

Anette Börner

Dr. sc. hum.

Subzelluläre Proteinextraktion an Pankreas zur Differenzierung von Krebs- und Normalgewebe

Geboren am 25/01/1979 in Wickede (Ruhr)

Diplom der Fachrichtung Biotechnologie am 26.11.2003 an der Fachhochschule Gießen-Friedberg in Gießen

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Magnus von Knebel Doeberitz

In den letzten Jahren hat die Proteomforschung, insbesondere nach Erstellung der ersten kompletten Sequenz des menschlichen Genoms, stark an Bedeutung gewonnen. Bereits 70% der heutigen Wirkungsziele für Medikamente werden durch Proteine repräsentiert. Die Probleme in der Proteinanalytik sind die große Komplexität und Dynamik des humanen Proteoms. Häufig werden Proteine, die zum Teil nur in geringer Kopienanzahl in einer Zelle vorliegen, bei Analysen von hoch abundanten Proteinen überdeckt und sind somit nur schwer oder überhaupt nicht analysierbar und Proteinmodifikationen, die ausschlaggebend für die Funktion der Proteine sind, sind schnell und kurzlebig.

Unser Ziel war es eine Methode zu entwickeln, die in der Lage ist, eine Momentaufnahme des Proteinstatus in humanem Pankreasgewebe widerzuspiegeln und dabei selektiv und reproduzierbar auch sehr kleine Mengen Protein zu detektieren.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Gewebeaufarbeitungs-Methoden getestet und mit einer subzellulären Proteinextraktion kombiniert. Schließlich wurde ein Prozessablauf etabliert, in dem gefrorenes humanes Pankreasgewebe in 20 µm dicke Scheiben geschnitten und in flüssigem Stickstoff zu Pulver zermahlen wurde. Mit einer sequentiellen Extraktionsprozedur, die auf der Verwendung von Detergenzien enthaltenden Puffern basiert, wurden die Proteine anschließend aus dem Gewebepulver extrahiert. Die Proteine dieser Extrakte wurden mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei nahezu allen Proteinextraktionen das Gesamtproteom des Pankreasgewebes in eine Zytosol-, Membran-, Zellkern- und Zytoskelettprotein-Fraktion

eingeteilt wurden. Außerdem konnten in Pankreaskrebs differentiell exprimierte Membranproteine durch Massenspektrometrie identifiziert werden.

Mit Hilfe des etablierten Prozessablaufs wurde die Komplexität des Proteoms reduziert und die Detektierbarkeit von niedrig abundanten Proteinen erhöht. Ein großer Vorteil ist zudem die Verwendung von gefrorenem Gewebe, welches die Extraktion von nicht-degradierten Proteinen aus dem enzymreichen Pankreasgewebe ermöglicht. Zusätzlich wirken sich die Detergenzien der Puffer stabilisierend auf die Proteinstruktur aus, so dass nach der Extraktion eine Bestimmung der Proteinstrukturen durchführbar ist. Es ist möglich, sich auf Proteinuntergruppen, wie den Membranproteinen, zu konzentrieren und Unterschiede auf Proteinebene in Krebs- und Nicht-Krebsgewebe zu detektieren. Die Identifizierung von in Pankreaskrebs speziell exprimierten Proteinen liefert Hinweise für die Suche nach Biomarkern des Pankreaskrebses und spielt eine wichtige Rolle für das Verständnis des Krankheitsmechanismus.