



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Selektive Proteomanalyse von präparativ isoliertem Plexus myentericus zur Untersuchung postnataler Entwicklungsvorgänge

Autor: Olivia Thil
Institut / Klinik: Kinderchirurgische Universitätsklinik
Doktorvater: Prof. Dr. K.-L. Waag

Die Anpassungsfähigkeit gastrointestinaler Funktionen an Veränderungen durch Ernährungsgewohnheiten, Wachstum oder Erkrankungen ist eine lebensnotwendige Eigenschaft. Gleichzeitig ist sie ein Hinweis auf die hohe Plastizität des enterischen Nervensystems, das eine zentrale Rolle bei der Regulation dieser Funktionen einnimmt. Adaptations- und Regenerationsmechanismen der intrinsischen Darminnervation sind in den vergangenen Jahren in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Zahlreiche morphologische Untersuchungen belegen die Flexibilität des enterischen Nervensystems während der postnatalen Entwicklung und im Alter. Die genauen molekularen Mechanismen, die diesen Vorgängen zu Grunde liegen, sind momentan noch nicht vollständig aufgeklärt. Mit dem Fortschritt der Genomforschung wurden die Grenzen rein genetischer Aspekte bei der Untersuchung funktioneller Abläufe deutlich. Analysen der funktionellen Einheit der Zelle, des Proteoms, ermöglichen differenzierte Einblicke in Veränderungen, die während des Zellzyklus ablaufen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmals eine für die Zellkultur beschriebene selektive präparative Isolierungsmethode von Plexus myentericus mit Methoden der Proteomforschung verknüpft.

Das isolierte Gewebe aus dem Darm von Sprague-Dawley Ratten wurde gereinigt und nach beschriebenen Methoden für die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese aufbereitet. Als experimenteller Ansatz wurde eine Drei- bzw. Vierfachbestimmung in unabhängigen Experimenten gewählt, um die Eignung der Präparation im Hinblick auf Reinheit des Zellmaterials, Proteingehalt und Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Zusätzlich wurden vier verschiedene Versuchsgruppen zur Beobachtung von alters- und darmabschnittsabhängigen Modifikationen der Proteinexpression in Plexus myentericus definiert. Verglichen wurden Veränderungen zwischen dem ersten und 14. postnatalen Tag bei enterischem Nervengewebe aus Dünndarm und Colon.

Die Gegenüberstellung der Versuchsläufe mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse durch PDQuest belegt reproduzierbare Expressionsprofile. Anhand zahlreicher Übereinstimmungen konnte die Tauglichkeit der selektiven Isolierungsmethode von Plexus myentericus aus Dünndarm und Colon für proteinbiochemische Untersuchungen gezeigt werden. Weiterhin konnten eindeutige (d.h. mindestens um den zweifachen Wert veränderte) Regulationen der Proteinexpression in den verschiedenen Altersgruppen beobachtet werden. Es wurden 39 differentiell exprimierte Proteine aus Plexus des Dünndarms eingehender untersucht. Zur Identifizierung der Proteine wurden zusätzlich massenspektrometrietaugliche 2D-Gele erstellt. Die anschließende MALDI-TOF-Analyse führte zu einer eindeutigen Strukturaufklärung von fünf in der Altersgruppe P1 überexprimierten Proteinen: Histon H2A (2-fach verstärkt), Tubulin α (2-fach verstärkt), Polyubiquitin (4-fach verstärkt), Stathmin (8-fach verstärkt) und heterogenes Ribonucleoprotein (nur in P1 detektiert). Zusammenfassend handelt es sich um relativ allgemeine, nicht ausschließlich neuronenspezifische Proteine, die jedoch wichtige Aufgaben im Rahmen der Zellregulation sowie bei Proliferations- und Differenzierungsvorgängen ausüben.

Mit dem Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit ist eine Grundlage für die selektive Proteomanalyse von Plexus myentericus gegeben. Die Untersuchung und der Vergleich der Proteinexpression enterischer Nervenzellen in Abhängigkeit verschiedener Parameter stellt ein wichtiges Instrument auf dem Weg zu einem besseren Verständnis funktioneller Mechanismen im Rahmen neuronaler Plastizität dar. Es ist vorstellbar, dass diese Erkenntnisse Ansatzpunkte für diagnostische (z. B. die Definition spezifischer Biomarker) oder therapeutische (z. B. gezielte Stimulation der Proliferation bei intestinalen Innervationsstörungen) Strategien bieten könnten.