sich für die Chymase eine deutliche Erhöhung der Signalintensität der amplifizierten cDNA-Amplikons erkennen (Abb. 4.18A und B). Dies spricht für einen erhöhten Chymase-mRNA-Level im Pankreasgewebe Foy-gefütterter Ratten im Vergleich zu gefasteten Tieren. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten ergibt eine 229-fache Induktion der Chymase-mRNA-Level (Abb. 4.18B). Ein deutlich stärkeres Signal (nicht densitometrisch bestimmt) zeigt sich im Zungengewebe, wo die Chymase von gewebständigen Mastzellen synthetisiert wird.

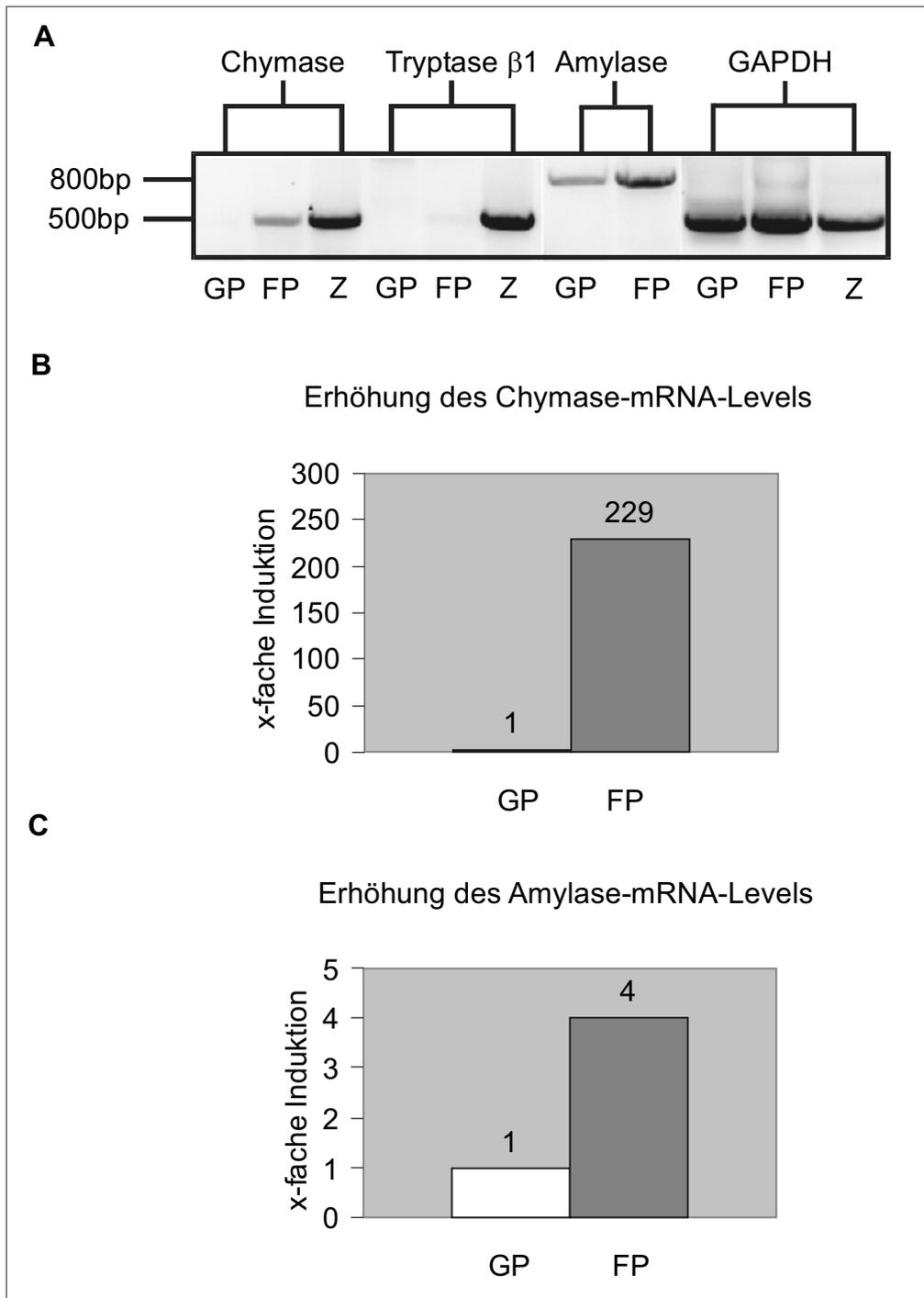


Abb. 4.18: (A): PCR von cDNA-Fragmenten von Rattenchymase und Rattentryptase β 1 sowie pankreatischer Amylase und GAPDH aus cDNA-Banken von Pankreata gefasteter Ratten (GP), Pankreata Foy-305-gefütterter Ratten (FP) und Rattenzungengewebe (Z) (nur für Chymase und Tryptase verwendet). Die kompletten PCR-Ansätze (50 μ l) wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

(B) und (C): Densitometrische Auswertung der Intensität der PCR-Signale; die erhaltenen Werte für die PCR-Signale aus (GP) wurden gleich 1 gesetzt und die in der Graphik dargestellten Ergebnisse für PCR-Signale (FP) zeigen die vielfache Induktion der mRNA-Level im Vergleich (GP). Unterschiedene in der Intensität der GAPDH-Banden wurden durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors in der Berechnung der Induktion berücksichtigt.

Für die Tryptase $\beta 1$ lässt sich unter Verwendung der cDNA-Banken aus Pankreasgewebe kein cDNA-Amplikon der entsprechenden Größe (erwartet ca. 500bp, siehe 2.5) detektieren, wohl aber im Reaktionsansatz, der cDNA aus Rattenzungengewebe enthielt (Abb. 4.18A). Die deutlichen Signale, die sowohl für Chymase als auch Tryptase $\beta 1$ in den Ansätzen mit cDNA aus der Rattenzunge zu detektieren sind, sprechen für eine spezifische PCR-Reaktion. Als Kontrolle für die Induktion der mRNA-Level anderer Zymogene nach Foy-305-Fütterung der Ratten wurden cDNA-Fragmente der pankreatischen Amylase gezielt aus den beiden verwendeten Pankreas-cDNA-Banken amplifiziert. Es können Amylase-spezifische cDNA-Fragmente einer Größe von ca. 800bp (2.5) detektiert werden, wobei die Amylase-mRNA-Level im Pankreasgewebe Foy-305-gefütterter Tiere im Vergleich zum Pankreasgewebe gefasteter Tiere induziert wird. Nach densitometrischer Auswertung zeigt sich eine vierfache Induktion der Amylase-mRNA-Level (Abb. 4.18B). Dies ist im Vergleich zu anderen Experimenten, in denen die Amylase-mRNA-Level im Pankreasgewebe durch Foy-305-Fütterung der Tiere induziert wurde, geringer (vgl. 4.8.3, Abb. 4.26). Der Einsatz einer cDNA-Bank aus Pankreasgewebe gefasteter Ratten ergibt für die Chymase nach der PCR ein kaum erkennbares cDNA-Amplikon im elektrophoretisch aufgetrennten Reaktionsansatz. Aus der Kombination der relativ geringen Erhöhung der Amylase-mRNA-Level in diesem Experiment und der anscheinend kaum vorhandenen Chymase-mRNA-Synthese im Pankreas gefasteter Ratten ergibt sich nach der densitometrischen Auswertung die im Vergleich zur Amylase deutlich stärkere Induktion der Chymase-mRNA-Level (Abb. 4.18B).

Als Ladekontrolle wurden PCR-Reaktionen mit sequenzspezifischen Primern für GAPDH (2.5) verwendet, hier zeigt sich ein Amplikon einer Größe von ca. 600bp. Leichte Intensitätsunterschiede, die in der densitometrischen Auswertung deutlich wurden, sprechen für eine geringfügig unterschiedliche *Template*-cDNA-Menge. Dies wurde durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors in der quantitativen Berechnung berücksichtigt. Die Tatsache, dass die Chymase-mRNA-Level im Pankreasgewebe unter Einfluss des oral verabreichten Proteaseinhibitors Foy-305 in ähnlicher Weise wie ein Zymogen induziert wird, spricht für eine Abhängigkeit der Chymaseexpression vom Fütterungsverhalten der Tiere. Dieses Phänomen ist spezifisch für die Chymase

und trifft nicht auf andere mastzellspezifische Proteine – in diesem Fall die Tryptase $\beta 1$ – zu, wodurch das Ergebnis spezifisch für die Azinuszellen des exokrinen Pankreas ist.

4.7.4 Die Chymase wird in AR42J-Zellen nicht exprimiert

Auch AR42J-Zellen, eine Zelllinie aus einem transplantierbaren Tumor der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas (Logsdon, 1986), wurden auf eine eventuelle Expression der Chymase hin untersucht. Dazu wurde eine cDNA-Bank aus AR42J-Zellen hergestellt (3.3.1, 3.3.2) und als Template für eine PCR mit sequenzspezifischen Primern für die Rattenchymase verwendet (3.3.3; 2.5). Dabei wurden sowohl unstimulierte als auch Dexamethason-stimulierte AR42J-Zellen (3.4.3) zur cDNA-Synthese verwendet, um zu untersuchen, ob die mRNA-Level eventuell exprimierter Chymase nach Dexamethason-stimulierter Granulabildung in den AR42J-Zellen erhöht sind. Als Positivkontrolle diente ein PCR-Ansatz mit Chymase-spezifischen Primern und cDNA aus Rattenzungengewebe, zur Ladekontrolle dienten PCR-Ansätze mit Primern gegen die GAPDH-Sequenz und cDNA aus unstimulierten sowie Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen (3.4.3). Als Kontrolle für die Dexamethason-vermittelte Zellstimulation dienten PCR-Ansätze mit Amylase-spezifischen Primern.

Die PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.3.6) und analysiert.

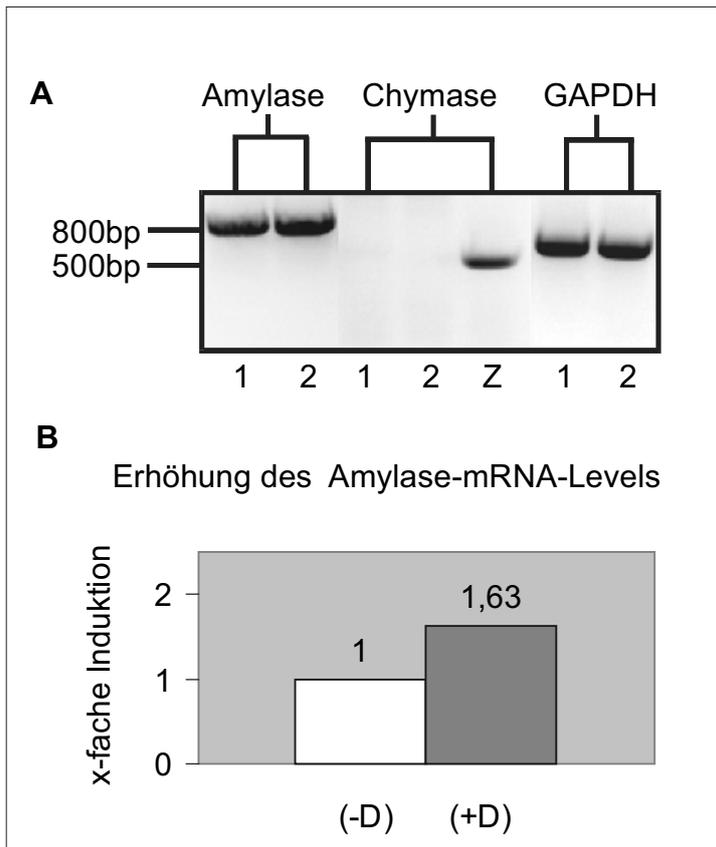


Abb. 4.19:

(A) PCR von cDNA-Fragmenten der pankreatischen Amylase, Chymase und GAPDH aus cDNA-Banken von unstimulierten AR42J-Zellen (1), Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen (2) und Rattenzungengewebe (Z). Die PCR-Ansätze wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. (B) Densitometrische Auswertung der PCR-Ergebnisse der Amylase; die erhaltenen Werte für die PCR-Signale aus unstimulierten AR42J-Zellen (-D) wurden gleich 1 gesetzt und die in der Graphik dargestellten Ergebnisse für PCR-Signale aus Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen (+D) zeigen die vielfache Induktion der Transkriptionsrate im Vergleich zu unstimulierten AR42J-Zellen (-D). Unterschiedene in der Intensität der GAPDH-Banden wurden durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors in der Berechnung der Induktion berücksichtigt.

Abbildung 19A zeigt, dass die Chymase anscheinend nicht in AR42J-Zellen exprimiert wird, weder mit cDNA aus unstimulierten AR42J-Zellen (1), noch mit cDNA aus Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen (2) kann ein Amplikon der entsprechenden Größe von ca. 500bp detektiert werden. Die Kontrollfraktionen mit den gegen GAPDH gerichteten Primern zeugen von der Intaktheit der verwendeten cDNA-Proben. Versuchsansätze mit Amylase-spezifischen Primern zeigen ein Amplikon einer Größe von ca. 800bp (Abb. 4.19A; vgl. 2.5) und eine erwartete erkennbare 1,63-fache Induktion Amylase-mRNA-Level im Vergleich unstimulierter AR42J-Zellen und Dexamethason-stimulierter AR42J-Zellen (Abb. 19B). Diese Induktion ist geringer als in der Literatur beschrieben (Logsdon et al., 1987). Es lässt sich feststellen, dass die Zellen – wenn auch gering – tatsächlich durch Dexamethason stimuliert wurden, jedoch in beiden Fällen keine Chymase-mRNA aufweisen. Als Positivkontrolle dafür, dass die PCR mit Chymase-spezifischen Primern unter den gegebenen Bedingungen erfolgreich war, wurde cDNA aus Rattenzungengewebe als Vorlage im Reaktionsansatz verwendet. Hier zeigt sich eine spezifische cDNA-

Bande der postulierten Größe von ca. 500bp, was grundsätzlich für eine erfolgreiche Amplifikation des gewünschten Chymase-cDNA-Fragments unter den gegebenen Versuchsbedingungen spricht.

Immunfluoreszenzstudien an AR42J-Zellen zeigten unter Verwendung des Ziege-anti-Chymase-Antikörpers (2.7) ebenfalls keine Markierung von Zymogengranula oder anderen Zellkompartimenten des sekretorischen Weges (nicht gezeigt).

4.7.5 Die Chymase lässt sich histologisch im exokrinen Rattenpankreasgewebe nachweisen

Im Folgenden sollte die Lokalisation der Chymase innerhalb des Pankreasgewebes untersucht werden. Da die Chymase nicht endogen in AR42J-Zellen exprimiert wird (vgl. 4.7.4), konnten Lokalisationsstudien nicht durch Immunfluoreszenzstudien an diesem Zellsystem untersucht werden. Deshalb wurde das Protein zunächst histologisch an Pankreasgewebeschnitten nachgewiesen. Daran schlossen sich ultrastrukturelle Untersuchungen in der Elektronenmikroskopie an.

Für die histologische Untersuchung der Chymase wurden Immunfluoreszenzstudien an Kryoschnitten von Rattenpankreasgewebe (3.2.1 und 3.2.2) durchgeführt. Die fixierten und permeabilisierten Gewebeschnitte wurden nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen sowohl mit einem Schaf-anti-Chymase-Antikörper in der Verdünnung (1:100) als auch einem Kaninchen-anti-Carboxypeptidase-Antikörper in der Verdünnung (1:1000) inkubiert. Als Zweitantikörper dienten Esel-anti-Schaf-TRITC (Verdünnung 1:100 in 1x PBS) und Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488 (Verdünnung 1:600 in 1x PBS). In einer Kontrollfärbung wurden die Gefrierschnitte mit an Chymase präabsorbiertem Schaf-anti-Chymase-Antikörper sowie einem Kaninchen-anti-Carboxypeptidase-Antikörper (s.o.) und den entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern inkubiert (2.7). Nach dem Aufbringen der Gewebeschnitte auf Objektträger wurden potentielle Kolokalisationen unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Mikroskop BX61 (Olympus, Hamburg)) untersucht.

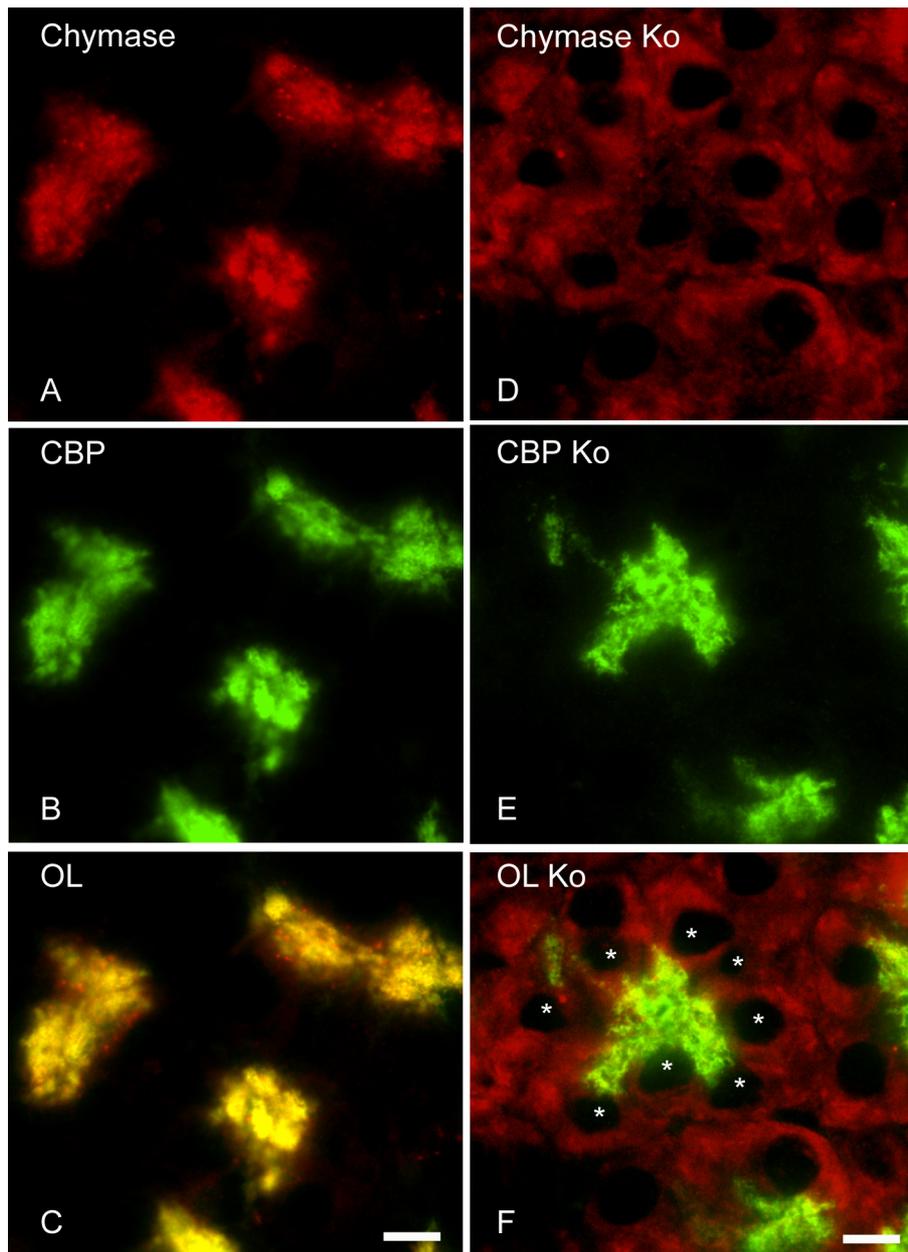


Abb. 4.20: Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten von Rattenpankreasgewebe. (A) bis(C): Doppelimmunfluoreszenz mit gegen Chymase (A) sowie Carboxypeptidase (B; CBP) gerichteten Erstantikörpern (Schaf-anti-Chymase-Antikörper (1:100), Kaninchen-anti-Carboxypeptidase-Antikörper (1:1000)). Als Zweitantikörper wurden Esel-anti-Schaf-TRITC (1:100) und Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488 (1:600) verwendet. (C): Überlagerung (OL) von (A) und (B). (D) bis (F): Negativkontrolle (Ko); Doppelimmunfluoreszenz analog zu (A) bis (C); in (D) wurde ein an Chymase prä-adsorbierter Schaf-anti-Chymase-Antikörper (1:100) verwendet (Chymase Ko). (E) zeigt das Fluoreszenzsignal für die Carboxypeptidase (CBP Ko); (F) zeigt die Überlagerung (OL Ko) von (D) und (E); weiße Sternchen in (F) markieren die Zellkerne der um das markierte Gangsystem liegenden Azinuszellen. Der Maßstab (weißer Balken in (C) und (F)) entspricht jeweils 10µm.

Abbildung 4.20 zeigt an Gefrierschnitten von Rattenpankreasgewebe eine Kolokalisation der Chymase mit der Carboxypeptidase, die sich im apikalen Bereich der Azinuszellen und im Lumen des abgehenden Pankreasganges darstellt (Abbildung 20C). In Kontrollexperimenten mit einem an Chymase prä- absorbierten Schaf-anti-Chymase-Erstantikörper (Abbildung 20D) konnte keine Kolokalisation mit Carboxypeptidase-markierten Kompartimenten dargestellt werden (Abb. 20F). Dies spricht für eine spezifische Erkennung der Chymase im Rattenpankreasgewebe und verifiziert die Kolokalisation von Chymase und Carboxypeptidase in Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreasgewebes.

4.7.6 Die Chymase kann in der Elektronenmikroskopie mit Hilfe des Ziege-anti-Chymase-Antikörpers und Protein-A-Gold-Partikeln von 15nm in den Zymogengranula der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas lokalisiert werden

Die Chymase sollte unter Verwendung des Ziege-anti-Chymase-Antikörpers und Protein-A-Gold-Partikeln von 15nm Durchmesser elektronenmikroskopisch an Ultradünnschnitten von Rattenpankreasgewebe in den Zymogengranula der Azinuszellen nachgewiesen werden (3.2.3). Dazu wurde Rattenpankreasgewebe in Lowicryl-K4M eingebettet. Ultradünnschnitte von Rattenzungengewebe (ebenfalls in Lowicryl-K4M eingebettet) dienen als Positivkontrolle, außerdem wurde ZG16p als Kontrolle für die Zymogengranulafraktion und zum Vergleich der Markierungsdichte auf Ultradünnschnitten von gefastetem Pankreasgewebe (Epon-Einbettung) nachgewiesen.

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf den Ultradünnschnitten mit BSA abgesättigt. Anschließend wurden die Ultradünnschnitte von Pankreas wie auch Zungengewebe mit einem Ziege-anti-Chymase-Antikörper (2.7) in einer Verdünnung von 1:100 (in 0,5% (w/v) BSA/1x PBS) und nachfolgend Protein-A-Goldpartikeln von 15nm Durchmesser inkubiert. Ultradünnschnitte von Pankreasgewebe wurden zu Vergleichszwecken mit dem anti-ZG16p-Antikörper (1:100 (in 0,5% (w/v) BSA/1x PBS)) und Protein-A-Goldpartikeln von 10nm Durchmesser inkubiert (2.7). Nach der Inkubation mit Uranylacetat (nur

bei Lowicryl-K4M-Einbettung) und der Kontrastierung mit Bleicitrat wurden die Ultradünnschnitte elektronenmikroskopisch ausgewertet.

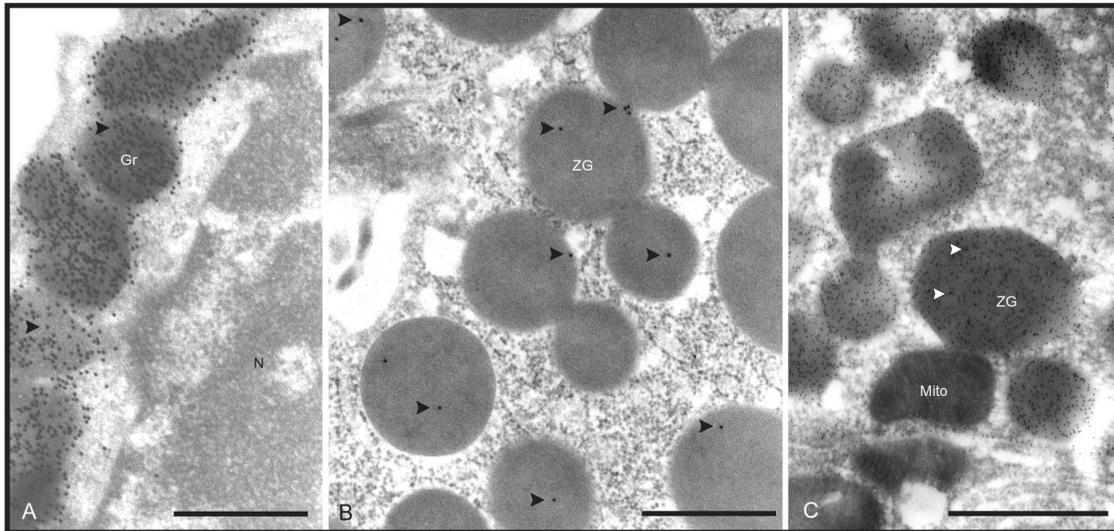


Abb. 4.21: Lokalisation der Chymase an Ultradünnschnitten von Rattenzungengewebe (A) und Pankreasgewebe aus gefasteten Ratten (B) sowie des ZG16p an Ultradünnschnitten von Pankreasgewebe aus gefasteten Ratten (C). Verwendet wurde der Ziege-anti-Chymase-Antikörper (1:100) bzw. der Kaninchen-anti-ZG16p-Antikörper (1:100) und Protein-A-Gold-Partikel (15nm für Chymase, 10nm für ZG16p; 1:60). Gr bezeichnet beispielhaft ein Mastzellgranulum der ausschnitthaft dargestellten Mastzelle im Zungengewebe, N den Zellkern der markierten Mastzelle. Mito (in C) bezeichnet ein Mitochondrium und ZG ausgewählte markierte Zymogengranula einer ausschnitthaft dargestellten Azinuszelle des exokrinen Rattenpankreas. Die schwarzen Pfeilspitzen weisen auf goldmarkierte Chymasemoleküle hin, die weißen Pfeilspitzen auf goldmarkiertes ZG16p; in (A) und (C) wurden exemplarisch für alle nur einige Goldpartikel mit Pfeilen markiert. Der Maßstab (schwarzer Balken) entspricht jeweils 1µm.

In Abbildung 4.21 ist eine spezifische Markierung der Zymogengranula (ZG) im Pankreasgewebe gefasteter Ratten (B) zu erkennen, wobei die Markierung durch den anti-Chymase-Antikörper relativ schwach ausfällt. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der 2D-Gelelektrophorese (Abb. 4.3 und 4.8, Spot B32), der Fraktionenblots (Abb. 4.17) und der PCR (Abb. 4.18), die zeigen, dass die Chymase im Gegensatz zu anderen Proteinen wie z.B. RNase A (Abb. 4.8, Spot B13) in geringeren Mengen im Pankreasgewebe exprimiert wird. Als Vergleich ist in (C) eine elektronenmikroskopische Abbildung von Gold-markiertem ZG16p in Zymogengranula dargestellt. Auch hier wird durch die höhere Markierungsdichte für ZG16p im Vergleich zur Chymase deutlich, dass die schon bekannten Zymogengranulaproteine wie ZG16p deutlich stärker in Zymogengranula exprimiert werden als die Chymase. Außerdem zeigt sich

hier die auf die Zymogengranula begrenzte Lokalisation des ZG16p, ein ebenfalls dargestelltes Mitochondrium ist nicht markiert.

Als Positivkontrolle wurden Ultradünnschnitte von Rattenzungengewebe mit dem anti-Chymase-Antikörper und Protein-A-Gold inkubiert (A). Hier zeigt sich eine starke und eindeutig auf die Mastzellgranula einer ausschnitthaft dargestellten Mastzelle aus Rattenzungengewebe beschränkte Markierung der Chymase, was die Chymase als Hauptprotein der Mastzellgranula bestätigt und die Funktionalität des anti-Chymase-Antikörpers in der Elektronenmikroskopie belegt.

4.7.7 Um die Chymase in AR42J-Zellen exprimieren und ihr *Targeting* und ihre Lokalisation untersuchen zu können, wurde die cDNA der Chymase (*Rat mast cell protease 1*, RMCP-1) in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert

Die vollständige kodierende Sequenz der Chymase (im weiteren als *Rat Mast Cell Protease 1* (RMCP-1) bezeichnet, um Verwechslungen mit dem amplifizierten cDNA-Fragment der quantitativen PCR auszuschließen) wurde mit spezifischen Klonierungsprimern (2.5) aus einer cDNA-Bank aus Rattenzungengewebe (3.3.1 und 3.3.2) mittels PCR amplifiziert (3.3.3) und nach elektrophoretischer Auftrennung im 1%igen Agarosegel (3.3.6) und anschließender Gelelution (3.3.7) des cDNA-Amplikons durch *TOPO TA Cloning* (3.3.4) in den Vektor pcr2.1 TOPO kloniert. Das RMCP-1/pcr2.1 TOPO-Konstrukt wurde durch chemische Transformation in DH5 α -Bakterien eingebracht (3.3.11) und nach Vervielfältigung durch Minipräparation wieder aus den Bakterien isoliert (3.3.12). Durch Restriktionsverdau (3.3.5) wurde das RMCP-1 cDNA-Fragment aus dem pcr2.1 TOPO-Vektor herausgeschnitten und nach Auftrennung im Agarosegel und Gelelution mit einem in gleicher Weise behandelten pcDNA3-Vektor ligiert (3.3.9). Auch dieses Konstrukt wurde durch chemische Transformation (3.3.11) in DH5 α -Bakterien eingebracht, vervielfältigt und durch Maxipräparation (3.3.12) isoliert.

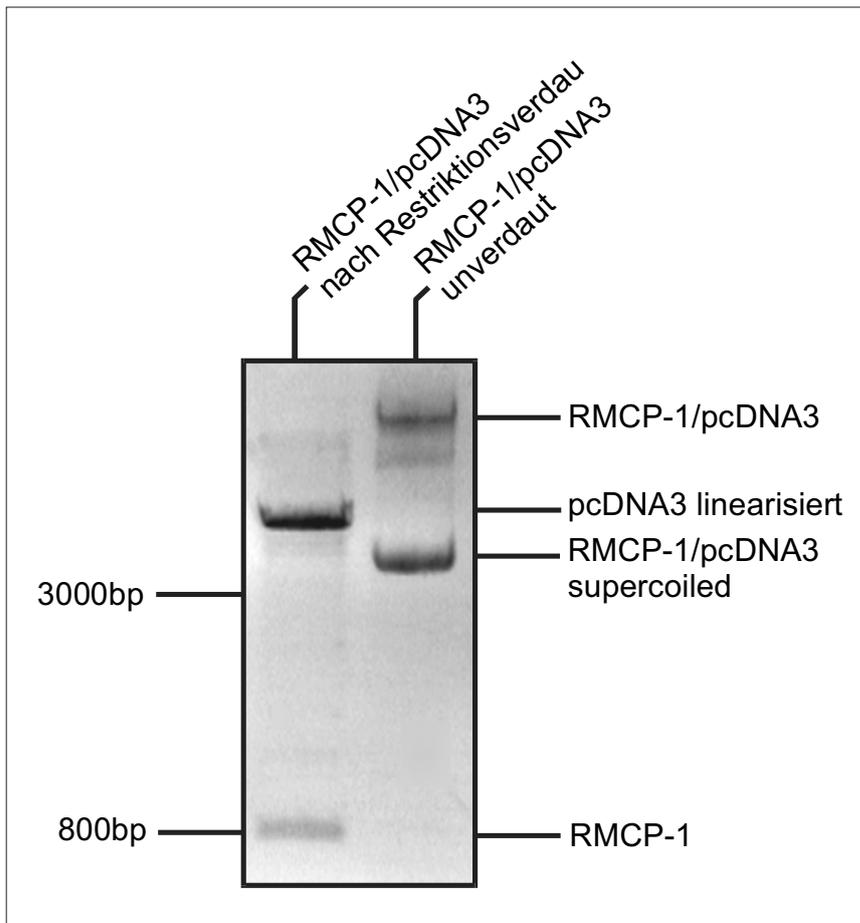


Abb. 4.22:

Kontrollrestriktionsverdau des RMCP-1/pcDNA3-Konstrukts mit BamHI und EcoRI. Gezeigt sind sowohl das ungeschnittene als auch das geschnittene Konstrukt nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel.

Abbildung 4.22 zeigt den Kontrollverdau des RMCP-1/pcDNA3-Konstrukts mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI (3.3.5). Hier sollte die Insertion des RMCP-1-cDNA-Fragments überprüft werden. Der Ansatz wurde parallel zu einem ungeschnittenen RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.3.6) und analysiert.

In der Spur des geschnittenen Reaktionsansatzes zeigen sich zwei distinkte DNA-Banden, eine Bande bei 800bp, was der vollständigen kodierenden Sequenz des klonierten RMCP-1-cDNA-Fragments entspricht, und eine Bande oberhalb von 3000bp, was dem linearisierten pcDNA3-Plasmid entspricht (5400bp; 2.3). In der Spur, in der das ungeschnittene RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt aufgetrennt wurde, zeigen sich ebenfalls zwei Hauptbanden, eine davon noch oberhalb der Bande des linearisierten pcDNA3-Plasmids; diese entspricht dem ungeschnittenen RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt. Die zweite Bande verläuft oberhalb der 3000bp-Markerbande und stellt die *Supercoiled*-Variante des ungeschnittenen RMCP-1/pcDNA3-Konstrukts dar. Aus dem Vergleich der Bandenmuster von geschnittenem und ungeschnittenem RMCP-1/pcDNA3-

Konstrukt lässt sich schlussfolgern, dass die Insertion der RMCP-1-cDNA-Sequenz in den pcDNA3-Vektor erfolgreich war. Die Sequenzierung des Konstrukts durch die Firma MWG Biotech bestätigte die korrekte Klonierung der Sequenz (nicht gezeigt). Dieses Konstrukt wurde im Weiteren für die Transfektion von AR42J-Zellen benutzt, um die Expression der Chymase und die eventuelle Kolokalisation mit sekretorischen Granula in diesen Zellen zu untersuchen.

4.7.8 Die Chymase wird nach Transfektion eines RMCP-1/pcDNA3-Konstrukts in AR42J-Zellen exprimiert und lässt sich in perinukleären Kompartimenten und sekretorischen Granula Dexamethason-stimulierter AR42J-Zellen mittels Immunfluoreszenz nachweisen

Um die Expression der Chymase in AR42J-Zellen zu untersuchen, wurden diese Zellen durch Elektroporation mit dem RMCP-1/pcDNA3-Konstrukt transfiziert (3.4.5b) und auf Deckgläschen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen dann mit Dexamethason stimuliert (3.4.3) und nach weiteren 48 Stunden fixiert (3.4.6). Um eine Kolokalisation von exprimierter Chymase mit Zymogengranula-assoziierten Proteinen zu untersuchen, wurden die Zellen nach Permeabilisierung und Absättigung unspezifischer Bindungsstellen (3.4.6) mit einem Ziege-anti-Chymase-Antikörper sowie einem Kaninchen-anti-Carboxypeptidase-Antikörper als Erstantikörper inkubiert, als Zweitantikörper dienten Esel-anti-Ziege-TRITC und Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488 (2.7). Nach dem Aufbringen der Deckgläschen auf Objektträger erfolgte die Auswertung der Präparate im Fluoreszenzmikroskop.

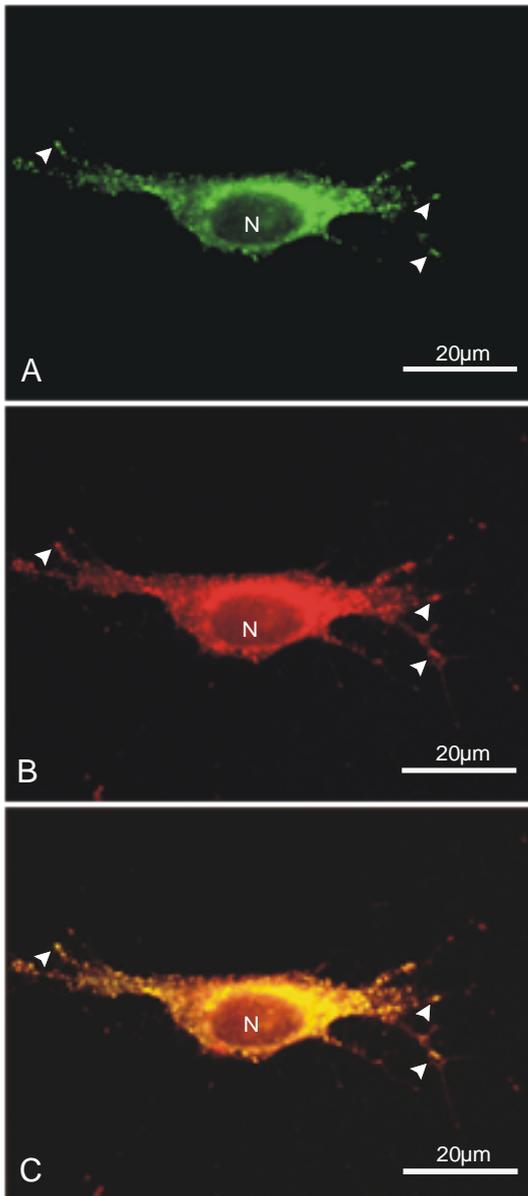


Abb. 4.23: Lokalisation der exprimierten Chymase und der endogenen Carboxypeptidase in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen.

(A) Darstellung der Lokalisation der Carboxypeptidase in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen mittels eines Kaninchen-anti-Carboxypeptidase-Antikörpers und eines Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488-Antikörpers als Zweitantikörper.

(B) Lokalisation der exprimierten Chymase in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen mittels eines Ziege-anti-Chymase-Antikörpers und eines Esel-anti-Ziege-TRITC-Antikörpers als Zweitantikörper.

(C) Doppelfluoreszenz durch Überlagerung von (A) und (B)
 Weiße Pfeilspitzen markieren in allen Abbildungen (A) bis (C) beispielhaft sekretorische Granula der dargestellten AR42J-Zelle, die sowohl durch anti-Carboxypeptidase-Antikörper als auch anti-Chymase-Antikörper markiert werden und sich in der Überlagerung gelb darstellen. N bezeichnet den Zellkern der dargestellten Zelle.

Abbildung 4.23 zeigt eine deutliche Kolokalisation der exprimierten Chymase (RMCP-1) mit der Carboxypeptidase. Diese Kolokalisation beinhaltet sowohl perinukleäre Kompartimente (endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat) als auch sekretorische Granula, erkennbar an den gelb dargestellten Kompartimenten in Abbildung 4.23C, die aus der Überlagerung der Abbildungen 4.23A und 4.23B resultieren. Damit wird die Chymase nach Transfektion eines RMCP-1/pcDMA3-Konstrukts offensichtlich auch in diesem exokrinen Zellsystem ähnlich einem Zymogen in sekretorische Granula sortiert. Diese Befunde unterstreichen die im exokrinen Pankreasgewebe für die Chymase ermittelten Ergebnisse.

4.8 Studien zur Regulation des mRNA-Levels und der Lokalisation der Peptidyl-Prolyl-cis/trans- Isomerase B im exokrinen Pankreas der Ratte

4.8.1 Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B wird im Immunoblot nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung als basischer Spot in der Wash-Fraktion identifiziert

Um das Ergebnis der MALDI-Analyse für die identifizierte Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (PPIB; Cyclophilin B) zu bestätigen, wurden 300µg der Wash-Fraktion der Zymogengranula 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4) und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7). Der Immunoblot wurde mit einem anti-Cyclophilin-B-Antikörper als Erstantikörper (1:1000) und anschließend mit einem anti-Kaninchen-HRP-Antikörper (1:2000) inkubiert. Unter Verwendung von ECL (2.8) wurden die markierten Proteinspots auf einem Röntgenfilm detektiert (3.1.7a).

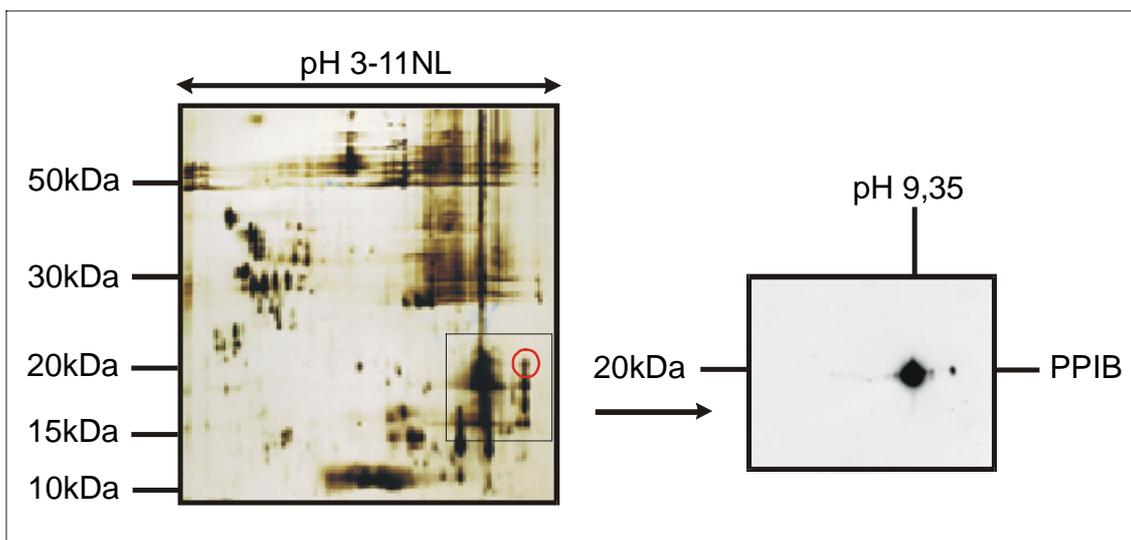


Abb. 4.24: Detektion der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B im 2D-Immunoblot. 300µg Wash wurden 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (pH-Bereich 3-11NL, 12,5% Polyacrylamid) und der markierte Bereich (schwarzer Rahmen in 2D-Gel-Abbildung) anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (PPIB) (roter Kreis im 2D-Gel) wurde mittels eines Kaninchen-anti-Cyclophilin-B-Antikörpers (1:1000) und eines anti-Kaninchen-HRP-Antikörpers (1:2000) unter Verwendung eines Chemilumineszenzreagens auf der Blotmembran detektiert.

Abbildung 4.24 zeigt, dass nach der Inkubation des 2D-Immunoblots mit den entsprechenden Antikörpern für die PPIB ein Spot mit dem für das Protein charakteristischen Molekulargewicht von 20kDa und einem isoelektrischen Punkt von 9,35 detektiert werden kann. Damit wird auch für die PPIB das Ergebnis der MALDI-Analyse (Tabelle 4.1, Spot B16) bestätigt.

4.8.2 Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase kann im Gegensatz zu anderen ER-ständigen Proteinen in den Zymogengranulasubfraktionen detektiert werden und findet sich dort ausschließlich in den Membranfraktionen

Um die Verteilung der PPIB innerhalb der verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen aufzuklären, wurden je 10µg der vier verschiedenen Subfraktionen (ZGI, ZGM, gZGM, *Wash*) sowie 10µg einer Mikrosomen-angereicherten Fraktion (3.1.1d) auf einem 12,5%igen SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4c) und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7). Die Mikrosomen-angereicherte Fraktion diente als Positivkontrolle, da sie das endoplasmatische Retikulum repräsentiert und die PPIB ein ER-ständiges Protein darstellt.

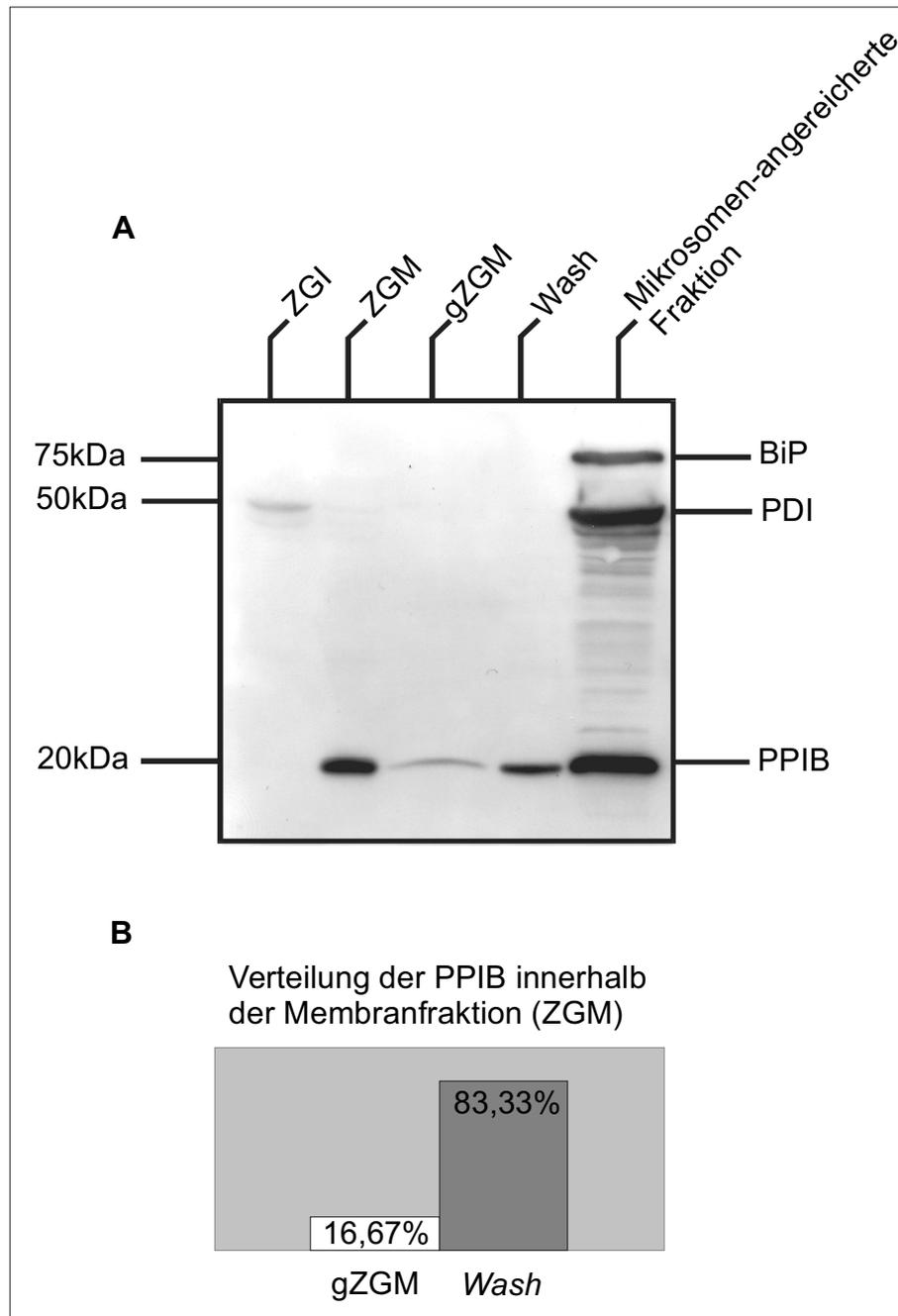


Abb. 4.25: (A) Detektion der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B sowie der PDI und BiP in den vier Zymogengranulasubfraktionen (ZGI, ZGM, gZGM, *Wash*) sowie einer Mikrosomen-angereicherten Fraktion. Es wurden je 10µg jeder Fraktion im 12,5%igen SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Die PPIB wurde mit einem Kaninchen-anti-Cyclophilin B-Erstantikörper (1:1000) und einem anti-Kaninchen-HRP-Zweitantikörper (1:2000) auf der Blotmembran detektiert, PDI wurde mit einem Kaninchen-anti-PDI-Antikörper (1:1000) und einem anti-Kaninchen-HRP-Antikörper (1:2000) als Zweitantikörper detektiert. Ebenso konnte BiP durch einen Maus-anti-BiP-Antikörper und einen entsprechenden HRP-gekoppelten anti-Maus-Antikörper unter anschließender Verwendung einer Chemilumineszenzlösung und Belichtung eines Röntgenfilms auf der Blotmembran detektiert werden. (B) Darstellung der Verteilung der PPIB in den Membranfraktionen gZGM und *Wash* basierend auf einer densitometrischen Auswertung der Intensität der Proteinbanden.

Im Fraktionenblot (Abb. 4.25A) kann die PPIB als eine eindeutige distinkte Proteinbande bei 20kDa detektiert werden, die vom Molekulargewicht der PPIB entspricht. Es zeigt sich, dass die PPIB in der Inhaltsfraktion der Zymogengranula nicht zu finden ist, sondern sich ausschließlich in den Membranfraktionen der Zymogengranula detektieren lässt. Ein eindeutiges Signal ergibt sich außerdem für die Mikrosomen-angereicherte Fraktion, in der die PPIB als bekanntes ER-residentes Protein stark vertreten ist. Innerhalb der Membranfraktionen ist die PPIB zu 83,33% in der *Wash*-Fraktion (*Wash*) vertreten, ein deutlich geringerer Anteil von 16,67% verbleibt auch nach Carbonatbehandlung (3.1.1c) an den gewaschenen Membranen (gZGM) (Abb. 4.25B). Auffällig ist sowohl im Fraktionenblot als auch im 2D-Blot (Abb. 4.24), dass sich die PPIB hier deutlich prominenter darstellt als im silbergefärbten 2D-Gel (Abb. 4.3 und 4.4). Dies mag an der Güte des Antikörpers sowie an dem signalverstärkenden Effekt eines Immunoblottings liegen, eventuell lässt sich die PPIB aber auch färberisch weniger gut darstellen als andere Proteine.

Um auszuschließen, dass es sich hier um eine Verunreinigung der Zymogengranulafraktion mit Mikrosomenanteilen handelt, wurde derselbe Fraktionenblot im Folgenden mit Antikörpern gegen die Proteindisulfid-Isomerase (PDI) und BiP (*Binding Protein*) inkubiert, beides ER-residente Proteine.

Alle drei Proteine (PPIB, PDI und BiP) stellen sich in der Mikrosomen-angereicherten Fraktion ähnlich prominent dar, Unterschiede ergeben sich in der Verteilung innerhalb der verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen. Die PDI wird als nur schwache Bande mit einem Molekulargewicht von 50kDa detektiert. Sie wird anscheinend nur in einem sehr geringen Maß in die Zymogengranula sortiert und findet sich dabei im Gegensatz zur PPIB fast ausschließlich in der Inhaltsfraktion (ZGI) wieder. (In der Literatur wird der Transport der PDI im sekretorischen Weg für die Azinuszellen des exokrinen Pankreas beschrieben (Yoshimori et al., 1990)). BiP kann nur in der Mikrosomen-angereicherten Fraktion als eine Bande mit einem Molekulargewicht von 75kDa detektiert werden, für die Zymogengranulasubfraktionen ergibt sich kein spezifisches Signal. 2D-Immunoblots, die mit Antikörpern gegen PDI und BiP inkubiert wurden, ergaben ebenfalls kein positives Signal (nicht gezeigt).

Daraus lässt sich folgern, dass die PPIB potentiell selektiv in die Zymogengranula sortiert bzw. selektiv am Rücktransport in das ER gehindert wird und innerhalb der Zymogengranula hauptsächlich an der Membran (ZGM) und dem submembranösen Netzwerk lokalisiert ist.

4.8.3 Der mRNA-Level der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B kann im Rattenpankreas durch Fütterung der Tiere mit dem Protease-inhibitor Foy-305 induziert werden

Unter Verwendung von PPIB-spezifischen Primern wurde die PPIB aus Rattenpankreas-cDNA-Banken amplifiziert (3.3.3), dabei dienten cDNA-Banken aus Pankreasgewebe gefasteter Ratten sowie Foy-305-gefütterter Ratten als *Template* (3.3.1 und 3.3.2). Zur quantitativen Kontrolle der Erhöhung der Zymogen-mRNA-Level unter Einfluss von Foy-305 wurde ein cDNA-Fragment der pankreatischen Amylase amplifiziert (2.5; 3.3.3), als Ladekontrolle dienten Reaktionsansätze mit GAPDH-spezifischen Primern. Die verschiedenen Reaktionsansätze wurden auf einem 1%igen Agarosegel (3.3.6) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend analysiert.

Abbildung 4.26A zeigt, dass aus beiden verwendeten cDNA-Banken PPIB-cDNA-Fragmente der postulierten Größe von ca. 500bp (2.5) amplifiziert werden konnten. Basierend auf der densitometrischen Auswertung der Signalintensität der cDNA-Banden kann eine 5,83-fache Induktion des PPIB-mRNA-Levels im Pankreasgewebe Foy-305-gefütterter Tiere im Vergleich zu gefasteten Tieren dargestellt werden (Abb. 4.26B). Für die pankreatische Amylase ergeben sich unter Verwendung der beiden genannten cDNA-Banken charakteristische cDNA-Fragmente von ca. 800bp (2.5), wobei die densitometrische Auswertung hier eine 5,79-fache Erhöhung des Amylase-mRNA-Levels zeigt (Abb. 4.26). Die Reaktionsansätze mit GAPDH-spezifischen Primern zeigen geringe Unterschiede in der Intensität der Signale, was auf eine leicht unterschiedliche Menge an eingesetzter cDNA hindeutet. Dies wurde durch einen Korrekturfaktor in der Berechnung des Induktionsfaktors berücksichtigt.

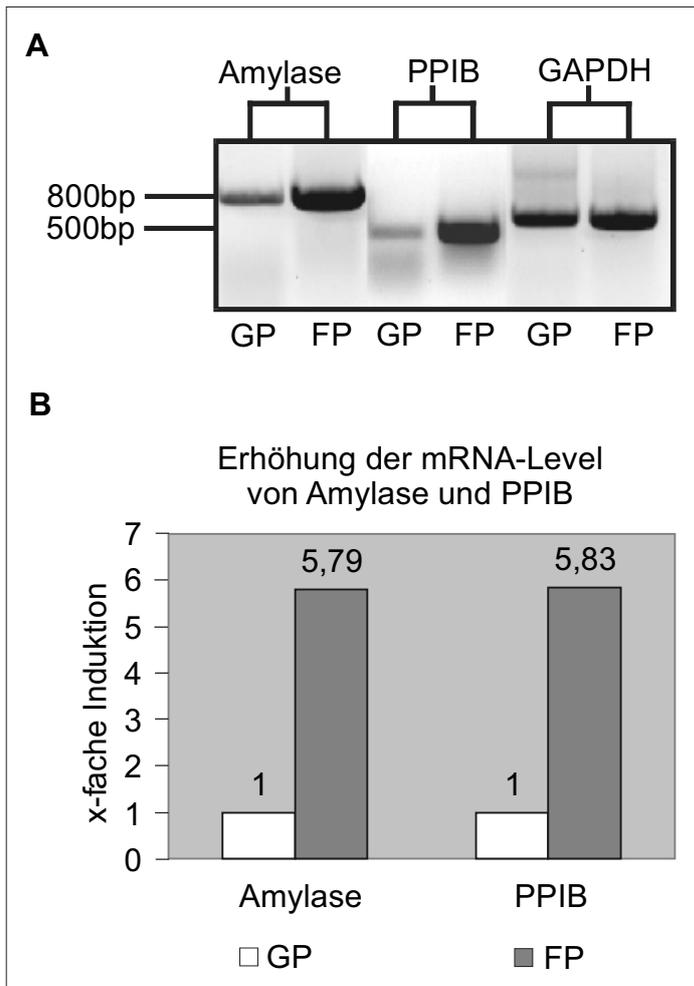


Abb. 4.26:

(A) PCR von Amylase-cDNA-Fragmenten (Amylase), PPIB-cDNA-Fragmenten (PPIB) und GAPDH-cDNA-Fragmenten (GAPDH) aus cDNA-Banken von Pankreata gefasteter Ratten (GP) und Pankreata Foy-305-gefütterter Ratten (FP); die Reaktionsansätze wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. (B) Densitometrische Auswertung der Intensitäten der cDNA-Banden aus (A); die erhaltenen Werte für die cDNA-Signale aus cDNA-Banken von (GP) wurden gleich 1 gesetzt und die in der Graphik dargestellten Ergebnisse für cDNA-Signale aus cDNA-Banken (FP) zeigen die vielfache Induktion der mRNA-Level im Vergleich (GP). Unterschiede in der Intensität der GAPDH-Banden wurden durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors in der Berechnung der Induktion berücksichtigt.

Es lässt sich feststellen, dass der PPIB-mRNA-Level im Rattenpankreas durch Fütterung der Tiere mit dem Proteaseinhibitor Foy-305 ähnlich dem mRNA-Level anderer Zymogene induziert werden kann, was einen Hinweis darauf liefert, dass die Expression der PPIB ähnlich wie bei Zymogenen abhängig vom Fütterungsverhalten der Tiere ist.

4.8.4 Der mRNA-Level der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B wird in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen nur gering induziert

Aus Zellpellets (3.4.8) von unstimulierten und Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen (3.4.3) wurden über RNA-Isolierung (3.3.1) und reverse Transkription (3.3.2) entsprechende cDNA-Banken hergestellt, die für eine quantitative PCR eingesetzt wurden. Dabei wurden mit spezifischen Primern sowohl cDNA-Fragmente der PPIB als auch der pankreatischen Amylase und GAPDH amplifiziert (2.5; 3.3.3). Amylase diente dabei als Kontrolle für die

Induktion von Zymogen-mRNA-Leveln in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen und als Vergleichsprobe zur PPIB. GAPDH diente als Lade- und Qualitätskontrolle der verwendeten cDNA-Banken. Die Versuchsansätze wurden im Anschluss an die PCR auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert (3.3.6).

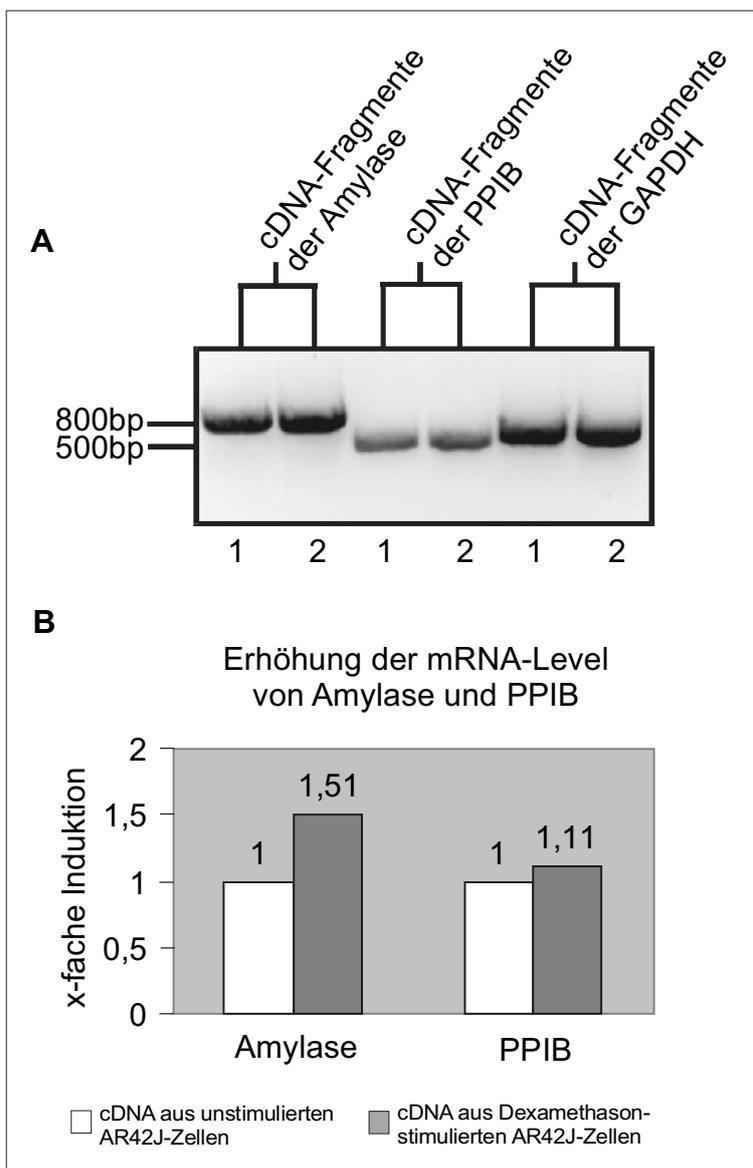


Abb. 4.27:

(A) PCR von cDNA-Fragmenten der pankreatischen Amylase, der PPIB und GAPDH aus cDNA-Banken von unstimulierten (1) und Dexamethason-stimulierten (2) AR42J-Zellen. Die Versuchsansätze wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. (B) Densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten aus (A); die erhaltenen Werte für die PCR-Signale aus cDNA-Banken von unstimulierten AR42J-Zellen (weiße Balken) wurden gleich 1 gesetzt und die in der Graphik dargestellten Ergebnisse für PCR-Signale aus cDNA-Banken von Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen (graue Balken) zeigen die vielfache Induktion der mRNA-Level im Vergleich zu unstimulierten AR42J-Zellen. Unterschiede in der Intensität der GAPDH-Banden wurden durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors in der Berechnung der Induktion berücksichtigt.

Die annähernd gleiche Intensität der cDNA-Fragmente, die sich in den Versuchsansätzen mit gegen GAPDH gerichteten Primern ergibt (Abb. 4.27A), zeugt von intakten cDNA-Banken und der gleichmäßigen Mengenverteilung derselben innerhalb der Versuchsansätze. Es lässt sich feststellen, dass der Amylase-mRNA-Level in AR42J-Zellen durch Zugabe von Dexamethason (2) im Vergleich zur unstimulierten Zellfraktion (1) 1,51-fach induziert wird, was als

Positivkontrolle dient, um sowohl die tatsächliche Induktion der AR42J-Zellen durch Dexamethason festzustellen (zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen, die sich nach Dexamethasonzugabe in der Zellkultur ergeben) als auch die Regulation typischer Zymogene unter Dexamethasongabe darzustellen. Der PPIB-mRNA-Level ist nur 1,11-fach erhöht im Vergleich Dexamethason-stimulierter und unstimulierter AR42J-Zellen. Auch an dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Induktion der Amylase-mRNA-Level nicht so hoch ausfällt, wie in der Literatur beschrieben (Logsdon et al., 1987). Somit sind Aussagen über die Induktion der mRNA-Level der PPIB in diesem Zellsystem anhand dieses Experiments nur sehr bedingt möglich. Möglicherweise wird die PPIB in AR42J-Zellen anders reguliert als klassische Zymogene.

4.8.5 Immunoblots von Zelllysaten aus unstimulierten sowie Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen zeigen keine deutliche Expressionsstimulation der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B

Zur Expressionskontrolle der PPIB in AR42J-Zellen wurden je 10µg von Zelllysaten aus unstimulierten sowie Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen (3.4.9) auf einem 12,5%igen SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4c) und im Anschluss auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7). Die Blots wurden mit einem Maus-anti-Tubulin-Antikörper (1:1000), einem Kaninchen-anti-Amylase-Antikörper (1:1000) sowie entsprechenden HRP-gekoppelten Zweitantikörpern (1:2000) inkubiert (vgl. 2.5), um einerseits die gleichmäßige Proteinauftragsmenge (Tubulin als Ladekontrolle) und andererseits die durch Dexamethason induzierte Expressionsstimulation sekretorischer Proteine (beispielhaft durch Amylase) darzustellen. Außerdem wurden die Blots mit einem Kaninchen-anti-Cyclophilin B-Antikörper (1:1000) und nachfolgend einem anti-Kaninchen-HRP-Antikörper (1:2000) inkubiert, um die Expression der PPIB vergleichend zwischen Dexamethason-stimulierter und unstimulierter Zelllysatzfraktion darzustellen.

Abbildung 4.28 zeigt eine 14,16-fache Induktion der Amylaseexpression nach Dexamethasonbehandlung der AR42J-Zellen (Abb. 4.28B). Im Gegensatz dazu zeigt sich für die PPIB keine deutliche Expressioninduktion, die Intensität der

Proteinbande bei 20kDa verstärkt sich nur gering um das 1,33-fache im Vergleich Dexamethason-stimulierter und unstimulierter AR42J-Zellen. Dieses Ergebnis stärkt die Ergebnisse der quantitativen PCR (Abb. 4.27). Die Expression der PPIB in AR42J-Zellen wird durch Dexamethason nur minimal stimuliert.

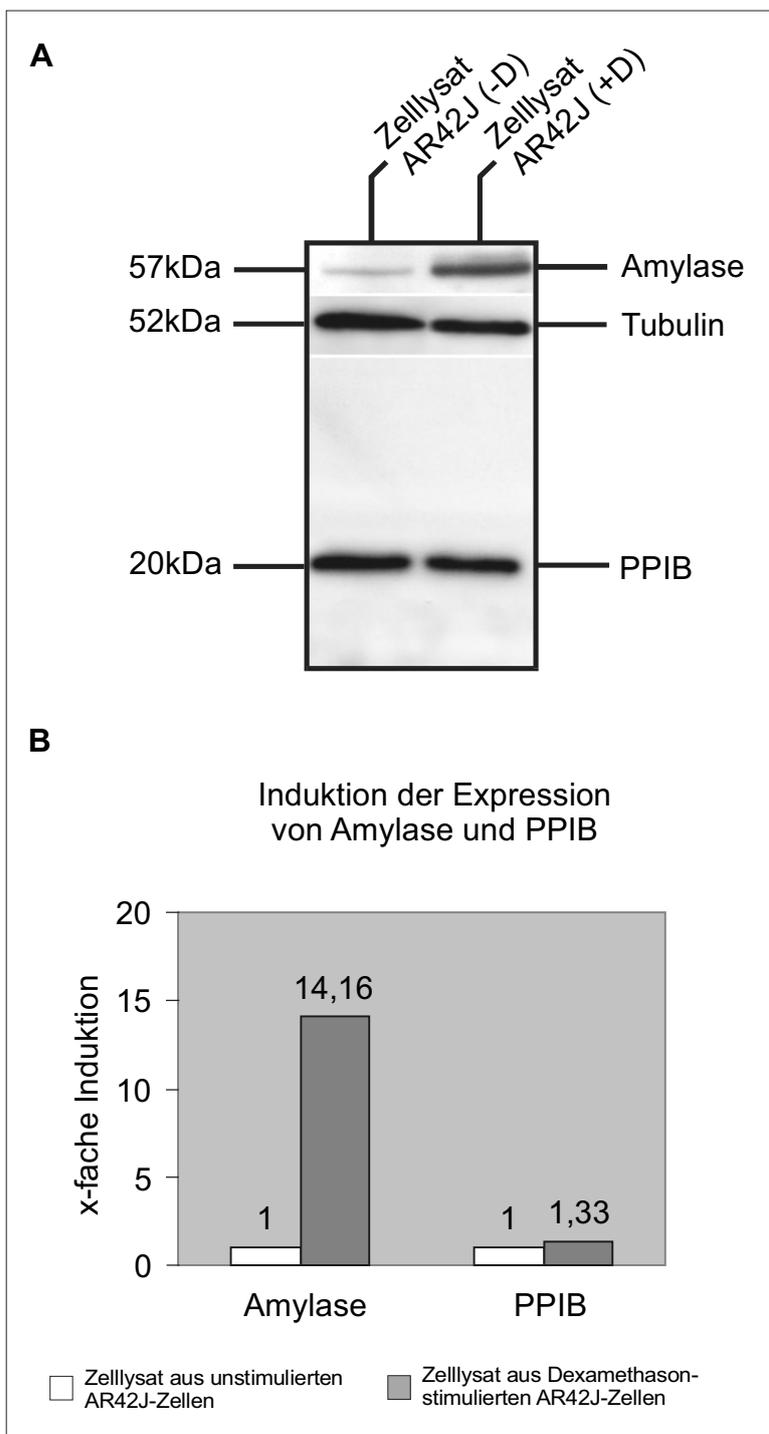


Abb. 4.28:

(A) Detektion von PPIB, Tubulin und Amylase in Zel lysaten von unstimulierten und Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen. Es wurden je 10µg von Zel lysaten aus unstimulierten (-D) sowie Dexamethason-stimulierten (+D) AR42J-Zellen auf einem 12,5%igen SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf Nitrocellulose geblotet. Die Detektion der Proteine erfolgte über einen Maus-anti-Tubulin-Antikörper (1:1000), einen Kaninchen-anti-Amylase-Antikörper (1:1000) und einen Kaninchen-anti-Cyclophilin B-Antikörper (1:1000) sowie die entsprechenden HRP-gekoppelten Zweitantikörper (anti-Kaninchen-HRP bzw. anti-Maus-HRP; 1:2000) unter Verwendung eines Chemilumineszenzreagenz. (B) Densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten aus (A). Unterschiede in der Intensität der Tubulinbanden wurden durch einen Korrekturfaktor in die Berechnung der Induktion von Amylase- und PPIB-Expression einbezogen.

Um dieses Ergebnis morphologisch zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzen an stimulierten AR42J-Zellen durchgeführt, die vergleichend die Lokalisation der endogenen PPIB und des Chymotrypsins innerhalb der Zellen darstellen sollten.

4.8.6 Die PPIB kolokalisiert in AR42J-Zellen mit perinukleären Kompartimenten, nicht aber mit Zymogengranula

Um die endogen exprimierte Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (PPIB) in den Zymogengranula der AR42J-Zellen nachzuweisen, wurden Dexamethason-stimulierte AR42J-Zellen verwendet (3.4.3). Dazu wurde eine Doppelimmunfluoreszenz (3.4.6) mit Kaninchen-anti-PPIB-Antikörper und Schaf-anti-Chymotrypsinogen-Antikörper als Erstantikörper durchgeführt (2.5), wobei angefärbtes Chymotrypsinogen als Markerprotein für die Zymogengranula verwendet wurde. Als Zweitantikörper wurden Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488 und Esel-anti-Schaf-IgG-TRITC (2.5) verwendet.

Abbildung 4.29 zeigt, dass die PPIB in den perinukleären Bereichen der AR42J-Zellen mit Chymotrypsinogen kolokalisiert (Abb. 4.29C; gelb gefärbte Areale). Sekretorische Granula zeigen ausschließlich eine TRITC-Färbung des markierten Chymotrypsinogens. Eine Kolokalisation von Chymotrypsinogen und PPIB im Bereich der sekretorischen Granula kann nicht eindeutig festgestellt werden und bestätigt so die erhobenen Immunoblot- und PCR-Befunde (Abb. 4.27 und 4.28). Anscheinend wird die PPIB nicht wie ein sekretorisches Protein reguliert und sortiert.

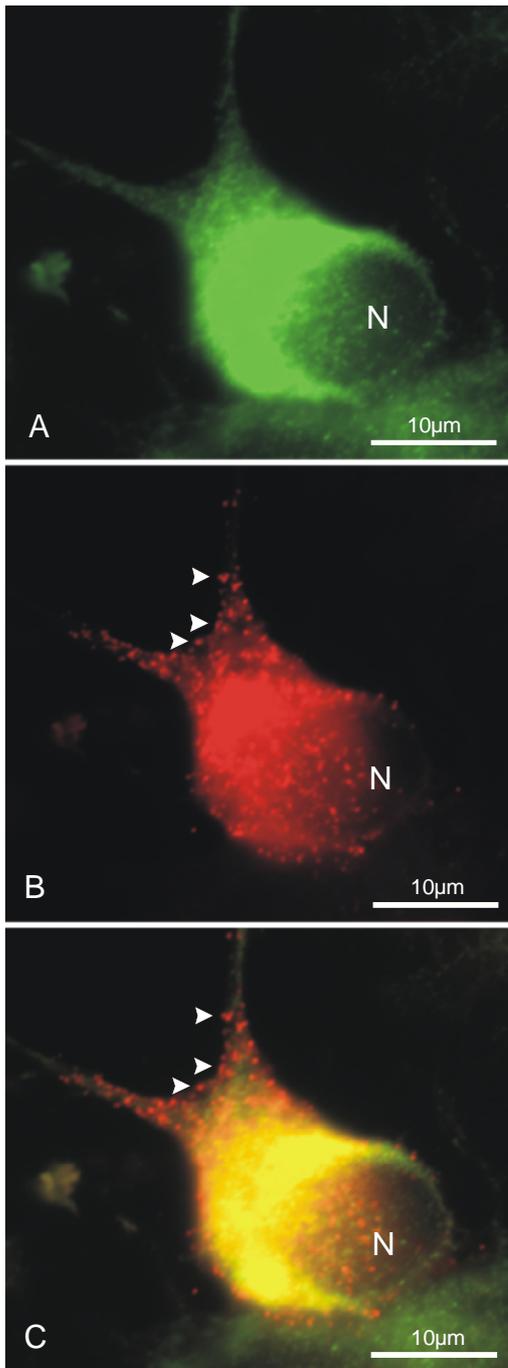


Abb. 4.29: Lokalisation des Chymotrypsinogens und der endogenen PPIB in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen.

(A) Lokalisation der endogenen PPIB in perinukleären Kompartimenten von Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen. Die PPIB wird über einen Kaninchen-anti-PPIB-Antikörper und einen Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488 als Zweitantikörper detektiert.

(B) Lokalisation des Chymotrypsinogens in perinukleären Kompartimenten sowie sekretorischen Granula von Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen. Chymotrypsin wird über einen Schaf-anti-Chymotrypsin-Antikörper sowie einen Esel-anti-Schaf-IgG-TRITC-Antikörper als Zweitantikörper detektiert.

(C) Überlagerung von (A) und (B), um potentielle Kollokalisierungen von PPIB und Chymotrypsin darzustellen. Weiße Pfeilspitzen in (B) und (C) weisen auf einzelne ausgewählte Zymogengranula hin; N bezeichnet den Zellkern der abgebildeten Zelle.

5. Diskussion

Die Azinuszellen des exokrinen Pankreas synthetisieren und sezernieren die für die Verdauung der Nahrung im Dünndarm notwendigen Verdauungsenzyme. Die meisten dieser Enzyme werden als inaktive Vorstufen, sogenannte Zymogene, synthetisiert. Diese werden an Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums gebildet und über das Netzwerk des endoplasmatischen Retikulums unter Beteiligung von Transportvesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. In den verschiedenen Golgi-Cisternen werden die Enzyme posttranslational modifiziert und im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in Zymogengranula sortiert. Die Sortierung der Zymogene und die Bildung der Zymogengranula beinhaltet eine Calcium- und pH-abhängige Kondensation der Zymogene (Dartsch et al., 1998; Chanat und Huttner, 1991). Die Anheftung dieser kondensierten Aggregate an die Membran des TGN sowie die daraus resultierende Clathrin-unabhängige Bildung von Zymogengranula wird möglicherweise durch eine submembranöse Matrix aus sulfatierten Proteoglykanen und assoziierten Proteinen vermittelt (Scheele et al., 1994; Schmidt et al., 2000; Schrader 2004). Nach ihrer Bildung werden die Zymogengranula in Abhängigkeit vom Zytoskelett zur apikalen Plasmamembran der Azinuszelle transportiert und dort gespeichert (Ueda et al., 2000; Valentijn et al., 2000). Erst auf einen hormonellen Stimulus hin entleeren sie ihren Inhalt exocytotisch in das Lumen des Pankreasganges (Williams et al., 2001).

Bisher sind nur wenige Proteine bekannt, die mit der Zymogengranulamembran assoziiert sind. Die weitere Identifizierung dieser peripheren Proteine ist notwendig, da ihnen vermutlich eine entscheidende Bedeutung bei der Sortierung und Verpackung sowie Inaktivierung der Zymogene zukommt. Fehler innerhalb dieser Prozesse können zur vorzeitigen Aktivierung der Zymogene innerhalb der Azinuszelle und damit zur Autolyse des Gewebes führen. Dies kann schwerwiegende Folgen wie die Entwicklung einer Pankreatitis nach sich ziehen (Raraty et al., 2000). Ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse der Granulagenese und Zymogensortierung/-inaktivierung ist daher von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung therapeutischer Maßnahmen.

Um die Proteinfraction der peripheren Membranproteine des exokrinen Rattenpankreas zu identifizieren, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, der

2D-gelelektrophoretische Methoden und massenspektrometrische Analysen kombiniert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu die Techniken der 2D-gelelektrophoretischen Proteinauftrennung sowie die geeignete Anfärbung der Proteine im SDS-Gel und die Aufarbeitung und proteolytische Spaltung der Proteine etabliert und optimiert. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. J. Nyalwidhe (AG Prof. Lingelbach, Institut für Biologie, Philipps-Universität Marburg), Frau Dr. D. Delacour (Institut für Zyobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg) und Herrn Dr. J. Adamkiewicz (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

5.1 Innerhalb der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas können viele Proteine über MALDI-MS und MALDI-MSMS identifiziert werden, darunter einige für Zymogengranula bisher unbekannte Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der peripheren Membranproteine der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas identifiziert und nachfolgend charakterisiert. Dazu wurde zunächst das Proteingemisch der sogenannten *Wash*-Fraktion der Zymogengranula, die hauptsächlich die durch Carbonatbehandlung von der Zymogengranulamembran entfernten peripheren Membranproteine enthält, 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4) und charakterisiert. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mittels immobilisierter pH-Gradienten (pH 3-11 NL), die anschließende molekulargewichtsspezifische Auftrennung wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem 12,5%igen SDS-Gel durchgeführt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte über MALDI-MS und MALDI-MSMS. Dazu wurden die resultierenden Proteinspots zunächst durch eine kombinierte Coomassie-/Silberfärbung im SDS-Gel angefärbt (3.1.5d, 3.1.5e), im Anschluss einzeln aus dem Gel ausgestochen und nachfolgend mit der Serinprotease Trypsin in proteinspezifische Peptidfragmente gespalten (3.1.6). Diese Peptidgemische wurden entsalzt und komplexiert mit einer MALDI-geeigneten Matrix auf ein entsprechendes Target geladen. Im Anschluss erfolgte dann die Analyse sowohl der Peptidspektren als auch einzelner Peptide im *Time-of-Flight*-Massenspektrometer sowie die

anschließende Identifizierung der Proteine über einen Vergleich der ermittelten Peptidspektren mit geeigneten Proteindatenbanken. Die so identifizierten Proteine sind in Tabelle 2.1 und 2.2 des Ergebnisteils dargestellt (4.4).

Die identifizierten Proteine der *Wash*-Fraktion lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Zunächst sind eine saure und eine basische Proteingruppe zu erkennen (siehe schwarze Rahmen in Abbildung 4.3 und 4.4). Die saure Proteingruppe umfasst hauptsächlich Proteine in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 20kDa bis 50kDa und einem pH-Bereich der isoelektrischen Punkte von ca. pH 4 bis pH 6. Die basische Proteingruppe beinhaltet überwiegend Proteine in einem Molekulargewichtsbereich von 10kDa bis 30kDa und isoelektrischen Punkten im pH-Bereich von ca. pH 8 bis pH 10. Sowohl innerhalb der sauren als auch basischen Gruppe finden sich verschiedene Proteine, die schon im Vorfeld als periphere Membranproteine der Zymogengranula beschrieben wurden. Hierzu gehören das Syncollin (Edwardson et al., 1997) und das ZG16p (Cronshagen et al. 1994) sowie das Annexin 4 (Fukuoka et al., 2002). Weiter finden sich Enzyme des Zymogengranulainhalts in dieser Proteinfraction, dazu gehören die pankreatische Amylase (McDonald et al., 1980), kationisches Trypsin III (Fletcher et al., 1987), RNase A (Beintema, 1983) und RNase H (Wood et al., 2001), Chymotrypsin B (Bell et al., 1984) und Chymotrypsin C (Kang et al., 1992), Chymopasin (Sogame et al., 2002) sowie lipidbindende Enzyme wie die Carboxyesterlipase (Kissel et al., 1989), die pankreatische Triacylglycerollipase (Payne et al., 1994), die Colipase (Wicker and Puigserver, 1990) sowie das *pancreatic lipase related protein 1* (Lowe, 2002). Ferner finden sich mitochondriale Proteine innerhalb dieser Proteinfraction. Dazu gehören die β - und δ -Kette der mitochondrialen ATP-Synthase (Garboczi et al., 1988; Higuti et al., 1993) sowie die Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheiten IV (Goto et al., 1989) und Va (Droste et al., 1989). Desweiteren fanden sich das *ERM-Binding Phosphoprotein* (Fouassier et al., 2000), ein *Ca²⁺-modulating Cyclophilin-Ligand* (Bram und Crabtree, 1994; Lee et al., 2001) und die α 1E-Untereinheit eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals (Piedras-Renteria et al., 1997). Außerdem fanden sich die Chymase (Lutzelschwab et al., 1997), das Hauptprotein aus sekretorischen Granula der Mastzellen, sowie die Peptidyl-

Prolyl-Isomerase B (Iwai et al., 1990), klassischerweise ein ER-residentes Protein.

Chen et al. (2006) publizierten Daten bezüglich der Membranproteine der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas, die sie basierend auf einem experimentellen Ansatz, der 2D-Liquid-Chromatographie mit MALDI-Analysen kombiniert, identifizierten. Dabei untersuchten sie Zymogengranulamembranen, die zuvor mit Kaliumbromid und Di-Natriumcarbonat gewaschen worden waren. Sie bestätigen einige der in unserer Arbeitsgruppe identifizierten Proteine, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine die *Wash*-Fraktion, also die durch Carbonatbehandlung von der Zymogengranulamembran entfernten Proteine, darstellen. Trotzdem finden sich einige der identifizierten Proteine auch in geringem Maß in der Fraktion der gewaschenen Membranen wieder, wie Immunoblotting-Experimente mit allen vier Zymogengranulafraktionen zeigen (vgl. Abb. 4.15). Chen et al. identifizierten unter anderem Anteile der mitochondrialen ATP-Synthase sowie spannungsabhängige Ionenkanäle, ebenso Enzyme der Inhaltsfraktion der Zymogengranula wie die α -Amylase, Chymotrypsin B und C und die lipidspaltenden Enzyme Carboxyesterlipase, pankreatische Triacylglycerollipase, *pancreatic lipase related protein 1* und Colipase, die sich ebenfalls in der *Wash*-Fraktion identifizieren ließen. Außerdem wurden auch die Matrixproteine ZG16p und Syncollin identifiziert. Am Beispiel von Syncollin und ZG16p zeigt sich, dass auch peripher mit der Membran assoziierte Proteine, die keine membranbindende Domäne besitzen, durch Carbonatbehandlung sowie Kaliumbromid nicht vollständig von der Zymogengranulamembran entfernt werden können. Dies bestätigt die in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Ergebnisse und somit können Vergleiche zwischen den publizierten Proteindaten und den im Verlauf dieser Arbeit identifizierten Proteinen zu einer besseren Einschätzung der Validität der erzielten Ergebnisse führen.

Berkane et al. (2007) veröffentlichten ebenfalls Proteindaten, die sie über 2D-Liquid-Chromatographie und anschließende MALDI-Analyse an den Membranen der Zymogengranula identifizierten. Dabei lag der Fokus auf Proteinen, die mit *lipid rafts* interagieren. Auch hier finden sich einige der von uns identifizierten Proteine wie die Carboxyesterlipase, die pankreatische

Triacylglycerollipase sowie das *pancreatic lipase related protein 1*. Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase finden sich auch in diesen Zymogengranulapräparationen.

Auch Rindler et al. (2007) identifizierten kürzlich basierend auf einem Ansatz aus eindimensionaler SDS-PAGE, Liquid-Chromatographie und Massenspektrometrie Proteine sowohl der Inhalts- als auch der Membranfraktionen der Zymogengranula. Sie identifizierten einige schon bekannte Zymogengranulainhaltsproteine wie pankreatische Amylase, Chymotrypsin, CEL, Colipase, Chymopasin u.a. sowie einige membranassoziierte Proteine wie GP2, Syncollin, ZG16p u.a.. Damit werden einige im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte Proteine bestätigt. Als neue Komponenten identifizierten Rindler et al. (2007) verschiedene Proteoglykane, u.a. das Glypican-4-Heparansulfat. Desweiteren fanden sich auch in dieser Analyse mitochondriale Proteinkomponenten in den Zymogengranula. Von besonderem Interesse sind Enzyme des endoplasmatischen Retikulums, die in der Zymogengranulafraktion identifiziert wurden. Dazu gehören BiP, die Proteindisulfidisomerase sowie auch die Peptidyl-Prolyl-Isomerase B. Trotz der großen Anzahl identifizierter Proteine (insgesamt 371) konnten Rindler et al. (2007) einige bekannte und prominente Proteine der Zymogengranula nicht identifizieren, dazu gehören u.a. die RNase A, Serglycin und ZG29p.

Man kann feststellen, dass Teile unserer Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen konform sind, was die Genauigkeit unserer Analysen und des gewählten experimentellen Ansatzes unterstreicht und außerdem die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der abweichenden Ergebnisse (v.a. Chymase und Peptidyl-Prolyl-Isomerase B) erhöht.

Einige von unserer Arbeitsgruppe identifizierte Proteine wurden bisher nicht von anderen Arbeitsgruppen identifiziert. Von besonderem Interesse sind hier die Chymase sowie die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B, die Rindler et al. (2007) zwar kürzlich neu identifiziert, aber bisher nicht charakterisiert haben.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal eine genauere Analyse der peripher mit der Zymogengranulamembran assoziierten Proteine und tragen so dazu bei, die Mechanismen der Zymogensortierung und -inaktivierung näher zu beschreiben und potentielle

Ansatzpunkte für therapeutische Maßnahmen bei Erkrankungen wie der Pankreatitis zu entdecken.

5.2 Stellen die Inhaltsproteine der Zymogengranula und die mitochondrialen Proteine eine „Verunreinigung“ der *Wash*-Fraktion dar oder handelt es sich tatsächlich um membranassoziierte Proteine der Zymogengranula?

Innerhalb der Gruppe der identifizierten Proteine der *Wash*-Fraktion finden sich sowohl Proteine der Inhaltsfraktion wieder (z.B. α -Amylase, Chymotrysin B und C, kationisches Trypsin) als auch Proteine mitochondrialen Ursprungs (β - und δ -Kette der mitochondrialen ATP-Synthase, Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheiten IV und Va). Ein unspezifisches Auftreten dieser Proteine in der verwendeten *Wash*-Fraktion durch Verunreinigungen der Probe mit mitochondrialen Komponenten oder eine mangelnde Trennung der Zymogengranulafraktionen während der Präparation kann mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 4.2 gezeigt, sind die Fraktionen der Zymogengranula eindeutig in Inhalts- und Membranfraktionen zu trennen. Die α -Amylase findet sich größtenteils in der Inhaltsfraktion, nur geringe Mengen finden sich in den Membranfraktionen. Die Assoziation dieser Inhaltsproteine mit der Membran der Zymogengranula und das Auftreten dieser Proteine in der *Wash*-Fraktion ist vermutlich bedingt durch die Verpackung der Zymogene innerhalb der Granula. Die sekretorischen Proteine aggregieren unter den im TGN herrschenden Bedingungen zu Proteinkomplexen (Kleene et al., 1999). Diese Komplexe werden vermutlich über Linkerproteine an die Zymogengranulamembran gebunden: so vermittelt das Inhaltsprotein ZG29p die Anbindung von Amylase an die Membran der Zymogengranula (Kleene et al., 2000). Die Anbindung erfolgt vermutlich über eine submembranöse Matrix, die aus sulfatierten Proteoglykanen und daran assoziierten Proteinen besteht (Scheele et al., 1994; Biederbick et al., 2003; Schmidt et al., 2000; Schrader 2004). Die Wechselwirkungen der Inhaltsproteine mit spezifischen Linkerproteinen könnte die Assoziation mit der submembranösen Matrix vermitteln. Durch die Carbonatbehandlung der Zymogengranulamembranen werden periphere Membranproteine sowie das Gerüst der submembranösen

Matrix von der Membran abgelöst und bilden dann die *Wash*-Fraktion. Die Verpackung der Zymogene und ihre Wechselwirkungen mit der Matrix könnten das Auftreten dieser Proteine in der *Wash*-Fraktion erklären. Diese Vermutung wird auch durch Chen et al. (2006) gestärkt, da selbst in der Fraktion gewaschener Zymogengranulamembranen sowohl periphere als auch Inhaltsproteine in gewissen Mengen vertreten sind.

Eine Verunreinigung der *Wash*-Fraktion mit mitochondrialen Proteinen kann ebenfalls relativ sicher ausgeschlossen werden. Zwar könnten mitochondriale Proteine durch die Art der Zymogengranulapräparation (3.1.1a) zu Artefakten führen, aber auch andere Arbeitsgruppen identifizierten mitochondriale Proteine in der Fraktion der Zymogengranulamembranen. So fanden sowohl Chen et al. (2006) als auch Berkane et al. (2007) Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase in ihren Präparationen. Diese Gruppen isolierten die Zymogengranula über einen Percoll- bzw. Sucrosegradienten, wodurch die Verunreinigung mit mitochondrialen Proteinen gering sind. Außerdem wurden die Untereinheiten I und II der Cytochrom-c-Oxidase in Zymogengranula identifiziert (Sadacharan et al., 2005), ebenso Cytochrom c selbst (Soltys et al., 2001). Explizit soll hier darauf hingewiesen werden, dass andere klassische Mitochondrienmarkerproteine wie Proteine der Importmaschinerie (TIM/TOM-Komplex) oder mitochondriale Matrixproteine (z.B. der β -Oxidation) nicht in der *Wash*-Fraktion identifiziert wurden. Die Funktion der identifizierten mitochondrialen Proteine sowie der Transportweg, über den sie in die Zymogengranula sortiert werden, sind bisher unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Patienten mit einer COX-Defizienz eine chronische Pankreatitis entwickeln, die durch die vorzeitige Aktivierung der Zymogene innerhalb der Zymogengranula ausgelöst wird (Kato et al., 1990). Außerdem kann die Beta-Untereinheit der ATP-Synthase Ca^{2+} binden (Hubbard et al., 1996). Somit spielen diese mitochondrialen Proteine eventuell eine Rolle bei der Verpackung und Kondensation bzw. der Inaktivierung der Zymogene.

5.3 Einige Proteine der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula konnten trotz mehrfacher Analyse nicht identifiziert werden, möglicherweise verursacht durch potentielle posttranslationale Modifikationen, die das Peptidmuster beeinflussen

Die Abbildungen 4.3, 4.4 und 4.5 stellen das repräsentative Proteinspotmuster dar, das nach der 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung (3.1.4) der *Wash*-Fraktion und anschließender Anfärbung der Proteine im SDS-Gel (3.1.5d und 3.1.5e) entsteht. Alle markierten Spots wurden mehrfach aus verschiedenen Gelen isoliert und die proteinspezifischen Peptidspektren analysiert. Trotz der Sauberkeit der Proben und der guten Qualität der Peptidspektren konnten einige Proteine nicht identifiziert werden. Dies kann mit unbekanntem posttranslationalen Modifikationen zusammenhängen oder aber auch ein Problem der verfügbaren Proteinmenge darstellen, wobei hier betont werden soll, dass die MALDI-Analyse eine hochsensitive Methode darstellt, die Proteinmengen im Femtomol-Bereich detektieren kann. Außerdem konnten einige schwache Spots eindeutig identifiziert werden im Gegensatz zu anderen stark angefärbten Spots, die in der MALDI-Analyse zu keinem Ergebnis führten, so dass vermutlich eher die Proteinmodifikationen das entscheidende Problem darstellen.

Die sauren Proteine der *Wash*-Fraktion ließen sich im Vergleich zu den basischen Proteinen der *Wash*-Fraktion bedeutend schlechter analysieren (39% (sauer) zu 73% (basisch); Abb. 4.10). Zwar waren die Peptidspektren gut, trotzdem ließen sich für einige Proteine keine eindeutigen Ergebnisse in der MALDI-Analyse erzielen. Es zeigte sich, dass die Proteine der sauren Gruppe im Gegensatz zu denen der basischen Gruppe glykosyliert sind (4.3; Abb. 4.7). Dies führte möglicherweise zu den beschriebenen Problemen in der Analyse, da durch die Glykosylierungen Schnittstellen der verwendeten Protease eventuell unzugänglich waren. Außerdem könnte es während der Analyse im Massenspektrometer zu abweichenden Molekülmassen der analysierten Peptide kommen, die durch die gebundenen Verzuckerungen verursacht werden. Beides könnte zu abweichenden Peptidspektren und damit zu Problemen in der Proteinidentifizierung führen. Mit Versuchen, die Glykosylierungen mittels Endoglykosidasen abzuspalten, wurde begonnen.

Einige Proteinspots wurden als Proteine identifiziert, deren Molekulargewicht oder isoelektrischer Punkt nicht dem zugeordneten Proteinspot entsprach (vgl. Tabelle 4.1 und 4.2). Da der Score entsprechend gut war, muss davon ausgegangen werden, dass es sich entweder um Fragmente der postulierten Proteine handelt, die eventuell durch die Carbonatbehandlung entstehen, oder aber um verwandte Proteine, die eine hohe Homologie zu den genannten Proteinen aufweisen.

5.4 Die Mastzell-spezifische Protease Chymase kann durch MALDI-Analysen eindeutig als Protein der Zymogengranula des exokrinen Pankreas der Ratte identifiziert werden und lässt sich ähnlich den sekretorischen Proteinen regulieren

Die Chymase wurde in der MALDI-Analyse eindeutig in der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula identifiziert. Dazu wurden 300µg *Wash* 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4), die isoelektrische Fokussierung wurde über einen pH-Bereich von pH 3-11NL durchgeführt, die anschließende molekulargewichtsspezifische Auftrennung der Proteinfraction erfolgte im 12,5%igen SDS-Gel. Nach kombinierter Coomassie-Silber-Färbung des Gels (3.1.5d und 3.1.5e) und Ausstechen der Proteinspots wurden diese proteolytisch in proteinspezifische Peptide gespalten und die Peptidspektren im Anschluss massenspektrometrisch analysiert (3.1.6). Dabei ergab sich für Spot B32 (Abb. 4.8) mit einem signifikanten Score von 82 eine Identifizierung der mastzellspezifischen Chymase. Die Chymase stellt eines der Hauptsekretionsprodukte von Mastzellen dar und wird dort in sekretorischen Granula gespeichert; in Zymogengranula des exokrinen Pankreas wurde dieses Enzym bisher nicht beschrieben. Im SDS-Gel stellte sich die Chymase im Vergleich zu anderen Proteinen der *Wash*-Fraktion (wie z.B. der RNase A (Spot B13) oder Syncollin (Spot B14); Abb. 4.6) als ein geringer exprimiertes Protein dar; der Proteinspot ist kleiner, was auf eine geringere Proteinmenge innerhalb der Granula schließen lässt .

Mastzellen wurden ursprünglich von Paul Ehrlich entdeckt und sind gewebständige Immunzellen, die eine zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen spielen (Janeway und Travers, 1997) und über spezifische

Rezeptoren IgE-vermittelte Immunantworten auslösen. Sie werden als unreife Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet und wandern unter dem Einfluss von SCF (*Stem Cell Factor*) in das Gewebe ein. Dort fördert SCF die Proliferation, Reifung und Differenzierung der Mastzellen sowie die Ausprägung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (Okayama und Kawakami, 2006). Die Vernetzung der Oberflächenrezeptoren durch IgE führt zur Ausschüttung sekretorischer Granula, die Enzyme, toxische und vasoaktive Substanzen (Histamin und Heparin), Cytokine und Lipidmediatoren enthalten. Zu den gespeicherten Enzymen gehören die Chymase sowie Tryptase, Carboxypeptidase und Kathepsin G. Diese aktivieren Metalloproteinasen der Bindegewebsmatrix und bauen zusammen mit diesen die Bindegewebsmatrix ab (Janeway und Travers, 1997). Bei Ratten lassen sich verschiedene Untergruppen von Mastzellen anhand der verschiedenen von ihnen sezernierten Serinproteinasen unterscheiden (Gibson und Miller, 1986; Pejler und Sadler, 1999). So enthalten bindegewebspezifische Mastzellen die Rattenmastzellproteinase 1 und 5 (Rat mast cell proteinase 1, RMCP-1, Chymase; Rat Mast Cell Protease 5, RMCP-5), während Mucosa-assoziierte Mastzellen RMCP-2 (Rat mast cell proteinase 2) enthalten. So enthalten auch Mastzellen der Zunge, Haut, des Lungenparenchyms ausschließlich RMCP-1. Auch zerebrale Mastzellen enthalten RMCP-1, zeigen aber während ihrer Entwicklung einen phänotypischen Wandel von der Expression von RMCP-2 zu RMCP-1 (Dimitriadou et al., 1996).

Die Funktionen der Chymase sind vielfältig, sie umfassen Schlüsselfunktionen bei Entzündungsprozessen und Gewebe-Remodeling (Leskinen et al., 2003) und spielen auch bei bronchialen Überreaktionen (Bradding et al., 2006) und atopischen Krankheitsbildern eine Rolle (Weidinger et al., 2005). Beim Menschen spaltet das Enzym zusammen mit dem Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Angiotensin II von Angiotensin I (Takai, 2003) und bewirkt eine Hyperplasie verletzter Gefäßstrukturen, ohne aber den Blutdruck zu beeinflussen. Bei Ratten kann Chymase zur Apoptose von glatten Muskelzellen in der Umgebung der Mastzellen führen, indem die Chymase das Fibronectin der extrazellulären Matrix abbaut und so *Focal Adhesions* zerstört (Leskinen et al., 2003). Die nähere Untersuchung dieses Prozesses zeigte eine Inhibierung des NF- κ B-Survival-Pathways durch Reduzierung von p65, der

Transaktivierungseinheit von NF- κ B, und dessen nukleäre Translokation (Leskinen et al., 2005).

Zur Verifizierung des MALDI-Analyse-Ergebnisses für die Chymase wurden 300 μ g der *Wash*-Fraktion wie beschrieben 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4) und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7). Der Immunoblot wurde mit einem Ziege-anti-Chymase-Antikörper und einem HRP-gekoppelten Esel-anti-Ziege-Antikörper inkubiert (2.7). Die im Verhältnis zu anderen Zymogengranulaproteinen geringer exprimierte Chymase wurde im Immunoblot unter Verwendung eines Chemilumineszenzreagenz eindeutig als singulärer Spot bei einem isoelektrischen Punkt von 9,54 und einem spezifischen Molekulargewicht von 28kDa nachgewiesen (Abb. 4.16). Der Immunoblot aller vier verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen zeigte eine bevorzugte Assoziation der Chymase mit Zymogengranulamembranen, ein geringerer Anteil der Chymase fand sich auch im Inhalt der Zymogengranula (Abb. 4.17). Innerhalb der Membranfraktionen der Zymogengranula zeigte sich eine bevorzugte Assoziation der Chymase mit peripheren Membrankomponenten, ein geringerer Anteil verblieb auch nach Carbonatbehandlung der Zymogengranulamembranen an der Membran. Kontrollexperimente, die über einen anti-Maus-Tryptase-Antikörper (2.7) die Tryptase als ein weiteres mastzellspezifisches Protein nachweisen sollten, brachten in den Zymogengranulasubfraktionen kein Signal, wohl aber in der Kontrollfraktion, in der ein Lysat aus Rattenzungengewebe elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet wurde (Abb. 4.17). Zungengewebe enthält viele gewebsspezifische Mastzellen und diente deshalb als Positivkontrolle für das durchgeführte Experiment. Somit scheint die Mastzell-spezifische Chymase spezifisch auch im exokrinen Pankreas der Ratte exprimiert zu werden und ist dort anscheinend in den Zymogengranula lokalisiert, wobei das Protein hauptsächlich membranassoziiert vorliegt.

Quantitative PCR-Studien, die Aussagen über die im untersuchten Pankreasgewebe vorhandenen mRNA-Level ermöglichen sollten, zeigen eine 229-fache Stimulation des Chymase-mRNA-Levels im Vergleich von Pankreata gefasteter und Foy-gefütterter Ratten (Abb. 4.18B) bei ähnlicher eingesetzter cDNA-Konzentration (dargestellt durch die ähnliche Intensität der GAPDH-Bande; Abb. 4.18A). Als Positivkontrolle für die Erhöhung des mRNA-Levels

diente ein Ansatz mit Amylase-spezifischen Primern. Hier zeigte sich eine 4-fache Induktion des Amylase-mRNA-Levels (Abb. 4.18C). Die im Vergleich zur Amylase sehr viel stärkere Induktion Chymase-mRNA resultiert möglicherweise aus der sehr geringen Chymase-mRNA-Menge im Pankreasgewebe gefasteter Ratten. Außerdem soll darauf hingewiesen werden, dass auch die Induktion der Amylase-mRNA in anderen Experimenten höher war (vgl. 4.8.3; Abb. 4.26). Trotzdem zeigt sich aber sowohl für die Chymase ebenso wie für die Amylase eine FOY-stimulierte Erhöhung des jeweiligen mRNA-Levels. Im Gegensatz zur Chymase ergab sich für die Mastzell-Tryptase in keiner der beiden cDNA-Präparationen ein entsprechendes cDNA-Amplikon. Eine Positivkontrolle bestehend aus einem Reaktionsansatz mit cDNA aus Zungengewebe zeigte sowohl für die Chymase als auch die Tryptase ein spezifisches Amplikon und schließt damit ein Fehlen des Amplikons im Tryptaseansatz aufgrund eventuell ungeeigneter Reaktionsbedingungen aus. Die Chymase wurde ähnlich zur pankreatischen Amylase auf mRNA-Ebene durch FOY-305-Fütterung der Ratten im Pankreas induziert. Histologische sowie elektronenmikroskopische Experimente (4.7.5, Abb. 4.20; 4.7.6, Abb. 4.21) wiesen die Chymase als Hautprotein in Mastzellen bzw. Mastzellgranula der Rattenzunge nach, ebenso aber auch spezifisch in Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas, wobei die Markierungsdichte der Chymase hier im Vergleich zu Mastzellgranula bedeutend geringer war. Dies liegt vermutlich daran, dass das Enzym kein häufiges Protein in Zymogengranula ist (Abb.4.8). Zusammengenommen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Chymase spezifisch in den Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas exprimiert wird und dort hauptsächlich assoziiert mit Zymogengranulamembranen vorliegt.

Im Gegensatz zu Pankreasgewebe wird die Chymase in AR42J-Zellen nicht endogen exprimiert, wie quantitative PCR-Studien an unstimulierten sowie Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen nahe legten (4.7.4, Abb. 4.19). In beiden Reaktionsansätzen ergab sich kein Chymase-spezifisches Amplikon, wohl aber in Zungengewebe, das durch die gewebsspezifischen Mastzellen als Positivkontrolle für die Chymaseexpression diente. Als Induktionskontrolle diente Amylase, deren mRNA-Level in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen im Vergleich zu unstimulierten AR42J-Zellen erhöht war (Abb. 4.19). Die Klonierung der Chymase (RMCP-1) in einen eukaryontischen

Expressionsvektor, die anschließende Transfektion und der Nachweis des Proteins in den AR42J-Zellen mittels Immunfluoreszenz zeigte eine Kolokalisation mit Carboxypeptidase-markierten Zellkompartimenten, u.a. sekretorischen Granula, und stützt so die bisher erzielten Ergebnisse (4.7.8; Abb. 4.23); die Chymase wird spezifisch in sekretorische Granula sortiert. Dabei scheint die Proteinmenge aber niedriger zu sein als bei anderen sekretorischen Proteinen wie der Amylase.

Die Funktion der Chymase in den Zymogengranula bleibt aufzuklären. Vermutlich ist das Enzym über seine Affinität zu Proteoglykanen mit der Membran der Zymogengranula assoziiert. Sekretorische Granula der bindegewebspezifischen Mastzellen, in denen die Chymase bisher beschrieben wurde, enthalten stark sulfatierte Chondroitinsulfat-Proteoglykane sowie Heparin, wobei nur Heparin von den Zellen selbst synthetisiert wird (Katz et al., 1986). Chondroitinsulfat resultiert in den bindegewebspezifischen Mastzellen von einer früheren Entwicklungsstufe her (Katz et al., 1986). Heparin selbst ist ein hoch sulfatiertes Glukosaminoglykan. Mehrere Moleküle werden kovalent mit dem Core-Protein Serglycin zu einem Proteoglykan verknüpft (Pejler und Sadler, 1999), ebenso bei Chondroitinsulfat. Chondroitinsulfat wird von mucosa-assoziierten Mastzellen synthetisiert. Bei Nagern unterstützen sulfatierte Glucosaminoglykane die Immunantwort gegen intestinale Infektionen und Parasiten (Maruyama et al., 2000). Die Chymase als eine hoch basische Chymotrysin-ähnliche Serinprotease wurde bisher nur in Mastzellen nachgewiesen und ist komplexiert mit Heparin in den sekretorischen Granula gespeichert. Zwar ist Heparin in Zymogengranula bisher nicht nachgewiesen worden, doch bindet die Chymase über ihre Heparinbindungsstellen eventuell auch an andere sulfatierte Proteoglykane.

Nach der Mastzellaktivierung wird der Komplex aus Chymase und Heparin sezerniert (Pejler und Sadler, 1999) Er bleibt im Gegensatz zu anderen Protease-Proteoglykan-Komplexen (wie z.B. bei der Trypsinase) auch nach der Sekretion erhalten. Die Aktivität der Chymase gegenüber bestimmten Substraten wie z.B. Thrombin und Pro-Collagenase wird durch die Bindung an Heparin erhöht. Dabei scheint Heparin hier als eine Art Katalysator für die Chymase und ihr Substrat zu dienen (Pejler und Sadler, 1999). Außerdem wird die Umsatzrate für geladene Substrate erhöht, da die Bindung an Heparin

einige der positiven Ladungen des stark basischen Enzyms abpuffert. Durch die Bindung an Heparin wird die Chymase außerdem gegen die Inhibition des Enzyms durch Plasmaproteaseinhibitoren geschützt. Desweiteren fördert diese Komplexbildung den Kontakt der Protease zur Mastzelloberfläche, vermutlich um die Chymase am Ort der Entzündung zu halten und eine Diffusion des Enzyms in andere Bereiche zu verhindern (Pejler und Sadler, 1999).

Durch die Sekretion in den Pankreasgang und die Assoziation mit ebenfalls sezernierten Proteoglykanen werden möglicherweise Bedingungen geschaffen, die es der Chymase ermöglichen, ihre potentiellen Substrate entsprechend umzusetzen. Mögliche Funktionen der Chymase könnten der Verdau von Bindegewebsproteinen der Nahrung sein. Möglicherweise vermittelt sie über ihre Bindung an Proteoglykane auch die Sortierung der Zymogene an die Zymogengranulamembran und könnte außerdem eine Rolle bei der Regulation der Zymogenaktivierung/-inaktivierung spielen. Eventuell wird auch die Aktivität der Chymase selbst durch die Bindung an Proteoglykane reguliert und das Enzym möglicherweise auch durch die Bindung an andere Proteoglykane als Heparin inaktiviert, um nach der Sekretion das Bindegewebe des Pankreasganges nicht zu verletzen.

5.5 Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (Cyclophilin B; PPIB) wird spezifisch im exokrinen Pankreas der Ratte exprimiert und lässt sich ähnlich den sekretorischen Proteinen regulieren

Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (Cyclophilin B; PPIB) wurde ebenfalls durch einen Kombinationsansatz aus 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung der *Wash*-Fraktion und anschließender Analyse der aufgetrennten Proteine mittels MALDI-MS und MALDI-MSMS mit einem signifikanten Score von 129 in der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula identifiziert (Spot B16, Abb. 4.8). Sie ist ein 20kDa-Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 9,35 (4.8.1; Abb. 4.24) und gehört zur Gruppe der Cyclophiline, die sich durch ihre Bindungsaffinität zu dem Immunsuppressor Cyclosporin A auszeichnen und deshalb auch als Immunophiline bezeichnet werden (Galat, 1993).

Cyclophiline finden sich in allen bisher untersuchten Organismen wie Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten und Säugern. Sie besitzen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-

Isomerase-Aktivität und assistieren dadurch bei der Proteinfaltung Prolin-haltiger Polypeptidketten (Wang und Heitman, 2005). Cyclophiline finden sich in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten und üben dort spezifische Funktionen aus. Bei Säugern sind Cyclophilin A sowie Cyclophilin 40 cytosolisch, wohingegen Cyclophilin B und C aminoterminal Signalsequenzen besitzen, die sie zum endoplasmatischen Retikulum und in den sekretorischen Weg dirigieren. Cyclophilin D ist in Mitochondrien lokalisiert, Cyclophilin E findet sich im Zellkern.

Cyclophilinen werden verschiedenste biologische Aufgaben zugeschrieben; so agieren sie als Chaperone bei der Proteinfaltung, regulieren molekulare Kanäle in Membranen, greifen in die Immunabwehr ein und spielen eine Rolle in der Gen- und Zellzyklusregulation sowie der Apoptose (Montague et al., 1997; Galat, 2003).

Durch Immunoblotting der 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose (3.1.4; 3.1.7) konnte die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B unter Verwendung eines anti-Cyclophilin-B-Antikörpers eindeutig als singulärer Spot im 2D-Immunoblot identifiziert werden (Abb. 4.24). Die Detektion des Proteins in den verschiedenen Zymogengranulasubfraktionen (je 10µg von ZGI, ZGM, gZGM und *Wash*) erfolgte durch die gelelektrophoretische Auftrennung identischer Mengen der jeweiligen Fraktionen und das anschließende Immunoblotting der Proteinfractionen auf Nitrocellulose (3.1.4; 3.1.7). Unter Verwendung des anti-Cyclophilin-B-Antikörpers (2.7) konnte die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B in allen Membranfraktionen der Zymogengranula (ZGM, gZGM und *Wash*) als Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 20kDa dargestellt werden, wobei der Hauptanteil des an die Zymogengranulamembran (ZGM) gebundenen Proteins durch Carbonatbehandlung von der Membran entfernt werden konnte und sich dann in der *Wash*-Fraktion befand, die größtenteils die peripheren Membranproteine der Zymogengranula beinhaltet (4.8.2; Abb. 4.25). Ein geringer Anteil des Proteins verbleibt auch nach Carbonatbehandlung an den gewaschenen Zymogengranulamembranen (gZGM). In der Inhaltsfraktion der Zymogengranula (ZGI) lässt sich das Protein nicht detektieren. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich zu den vier Zymogengranulasubfraktionen eine Mikrosomen-angereicherte Fraktion des Rattenpankreas parallel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Auch hier

ergab sich ein sehr starkes spezifisches Signal für die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B, die im Molekulargewicht dem in den Zymogengranulasubfraktionen detektierten Protein entsprach (Abb.4.25). Auffällig ist sowohl im Fraktionenblot als auch im 2D-Blot (Abb. 4.24 und 4.25), dass sich die PPIB dort deutlich prominenter darstellt als im silbergefärbten 2D-Gel (Abb. 4.8). Dies mag an der Güte des Antikörpers sowie an dem signalverstärkenden Effekt eines Immunoblottings liegen, eventuell lässt sich die PPIB aber auch färberisch weniger gut darstellen als andere Proteine.

Cyclophilin B (Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B; PPIB) wurde zunächst als ER-ständiges Protein beschrieben (Bose und Freedman, 1994), dann fanden sich Hinweise für eine Sortierung in den sekretorischen Weg, wobei der sezernierten Form die aminoterminal ER-Signalsequenz sowie ein C-terminales ER-Retentionssignal zu fehlen scheinen (Price et al., 1994; Bose und Freedman, 1994). Mariller et al. (1996) beschreiben eine in die humane Milch sezernierte trunkierte Form der PPIB, der fünf Aminosäuren des identifizierten C-terminalen ER-Retentionssignals der PPIB fehlen. Außerdem findet sich das Enzym im Blutplasma, wo es an Zelloberflächenrezeptoren von Blutzellen bindet und die Zelladhäsion vermittelt (Carpentier et al., 1999; Allain et al., 2002). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte Form der PPIB scheint das ER-Retentionssignal noch zu besitzen, der C-terminale Bereich, in dem das Retentionssignal liegt, wird von den analysierten Peptiden abgedeckt (nicht gezeigt). Anscheinend wird im exokrinen Pankreas die PPIB trotz des ER-Retentionssignals in die Zymogengranula sortiert. 1997 wurde zum ersten Mal eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase in reguliert sekretorischen Granula identifiziert (Takaki et al., 1997). Es handelt sich um ein 27kDa-Protein in den L-Granula der Blutzellen des Pfeilschwanzkrebses. Die Blutzellen dieses Krebses repräsentieren den Hauptanteil seines Immunsystems und der identifizierten Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase G wird eine mögliche Rolle bei der Speicherung der reguliert sezernierten Proteine zugeschrieben. Vergleichende Studien mit verschiedenen Cyclophilinen ergaben, dass die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase G (Cyclophilin G) die höchste Homologie mit Cyclophilin B/ PPIB aufweist. Auch Cyclophilin G fehlt das carboxyterminale ER-Retentionssignal. Weitere Studien beschreiben Cyclophilin B im bovinen Hirn (Galat und Bouet, 1994). Neuere Ergebnisse zeigen die Kolokalisation mit

präsynaptischen Vesikeln (Lane-Guermonprez et al., 2005). Auch in exokrinen Drüsen wird Cyclophilin sezerniert, so konnten Walz et al. (2006) in einem proteomanylatischen Ansatz Cyclophilin B im humanen Speichel nachweisen.

Die PPIB wird spezifisch in die Zymogengranula sortiert. Dies zeigten Kontrolllexperimente, die die PPIB sowie die im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Chaperone Proteindisulfid-Isomerase (PDI) und BiP/Grp78 im Immunoblot nachwiesen (4.8.2; Abb. 4.25). Sowohl PDI als auch BiP fanden sich ähnlich stark markiert wie die PPIB in der Mikrosomen-angereicherten Fraktion wieder bei einem für diese Proteine spezifischen Molekulargewicht von ca. 78kDa (BiP) bzw. ca 50kDa (PDI). Im Gegensatz zur PPIB fanden sich diese beiden Proteine aber nicht bzw. kaum in den Zymogengranulasubfraktionen wieder (Abb. 4.25). Die PDI lässt sich schwach im Inhalt der Zymogengranula detektieren. Für BiP ergibt sich in keiner der Zymogengranulasubfraktionen ein spezifisches Signal. Sowohl für die PDI als auch für BiP und andere ER-residente molekulare Chaperone wird ein Transport über den sekretorischen Weg im exokrinen Pankreas beschrieben (Bruneau et al., 2000). Hier scheinen vor allem lipidassoziierte Proteine verantwortlich zu sein (CEL, ApoB100). Neben Cyclophilin B wird auch für andere molekulare Chaperone ein Transport innerhalb des sekretorischen Weges beschrieben. So wird Apolipoprotein B als unvollständig gefaltetes Zwischenprodukt zusammen mit den molekularen Chaperonen GRP94, ERp72, BiP, Calreticulin und Cyclophilin B vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat transportiert (Zhang und Herscovitz, 2003). Auch lipolytische Enzyme des exokrinen Pankreas werden, an Chaperone assoziiert, im sekretorischen Weg transportiert. Teilweise werden diese wie im Fall der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) auch trotz eines ER-Retentionssignals über den Golgi-Apparat und Zymogengranula in das Azinusalumen sezerniert (Yoshimori et al., 1990; Bruneau et al., 2000) und können eventuell für die intestinale Aufnahme der Proteine in die Enterocyten von Bedeutung sein. Außerdem kann die Veränderung des Gleichgewichts zwischen Chaperonen und pankreatischen Enzymen zu pathologischen Veränderungen führen (Li und Bendayan, 2005).

Auch Chen et al. (2006) konnten die PDI mittels MALDI-Analyse in der Fraktion der gewaschenen Zymogengranula identifizieren, allerdings nur über einen

Kombinationsansatz aus 2D-Gelelektrophorese und Liquidchromatographie. Gleiches gilt für Rindler et al. (2007), die außerdem auch die PPIB identifizieren konnten und damit unsere Ergebnisse untermauern. Unsere Arbeitsgruppe fand die PDI sowie BiP zwar in der Mikrosomen-angereicherten Fraktion, im Gegensatz zur PPIB, die in den Membranfraktionen der Zymogengranula stark vertreten war, aber nicht (BiP) bzw. kaum (PDI) in den Fraktionen der Zymogengranula. Außerdem fand sich die geringe detektierte Menge der PDI im Zymogengranulainhalt, während die PPIB sich ausschließlich in den Membranfraktionen der Zymogengranula detektieren ließ (Abb. 4.25). Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse für eine spezifische Sortierung der PPIB in die Zymogengranula sowie eine definierte Funktion des Proteins innerhalb der Granula.

Mittels der quantitativen PCR (3.3.3) konnte nachgewiesen werden, dass sich der mRNA-Level der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-B im exokrinen Pankreas ähnlich dem mRNA-Level der pankreatischen Amylase induzieren lässt (4.8.3; Abb.4.26). Hier wurden spezifische cDNA-Fragmente von pankreatischer Amylase, PPIB und GAPDH aus cDNA-Banken amplifiziert, die sowohl aus Pankreasgewebe gefasteter Ratten als auch aus Pankreasgewebe Foy-stimulierter Tiere gewonnen wurden (3.3.1 und 3.3.2). Bei gefasteten Tieren werden die produzierten Verdauungsenzyme in den Zymogengranula gespeichert, die mRNA-Level der entsprechenden Proteine sind verringert. Somit sind die mRNA-Level im Gewebe gering und entsprechend die Häufigkeit der jeweiligen cDNA nach reverser Transkription. FOY-305 ist ein Serinprotease-Inhibitor, der im Verdauungstrakt der Tiere die Verdauungsenzyme inhibiert. In den Pankreata von Tieren, denen FOY-305 oral verabreicht wurde, wird aufgrund des erhöhten Bedarfs an Verdauungsenzymen der entsprechende mRNA-Level erhöht. Daraus resultiert ein erhöhter cDNA-Level in den jeweiligen Präparationen. Dieser Prozess ist also spezifisch für die reguliert vom Pankreas sezernierten Verdauungsenzyme. Für die PPIB zeigte sich ähnlich zur pankreatischen Amylase (5,79-fache Induktion) eine 5,83-fache Induktion des entsprechenden mRNA-Levels im Pankreas im Vergleich von gefasteten und Foy-gefütterten Ratten (4.8.3; Abb. 4.26). Diese Ergebnisse zeigen eine Foy-abhängige Induktion sowohl der PPIB- als auch der Amylase-mRNA-Level in vergleichbarem Ausmaß. Dies bestätigt

die Ergebnisse des Immunoblots (4.8.2; Abb. 4.25), offensichtlich wird die PPIB spezifisch in Zymogengranula sortiert und bezüglich ihres mRNA-Levels ähnlich einem sekretorischen Enzym reguliert. Dies spricht ebenfalls für eine spezifische Funktion der PPIB in den Granula, die vermutlich aufgrund ihrer Eigenschaft als molekulares Chaperon unter anderem die Faltung der Proteine beinhaltet und damit äquivalent zu der Menge an produzierten Enzymen reguliert werden muss. Experimente mit AR42J-Zellen zeigen ein anderes Bild. Um die Expression der PPIB und die eventuelle Expressionsstimulation der PPIB durch Behandlung der Zellen mit Dexamethason zu untersuchen, wurde RNA aus unstimulierten sowie Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen gewonnen und in cDNA transkribiert (3.3.1 und 3.3.2). Gleiche Mengen dieser cDNA wurde dann für eine quantitative PCR eingesetzt (3.3.3), um den PPIB-mRNA-Level in unstimulierten und Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen vergleichen zu können. Abbildung 4.27 zeigt eine nur schwache bis gar keine Induktion der PPIB-mRNA in AR42J-Zellen nach Stimulation der Zellen mit Dexamethason. Im Gegensatz zu Pankreasgewebe scheint die Expression der PPIB nicht durch expressionsfördernde Reagenzien stimuliert zu werden. Immunfluoreszenzstudien zeigten die endogene PPIB im endoplasmatischen Retikulum, eine Kolokalisation mit sekretorischen Granula der AR42J-Zellen ließ sich aber nicht nachweisen (4.8.6; Abb. 4.29). Auch Immunoblotstudien, in denen Zellysate unstimulierter sowie Dexamethason-stimulierter AR42J-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet wurden, zeigten nur eine sehr geringe 1,33-fache Induktion der PPIB-Expression durch Dexamethason (4.8.5; Abb. 4.28). Im Vergleich dazu erhöht sich die Expression der Amylase um das 14,14-fache in Dexamethason-stimulierten AR42J-Zellen (Abb. 4.28). Die Expression der PPIB wird in diesem Zellsystem augenscheinlich anders reguliert als die Amylaseexpression. Anscheinend wird die endogen in den AR42J-Zellen exprimierte PPIB dort nicht oder kaum in sekretorische Granula sortiert. AR42J-Zellen exprimieren nicht alle Proteine der Zymogengranula der Ratte, außerdem sind ihre Zymogengranula kleiner als das Äquivalent im Pankreasgewebe. Möglicherweise fehlt in diesem Zellsystem ein Protein, das im exokrinen Pankreas die Sortierung der PPIB in Zymogengranula vermittelt. Es ist interessant zu vermuten, dass die PPIB in den Zymogengranula des exokrinen

Rattenpankreas aufgrund ihrer Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-Aktivität als Chaperon agiert, um die sekretorischen Enzyme des exokrinen Pankreas in einer inaktiven Konformation zu halten und so eine vorzeitige Aktivierung proteolytischer Prozesse zu vermeiden. Außerdem könnte sie auch bei der Komplexierung der Proteine oder der Anbindung der Proteinkomplexe an die submembranöse Matrix (Schmidt et al., 2000) mitwirken. Hinweise darauf geben Studien, die die Interaktion von PPIB mit Glukosaminoglykanen beschreiben. So wird die Zelladhäsion von T-Lymphozyten an die extrazelluläre Matrix durch eine Interaktion von Cyclophilin B mit Glykosaminoglykanen und sulfatierten Proteoglycanen sowie Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt und ist unabhängig von der Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität des Proteins (Vanpouille et al., 2004; Allain et al., 2002; Carpentier et al., 1999).

Desweiteren konnten Nagata et al. (2000) zeigen, dass Cyclophilin B von Thymuszellen nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors aus dem ER in das Cytosol und den Zellkern gelangt und dort zur Degradation chromosomaler DNA und anschließend zur Apoptose führt. Außerdem erleichtert extrazelluläres Cyclophilin B die Translokation von Prolaktin in den Zellkern und führt so zu einer Aktivierung von Stat5 (Ryczyn et al., 2000). Aus den genannten Ergebnissen lässt sich eine Funktion von Cyclophilin B beim Transport von Proteinen zwischen verschiedenen Zellkompartimenten ableiten.

Innerhalb des sekretorischen Weges kolokalisiert Cyclophilin B mit Calreticulin entweder innerhalb des endoplasmatischen Retikulums oder anderen Calciumspeichern (Arber et al., 1992). Außerdem bindet das Protein den CAML (*Calcium modulating cyclophilin ligand*), ein Protein, das an der Regulation intrazellulärer Calciumlevel (Bram und Crabtree, 1994) beteiligt ist. Die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist aber bisher unbekannt. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass auch der *Calcium modulating cyclophilin ligand* im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit mittels MALDI-Analyse in der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula identifiziert wurde, wenn auch mit einem nicht signifikanten Score (Abb./ Tab. Spot B8, Score 38). Komplexe aus Cyclosporin A und Cyclophilin A oder B inhibieren die Calciumabhängige Phosphatase Calcineurin (Liu et al., 1991). Zusammengenommen zeigen diese Befunde eine eventuelle Funktion der PPIB in Ca^{2+} -abhängigen Prozessen auf. Da auch die selektive Kondensation der

sekretorischen Proteine in den Zymogengranula Ca^{2+} -abhängig reguliert wird (Chanat und Huttner, 1991), könnte dem Protein auch hier eine potentielle Funktion zukommen.

5.6 Auch die RNase A zeigt neben ihrer Lokalisation im Inhalt der Zymogengranula eine deutliche Membranassoziation, die vermutlich durch die Interaktion mit Proteoglykanen vermittelt wird

Die RNase A ist eine Endonuklease mit einem Molekulargewicht von 17kDa und einem isoelektrischen Punkt von 8,63 und wird spezifisch vom exokrinen Pankreas sezerniert (Beintema, 1983). Sie wurde wie die PPIB als singulärer Proteinspot in der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas nach 2D-Gelelektrophorese und MALDI-Analyse identifiziert (Abb. 4.8/Tab.4.1; Spot B13). Um das Ergebnis der MALDI-Analyse zu verifizieren, wurden 300µg der *Wash-Fraktion* 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.4) und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7). Durch einen Kaninchen-anti-RNase A-Antikörper und einen HRP-gekoppelten Esel-anti-Kaninchen-Antikörper (2.7) konnte die RNase A eindeutig als einzelner Proteinspot bei einem proteinspezifischen isoelektrischen Punkt von 8,6 und einem Molekulargewicht von 17kDa dargestellt werden (4.6.1; Abb. 4.14). Fraktionenblots aller vier Zymogengranulasubfraktionen (ZGI, ZGM, gZGM, *Wash*) auf Nitrocellulose (4.6.2; Abb. 4.15) zeigten, dass die RNase A ein prominentes Enzym im Zymogengranulainhalt darstellt, dass sie aber 39,03% der Gesamtmenge von RNase A in Zymogengranula in der Membranfraktionen der Zymogengranula zu detektieren sind. Durch Carbonatbehandlung der Zymogengranulamembranen ließen sich 82,64% der RNase A von der Membran entfernen und fand sich in der *Wash*-Fraktion der peripheren Membranproteine, ein geringerer Anteil von 17,36% verblieb auch nach der Carbonatbehandlung an den gewaschenen Zymogengranulamembranen (gZGM). Die Anbindung der RNase A an die Zymogengranulamembran wird vermutlich durch ihre Assoziation mit Proteoglykanen der submembranösen Matrix (Schmidt et al., 2000) vermittelt. Verschiedene Studien belegen eine Interaktion von RNase A sowohl mit Heparin (Dvorak und Morgan, 1998b) als auch mit Chondroitinsulfat (Dvorak und Morgan, 1998a). Diese Interaktionen

macht man sich zunutze, um mittels markierter RNase A gezielt Proteoglykanhaltige Zellkompartimente oder Gewebestrukturen morphologisch darzustellen. In diesem Zusammenhang wurden unter Verwendung von Protein-A-Goldmarkierter RNase A auch die Zymogengranula des exokrinen Pankreas spezifisch markiert (Dvorak und Morgan, 1999), was einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von Proteoglykanen in diesen Organellen liefert und somit unsere Hypothese der submembranösen Proteoglykanmatrix in Zymogengranula stützt.

5.7 CEL und lipidspaltende Enzyme: Mögliche Assoziationen lipidbindender Enzyme mit Zymogengranulamembranen durch Interaktionen mit Lipidmikrodomänen der Zymogengranulamembranen oder Proteoglykanen der submembranösen Matrix

Innerhalb der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula wurden einige Proteine über MALDI-Analyse (3.1.6) identifiziert, die an Lipidoberflächen binden können und im Lipidstoffwechsel eine Rolle spielen. Dazu gehören die Carboxyesterlipase (CEL) (Tab. 4.1 und 4.2; Abb. 4.8 und 4.9; Spots S1, S3, S11, S28, S31, S33, S21, S45, B1, B3, B40), die pankreatische Triacylglycerollipase (Tab. 4.1/Abb. 4.8; Spot B37), das *pancreatic lipase related protein 1* (Tab. 4.2; Abb. 4.9; Spots S6 und S7) und die Colipase (Tab. 4.1 und 4.2; Abb. 4.8 und 4.9; Spots S61, B12, B25, B27, B28, B30, B31). Die pankreatische Triacylglycerollipase ist ein pankreatisches Verdauungsenzym, das Ester von langkettigen Fettsäuren und Glycerol zu 2-Monoacylglycerol und freien Fettsäuren hydrolysiert (Payne et al., 1994).

Die pankreatische Colipase wurde in allen bisher untersuchten Wirbeltieren identifiziert. Sie wird im Gegensatz zur Triacylglycerollipase und der Carboxyesterlipase als Zymogen (Procolipase) vom Pankreas sezerniert und im Dünndarm durch Trypsin aktiviert. Das rattenspezifische Enzym besitzt ein Molekulargewicht von ca. 12kDa. Northernblotanalysen beschreiben die Expression der Ratten-Colipase neben dem Pankreas ebenfalls in Dünndarm und Magen (Winzell et al., 1998). Dabei scheint die Regulation der Expression der Colipase vom Fettgehalt der Nahrung abhängig zu sein.

Die Colipase stellt einen Kofaktor der pankreatischen Triacylglycerollipase dar. Sie ermöglicht die Bindung der Lipase an Lipid-Wasser-Interphasen. Dabei bindet die Colipase mit ihrem hydrophilen Anteil im Verhältnis von 1:1 die Triacylglycerollipase, bewirkt dadurch eine Konformationsänderung des Enzyms und vermittelt über ihre hydrophoben Anteile die Bindung der Lipase an Lipidoberflächen (Lowe, 1997; Cordle et al., 1998). Die Komplexbildung zwischen Colipase und Lipase basiert auf einer spezifischen, für die Funktionalität des Komplexes essenziellen Ionenbindung zwischen den beiden Proteinen. Mutationen beider Proteine in diesem die Bindung betreffenden Bereich resultieren in einer reduzierten Affinität der beiden Proteine zueinander und damit in einer ineffizienten Katalysereaktion (Ayvazian et al., 1998). Ohne Beteiligung der Colipase wird die Enzymaktivität der Triacylglycerollipase zusätzlich durch die in den Dünndarm sezernierten Gallensäuren inhibiert (Lowe, 1997).

Das *pancreatic lipase related protein 1* ist ein Glykoprotein von 52kDa und wurde ursprünglich als pankreatische Triacylglycerollipase identifiziert. Später stellte sich heraus, dass es sich um ein Protein handelt, das sehr homolog zur Lipase ist, jedoch im Gegensatz zu dieser anscheinend keine katalytische Aktivität aufweist (Lowe, 2002).

Die Carboxyesterlipase gehört zur Gruppe der Serinesterasen und dient zusammen mit anderen Lipasen der Hydrolyse von Nahrungsfetten im Dünndarm. Dabei ist die Substratbandbreite des Enzyms sehr groß; es hydrolysiert sowohl Tri-, Di- und Monoacylglycerole, Cholesterol- und Retinolester sowie Lysophosphatidylglycerole und Phospholipide. Manche Hydrolysereaktionen des Enzyms sind dabei abhängig von der Anwesenheit von Gallensalzen (Shamir et al., 1996).

Das rattenspezifische Enzym besitzt ein Molekulargewicht von 67kDa (ohne Berücksichtigung der Glykosylierung) und wird sowohl N- als auch O-glykosidisch modifiziert (Abouakil et al., 1993; Bruneau et al., 1997). Die Carboxyesterlipase konnte neben dem Pankreas auch in anderen Geweben wie Leber, Darm, Niere, Aorta und Makrophagen detektiert werden, ebenso in der Milch mancher Spezies (Mensch, Gorilla, Katze, Hund; nicht Ratte und Rind). Außerdem wurde das Enzym auch im Blutplasma verschiedener Säuger (inklusive Mensch und Ratte) nachgewiesen. Die Enzymaktivität scheint dabei

nicht unbedingt mit einer Synthese des Enzyms innerhalb der betreffenden Gewebe in Zusammenhang zu stehen, sondern kann durch eine gewebsspezifische Isoform oder durch die vom Pankreas sezernierte Form der CEL induziert werden (Shamir et al., 1996). Die Expression der CEL in unterschiedlichen Geweben weist auf vielfältige Funktionen des Enzyms hin. So beeinflusst es das Fortschreiten von Arteriosklerose (Li und Hui, 1998). Das im Blutplasma zirkulierende Enzym assoziiert über Heparinbindungsstellen eventuell mit Proteoglykanen verschiedener Zelloberflächen (Shamir et al., 1996; Rebai et al., 2005). Experimente mit transfizierten CHO-Zellen weisen auf eine Beteiligung der intrazellulären Form des Proteins an der Cholesterolumöostase hin (Le Petit-Thevenin et al., 1998). Die Bindung der CEL an Lipidoberflächen ist abhängig von der Lipidzusammensetzung. Der Ionisierungsgrad der Fettsäuren sowie der Gehalt an Phospholipiden regulieren die Bindungs- und Katalysefähigkeit des Enzyms (Tsujita und Brockman, 1987; Tsujita et al., 1989; Muderwha und Brockman, 1990). Die Hydrolyseprodukte der CEL stören den Aufbau der Lipidschicht und können als biologische Signalstoffe dienen (z.B. Diacylglycerol, freie Sterole oder Fettsäuren). Withiam-Leitch et al. (1995) identifizierten eine membrangebundene Form der CEL. Möglicherweise stellen die lösliche und die membranassoziierte Form zwei Varianten des Enzyms dar, die durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen entstehen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die CEL über die erwähnten Heparinbindungsstellen mit der Membran der Zymogengranula interagiert. Zwar wird Heparin im exokrinen Pankreas nicht exprimiert, doch besteht potenziell die Möglichkeit, dass die CEL über die erwähnten Bindungsstellen eventuell andere sulfatierte Proteoglykane bindet. In diesem Zusammenhang wurde bisher Chondroitinsulfat in den Zymogengranula der Ratte beschrieben (Schmidt et al., 2000).

Die Glykosylierung des Enzyms ist essentiell für seine Sekretion (Abouakil et al., 1993; Bruneau et al., 1997). Dabei sind sowohl die im endoplasmatischen Retikulum erfolgende N-Glykosylierung als auch die O-glykosidischen Modifikationen im Golgi-Apparat essentiell. Zur korrekten posttranslationalen Modifikation des Proteins ist seine Bindung an intrazelluläre Membranen (ER und Golgi) notwendig. Diese Assoziation wird durch einen Proteinkomplex, der u.a. Grp94 beinhaltet, vermittelt (Nganga et al., 2000). Die O-glykosidischen

Modifikationen erfolgen hauptsächlich in einer C-terminalen Domäne der Carboxyesterlipase, die reich an Prolin, Glutamat, Threonin und Serin ist (sog. PEST-Sequenzen). Diese Sequenzen vermitteln normalerweise die intrazelluläre Degradation von Proteinen (Rechsteiner und Rogers, 1996). Durch die Glykosylierungen werden diese Sequenzen maskiert und das Enzym kann sezerniert werden (Bruneau et al., 1997). Die Phosphorylierung des Enzyms an einem bestimmten Threoninrest (Pasqualini et al., 2000) führt zur Dissoziation des Proteins von der Membran, zur Kopräzipitation mit anderen pankreatischen Enzymen und anschließend zur Sekretion (Lombardo et al., 2001). Neuere Studien legen eine Assoziation der Carboxyesterlipase mit Lipid-Mikrodomänen (*lipid rafts*) nahe. Dabei scheint u.a. eine Sphingolipid-Bindungsdomäne des Enzyms die Bindung an *lipid rafts* zu vermitteln (Aubert-Jousset et al., 2004). Außerdem könnte die Assoziation mit *lipid rafts* und damit mit verschiedenen Membransystemen durch die Affinität von CEL zu Cholesterol vermittelt werden, da Cholesterol einen Hauptbestandteil von *lipid rafts* darstellt. Berkane et al. (2007) identifizierten verschiedene Membranproteine der Zymogengranula der Ratte über ihre Affinität zu *lipid rafts* und konnten in diesem Zusammenhang auch die Carboxyesterlipase identifizieren. In früheren Arbeiten wiesen auch Schmidt et al. (2001) die CEL in Lipid-Mikrodomänen von Zymogengranula der Ratte nach.

In der MALDI-Analyse wurden mehrere verschiedene Proteinspots (Tab. 4.1 und 4.2; Abb. 4.8 und 4.9; Spots S1, S3, S11, S28, S31, S33, S21, S45, B1, B3, B40) als Carboxyesterlipase identifiziert. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Proteine der *Wash*-Fraktion nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung (3.1.4) auf Nitrocellulose geblottet (3.1.7) und anschließend wurde die Blotmembran mit einem gegen die Carboxyesterlipase gerichteten Erstantikörper sowie einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper (2.7) inkubiert. Durch den Antikörper wurden sowohl die als CEL identifizierten Proteinspots als auch einige andere Proteine markiert, vornehmlich die der sauren Gruppe (4.6.1; Abb. 4.13) mit einem Molekulargewicht von 30kDa bis 50kDa. Bei diesen markierten Proteinen könnte es sich um verschiedene Isoformen der CEL handeln oder um Proteine, die eine hohe Homologie zur CEL aufweisen, so wie es sich bei der pankreatischen Triacylglycerollipase und den beiden verwandten Proteinen

PLRP 1 und 2 darstellt (Lowe, 2002). Andererseits könnte es sich auch um Degradationsprodukte handeln, die durch die Carbonatbehandlung entstehen, da die verschiedenen detektierten Proteine, die sich in ihrem Molekulargewicht sowie ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden, hauptsächlich in der *Wash*-Fraktion sowie in geringen Anteilen in der Fraktion der gewaschenen Zymogengranulamembranen auftreten, nicht aber in der Inhalts- oder Gesamtmembranfraktion (nicht gezeigt).

Die Membranassoziation der CEL wird in der Literatur als notwendig für die korrekte Ausführung posttranslationaler Modifikationen (Glykosylierungen und Phosphorylierung) und die daraus resultierende Sekretion des Proteins beschrieben. Dabei wird die Bindung an die Membranen von ER- und Golgi-Kompartimenten durch Grp94 vermittelt (Nganga et al., 2000). Die Carboxyesterlipase löst sich nach erfolgter Glykosylierung und Phosphorylierung im TGN von der Membran und kondensiert zusammen mit anderen pankreatischen Enzymen. Immunoblots aller vier Zymogengranulasubfraktionen (Abb. 4.15) zeigten aber eine starke Präsenz (78,74% der Gesamt-CEL-Menge in ZG; Abb. 4.15B) des Enzyms in den Membranfraktionen der Zymogengranula, also auch noch in Post-Golgi-Kompartimenten. Dies lässt sich einerseits durch eine membranassoziierte Isoform der CEL erklären (Withiam-Leitch et al., 1995), andererseits aber auch durch Beobachtungen, dass die CEL Bindungsdomänen für Lipid-Mikrodomänen-assoziierte Sphingolipide aufweist (Aubert-Jousset et al., 2004). Auch die Affinität zu Cholesterol kann für die Assoziation mit lipid rafts und damit die Interaktion mit der Zymogengranulamembran verantwortlich sein (Berkane et al., 2007). Überdies können auch die Heparinbindungsstellen des Enzyms, die die Interaktion des sezernierten Proteins mit der extrazellulären Matrix vermitteln können (Rebai et al., 2005), für eine Assoziation des Enzyms mit Proteoglykanen der submembranösen Matrix der Zymogengranula und damit eine stärkere Membranassoziation der CEL verantwortlich sein.

Auch andere in der *Wash*-Fraktion identifizierte Proteine wie z.B. die Lipase zeigen aufgrund ihrer Bindungsaffinität zu Lipiden möglicherweise eine stärkere Assoziation mit der Zymogengranulamembran (Berkane et al., 2007).

5.8 Die charakterisierten Proteine der *Wash*-Fraktion (Chymase, PPIB, RNase A, CEL) assoziieren potentiell mit Proteoglykanen: Stärkung der Hypothese der submembranösen Matrix und mögliche Funktionen der charakterisierten Proteine bei der Anbindung der Proteinaggregate an die Zymogengranulamembran sowie bei der Protektion vor vorzeitiger Aktivierung der Zymogene und Autolyse

Interessanterweise können alle innerhalb dieser Arbeit näher charakterisierten Proteine der *Wash*-Fraktion (Chymase, PPIB, RNase A, CEL) mit Proteoglykanen interagieren bzw. weisen Bindungsstellen für Proteoglykane auf. So assoziiert die Chymase in Mastzellen mit Heparin und wird im Komplex mit diesem sezerniert (Pejler und Sadler, 1999). Ebenso bindet die PPIB an Glucosaminoglykane und sulfatierte Proteoglykane und vermittelt darüber die Adhäsion von Blutzellen an die extrazelluläre Matrix (Vanpouille et al., 2004). Auch die RNase A assoziiert mit Heparin und Chondroitinsulfat und wird als experimentelles Mittel genutzt, um Proteoglykane in Zellen und Geweben über ihre Affinität zu RNase A zu lokalisieren (Dvorak und Morgan, 1998a; Dvorak und Morgan, 1999). Letztlich besitzt auch die CEL Heparinbindungsstellen, die eine Bindung an Proteoglykane ermöglichen können (Rebai et al., 2005). Über diese Bindungsstellen assoziiert das im Blutplasma zirkulierende Enzym mit Proteoglykanen der Zelloberflächen. Scheele et al. (1994) postulierten eine submembranöse Matrix in den Zymogengranula des exokrinen Pankreas der Ratte, die aus sulfatierten Proteoglykanen und Glykoproteinen besteht, erste Charakterisierungen von Proteoglykanen in Zymogengranula folgten durch Schmidt et al. (2000). Rindler et al. (2007) konnten basierend auf einem proteomanalytischen Ansatz weitere Proteoglykane in den Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas identifizieren. Über die Affinität zu Proteoglykanen kann die unerwartete und relativ stabile Assoziation der Proteine mit der Zymogengranulamembran erklärt werden, ein mehr oder weniger ausgeprägter Anteil der Proteine verbleibt auch nach Carbonatbehandlung an der Zymogengranulamembran. Für die Chymase und vermutlich auch die RNase A scheint die Bindung an Proteoglykane Auswirkungen auf die Funktionalität zu haben (Pejler und Sadler, 1999; Dvorak und Morgan, 1998b). Das Auftreten dieser Enzyme in den Membranfraktionen der Zymogengranula stützt die

Hypothese der submembranösen Proteoglykan-haltigen Matrix in den Zymogengranula und erlaubt Hypothesen über einen möglichen Sortierungsmechanismus für (zumindest einige) Zymogene durch die Bindung an Proteoglykane. Zusätzlich könnten diese beiden Proteine ebenso wie die PPIB und die CEL Adapterfunktionen ausüben. CEL und PPIB vernetzen Proteoglykane mit anderen Komponenten (Rebai et al., 2005; Vanpouille et al., 2004) und könnten so möglicherweise dazu beitragen, die kondensierten Proteinaggregate an die Zymogengranula zu binden und so die Sortierung zu vermitteln. Die PPIB könnte darüber hinaus in ihrer Funktion als PPIase für die intakte Kondensation und die Speicherung der Zymogene in ihrer inaktiven Form verantwortlich sein, eventuell auch über die Mitwirkung an der Regulation des intrazellulären Ca^{2+} -Levels (Liu et al., 1991; Arber et al., 1992). Dadurch kann eine vorzeitige Aktivierung der sekretorischen Enzyme und somit eine Schädigung des Organs potentiell vermieden werden. Auch andere normalerweise ER-residente Chaperone wie die PDI und BiP werden als Bestandteile des sekretorischen Weges beschrieben (Bruneau et al., 2000). Auch ihnen könnte eine Rolle bei der Protektion des Organs vor Autolyse zukommen.

5.9 Einige mit der submembranösen Matrix der Zymogengranula assoziierte Proteine erfüllen möglicherweise protektive Aufgaben und schützen das empfindliche Pankreas so gegen Infektionen

Neben der vorzeitigen Aktivierung von Zymogenen innerhalb des Organs müssen auch Infektionen von diesem äußerst empfindlichen Organ ferngehalten werden. Eine vorzeitige Zymogenaktivierung oder andere Infektionen können schwerwiegende Folgen wie die Entstehung einer Pankreatitis haben (Weber und Adler, 2001).

Für einigen identifizierte Proteine der Zymogengranula wird bereits eine protektive Funktion nach ihrer Sekretion in das Pankreasganglumen zugeschrieben. So kann Syncollin Homooligomere bilden und dadurch potentiell zu porenähnlichen Strukturen in Membranen führen (An et al., 2000; Geisse et al., 2002). In aufgereinigter nativer Form kann das Protein Liposomen und Erythrozyten permeabilisieren (Geisse et al., 2002; Wäsle et al., 2004a),

außerdem wird es von neutrophilen Granulozyten sezerniert (Bach et al., 2006). Syncollin ist ein basisches Protein (Edwardson et al., 1997), ebenso wie die von Mastzellen sezernierte Chymase (Pejler und Sadler, 1999) und viele andere Proteine, die in die Immunabwehr involviert sind. Durch ihren basischen Charakter wird die Anbindung an negativ geladene Oberflächen von Bakterien vermittelt. Man kann vorsichtig vermuten, ob die Chymase durch ihren basischen Charakter ähnlich dem Syncollin innerhalb des Pankreas und des weiteren Verdauungstrakts eine mögliche protektive Funktion ausüben kann. Auch dem GP2, das mit Syncollin interagieren kann (Kalus et al., 2002), wird eine Beteiligung an Prozessen zugeschrieben, die den Organismus gegen Infektionen schützen sollen. So wird ein Homolog des GP2, das spezifisch in der Niere exprimierte Uromodulin, für die Bindung an *E. coli* und eine damit verbundene Beteiligung an deren Abwehr verantwortlich gemacht (Mo et al., 2004; Säemann et al., 2005). Auch das Lektin ZG16p, das ebenfalls vom exokrinen Pankreas sezerniert wird, könnte an protektiven Prozessen beteiligt sein: neuere Studien schreiben intestinalen Lektinen eine Beteiligung bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen zu (Cash et al., 2006).

Neben diesen schon bekannten und potentiell protektiv wirkenden sekretorischen Proteinen der Zymogengranula sind die neu identifizierten basischen Proteine der *Wash*-Fraktion der Zymogengranula – Chymase und PPIB – Proteine, die in einem anderem Zusammenhang in die Immunabwehr einbezogen sind. So vermittelt die PPIB die Adhäsion von T-Lymphozyten an die extrazelluläre Matrix (Vanpouille et al., 2004). Auch die Chymase ist in Entzündungsprozesse sowie allergische Reaktionen eingebunden (Leskinen et al., 2003; Weidinger et al., 2005; Bradding et al., 2006). Möglicherweise können beide Proteine auch nach der Sekretion durch das Pankreas im weitesten Sinne protektive Funktionen ausüben, die sich aber vermutlich von ihrer Funktion im Blut unterscheiden und näher untersucht werden müssten. Beispielsweise könnten sie eine vorzeitige Aktivierung der sezernierten Verdauungsenzyme innerhalb des Pankreasganges inhibieren, was aber an dieser Stelle nur spekulativ ist.

5.10 Ausblick auf folgende Experimente

Weiterführende Arbeiten werden die vollständige Identifizierung der Proteine der *Wash*-Fraktion zum Ziel haben. Kenntnisse über die Art und Funktion dieser Proteine sowie der integralen Membranproteine sind von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Granulabiogenese und Zymogensortierung und damit essentiell für das Verständnis und die Behandlung pathophysiologischer Vorgänge innerhalb des Pankreas. In diesem Zusammenhang sollen auch die bereits identifizierten Proteine weiter charakterisiert werden. Dabei kommt den bisher in dieser Fraktion identifizierten unbekannt Proteinen eine große Bedeutung zu. So sollen vor allem weitere Studien zur Chymase und Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B folgen. Diese werden konfokale Mikroskopie für weitere Lokalisationsstudien einschließen sowie Experimente zur Funktion dieser Proteine innerhalb des exokrinen Pankreas. In diesem Zusammenhang sollen für die endogen in AR42J-Zellen exprimierte PPIB *Silencing*-Experimente mit siRNA zum Einsatz kommen. Außerdem sollen Bindungspartner der nachgewiesenen Proteine identifiziert werden.

Auch zu den bereits bekannten peripheren Membranproteinen Syncollin und ZG16p wird weiter über ihre genaue Funktion spekuliert, so dass auch hier weitere Studien notwendig sind. Ebenso wirft die relativ starke Membranassoziation mancher Inhaltsproteine wie der RNase A mit der Granulamembran Fragen über die Art der Interaktion auf. Da die innerhalb dieser Arbeit näher charakterisierten Proteine (Chymase, PPIB, RNase A und CEL) alle Proteoglykanbindungsstellen besitzen, wird die Hypothese zur submembranösen Matrix in Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas weiter gestärkt. Ein weiteres Ziel fortführender Arbeiten sollte deshalb auch in der Identifizierung von Proteoglykankomponenten in Zymogengranula liegen.

6. Zusammenfassung

Das exokrine Pankreas ist eine tubuloazinöse Drüse, deren Azinuszellen die Verdauungsenzyme (Zymogene) synthetisieren, sortieren und sezernieren. Diese Enzyme werden in sekretorischen Granula, den Zymogengranula (ZG) verpackt, unterhalb der apikalen Plasmamembran gespeichert und erst auf einen hormonellen oder nervalen Stimulus hin in das Gangsystem sezerniert (regulierte Sekretion).

Die Zymogengranula werden am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) gebildet. Während die selektive Aggregation der Zymogene im leicht sauren Milieu des TGN relativ gut untersucht ist, liegen nur wenige Informationen über die spezifische Interaktion der Zymogenaggregate mit der Membran des TGN bzw. der ZG vor. In diesem Zusammenhang wird die Rolle von Lipidmikrodomänen und einer submembranösen Proteinmatrix diskutiert. Fehler bei der Zymogensortierung und -inaktivierung können zu proteolytischen Prozessen innerhalb der Azinuszellen und nachfolgend zu schwerwiegenden klinischen Krankheitsbildern wie der Entzündung des Pankreas (Pankreatitis) beitragen. Kenntnisse über den molekularen Aufbau der Granulamembran sowie die Art und Funktion der Membranproteine der Zymogengranula sind daher sowohl von zellbiologischer als auch klinischer bzw. therapeutischer Bedeutung.

Bisher wurden nur wenige Membranproteine der Zymogengranula identifiziert und molekular charakterisiert. Vor allem den peripheren Membranproteinen kommt hier eine große Bedeutung zu, da sie potentiell die Sortierung und Verpackung der Zymogene sowie den Granulattransport und die Exozytose vermitteln.

Ziel im ersten Teil dieser Arbeit war es, die peripheren Membranproteine der Zymogengranula (Proteine der sog. *Wash*-Fraktion) des exokrinen Pankreas der Ratte anzureichern und zu identifizieren. Dazu wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, der Granulasubfraktionierung, isoelektrische Fokussierung, 2D-gelelektrophoretische Methoden sowie MALDI-MS- und MALDI-MSMS-Analysen kombinierte. Die Methoden der 2D-Gelelektrophorese mittels immobilisierter pH-Gradienten, die anschließende Aufarbeitung der Proteinspots, der In-Gel-Verdau der Proteine und die Analyse der Peptidspektren durch MALDI-MS und MALDI-MSMS wurden im Verlauf dieser Arbeit von mir etabliert und optimiert.

Die Proteine der *Wash*-Fraktion ergeben nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung ein charakteristisches und reproduzierbares Proteinspotmuster, das sich vom Verteilungsmuster anderer Granulasubfraktionen unterscheidet, und lassen sich in eine saure und eine basische Proteingruppe einteilen. Insgesamt wurden 103 reproduzierbare Proteinspots mehrfach analysiert. Von den Proteinen der sauren Gruppe konnten bisher 39% identifiziert werden, was vermutlich auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist. Durch *Glykostaining*-Methoden konnte ich nachweisen, dass die Proteine der sauren Gruppe im Gegensatz zu denen der basischen glykosyliert sind.

Zu den identifizierten Proteinen gehören typische Inhaltsproteine der Zymogengranula (z. B. RNase A) (24%), ein großer Anteil lipidbindender Proteine (41%) sowie periphere Membranproteine der Zymogengranula (16%) (z. B. Annexin IVa, das Ezrin-Radixin-Moesin-(*ERM*)-*binding phosphoprotein*, Syncollin, das sekretorische Lektin ZG16p). Der große Anteil lipidbindender Proteine innerhalb dieser Fraktion erklärt sich vermutlich durch die Affinität dieser Proteine zu Membranlipiden, das Auftreten von Inhaltsproteinen der Zymogengranula innerhalb der *Wash*-Fraktion könnte durch die Interaktion mit der postulierten submembranösen Matrix zustande kommen. Einige der identifizierten Proteine sind mitochondrialen Ursprungs (11%) und stellen Untereinheiten von ATP-Synthase und Cytochrom-c-Oxidase dar. Auch andere Arbeitsgruppen konnten Untereinheiten dieser Proteine in Zymogengranula nachweisen und postulieren mögliche Funktionen dieser Proteine innerhalb der Zymogengranula. Aber auch Proteine, die bisher nicht in ZG beschrieben wurden, konnten identifiziert werden. Hierzu gehört die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B (PPIB), ein klassisches ER-ständiges Protein, sowie die Chymase (RMCP-1), eine mastzellspezifische Serin-Protease, die beide der basischen Gruppe zugeordnet werden.

Im zweiten Teil meiner Arbeit habe ich die Membranlokalisation der RNase A, der CEL sowie der Chymase und der PPIB verifiziert und insbesondere letztere Proteine näher charakterisiert. Durch Einsatz spezifischer Antikörper konnte die mastzellspezifische Chymase (RMCP-1) im 2D-Immunoblot sowie nach Granulasubfraktionierung eindeutig als peripheres Membranprotein der Zymogengranula nachgewiesen werden. Andere mastzellspezifische Proteine (z. B. Trypsase) wurden in den Granulafraktionen nicht detektiert. Quantitative

PCR-Studien zeigten zudem für die Chymase eine Abhängigkeit der Transkriptionsrate vom Fütterungsverhalten der Tiere. Morphologische Studien wiesen die Chymase sowohl auf histologischer als auch elektronenmikroskopischer Ebene als Zymogengranula-assoziiertes Protein aus. Ich konnte zeigen, dass die Chymase nicht in AR42J-Zellen, einem exokrinen Modellsystem, exprimiert wird. Nach Transfektion dieser Zellen mit einem geeigneten Chymasekonstrukt zeigte sich jedoch in der Immunfluoreszenz eine Sortierung der exprimierten Chymase in Zymogengranula der AR42J-Zellen, dargestellt durch eine Kollokalisierung mit Carboxypeptidase.

Durch spezifische Antikörper konnte ich auch die PPIB eindeutig im 2D-Immunoblot der *Wash*-Fraktion und nach Granulasubfraktionierung in den Membranfraktionen detektieren. Andere ER-residente *Chaperone* wurden kaum bzw. nicht in den Zymogengranulafraktionen identifiziert. Quantitative PCR-Studien wiesen auch für die PPIB im exokrinen Pankreas eine Abhängigkeit der Transkriptionsrate vom Fütterungsverhalten der Tiere nach, was die Ergebnisse der Lokalisationsstudien stützt. Eine potentielle Funktion der granulären PPIB könnte in der Aufrechterhaltung der Konformation bestimmter Verdauungsenzyme liegen. Dies könnte Einfluß auf die autokatalytische Aktivierung dieser Enzyme haben. Eine weitere Funktion könnte in der Sortierung der Zymogene liegen.

Interessanterweise können die in dieser Arbeit näher charakterisierten Proteine (Chymase, PPIB, CEL und RNase A) alle potentiell mit Proteoglykanen interagieren und stützen durch ihre starke Assoziation mit der Zymogengranulamembran die Hypothese der submembranösen Granulamatrix. Der Fokus nachfolgender Experimente soll auf der weiteren Identifizierung neuer Komponenten dieser Matrix sowie in der funktionellen Analyse der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proteine liegen.

7. Literaturverzeichnis

Abouakil N, Mas E, Bruneau N, Benajiba A, Lombardo D, 1993

Bile salt-dependent lipase biosynthesis in rat pancreatic AR42J cells. Essential requirement of N-linked oligosaccharide for secretion and expression of a fully active enzyme. *J Biol Chem.* 268: 25755-25763

Allain F, Vanpouille C, Carpentier M, Slomianny MC, Durieux S, Spik G, 2002

Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Acad Sci (United States)*. 99: 2714-2719

Altan-Bonnet N, Sougrat R, Lippincott-Schwartz J, 2004

Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology.* 2004, 16:364-372

An SJ, Hansen NJ, Hodel A, Jahn R, Edwardson JM, 2000

Analysis of the association of syncollin with the membrane of the pancreatic zymogen granule. *J Biol Chem.* 275: 11306-11311

Antonin W, Wagner M, Riedel D, Brose N, Jahn R, 2002

Loss of the zymogen granule protein syncollin affects pancreatic protein synthesis and transport but not secretion. *Mol Cell Biol.* 22: 1545-54

Arber S, Krause KH, Caroni P, 1992

s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J Cell Biol.* 116: 113-125

Aubert-Jousset E, Garmy N, Sbarra V, Fantini J, Sadoulet MO, Lombardo D, 2004

The Combinatorial Extension Method Reveals a Sphingolipid binding domain on Pancreatic Bile Salt-Dependent Lipase: Role in secretion. *Structure.* 12: 1437-1447

Ayvazian L, Crenon I, Hermoso J, Pignol D, Chapus C, Kerfelec B, 1998

Ion pairing between lipase and Colipase plays a critical role in catalysis. *J Biol Chem.* 273(50): 33604-33609

Bach JP, Borta H, Ackermann W, Faust F, Borchers O, Schrader M, 2006

The secretory granule protein syncollin localizes to HL-60 cells and neutrophils. *J Histochem Cytochem.* 54(8): 877-888

Bachmann S, Mutig K, Bates J, Welker P, Geist B, Gross V, Luft FC, Alenina N, Bader M, Thiele BJ, Prasad K, Raffi HS, Kumar S, 2005

Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288(3): F559-67

Bates JM, Raffi HM, Prasad K, Mascarenhas R, Laszik Z, Maeda N, Hultgren SJ, and Kumar S, 2004

Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection. *Kidney Int.* 65: 791–797

Beintema JJ, 1983

Rat pancreatic ribonuclease: agreement between the corrected amino acid sequence and the sequence derived from its messenger RNA. *FEBS Lett.* 159: 191-195

Bell GI, Quinto C, Quiroga M, Valenzuela P, Craik CS, Rutter WJ, 1984

Isolation and sequence of a rat chymotrypsin B gene. *J Biol Chem.* 259: 14265-14270

Berkane AA, Nguyen HTT, Tranchida F, Waheed AA, Deyris V, Tchiakpe L, Fasano C, Nicoletti C, Desseaux V, Ajandouz EH, Comeau D, Comeau L, Hiol A, 2007

Proteomic of lipid rafts in the exocrine pancreas from diet-induced obese rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 355: 813-819

Bethune J, Wieland F, Moelleken J, 2006

COPI-mediated transport. *J Membr Biol.* 211(2): 65-79

Biederbick A, Licht A, Kleene R, 2003

Serglycin proteoglycan is sorted into zymogen granules of rat pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol.* 82(1): 19-29

Borgonovo B, Ouwendijk J, Solimena M, 2006

Biogenesis of secretory granules. *Curr Opin Cell Biol.* 18: 365-370

Bornman PC and Beckingham IJ, 2001

ABC of diseases of liver, pancreas and biliary system: Chronic pancreatitis. *BMJ.* 322: 660-663

Bose S, Freedman RB, 1994

Peptidyl prolyl cis-trans-isomerase activity associated with the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 300: 865-870

Boulatnikov I, De Lisle RC, 2004

Binding of the Golgi Sorting Receptor Muclin to Pancreatic Zymogens through Sulfated O-linked Oligosaccharides. *J Biol Chem.* 279 (39): 40918-40926

Bradding P, Walls AF, Holgate ST, 2006

The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* (United States) 117(6): 1277-1284

Bradford M, 1976

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254

Bram RJ, Crabtree GR, 1994

Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature.* 371: 355-358

Bruneau N, Lombardo D, Levy E, Bendayan M, 2000

Roles of Molecular Chaperones in Pancreatic Secretion and Their Involvement in Intestinal Absorption. *Microscopy research and technique.* 49:329–345

Burgoyne RD, Morgan A, 2003

Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev (United States).* 83(2): 581-632

Burnette WN, 1981

“Western blotting” : electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate — polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem (United States).* 112(2): 195-203

Carpentier M, Allain F, Haendler B, Denys A, Mariller C, Benaissa M, Spik G, 1999

Two Distinct Regions of Cyclophilin B Are Involved in the Recognition of a Functional Receptor and of Glycosaminoglycans on T Lymphocytes. *J Biol Chem.* 274(16): 10990-10998

Cash HL, Witham CV, Behrendt CL, Hooper LV, 2006

Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science.* 313, 1126

Castle JD, 1990

Sorting and secretory pathways in exocrine cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2(2): 119-26

Castle D und Castle A, 1998

Intracellular transport and secretion of salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9:4-22

Chanat E, Huttner WB, 1991

Milieu-induced selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans Golgi network. *J Cell Biol.* 115: 1505-1529

Chen CY, Cronshagen U, Kern HF, 1997

A novel pancreas-specific serpin (ZG46p) localizes to the soluble and membrane fraction of the Golgi-Complex and the zymogen granules of acinar cells. *Eur J Cell Biol.* 73: 205-214

Chen X, Walker AK, Strahler JR, Simon ES, Tomanicek-Volk SL, Nelson BB, Hurley MC, Ernst SA, Williams JA, Andrews PC, 2006

Organellar Proteomics: Analysis of pancreatic zymogen granule membranes. *Mol Cell Proteomics (United States).* 5(2): 306-312

Cho SJ, Sattar AK, Jeong EH, Satchi M, Cho JA, Dash S, Mayes MS, Stromer MH, Jena BP, 2002

Aquaporin 1 regulates GTP-induced rapid gating of water in secretory vesicles. *Proc Natl Acad Sci (United States).* 99: 4720-4724

Colomer V, Kicska Ga, Rindler MJ, 1996

Secretory granule content proteins and the luminal domains of granula membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. *J Biol Chem.* 271 (1):48-55

Cordle RA, Lowe ME, 1998

The hydrophobic surface of Colipase influences lipase activity at an oil-water-interface. *J Lipid Res.* 39(9): 1759-1767

Cronshagen U, Volland P, Kern HF, 1994

cDNA cloning and characterization of a novel 16kDa protein located in zymogen granules of rat pancreas and goblet cells of the gut. *Eur J Cell Biol.* 65: 366-377

Dartsch H, Kleene R, Kern HF, 1998

In vitro condensation-sorting of enzyme proteins isolated from rat pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol.* 75:211-222

De Lisle RC, 2005

Altered posttranslational processing of glycoproteins in cerulein-induced pancreatitis. *Exp Cell Res.* 308: 101-113

De Lisle RC, Norkina O, Roach E, Ziemer D, 2005

Expression of pro-Muclin in pancreatic AR42J cells induces functional regulated secretory granules. *Am J Physiol Cell Physiol.* 289: 1169-1178

Dikeakos JD, Reudelhuber TL, 2007

Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J Cell Biol (United States).* 177(2): 191-196

Dimitriadou V, Rouleau A, Trung Tuong MD, Ligneau X, Newlands GFJ, Miller HRP, Schwartz JC, Garbarg M, 1996

Rat cerebral mast cells undergo phenotypic changes during development. *Developmental Brain Research* 97: 29-41

Dittie A, Kern HF, 1992

The major zymogen granule membrane protein GP2 in the rat pancreas is not involved in granule formation. *Eur J Cell Biol.* 58(2):243-58

Droste M, Schon E, Kadenbach B, 1989

Nucleotide sequence of cDNA encoding subunit Va from rat heart cytochrome c oxidase. *Nucleic Acids Res.* 17: 4375-4375

Dvorak AM, Morgan ES, 1998a

Ribonuclease-gold labels chondroitin sulphate in guinea pig basophil granules. *Histochem J.* 30: 603-608

Dvorak AM, Morgan ES, 1998b

Ribonuclease-gold labels heparin in human mast cell granules: new use for an ultrastructural enzyme affinity technique. *J Histochem Cytochem.* 46(6): 695-706

Dvorak AM, Morgan ES, 1999

Ribonuclease-gold labels proteoglycan-containing cytoplasmic granules and ribonucleic acid-containing organelles – a survey. *Histol Histopathol.* 14(2): 597-626

Edwardson JM, An S, Jahn R, 1997

The secretory granule protein syncollin binds to syntaxin in a Ca²⁺-sensitive manner. *Cell* 90: 325-333

Fletcher TS, Alhadeff M, Craik CS, Largman C, 1987

Isolation and characterisation of a cDNA encoding rat cationic trypsinogen. *Biochemistry* 26: 3081-3086

Forsberg E, Kjellen L, 2001

Heparansulfat: Lessons from knockout mice. *J Clin Invest.* 108: 175-80

Fouassier L, Yun CHC, Fitz JG, Doctor RB, 2000

Evidence for ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions. *J Biol Chem.* 275: 25039-25045

Freedman SD, Scheele A, 1993

Regulated secretory proteins in the exocrine pancreas aggregate under conditions that mimic the trans-Golgi network. *Biochem Biophys Res Commun.* 197(2): 992-999

Freedman SD, Scheele GA, 1994

Acid-base interactions during exocrine pancreatic secretion. Primary role for ductal bicarbonate in acinar lumen function. *Ann NY Acad Sci.* 713: 199-206

Freedman SD; Kern HF; Scheele GA, 1998

Cleavage of GPI-anchored proteins from the plasma membrane activates apical endocytosis in pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol.* 75(2):163-73

Freedman SD, Kern HF, Scheele GA, 1998a

Acinar lumen pH regulates endocytosis but not exocytosis at the apical plasma membrane of pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol.* 75: 153-162

Freedman SD, Kern HF, Scheele GA, 1998b

Cleavage of GPI-anchored proteins from the plasma membrane activates apical endocytosis in pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol.* 75: 163-173

Fukuoka S, Freedman SD, Scheele GA, 1991

A single gene encodes membrane-bound and free forms of GP2, the major glycoprotein in pancreatic secretory (zymogen) granule membranes. *Proc Natl Acad Sci (United States).* 88: 2898-902

Fukuoka S, Horst K, Kazuki-Sugino R, Ikeda Y, 2002

Cloning and characterization of ZAP36, an annexin-like, zymogen granule membrane associated protein, in exocrine pancreas. *Biochim Biophys Acta* 1575: 148-152

Galat A, 1993

Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem.* 216(3): 689-707

Galat A, 2003

Peptidylprolyl Cis/Trans Isomerases (Immunophilins): Biological Diversity-Targets-Functions. *Curr Topics Med Chem.* 3: 1315-1347

Galat A, Bouet F, 1994

Cyclophilin B is an abundant protein whose conformation is similar to cyclophilin A. *FEBS Lett.* 347: 31-36

Garboczi DN, Fox AH, Gerring SL, Pedersen PL, 1988

Beta subunit of rat liver mitochondrial ATP synthase: cDNA cloning, amino acid sequence, expression in *E. coli* and structural relationship to adenylate kinase. *Biochemistry* 27: 553-560

Geisse NA, Wäsle B, Saslowsky DE, Henderson RM, Edwardson JM, 2002

Syncollin homo-oligomers associate with lipid bilayers in the form of doughnut-shaped structures. *J Membr Biol.* 189: 83-92

Gerasimenko JV, Flowerdew SE, Voronina SG, Sukhomlin TK, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV, 2006

Bile Acids Induce Ca²⁺ Release from both the Endoplasmic Reticulum and acidic Intracellular Calcium Stores through Activation of Inositol Triphosphate Receptors and Ryanodine Receptors. *J Biol Chem.* 281(52): 40154-40163

Gibson S, Miller HRP, 1986

Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases. *Immunology* 58: 101-104

Gondre-Lewis MC, Petrache HI, Wassif CA, Harries D, Parsegian A, Porter FD, Loh YP, 2006

Abnormal sterols in cholesterol-deficiency diseases cause secretory granule malformation and decreased membrane curvature. *J Cell Science* 119: 1876-1885

Gorelick FS, Jamieson JD, 1981

Structure-function relationships of the pancreas. *Physiology of the Gastrointestinal tract*, L.R. Johnson (Ed), Raven Press, New York

Görg A, 2004

2D-Electrophoresis: Principles and Methods. 4th edition, GE Healthcare (User Manual)

Goto Y, Amuro N, Okazaki T, 1989

Nucleotide sequence of cDNA for rat brain and liver cytochrome c oxidase subunit IV. *Nucleic Acids Res.* 17: 2851-2851

Gürkan C, Stagg SM, Lapointe P, Balch WE, 2006

The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(10): 727-738

Hahn E, Riemann J, 1996

Klinische Gastroenterologie, S. 1127-1145

Hansen NJ, Antonin W, Edwardson JM, 1999

Identification of SNAREs involved in regulated exocytosis in the pancreatic acinar cell. *J Biol Cell.* 274: 22871-6

Hays LB, Wicksteed B, Wang Y, McCuaig JF, Philipson LH, Edwardson JM, Rhodes CJ, 2005

Intragranular targeting of syncollin, but not a syncollinGFP chimera, inhibits regulated insulin exocytosis in pancreatic β -cells. *J Endocrinology* 185: 57-67

Heukeshoven J, Dernick R, 1988

Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulphate gels. *Electrophoresis.* 9(1): 28-32

Higuti T, Kuroiwa K, Miyazaki S, Toda H, Kakuno T, Sakiyama F, 1993

The complete amino acid sequence of subunit d of rat liver mitochondrial H(+) ATP synthase. *J Biochem.* 114: 714-717

Hodel A, An SJ, Hansen NJ, Lawrence J, Wäsle B, Schrader M, Edwardson JM, 2001

Cholesterol-dependent interaction of syncollin with the membrane of pancreatic zymogen granule. *Biochem J.* 356: 843-850

Holloway MP, Bram RJ, 1998

Co-localization of calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools. *J Biol Chem.* 273(26): 16346-50

Hubbard MJ, McHugh NJ, 1996

Mitochondrial ATP synthase F1-beta-subunit is a calcium-binding protein. *FEBS Lett.* 391(3): 323-329

Huttner WB, Zimmerberg J, 2001

Implications of lipid mikrodomains for membrane curvature, budding and fission. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 478-84

Iwai N, Inagami T, 1990

Molecular cloning of a complementary DNA to rat cyclophilin-like protein mRNA. *Kidney Int.* 37: 1460-1465

Janeway CA, Travers P, 1997

Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg

Jeftinija S, 2006.

The story of cell secretion: events leading to the discovery of the "porosome" – the universal secretory machinery in cells. *J Cell Mol Med.* 10 (2): 273-279

Jessop NW, Hay RI, 1980

Characteristics of two rat pancreatic cell lines derived from transplantable tumors. *In vitro.* 16: 212 A

Junqueira LC, Carneiro J, 1996

Histologie. 4. Auflage *Springer-Verlag*, Heidelberg, Berlin und New York

Kalus I, Hodel A, Koch A, Kleene R, Edwardson JM, Schrader M, 2002

Interaction of syncollin with GP2, the major membrane protein of pancreatic zymogen granules, and association with lipid mikrodomains. *Biochem J.* 362: 433-442

Kang J, Wiegand U, Mueller – Hill B, 1992

Identification of cDNAs encoding two novel rat pancreatic serine proteases. *Gene* 110: 181-187

Kato S, Miyabayashi S, Ohi R, Nakagawa H, Abe J, Yamamoto K, Watanabe S, Tada K, 1990

Chronic pancreatitis in muscular cytochrome c oxidase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 11: 549-552

Katz HR, Austen KF, Caterson B, Stevens RL, 1986

Secretory Granules of Heparin-containing Rat Serosal Mast Cells also Possess Highly Sulfated Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *J Biol Chem.* 261 (29): 13393-13396

Kissel JA, Fontaine RN, Turck CW, Brockman HL, Hui DY, 1989

Molecular cloning and expression of cDNA for rat pancreatic cholesterol esterase. *Biochim Biophys Acta.* 1006: 227-237

Kleene R, Dartsch H, Kern HF, 1999a

The secretory lectin ZG16 mediates sorting of enzyme proteins to the zymogen granule membrane in pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol.* 78: 79-90

Kleene R, Kastner B, Rösser R, Kern HF, 1999b

Complex formation among rat pancreatic secretory proteins under mild alkaline pH conditions. *Digestion* 60(4): 305-13

Kleene R, Claßen B, Zdzieblo J, Schrader M, 2000

SH3 binding sites of ZG29p mediate an interaction with amylase and are involved in condensation-sorting in the exocrine rat pancreas. *Biochemistry* 39: 9893-9900

Kleinmann HK, Goodwin EB, Rennard SL, Martin GR, 1981

Preparation of collagen substrates for cell attachment : Effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal Biochem.* 94: 308

Kleizen B, Braakman I, 2004

Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* 16(4): 343-349

Kyhse-Andersen J, 1984

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Bophys Methods.* 10(3-4): 203-209

Kyriakides C, Jasleen J, Wang Y, Moore FD, Ashley SW, Hechtman HB, 2001

Neutrophils not complement, mediate the mortality of experimental hemorrhagic pancreatitis. *Pancreas* 22: 40-6

Laemmli UK, 1970

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685

Lane-Guermonprez L, Morot-Gaudry-Talarmain Y, Meunier FM, O'Regan S, Onofri F, Le Caer JP, Benfenati F, 2005

Synapsin associates with cyclophilin B in an ATP- and cyclosporin A-dependent manner. *J Neurochem.* 93: 1401-1411

Leblond FA, Viau G, Laine J, Lebel D, 1993

Reconstruction in vitro of the pH-dependent aggregation of pancreatic zymogens en route to the secretory granule: Implication of GP2. *Biochem J.* 291(Pt1): 289-96

Lee M, Chung S, Uhm DY, Park MK, 2005

Regulation of zymogen granule exocytosis by Ca^{2+} , cAMP, and PKC in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 334: 1241-1247

Lee SJ, Drabik K, Benveniste EN, 2001

Cloning of rat calcium-modulating cyclophilin ligand. *DNA Seq.* 12: 209-213

Le Petit-Thevenin J, Bruneau N, Nobili O, Lombardo D, Verine A, 1998

An intracellular Role for pancreatic bile salt-dependent lipase: evidence for modification of lipid turnover in transfected CHO cells. *Biochim Biophys Acta.* 1393(2-3): 307-316

Leskinen MJ, Lindstedt KA, Wang Y, Kovanen PT, 2003

Mast Cell Chymase Induces Smooth Muscle Cell Apoptosis by a Mechanism Involving Fibronectin Degradation and Disruption of Focal Adhesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:238-243

Leskinen JM, Heikkilä HM, Speer MY, Hakala JK, Laine M, Kovanen PT, Lindstedt KA, 2005

Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by disrupting NF- κ B-mediated survival signaling. *Exp Cell Research.* 312: 1289-1298

Li YY, Bendayan M, 2005

Alteration of chaperonin 60 and pancreatic enzyme in pancreatic acinar cell under pathological condition. *World J Gastroenterol.* 11(46):7359-7363

Lindkvist B, Fajardo I, Pejler G, Borgström A, 2006

Cathepsin B Activates Human Trypsinogen 1 but Not Proelastase 2 or Procarboxypeptidase B. *Pancreatology* 6: 224-231

Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL, 1991

Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, 2000

Molecular Cell Biology. 4th edition, *W.H. Freeman and Company*, New York

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J, 2004

Molecular Cell Biology. 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York

Logsdon CD, Moessner J, Williams JA, Goldfine ID, 1985

Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, secretory organelles, and secretion in pancreatic acinar AR42J cells. *J Cell Biol.* 100(4): 1200-1208

Logsdon CD, 1986

Glucocorticoids increase cholecystokinin receptors and amylase secretion in pancreatic acinar AR42J cells. *J Biol Chem.* 261(5): 2096-2101

Logsdon CD, Perot KJ, McDonald AR, 1987

Mechanism of Glucocorticoid-induced Increase in Pancreatic Amylase Gene Transkription. *J Biol Chem.* 262(32): 15765-15769

Lombardo D, 2001

Bile Salt-Dependent Lipase: its pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta.* 1553: 1-28

Lottspeich F, Zorbas H, 1998

Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag* Heidelberg Berlin

Lowe ME, 1997

Colipase stabilizes the lid domain of pancreatic triglyceride lipase. *J Biol Chem.* 272(1): 9-12

Lowe ME, 2002

The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res.* 43: 2007–2016

Lutzelschwab C, Pejler G, Aveskogh M, Hellman L, 1997

Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *J Exp Med.* 185: 13-29

Mariller C, Allain F, Kouach M, Spik G, 1996

Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochim Biophys Acta.* 1293: 31-38

Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N, 2000

A Role of Mast Cell Glucosaminoglycans for the Immunological Expulsion of Intestinal Nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *J Immunology*. 164: 3749-3754

Matsumoto R, Sali A, Ghildyal N, Karplus M, Stevens RL, 1995

Packing of proteases and proteoglycans in the granules of mast cells and other hematopoietic cells. A cluster of histidines on mouse mast cell protease 7 regulates its binding to heparin serglycin proteoglycans. *J Biol Chem*. 270: 19524-31

Matter K, 2000

Epithelial polarity: sorting out the sorters. *Curr Biol*. 10(1): R39-42

McDonald RJ, Crerar MM, Swain WF, Pictet RL, Thomas G, Rutter WJ, 1980

Structure of a family of rat amylase genes. *Nature* 287: 117-122

McMahon HT, Mills IG, 2004

COP and Clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Current Opinion in Cell Biology* 2004, 16:379-391

Merril CR, Dunau ML, Goldman D, 1981

A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 110(1): 201-207

Mo L, Zhu XH, Huang HY, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR, 2004

Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *Am J Physiol Renal Physiol*. 286: F795-802

Montague JW, Hughes FM, Cidlowski JA, 1997

Native recombinant Cyclophilins A, B und C Degrade DNA Independently of Peptidylprolyl cis-trans-Isomerase Activity. *J Biol Chem*. 272(10): 6677-6684

Muderwha JM, Brockman HL, 1990

Binding of pancreatic carboxylester lipase to mixed lipid films. Implications for surface organization. *J Biol Chem*. 265(32): 19644-19651

Nagata T, Kishi H, Liu QL, Yoshino T, Matsuda T, Jin ZX, Murayama K, Muraguchi A, 2000

Possible involvement of cyclophilin B und caspase-activated deoxyribonuklease in the induction of chromosomal DNA degradation in TCR-stimulated thymocytes. *J Immunol*. 165: 4281-4289

Nemoto T, Kojima T, Oshima A et al., 2004

Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J Biol Chem.* 279: 37544-37550

Nganga A, Bruneau N, Sbarra V, Lombardo D, Le Petit-Thevenin J, 2000

Control of pancreatic bile-salt-dependent-lipase secretion by the glucose-regulated protein of 94kDa (Grp94). *Biochem J.* 352: 865-874

Okayama Y, Kawakami T, 2006

Development, Migration and Survival of Mast Cells. *Immunol Res.* 34(2): 97-115

Pak J, Pu Y, Zhang ZT, Hasty DL, and Wu XR, 2001

Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated Escherichia coli and prevents E. coli from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J Biol Chem.* 276: 9924–9930

Palade GE, 1975

Intracellular aspects in the process of protein secretion. *Science* 189:347-58

Pasqualini E, Caillol N, Valette A, LLoubes R, Verine A, Lombardo D, 2000

Phosphorylation of the rat pancreatic bile salt-dependent lipase by casein kinase II is essential for secretion. *Biochem J.* 345: 121-128

Payne RM, Sims HF, Jennens ML, Lowe ME, 1994

Rat pancreatic lipase and two related proteins: enzymatic properties and mRNA expression during development. *Am J Physiol.* 266:G914-G921

Pejler G, Sadler JE, 1999

Mechanism by Which Heparin Proteoglycan Modulates Mast Cell Chymase Activity. *Biochemistry* 38: 12187-12195

Pelham HR, 1990

The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 15(12): 483-486

Pickett JA, Edwardson JM, 2006

Compound Exocytosis: Mechanisms and Functional Significance. *Traffic* 7: 109-116

Piedras-Renteria ES, Chen CC, Best PM, 1997

Antisense oligonucleotides against rat brain alpha1E DNA and its atrial homologue decrease T-type calcium current in atrial myocytes. *Proc Natl Acad Sci. (United States)* 94(26):14936-41

Ponnambalam S, Baldwin SA, 2003

Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol.* 20(2): 129-39

Price ER, Jin M, Lim D, Pati S, Walsh CT, McKeon FD, 1994

Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci. (United States)* 91: 3931-3935

Prydz K, Dalen KT, 2000

Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Science.* 113: 193-205

Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen OH, 2000

Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci. (United States)* 97:13126-31

Rebai O, Le Petit-Thevenin J, Bruneau N, Lombardo D, Verine A, 2005

In Vitro Angiogenic Effects of Pancreatic Bile Salt-Dependent Lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 359-364

Rechsteiner M, Rogers SW, 1996

PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 21: 267-271

Reggio HA, Palade GE, 1978

Sulfated compounds in the zymogen granules of the guinea pig pancreas. *J Cell Biol.* 77(2): 288-314

Rehm H, 2002

Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 4. Auflage *Spektrum Akademischer Verlag* Heidelberg und Berlin

Rindler MJ, 1992

Biogenesis of storage granules and vesicles. *Curr Opin Cell Biol.* 4: 616-22

Rindler MJ, Xu CF, Gumper I, Smith NN, Neubert TA, 2007

Proteomic Analysis of Pancreatic Zymogen Granules: Identification of New Granule Proteins. *J Proteome Res.* (Epub ahead of print)

Rodriguez-Boulan E, Musch A, 2005

Protein sorting in the Golgi complex : shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta.* 1744(3): 455-464

Rycyzyn MA, Reilly SC, O'Malley K, Clevenger CV, 2000

Role of Cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retranslocation. *Mol Endocrinol.* 14: 1175-1186

Sadacharan SK, Singh B, Bowes T, Gupta RS, 2005

Localization of mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunits I und II in rat pancreatic zymogen granules and pituitary growth hormone granules. *Histochem Cell Biol.* 124: 409-421

Säemann MD, Weichert T, Hörl WH, Zlabinger GJ, 2005

Tamm-Horsfall protein: a multilayered defence molecule against urinary tract infection. *Eur J Clin Invest.* 35: 227-235

Sargent TD, Yang M, Bonner J, 1981

Nucleotide sequence of cloned rat serum albumin messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci (United States).* 78: 243-246

Scheele GA, Fukuoka S, Freedman SD, 1994

Role of the GP2/THP family of GPI-anchored proteins in membrane trafficking during regulated exocrine secretion. *Pancreas* 9(2): 139-49

Schmidt K, Dartsch H, Linder D, Kern HF, Kleene R, 2000

A submembranous matrix of proteoglycans on zymogen granule membranes is involved in granule formation in rat pancreatic acinar cells. *J Cell Science.* 113, 2233-2242

Schmidt K, Schrader M, Kern HF, Kleene R, 2001

Regulated apikal secretion of zymogens in rat pancreas: Involvement of the GPI-anchored glycoprotein GP2, the lectin ZG16p and cholesterol-glycosphingolipid enriched microdomains. *J Biol Chem.* 276(17): 14315-23

Schrader M, 2004

Membrane targeting in secretion. *Subcell Biochem.* 37: 391-421

Schuck S, Simons K, 2004

Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci.* 117(Pt25): 5955-64

Shamir R, Johnson WJ, Morlock-Fitzpatrick K, Zolfaghari R, Li L, Mas E, Lombardo D, Morel DW, Fisher EA, 1996

Pancreatic Carboxyl Ester Lipase: A circulating enzyme that modifies normal and oxidized Lipoproteins in vitro. *J Clin Invest.* 97(7): 1696-1704

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M, 1996

Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68(5): 850-858

Sogame Y, Kataoka K, Kato M, Sakagami J, Osawa S, Takatera A, Mitsuyoshi M, Usui N, Mitsui S, Yamaguchi N, 2002

Molecular cloning and characterization of chymopasin, a novel serine protease from rat pancreas. *Pancreas* 25(4): 378-386

Soltys BJ, Andrews DW, Jemmerson R, Gupta RS, 2001

Cytochrome c localizes in secretory granules in pancreas and anterior pituitary. *Cell Biology International.* 25(4): 331-338

Steer ML and Meldolesi J, 1987

The cell biology of experimental pancreatitis. *New Engl J Med.* 316:144-150

Sugiya H, Matsuki M, 2006

AQPs and Control of Vesicle Volume in Secretory Cells. *J Membrane Biol.* 210: 155-159

Swarovsky B, Steinhilber W, Scheele GA, Kern HF, 1988

Coupled induction of exocrine proteins and intracellular compartments involved in the secretory pathway in AR42J cells by glucocorticoids. *Eur J Cell Biol.* 47(1): 101-111

Takai S, Miyazaki M, 2003

A Novel Therapeutic Strategy Against Vascular Disorders with Chymase Inhibitor. *Current Vascular Pharmacology* 1: 217-224

Takaki Y, Muta T, Iwanaga S, 1997

A peptidyl-prolyl cis/trans-Isomerase (Cyclophilin G) in Regulated Secretory Granules. *J Biol Chem.* 272(45): 28615-28621

Tan S, Hooi SC, 2000

Syncollin is differentially expressed in rat proximal small intestine and regulated by feeding behaviour. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278: G308-20

Tartakoff AM, Jamieson JD, Scheele GA, Palade GE, 1975

Studies on the pancreas of the guinea pig. Parallel processing and discharge of exocrine proteins. *J Biol Chem.* 250(7): 2671-2677

Teasdale RD, Jackson MR, 1996

Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12: 27-54

Thevenod F, 2002

Ion channels in secretory granules of the pancreas and their role in exocytosis and release of secretory proteins. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C651-72

Thiele C und Huttner WB, 1998a

The disulfid-bonded lloop of cccchromogranins, which is essential for sorting to secretory granules, mediates homodimerisation. *J Biol Chem.* 273: 1223-31

Thiele C und Huttner WB, 1998b

Protein and lipid sorting from the trans Golgi network to secretory granules – recent developments. *Semin Cell Dev Biol.* 9:511-6

Tooze SA, 1998

Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochem Biophys Acta* 1404: 231-244

Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci (United States).* 76: 4350-4354

Tsujita T, Brockman HL, 1987

Regulation of carboxylester lipase adsorption to surfaces. 1. Chemical specificity. *Biochemistry* 26(25): 8423-8429

Tsujita T, Muderwha JM, Brockman HL, 1989

Lipid-Lipid Interactions as Regulators of Carboxylester Lipase Activity. *J Biol Chem.* 264(15): 8612-8618

Ueda N, Ohnishi H, Kanamaru C, Suzuki J, Tsuchida T, Mashima H, Yasuda H, Fujita T, 2000

Kinesin is involved in regulation of rat pancreatic amylase secretion. *Gastroenterology* 119: 1123-31

Valentijn JA, Valentijn K, Pastore LM, Jamieson JD, 2000

Actin coating of secretory granules during regulated exocytosis correlates with the release of rab3D. *Proc Natl Acad Sci (United States)*. 97: 1091-5

Vanpouille C, Denys A, Carpentier M, Pakula R, Mazurier J, Allain F, 2004

Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate. *Biochem J*. 382: 733-740

Wagner AC, Williams JA, 1994

Pancreatic zymogen granule membrane proteins: molecular details begin to emerge. *Digestion* 55: 191-9

Walz A, Stühler K, Wattenberg A, Hawranke E, Meyer HE, Schmalz G, Blüggel M, Ruhl S, 2006

Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 6: 1631-1639

Wang P, Heitman J, 2005

The cyclophilins. *Genome Biology* 6: 226

Wäsle B, Hays LB, Rhodes CJ, Edwardson JM, 2004

Syncollin inhibits regulated corticotropin secretion from AtT-20 cells through a reduction in the secretory vesicle population. *Biochem J*. 380: 897-905

Wäsle B, Hays LB, Rhodes CJ, Edwardson JM, 2004a

Syncollin inhibits regulated corticotrophin secretion from AtT-20 cells through a reduction in the secretory vesicle population. *Biochem J*. 380: 897-905

Wäsle B, Turvey M, Larina O, Thorn P, Skepper J, Morton AJ, Edwardson JM, 2005

Syncollin is required for efficient zymogen granule exocytosis. *Biochem J*. 385 (Pt 3): 721-727

Weber CK und Adler G, 2001

From acinar cell damage to systemic inflammatory response: current concepts in pancreatitis. *Pancreatology* 4: 141-145

Weidinger S, Rümmler L, Klopp N, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Fischer G, Holle R, Gauger A, Schäfer T, Jacob T, Ollert M, Behrendt H, Wichmann HE, Ring J, Illig T, 2005

Association study of mast cell chymase polymorphisms with atopy. *Allergy* 60: 1256-1261

Wessel D, Flügge UI, 1984

A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138(1): 141-143

Wild K, Halic M, Sinning I, Beckmann R, 2004

SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol.* 11(11): 1049-1053

Wild K, Rosendal KR, Sinning I, 2004

A structural step into the SRP cycle. *Mol Microbiol.* 53(2): 357-363

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA et al. (1996)

Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature Genetics* 14:141-145

Wicker C, Puigserver A, 1990

Rat pancreatic colipase mRNA: nucleotide sequence of a cDNA clone and nutritional regulation by a lipidic diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 167: 130-136

Williams JA, 2001

Intracellular signalling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol.* 63: 77-97

Williams JA, 2006

Regulation of pancreatic acinar cell function. *Curr Opin Gastroenterology.* 22: 498-504

Winzell MS, Lowe ME, Erlanson-Albertsson C, 1998

Rat gastric procolipase: sequence, expression and secretion during high-fat feeding. *Gastroenterology* 115(5): 1179-1185

Withiam-Leitch M, Rubin RP, Koshlukova SE, Aletta JM, 1995

Identification and characterization of carboxyl ester hydrolase as a phospholipid hydrolyzing enzyme of zymogen granule membranes from rat exocrine pancreas. *J Biol Chem.* 270(8): 3780-3787

Witt H, Luck W, Hennies HC et al. (2000)

Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genetics* 25:213-216

Wood DW, Setubal JC, Kaul R, Monks DE, Kitajima JP, et al., 2001

The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2323

Yang K, Ding YX, Chin WC, 2007

K⁺-induced ion-exchanges trigger trypsin activation in pancreas acinar zymogen granules. *Arch Biochem Biophys*. 459: 256-263

Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ, 1999

New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev*. 79(1): 73-98

Yoshimori T, Semba T, Takemoto H, Akagi S, Yamamoto A, Tashiro Y, 1990

Protein disulfid-Isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. *J Biol Chem*. 265(26): 15984-15990

Yu S, Michies SA, Lowe AW, 2004

Absence of the Major Zymogen Granule Membrane Protein , GP2, Does Not Affect Pancreatic Morphology or Secretion. *J Biol Chem*. 279 (48): 50274-50279

Zhang J, Herscovitz H, 2003

Nascent lipidated Apolipoprotein B is transported to the Golgi as an incompletely folded intermediate as probed by its association with network of endoplasmic reticulum molecular chaperones, GRP94, ERp72, BiP, Calreticulin, and Cyclophilin B. *J Biol Chem*. 278(9): 7459-7468

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb	Abbildung
AMV-RT	<i>avian myoblastosis virus</i> -reverse Transkriptase
APS	Ammoniumpersulfat
u.a.	und andere
BiP	Binding Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CEL	Carboxyesterlipase
CGN	cis-Golgi-Netzwerk
CHAPS	3-(N-(3-Cholanamidopropyl)- dimethylammonio)-1-propansulfonat
COP	coatomer protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heisst
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribnucleic acid
dNTP	2`desoxy-Nukleosid-5`-triphosphat
dT	desoxy-Thymidin
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
E.coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-intermediate compartment
et al	und weitere
Fa	Firma
FCS	Fetales Rinderserum
FOY	Ethyl-4-(6-Guanidinbenzoyloxy)-benzoat
g	Gramm
xg	x 9,81m/s ²
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GP2	Glykoprotein 2
gZGM	Gewaschene Zymogengranulamembranen
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp	Heat shock protein
Hz	Hertz
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
LDI	Laserdesorption/Ionisierung
M	Molar
m	Milli
μ	Mikro
MALDI	Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation

MES	2-Morpholino-Ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MMLV-RT	<i>Moloney-murine-leukimeavirus-reverse</i> Transkriptase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MSMS	Tandem-Massenspektrometrie
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PAA	Polyacrylamid
PAS	Periodic Acid/Schiff-Reagenz
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEI	Polyethylenimin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Konzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Poly-A	Poly-Adenylat
PPIB	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase B; Cyclophilin B
ppm	parts per million
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum

RMCP-1	Rat mast cell protease 1
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid
sec	Sekunden
sog	sogenannt
SRP	Signal recognition particle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TOF	Time of flight
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
U	Units
u.a.	unter anderem
Ü.N.	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	Vergleiche
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume
ZG	Zymogengranula
ZGI	Zymogengranulainhalt
ZGM	Zymogengranulamembran
2D-Gel	Zweidimensionales Gel

8.2 Lebenslauf

Name:	Heike Gisela Borta geb. Rolink
geb. am:	10.11.1976 in Münster/Westf.
Staatangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet seit 10.05.2002; eine Tochter
wohnhaft:	Wehrdaer Straße 101, 35041 Marburg
<u>Schulbildung:</u>	
1983 – 1987	Johannesgrundschule Altenberge/Westf.
1987 – 1995	Marienschule Münster/Westf.
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife
<u>Universitäre</u>	
<u>Ausbildung:</u>	
Okt 1995 – Dez 1999	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
Jan – Sept 2000	Diplomarbeit am Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. H.F. Kern mit dem Titel: „Klonierung, Expression und Charakterisierung der Carboxyesterlipase und Colipase: Untersuchungen zur Sortierung und Sekretion von Zymogenen im exokrinen Pankreas der Ratte“
Sept. 2000	Diplom, Gesamtnote „sehr gut“
Nov. 2000 – Okt. 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg
Nov.2002 – März 2004	Schwangerschafts-/Elternzeit
April 2004-März 2007	Doktorarbeit am Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg bei PD Dr. Michael Schrader mit dem Titel: „Identifizierung und Charakterisierung von peripheren Membranproteinen der Zymogengranula des exokrinen Pankreas der Ratte durch subgranuläre Proteomanalyse“

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aurich	Wagner
Barth	Westermann
Bestgen	
Brüne	
Eilers	
Elsässer	
Feuser	
Gudermann	
Habermehl	
Hartmann	
Kern	
Kirchner	
Knöller	
Koolman	
Lammel	
Lill	
Löffler	
Mandrek	
Müller	
Mutters	
Perst	
Röhm	
Schäfer	
Schrader	
Schulz	
Schwee	
Seitz, J	
Seitz, KA	
Steinmetz	

8.4 Danksagung

Zuerst und besonders herzlich danke ich PD Dr. Michael Schrader für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas. Sein Optimismus und die zumeist konstruktiven Diskussionen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und über manche Frustration hinweggeholfen.

Floriane Faust, Nina Bonekamp und Hannah Delille danke ich für ihre professionelle sowie moralische Unterstützung. Die freundschaftliche Beziehung zu ihnen ging weit über ein kollegiales Verhältnis hinaus und hat mir sehr geholfen, nicht aufzugeben. Dafür einen ganz herzlichen Dank.

Großen Dank schulde ich auch Annett Koch für die freundliche Einweisung in die Methodik der 2D-Gelelektrophorese sowie Dr. Delphine Delacour, die mich mit Geduld an die Methodik der massenspektrometrischen Analyse herangeführt hat. An dieser Stelle sei auch Dr. Julius Nyalwidhe (AG Prof. Dr. Lingelbach, Institut für Biologie, Philipps-Universität Marburg) sowie Dr. Jürgen Adamkiewicz (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg) für die Durchführung und die Unterstützung bei der massenspektrometrischen Analyse herzlich gedankt.

Ein ebenso herzlicher Dank gilt Waltraud Ackermann sowie Brigitte Agricola für die Unterstützung der histologischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für klinische Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg möchte ich ganz herzlich für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit danken. Es hat sehr viel Spaß mit euch gemacht.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, meinen Eltern, meinem Mann und meiner Tochter, die mich zu jeder Zeit unterstützt und aufgerichtet haben und damit in ganz besonderer Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt möchte ich der Jürgen-Manchot-Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung in den letzten drei Jahren danken, ohne die die Durchführung und der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung von peripheren Membranproteinen der Zymogengranula des exokrinen Pankreas der Ratte durch subgranuläre Proteomanalyse“ im Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Roland Lill mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. Michael Schrader ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den

Heike Borta

Aus dieser Studie hervorgegangene Publikationen:

Bach JP, Borta H, Ackermann W, Faust F, Borchers O, Schrader M, 2006
The secretory granule protein syncollin localizes to HL-60 cells and neutrophils.
J Histochem Cytochem. 54(8): 877-888

Faust F, Borta H, Schrader M, 2007
The small GTPase Rab8a is involved in zymogen granule formation in acinar cells of the exocrine pancreas. (*submitted*)

Borta H, Faust F, Schrader M, 2007
Insights into the membrane proteome of zymogen granules from rat pancreas: Analysis of membrane-associated proteins. (*in preparation*)

Publizierte Abstracts:

Faust F, Borta H, Schrader M

The small GTPase Rab8a is involved in zymogen granule formation in acinar cells of the exocrine pancreas. *Eur J Cell Biol.* 85S1 (Suppl. 56) S1-8 (abstr.), 2006

Weitere Publikationen:

Gromoll J, Schulz A, Borta H, Gudermann T, Teerds KJ, Greschniok A, Nieschlag E, Seif FJ, 2002

Homozygous mutation within the conserved Ala-Phe-Asn-Glu-Thr motif of exon 7 of the LH receptor causes male pseudohermaphroditism. *Eur J Endocrinology.* 147(5) : 597-608

Weitere publizierte Abstracts:

Borta H, Gudermann T

FSH-induced effects on primary rat sertoli cells include transactivation of the EGF receptor. (meeting of current and former members of the Ernst-Schering-Foundation scholarship; August 2004)

Teilnahme an Meetings:

Meeting of current and former members of the Ernst-Schering-Foundation scholarship in August 2004

Borta H, Gudermann T

FSH-induced effects on primary rat sertoli cells include transactivation of the EGF receptor. (*poster presentation*)