



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**  
**Fakultät Life Sciences**

# In-vitro-Untersuchungen zur zeit- und temperaturabhängigen Degradation von relevanten Proteinen in postmortalem humanem Gewebe

Bachelorarbeit  
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von  
Heike Faber  
Matrikelnummer 1900057

Gutachter: Prof. Christoph Maas, HAW Hamburg  
Gutachter: Dr. Martin Jübner, Institut für Rechtsmedizin Köln

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Instituts für Rechtsmedizin Köln.

# Inhalt

|   |    |
|---|----|
| Vorwort .....   | 4  |
| 1. Einführung .....   | 6  |
| 1.1 Begriffserläuterungen .....                               | 6  |
| 1.1.1 Proteine .....  | 6  |
| 1.1.2 Proteom und Proteomik .....                             | 6  |
| 1.1.3 Mikrotubuli .....                                       | 7  |
| 1.1.4 $\alpha$ - Tubulin .....                                | 7  |
| 1.1.5 Dihydrolipoyl Dehydrogenase (DLD) .....                 | 8  |
| 1.1.6 Aufbau einer Muskelzelle .....                          | 9  |
| 1.1.7 $\alpha$ - Actinin .....                                | 10 |
| 1.1.8 Myosin bindendes Protein (MYBPC) .....                  | 10 |
| 1.2 Theorie PAGE und WB .....                                 | 10 |
| 1.2.1 SDS- PAGE .....   | 11 |
| 1.2.2 WesternBlot .....                                       | 11 |
| 2. Material und Methoden .....                                | 12 |
| 2.1 Material .....  | 12 |
| 2.2 Durchführung der Versuche .....                           | 15 |
| 2.2.1 Lagerungsbedingen der Proben .....                      | 15 |
| 2.2.2 Probenaufarbeitung .....                                | 16 |
| 2.2.3 Proteinfällung .....                                    | 16 |
| 2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration .....               | 17 |
| 2.2.5 SDS- PAGE mit Minigelen .....                           | 18 |
| 2.2.6 Westernblot der Mini- Gele .....                        | 19 |
| 2.2.7 Detektion der Membran .....                             | 20 |
| 2.2.8 Strippen der Membran und Färben mit Tinte .....         | 20 |
| 2.2.9 Behandlung des Gels nach der SDS- PAGE .....            | 21 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion .....                            | 22 |
| 3.1 Anmerkungen zu den dargestellten Ergebnissen .....        | 22 |
| 3.2 Verbesserung der Durchführung .....                       | 22 |
| 3.3 Aussagen über das Proteinverhalten in den Gelen .....     | 27 |
| 3.4 Untersuchungen für $\alpha$ - Tubulin .....               | 31 |
| 3.5 Untersuchungen über $\alpha$ - Actinin .....              | 38 |
| 3.6 Untersuchungen über das Myosin bindende Protein .....     | 41 |
| 3.7 Untersuchungen über die Dihydrolipoyl Dehydrogenase ..... | 45 |
| 4. Fazit .....  | 47 |
| 5. Ausblick .....   | 48 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 6. Literaturverzeichnis.....   | 49 |
| 7. Abkürzungen .....           | 50 |
| 8. Abbildungsverzeichnis ..... | 52 |
| Danksagung.....                | 57 |

## Vorwort

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Thema der Proteindegradation in postmortalem humanem Gewebe. Es sollte untersucht werden, ob sich die Proteine nach dem Tod eines Organismus mit einem erkennbaren Muster abbauen und ob sich daraus Rückschlüsse auf den Todeszeitpunkt einer Person ziehen lassen.

Bisher stehen der Rechtsmedizin verschiedene Methoden zur Bestimmung des Todeszeitpunkts zur Verfügung. So kann unter anderem neben der Messung der Körpertemperatur eine Begutachtung der Leichenflecken sowie eine Analyse der Insekten, die den Körper nach dem Tod besiedeln, durchgeführt werden. Bei diesen Verfahren handelt es sich um relativ aufwendige Methoden, die mit zunehmender Zeit ungenauer werden.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten die Grundlagen für eine Bestimmung der Todeszeit anhand der molekularen Veränderungen des Proteoms gelegt werden. Es könnte sich daraus eine Methode entwickeln lassen, mit der sich z.B. aus einem Tropfen Blut der Todeszeitpunkt ermitteln lässt.

Als Biomarker für die Untersuchung der Degradation wurde zunächst  $\alpha$ -Tubulin ausgewählt. Es dauerte lange, bis die Methode zur Detektion von  $\alpha$ -Tubulin korrekt funktionierte. Durch die zeitliche Begrenzung des Projekts war es dann nicht mehr möglich  $\alpha$ -Tubulin genauer zu untersuchen.

Stattdessen wurden andere Proteine ausgesucht, bei denen eine Degradation innerhalb eines angemessenen Zeitraums beobachtet werden konnte. Bei diesen Proteinen handelt es sich um  $\alpha$ -Actinin, Myosin bindendes Protein C und die Dihydrolipoyl Dehydrogenase. Bei diesen drei Proteinen funktionierte auch die Detektion sofort, so dass eine zügige Untersuchung möglich war.

Am Ende des Projekts zeigte sich ein schwerwiegender Planungsfehler bei den Versuchsreihen, in denen die neuen Proteine untersucht wurden. Bei diesen wurde das untersuchte Intervall zu kurz gewählt, so dass bei den durchgeführten Untersuchungen keine aussagekräftigen Ergebnisse über die Entwicklung des Proteingehalts getroffen werden konnten.

In Erinnerung an meine Oma Ingrid Brumshagen, die  
leider während des Projekts verstorben ist und die  
erfolgreichen Durchführungen meiner Versuche nicht  
mehr erlebt hat.

## 1. Einführung

Das durchgeführte Projekt dient dazu, die Entwicklung von Proteinen nach dem Tod des menschlichen Organismus zu untersuchen. Diese Untersuchungen sind der erste Schritt zur Entwicklung einer Methode zur Bestimmung des Todeszeitpunkts eines Menschen.

Bisher stehen für die Feststellung des Todeszeitpunkts verschiedene, relativ aufwendige Methoden zur Verfügung. Bei einer wird zunächst die Temperatur festgestellt und dann der genaue Todeszeitpunkt errechnet. Sie hat den Nachteil, dass sie nur solange funktioniert, bis der untersuchte Organismus die Temperatur der Umgebung angenommen hat. Danach kann z.B. die zweite Methode, die Untersuchung der Insekten und ihrer Entwicklungsstadien, Aufschluss über den Todeszeitpunkt geben. Ein Nachteil hier ist, dass diese Untersuchung sehr aufwendig ist. Weitere Möglichkeiten zur Feststellung des Todeszeitpunktes sind die Begutachtung der Leichenflecke sowie die Einschätzung der Totenstarre. Die hier durchgeführten Untersuchungen könnten zu einer Methode führen, bei der der Todeszeitpunkt anhand des Abbaus von Proteinen bestimmt wird. Dieser Test könnte, z.B. als Teststreifen, bereits am Fundort der Leiche eingesetzt werden. Für eine solche Bestimmung wäre es von Vorteil, wenn das zur Bestimmung verwendete Protein in jeder Zelle des Organismus vorkommt. Ein solches Protein ist  $\alpha$ -Tubulin. Es kommt als Bestandteil des Zytoskeletts in allen Zellen eines Organismus vor.

In der dem Projekt zur Verfügung stehenden Zeit konnte Tubulin zunächst nicht spezifisch nachgewiesen werden. Dies führte dazu, dass weitere Proteine untersucht wurden. Nach einem Screening, bei dem auf ein abnehmendes Verhalten nach längerer Lagerung des Gewebes bei unterschiedlichen Temperaturen geachtet wurde, wurden die Proteine  $\alpha$ -Actinin 2, Myosin bindendes Protein C und Dihydrolipoyl Dehydrogenase in die Untersuchung einbezogen.

### 1.1 Begriffserläuterungen

#### 1.1.1 Proteine

Bei Proteinen handelt es sich um Makromoleküle, die aus Aminosäuren zusammengesetzt sind. Es gibt sehr viele verschiedene Proteine, die in einem Organismus verschiedenste Aufgaben erfüllen.

Es gibt 20 Aminosäuren, die sich bei jedem Protein unterschiedlich hintereinander reihen. Die Reihenfolge der Aminosäuren bestimmt die Struktur, Form, Ladung und Funktion des Proteins. (1)

Diese Struktur ist nicht unzerstörbar. Sie kann durch andere Proteine, so genannte Proteasen, angegriffen und aufgelöst werden. Auch die Umgebung, die durch den pH-Wert, die Menge an vorhandenen Salzen, die Temperatur und anderes charakterisiert ist, hat einen Einfluss auf die Stabilität des Proteins. Wenn einer oder mehrere dieser Parameter nicht mehr stimmt, lockert sich die Struktur des Proteins bis dieses nur noch als Aminosäurekette vorliegt. Dann ist das Protein denaturiert. Dieses Verhalten kann für die Untersuchung von Proteinen nützlich sein.

#### 1.1.2 Proteom und Proteomik

Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Es kann sich jederzeit verändern, je nach dem in welcher

Umgebung sich der Organismus befindet. Nach dem Tod eines Lebewesens werden keine weiteren Proteine mehr produziert und die Anzahl der Proteine verringert sich, das Proteom wird kleiner.

Die Proteomik beschäftigt sich mit der Untersuchung des Proteoms. Sie kann anhand der Veränderungen in einem Proteom Proteine mit spezifischen Aufgaben oder Verhaltensweisen finden. Diese bieten Hinweise auf mögliche Krankheiten und Ansatzpunkte für neue Entwicklungen. (2) . Viele Proteine sind als Biomarker für bestimmte Krankheiten in der klinischen Chemie etabliert, z.B. Troponin als Indikator für eine vorhandene Herzschädigung z.B. durch einen Herzinfarkt.

### 1.1.3 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind ein wichtiger Bestandteil jeder Zelle. Als Teil des Zytoskeletts bilden sie zusammen mit den Actinfilamenten und den Intermediärfilamenten ein Gerüst, welches der Zelle ihre Form und Stabilität verleiht. Die Mikrotubuli haben verschiedene Aufgaben innerhalb der Zelle. (3) Sie bilden bei der Zellteilung die Spindel, die die Chromatiden trennt. Außerdem dienen die Mikrotubuli der Organisation der Zellorganellen innerhalb der Zelle sowie dem Transport von Molekülen. Durch einen stetigen Auf- und Abbau der Tubulindimere tragen die Mikrotubuli auch zur Fortbewegung der Zelle bei.

### 1.1.4 $\alpha$ - Tubulin

Als erstes Zielprotein wurde  $\alpha$ - Tubulin ausgewählt. Es bildet zusammen mit  $\beta$ -Tubulin als Heterodimere die Mikrotubuli, die in jeder Zelle als Bestandteil des Zytoskeletts neben den Actinfilamenten und den Intermediärfilamenten vorhanden sind.  $\alpha$ - und  $\beta$ - Tubulin sind unterschiedlich stark negativ geladene globuläre Proteine und haben jeweils ein relatives Molekulargewicht von 55 kDa. (4) Sie lagern sich zu Dimeren zusammen, die sich zu Protofilamenten aneinanderreihen, so dass sich  $\alpha$ - und  $\beta$ - Tubulin abwechseln. Zwischen diesen Protofilamenten werden Verbindungen aufgebaut, die zu einer Polymerisation der Mikrotubuli führen.

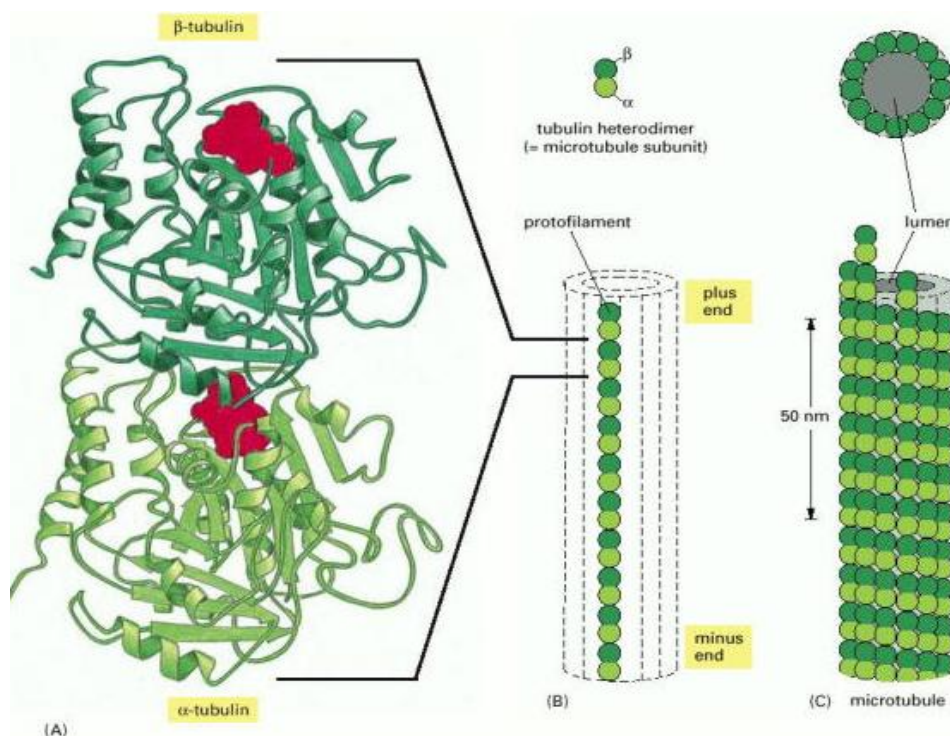


Abbildung 1: Die Struktur von Mikrotubuli und ihrer Untereinheiten

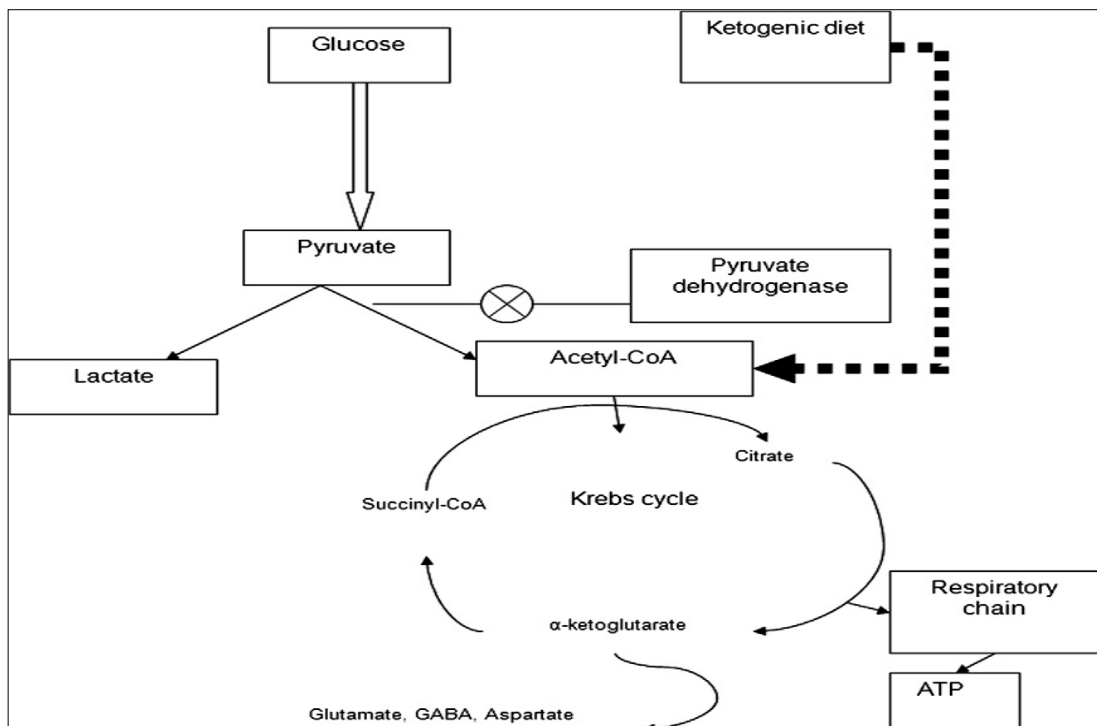
- (A) Protofilamente bestehen aus Tubulin Heterodimeren, die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Tubulin Monomeren gebildet werden. Diese binden GTP (rot).  
 (B) Jedes Protofilament besteht aus Tubulin Heterodimeren mit benachbarten Untereinheiten.  
 (C) 13 parallel ausgerichtete Protofilamente bilden eine Mikrotubuli Röhre. (aus 5)

Durch die abwechselnde Anordnung von  $\alpha$ - und  $\beta$ - Tubulin weisen Mikrotubuli eine Polarität auf, die für den Auf- und Abbau der Mikrotubuli sowie für den Transport entlang der Mikrotubuli wichtig ist.

### 1.1.5 Dihydrolipoyl Dehydrogenase (DLD)

Ein weiteres weit verbreitetes Protein ist das Enzym Dihydrolipoyl Dehydrogenase. Es ist als Untereinheit der Pyruvat- Dehydrogenase und der  $\alpha$ -Ketoglutarat- Dehydrogenase an den Vorgängen der Glykolyse und dem Zitronensäurezyklus beteiligt. (6)

In Abb. 2 ist eine Darstellung der wichtigen biochemischen Prozesse zur Energiegewinnung, die Glykolyse und der Zitronensäurezyklus, zu sehen. Am reibungslosen Ablauf dieser Reaktionen ist DLD als Bestandteil der oben genannten Enzymkomplexe beteiligt.



**Abbildung 2: Darstellung der Atmungskette mit den benötigten Reaktionswegen und wichtigen Reaktionsschritten. (aus 7)**

Es katalysiert die Abspaltung von Wasserstoff von Dihydrolipoyl. Die von DLD katalysierten Reaktionen finden innerhalb der Mitochondrien als Energie produzierende Reaktionen statt. Da Mitochondrien in fast allen Zellen vorkommen, würde sich DLD auch als Marker für eine weitergehende Untersuchung der Proteindegradation eignen.

Eine Mutation bzw. eine Aktivitätsverminderung dieses Enzyms führt auf Grund seiner zentralen Rolle in den wichtigen energiegewinnenden Kreisläufen zu schweren Krankheiten. (6,8)



### 1.1.6 Aufbau einer Muskelzelle

Es gibt drei Arten von Muskeln: Skelett-, Herz- und glatte Muskeln. In diesem Projekt wurde sich auf den Skelettmuskel Psoas major, der für die Beugung der Hüfte mitverantwortlich ist, konzentriert.

Muskeln sind hierarchisch aufgebaute Gewebe. Ihr Aufbau ist in Abb. 3 dargestellt.

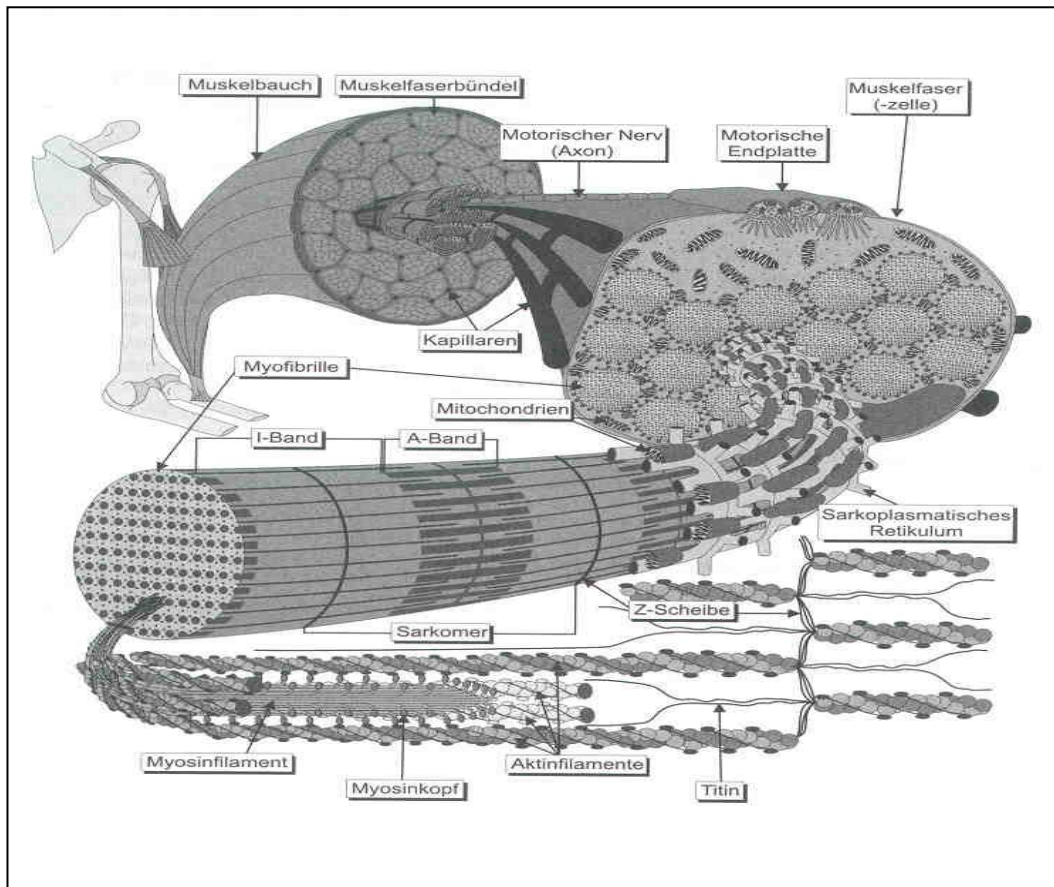


Abbildung 3: Darstellung der hierarchischen Struktur eines Muskels (aus 9)

Sie bestehen aus Faszien, von denen mehrere als ganzer Muskel durch das Epimysium zusammengehalten und durch Sehnen an den Knochen befestigt werden. Die Faszien bestehen aus den Muskelzellen, auch Myozyten genannt. Diese sind sehr lang gestreckt und enthalten mehrere Myofibrillen. Bei diesen kann man eine klare Struktur erkennen, da sie in Sarkomere eingeteilt sind. Diese Sarkomere sind der Ort, wo die Kontraktion eines Muskels stattfindet. Der Hauptbestandteil eines Sarkomers besteht aus Actin- und Myosinfasern, die bei einer Kontraktion aneinander vorbeigleiten und so den Muskel verkürzen. Durch die Anordnung der Proteine kann man das Sarkomer in verschiedene Banden einteilen.

Die Z- Scheiben sind die äußersten Begrenzungen eines Sarkomers. Hier werden die Aktinfilamente verankert. Darauf folgt das I- Band, in dem sich vor allem Actin befindet. Der Bereich, in dem sich Actin und Myosin überlagern, wird als A- Band bezeichnet. Innerhalb des A- Bandes befindet sich noch das H- Band mit der M- Scheibe. Im H- Band befindet sich vor allem das Myosin, das an der M- Scheibe fixiert ist.

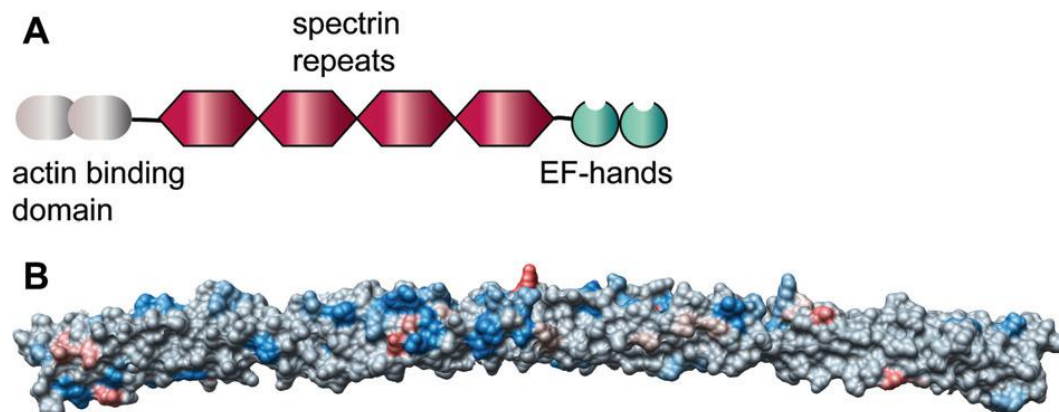
Neben den zwei Hauptproteinen Actin und Myosin gibt es noch einige andere Proteine, die für den reibungslosen Ablauf einer Kontraktion wichtig sind. Zwei

davon wurden in diesem Projekt ebenfalls untersucht:  $\alpha$ - Actinin 2 und das Myosin- bindende Protein.

### 1.1.7 $\alpha$ - Actinin

Es gibt verschiedene Isoformen von  $\alpha$ - Actinin. In diesem Projekt wurde die Form  $\alpha$ - Actinin 2 untersucht.

Bei  $\alpha$ - Actinin 2 handelt es sich um ein stabförmiges Protein aus Muskelzellen. Es hat ein relatives Molekulargewicht von ungefähr 100 kDa und verankert die Actinfilamente an der Z- Scheibe im Sarkomer sowie das Zytoskelett indirekt an der Membran. (10) In Abb. 4 sind eine schematische Darstellung von  $\alpha$ - Actinin sowie eine Darstellung der Oberflächenstruktur zu sehen.



**Abbildung 4:** (A) Schematische Darstellung von  $\alpha$ - Actinin mit seinen Bestandteilen Actin-bindende Domäne, vier Spekttrin- Wiederholungen sowie den EF- Händen (B) Darstellung der Oberflächenstruktur von  $\alpha$ - Actinin mit der Actin- Bindenden Domäne links bis zur vierten Spekttrinwiederholung (aus 11)

Eine Mutation von  $\alpha$ - Actinin 2 führt zu der vererbaren Herzkrankheit Hypertrophe Kardiomyopathie. (12) Bei dieser ist ein Teil des Herzmuskels, vor allem das interventrikuläre Septum, vergrößert, was zu einem höheren Risiko für den plötzlichen Herztod führt. (13) Auch ist  $\alpha$ - Actinin an der Regulierung von Kaliumkanälen beteiligt. (14) Einer dieser Kaliumkanäle ist der NMDA-Rezeptor, der an der postsynaptischen Nervenzelle den Ionenfluss zur Regulierung des Membranpotentials beteiligt ist. (10, 15)

### 1.1.8 Myosin bindendes Protein (MYBPC)

Bei dem Myosin bindenden Protein C handelt es sich ebenfalls um ein Protein aus dem Muskel. Es hat ein relatives Molekulargewicht von 149 kDa und ist im zentralen Band, dem C- Band, innerhalb des A- Bands eines Sarkomers zu finden und hält die Myosinfilamente in diesem zusammen. Es wird intensiv erforscht, da eine Mutation bei diesem Protein zu einer schweren vererblichen Herzerkrankung, der Hypertrophen Kardiomyopathie, führt. (16)

## 1.2 Theorie PAGE und WB

Für die Untersuchung der Proteine wurden die gelösten Proteine zunächst mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit einem WesternBlot auf eine Membran transferiert und auf dieser detektiert. Bei diesen beiden Methoden handelt es sich um gut erforschte Analysemethoden für Proteine, die im Folgenden näher beschrieben werden.

### 1.2.1 SDS- PAGE

Für eine genauere Untersuchung des Zielproteins muss das Proteingemisch, das nach der Homogenisation erhalten wird, aufgetrennt und in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt werden.

Dies geschieht durch eine SDS-PAGE. Diese wird in Anlehnung an die originale Prozedur von Ulrich K. Laemmli durchgeführt. (17) Dabei wird ein Gel aus Polyacrylamid verwendet, an das eine Spannung angelegt wird, damit die Proteine durch das Gel wandern. Bei der SDS- PAGE handelt es sich um eine denaturierende Form der Elektrophorese, da für die Probenvorbereitung SDS im Probenpuffer verwendet wird. Das SDS steht für Sodium Dodecyl Sulfat, eine negativ geladene Substanz, die Proteine denaturiert und sich an diese anlagert. Diese werden dadurch mit einer einheitlichen Ladung versehen, so dass sie im Gel beim Anlegen einer Spannung nur nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Die Auftrennung geschieht, weil das Acrylamid beim Auspolymerisieren eine netzartige Struktur ausbildet, die Moleküle je nach ihrer Größe unterschiedlich stark zurückhält. Die Größe der entstandenen Poren wird durch die eingesetzte Menge an Acrylamid sowie dem Brückenbildner Bisacrylamid bestimmt. Durch die Poren wird das Proteingemisch aufgetrennt, wobei die großen Moleküle stärker zurückgehalten werden und somit langsamer durch das Gel wandern als kleinere. Um eine zielgerichtete Bewegung der Proteine zu erreichen, wird eine Spannung an das Gel angelegt. Diese sorgt dafür, dass die durch das SDS negativ geladenen Proteine zum Plus- Pol in das Gel hindurch wandern. Die Spannung wird solange angelegt, bis das kleinste Molekül, meistens ein Farbmolekül wie Bromphenolblau, das untere Ende des Gels erreicht hat.

Nach dem Lauf kann das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen werden und für weitere Untersuchungen wie einen WesternBlot verwendet werden.

### 1.2.2 WesternBlot

Da die Proteine im Gel nicht untersucht werden können, müssen sie aus diesem, möglichst in ihrer aufgetrennten Ordnung, aus diesem herausgeholt werden. Dies geschieht durch einen Western Blot. Bei diesem werden die Proteine so wie sie sich aufgetrennt haben, durch Anlegen einer Spannung vom Gel auf eine Membran transferiert. Diese Methode wurde zuerst von Harry Towbin entwickelt. (18)

Auf dieser Membran können die Proteine nun identifiziert werden. Die Membran besteht aus Polyvinylidenfluorid (PVDF). Dieses Material hat sehr hydrophobe Eigenschaften, weshalb die Proteine gut daran binden. Auch ist diese Membran relativ stabil gegenüber chemischen und mechanischen Einflüssen. (19)

Für die Detektion und Identifizierung der Proteine werden Antikörper verwendet, die sich nur an ein spezifisches Protein binden. Durch einen weiteren Antikörper können die gebundenen Antikörper markiert und z.B. durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Die Farbreaktion ist enzymatisch gesteuert durch die alkalische Phosphatase, die an den zweiten Antikörper gebunden ist. Diese setzt die Substrate BCIP und NBT, die in der Farblösung enthalten sind um, so dass die markierten Proteine rosa gefärbt sind. (20)

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Verwendete Kits & Fertigmateriale

|  | Name   | Firma         |
|--|--|---------------|
|  | 2-D Quant Kit                                    | GE Healthcare |
|  | WesternBreeze Chromogenic Immunodetection System | Invitrogen    |
|  | Nu PAGE 4-12% Bis- Tris Gel (10, 12, 15 well)    | Novex         |
|  | Glasperlen, Durchmesser 0,5 mm                   |               |

#### Verwendete Lösungen

| Abkürzung | Bezeichnung  | Firma      |
|-----------|--|------------|
| L1        | MOPS SDS Laufpuffer (20x)<br>50 mM MOPS<br>50 mM Tris Base<br>0.1% SDS<br>1 mM EDTA<br>pH 7.7  | Novex      |
| L2        | Tris- Glycin Transferpuffer (25x)<br>25 mM Bicine<br>25 mM Bis-Tris (free base)<br>1 mM EDTA<br>pH 7.2   | Novex      |
| L3        | NuPAGE Antioxidant   | Invitrogen |
| L4        | NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)<br>0.5M DTT   | Invitrogen |
| L5        | NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)<br>106 mM Tris HCl<br>141 mM Tris Base<br>2% LDS<br>10% Glycerol<br>0.51 mM EDTA<br>0.22 mM SERVA Blue G250<br>0.175 mM Phenol Red<br>pH 8.5 | Invitrogen |
| L6        | BenchMark Prestained Proteinladder   | Invitrogen |
| L7        | Novex sharp prestained Protein Standard  | Invitrogen |
| L8        | Tris- HCl (1 L) 1,5M<br>Tris 181,7 g<br>H <sub>2</sub> O 750 ml<br>HCl 37% pH einstellen auf 8,8<br>Auffüllen mit H <sub>2</sub> O auf 1 L                                 |            |
| L9        | Tris- HCl mit Proteasehemmer<br>Tris- HCl (L8) x ml<br>Proteasehemmer 0,5 M/ c=<br>10µl/ml   |            |
| L10       | 1 % Bromphenolblau- Lösung<br>Bromphenolblau 100 mg<br>Tris 60 mg<br>H <sub>2</sub> O 10 ml  |            |
| L11       | 2x Probenpuffer SDS- PAGE (für 10ml)<br>Tris 0,125M 0,1514 g   |            |

|     |  |  |
|-----|--|--|
|     | <b>ODER</b> Tris HCl 1,5M (L8) 833 µl<br>SDS 4 % 0,4 g<br>Glycerin 20% 2 ml<br>1% Bromphenolblau 0,004% 40 µl (L10)<br>H <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen<br>DTT 200mM 0,03085 g (für 1 ml, hinzugeben wenn gebraucht)   |  |
| L12 | <b>Laufpuffer 1X Tris-Glyzin (SDS- PAGE)</b><br>(für 1 Liter)<br>Tris Base 25 mM 3,0285 g<br>Glyzin 190 mM 14,2633 g<br>SDS 0.1% 1 g<br>H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen<br>pH auf 8,3 einstellen  |  |
| L14 | <b>10x TBS</b><br>24,2 g Tris<br>80 g NaCl<br>Einstellen des pH-Wertes mit ca. 20 ml 25 % HCl auf 7,6, anschließend mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen   |  |
| L15 | <b>TBS- T</b><br>100 ml 10× TBS (L14)<br>1 ml Tween-20<br>900 ml ddH <sub>2</sub> O  |  |
| L16 | <b>TBS- T ink</b><br>50 ml TBS-Tween (L15)<br>0,1 ml Fount India Ink (Pelikan)   |  |
| L18 | <b>Geltrocknungslösung (500 ml)</b><br>Ethanol 20 % 100 ml<br>Glycerin 10 % 50 ml<br>H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen   |  |
| L19 | <b>Entfärbelösung</b><br>Methanol 40 %<br>Essigsäure 10 %<br>H <sub>2</sub> O 50 %   |  |
| L20 | <b>Stripping Puffer (mild) (für 1 L)</b><br>Glyzin 200 mM 15 g<br>SDS 3,5 mM 1 g<br>Tween20 1 % 10 ml<br>HCl pH auf 2.2 einstellen<br>H <sub>2</sub> O auf 1 Lauffüllen  |  |
| L21 | <b>BSA Blocking Lösung für WB (für 100 ml)</b><br>BSA 5 g<br>TBST (L15) 100 ml   |  |
| L22 | <b>Homogenisierungspuffer (für 100 ml)</b><br>Kaliumchlorid 100 mM 0,745g<br>Tris 50 mM 0,61g<br>Magnesiumchlorid 5 mM 0,1g (6 H <sub>2</sub> O)<br>mit ddH <sub>2</sub> O lösen<br>auf pH 7,4 mit HCl einstellen<br>mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen |  |
| L23 | <b>Coomassie- Lösung</b><br>0,12% Coomassie Brilliant Blue G250<br>10% NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub><br>10% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>20% Methanol   |  |

#### Verwendete Chemikalien

| Name             | Firma         |
|------------------|---------------|
| TRIS             | GE Healthcare |
| Bromphenolblau   | GE Healthcare |
| Glyzin           | Merck         |
| SDS              | GE Healthcare |
| Natriumchlorid   | Merck         |
| Magnesiumchlorid | CalBioChem    |
| Kaliumchlorid    | Merck         |
| Glycerin         | GE Healthcare |
| Aceton           | ROTH          |
| DTT              | GE Healthcare |
| BSA              | Sigma Aldrich |
| Methanol         | ROTH          |
| Chloroform       | ROTH          |
| Mercaptoethanol  | AppliChem     |
| Tween 20         | Fluka         |
| Essigsäure       | ROTH          |
| Salzsäure        | ROTH          |

#### Verwendete Antikörper und Positivkontrollen

| Abkürzung | Bezeichnung   | Firma                       |
|-----------|---|-----------------------------|
|           | AK „ $\alpha$ 3C Tubulin (h) 293T Lysat“ (100 $\mu$ g/ 200 $\mu$ l)   | Santa Cruz<br>Biotechnology |
|           | AK „MYBPC1 monoclonal antibody (M01) clone 3G4“ (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)  | Abnova                      |
|           | AK „DLD monoclonal antibody (M02) clone 3C1“ (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)   | Abnova                      |
|           | AK „ $\alpha$ - Actinin (H-2)“ (0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l)   | Santa Cruz<br>Biotechnology |
|           | AK „anti- alpha Tubulin antibody (DM1A)“ (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)   | abcam                       |
|           | PK „MYBPC1 (Human) Recombinant Protein (Q01)“ (0,23 $\mu$ g/ $\mu$ l)   | Abnova                      |
|           | PK „ $\alpha$ - Tubulin Peptid“ (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)  | abcam                       |
|           | PK „Lipoamide Dehydrogenase Overexpression Lysate“ (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)   | Novus Biologicals           |
|           | PK „A-673 Cell Lysate“, (2,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)<br>Lysat von gutartigen Muskelkrebszellen (Rhabdomyom $\alpha$ - Zellen) | Santa Cruz<br>Biotechnology |

#### Verwendete Geräte:

| Abkürzung | Name                         | Firma                       |
|-----------|------------------------------|-----------------------------|
| G1        | Thermomixer comfort          | Eppendorf                   |
| G2        | Heraeus Fresco 17 centrifuge | Thermo Scientific           |
| G3        | Biofuge 28 RS                | Heraeus Sepatech            |
| G4        | Mini centrifuge C-1200       | National Labnet Co.,<br>USA |

|     |  |                       |
|-----|--|-----------------------|
| G5  | VWR international (Vortexschüttler)          |                       |
| G6  | Electrophoresis power Supply EPS 601         | GE Healthcare         |
| G7  | Novex Mini Cell X-Cell SureLock              | Invitrogen            |
| G8  | Vibramax 100 (Schüttler)                     | Heidolph              |
| G9  | Pipetten (10, 100, 1000, 5000 µl)            | Eppendorf Research    |
| G10 | Pipettenspitzen                              | Eppendorf             |
| G11 | Eppendorfgefäße                              | Eppendorf             |
| G12 | LA 230 S (Analysewaage)                      | Sartorius             |
| G13 | „Disruptor Genie“<br>(Homogenisierschüttler) | Scientific Industries |
| G14 | Photometer                                   |                       |
| G15 | Ultraturax                                   |                       |

## 2.2 Durchführung der Versuche

Für die Versuche wurden unterschiedliche humane Gewebearten verwendet. Zu Beginn des Projekts wurde mit Blut gearbeitet. Als sich abzeichnete, dass in diesem Material innerhalb der zur Verfügung stehenden Zeit keine reproduzierbaren Ergebnisse zu erwarten waren, wurden Proben vom Hüftbeugermuskel, Herzmuskel und dem Großhirn untersucht. Zum Schluss wurden die Untersuchungen auf den Hüftbeugermuskel konzentriert. Für die Untersuchung der Entwicklung der Proteindegradation wurden von größeren Gewebestücken kleinere Aliquots abgeteilt und in Eppendorfgefäßen bei entsprechend ausgewählten Bedingungen gelagert.

### 2.2.1 Lagerungsbedingungen der Proben

In diesem Projekt sollte die Proteindegradation bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen untersucht werden. Dafür wurden von frischem Probenmaterial Aliquots genommen und diese bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert.

Als Kontrolltemperatur wurden jeweils Proben genommen, die nur bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren waren. In diesen sollte sich über einen kurzen Zeitraum keine Veränderung der Proteinnengen zeigen. Um die Auswirkungen einer kühleren Umgebungstemperatur zu untersuchen, wurden die Probenaliquots bei  $+4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank gelagert. Auch hier war nur mit einer geringen Abnahme der Proteine zu rechnen, da die kühle Temperatur auch die Aktivität der für den Abbau verantwortlichen Enzyme verlangsamt. Zur Simulation der Entwicklung der Proteinabnahme bei Raumtemperatur wurden die Aliquots bei  $+20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Als letzte Temperatur wurden  $+45^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank verwendet, um die Entwicklung bei erhöhter Umgebungstemperatur zu simulieren.

Die Versuchsreihen für die Muskelproben wurden über unterschiedlich lange definierte Zeiträume durchgeführt. Hier wurden die Proben über 24 Stunden und vier Tage bei allen vier Bedingungen gelagert. Gegen Ende des Projekts wurden die Untersuchungen auf die Lagerung bei Raumtemperatur über eine Woche sowie die Lagerung im Brutschrank für drei Tage eingegrenzt. Bis auf die Lagerung im Brutschrank, bei der die Proben alle zwei Stunden genommen wurden, sind bei den anderen Versuchsreihen nur tageweise Proben untersucht worden.

Die Blutproben wurden nur im Gefrierschrank, im Kühlschrank und bei Raumtemperatur gelagert. Hier wurden keine genaueren Untersuchungen zum



unterschiedlichen Verhalten der Proteinabnahme gemacht, weil sich bei diesen keine Ergebnisse in der Detektion zeigten.

### 2.2.2 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung richtete sich zum Teil nach der untersuchten Gewebeart. Zum anderen kamen im Laufe des Projekts auch noch andere Methoden, wie die Homogenisierung mit Glasperlen, hinzu.

Das erste Gewebe bzw. die erste Körperflüssigkeit, die untersucht wurde, war Blut. Von diesem wurden 0,2 g in ein 15 ml Röhrchen eingewogen und mit 2 ml Tris- HCl mit Proteaseinhibitor (L9) als Homogenisierungspuffer versetzt. Dies wurde dann für 50 Sekunden mit Ultraschall homogenisiert. Dann wurden die Röhrchen für 30 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Für die Blutproben wurde keine Glasperlenhomogenisation durchgeführt.

Als nächstes Gewebe kam der Hüftbeugermuskel dazu. Von diesem wurden zwischen 0,1 und 0,4 g in die Röhrchen bzw. die Eppendorfgefäße eingewogen. Die Probe im Röhrchen wurde mit 4 ml Tris- HCl mit Proteaseinhibitor (L9) als Homogenisierungspuffer versetzt. Dann wurde das Muskelstück mit dem Ultraturrax (G15) homogenisiert und anschließend noch mal für 50 Sekunden mit Ultraschall beschallt. Die klein geschnittene Probe im Eppendorfgefäß wurde mit Glasperlen und 1 ml Homogenisierungspuffer (L22) versetzt und für 10 Minuten in dem entsprechenden Gerät (G14) geschüttelt. Um eine Zersetzung der Proteine durch zu viel Wärme zu vermeiden, wurde das Eppendorfgefäß danach für 20 Minuten ins Eis gestellt. Um eine gute Homogenisierung zu gewährleisten, wurde das Eppendorfgefäß dann noch mal 10 Minuten geschüttelt und anschließend abzentrifugiert.

Zwischendurch wurden auch Versuche mit Herzmuskel und Großhirn durchgeführt. Diese wurden wie der Hüftbeugermuskel mit dem Turrax und Ultraschall homogenisiert.

### 2.2.3 Proteinfällung

Für die Proteinfällung aus dem Homogenisat wurden während des Projekts zwei verschiedene Methoden angewandt. Zu Beginn des Projekts wurden die Proben mit Chloroform und Methanol nach Wessel (21) gefällt, gegen Ende mit Aceton im Gefrierschrank.

Während des Projekts wurde lange davon ausgegangen, dass sich das anfängliche Zielprotein Tubulin im Überstand des Homogenisats befindet. Daher wurde für die Fällung eine entsprechende Menge des Überstandes genommen und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die Menge wurde in mehreren Versuchen ermittelt und richtete sich danach, dass die Bahnen des Gels nicht überladen wurden und sich die Proteine in Banden auftrennen konnten. Meist betrug die verwendete Menge 50 – 100 µl für Muskelproben. Für Blutproben wurden meist 200 µl gefällt, was zu einer Überladung der Bahnen führte und durch entsprechende Reduzierung geändert wurde. Zum Ende des Projekts wurden auch Anteile der abzentrifugierten Pellets gefällt. Bei der Untersuchung zeigte sich, dass sich das Tubulin im Pellet befand.

Das Homogenisat im Eppendorfgefäß wurde mit 800 µl Methanol, 200 µl Chloroform und 600 µl Reinstwasser versetzt und kurz gemischt. Die Eppendorfgefäße wurden kurz zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu ermöglichen. Dann wurde das Methanol- Wassergemisch als oberste Schicht abgenommen und verworfen. Die gefällten Proteine schwammen auf dem Chloroform. In das Eppendorfgefäß wurden wieder 800 µl Methanol hinzugeben



und das ganze dann für 12 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Eppendorfgefäß offen stehen gelassen, damit das Pellet etwas abtrocknen konnte.

Die Acetonfällung hat nicht ganz so viele Schritte. Bei ihr wird das Eppendorfgefäß mit dem Homogenisat mit 1 ml im Gefrierschrank vorgekühltem Aceton versetzt. Das Eppendorfgefäß wird geschlossen, kurz gevortext und dann für eine Stunde in den Gefrierschrank gestellt. Danach wird es für 15 Minuten abzentrifugiert und das Aceton verworfen. Auch hier wird das Eppendorfgefäß offen stehen gelassen, um restliches Aceton zu verdampfen.

Beim Aceton zeigen sich mehr Proteine, die auch besser aufgetrennt werden, daher wurden die Proben für die Untersuchungen der Proteine  $\alpha$ - Actinin, Myosin bindendes Protein und Dihydropolyl Dehydrogenase nur mit Aceton gefällt.

#### 2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem 2D Quant Kit von GE Healthcare durchgeführt. Mit der Kenntnis des Proteingehalts lässt sich berechnen, wie viel Protein auf das Gel aufgetragen wird. Die Proteinbestimmung geschieht in Anlehnung an die Arbeit von O. Lowry. (22)

Für die Bestimmung des Proteingehalts werden die gefällten Proteinpellets in Homogenisierungspuffer (L22) resuspendiert. Es ist wichtig, darauf zu achten, dass man mit den verwendeten Puffern im selben Puffersystem bleibt, um die Ergebnisse gut vergleichen zu können. Von den resuspendierten Proben werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Proben sowie die entsprechenden Volumina der BSA- Standardlösung für die Standardkurve werden in Eppendorfgefäße pipettiert und dann mit 500  $\mu$ l fertiger „Precipitant“- Lösung sowie 500  $\mu$ l „Co-precipitant“- Lösung versetzt, geschüttelt und abzentrifugiert.

Der Überstand wird sorgfältig entfernt und die Eppendorfgefäße mit 100  $\mu$ l Kupferlösung, 400  $\mu$ l Reinstwasser und 1 ml Farbreagenz versetzt. Diese Mischung wird für 20 Minuten stehen gelassen und danach in Küvetten gefüllt. Diese werden bei 480 nm im Photometer (G15) vermessen. Aus den Werten der BSA- Standardkurve lässt sich eine Gleichung ermitteln, mit der der Proteingehalt der Proben berechnet werden kann. Ein Beispiel für eine solche Kurve zeigt Abb. 5. Die gemessenen Werte der Standardkurve werden in ein Diagramm eingetragen und es wird eine Trendlinie zur Ermittlung der entstandenen Geradengleichung durch die Punkte hindurch gelegt. Die genaue Berechnung wurde mit dem Programm Microsoft Excel durchgeführt.

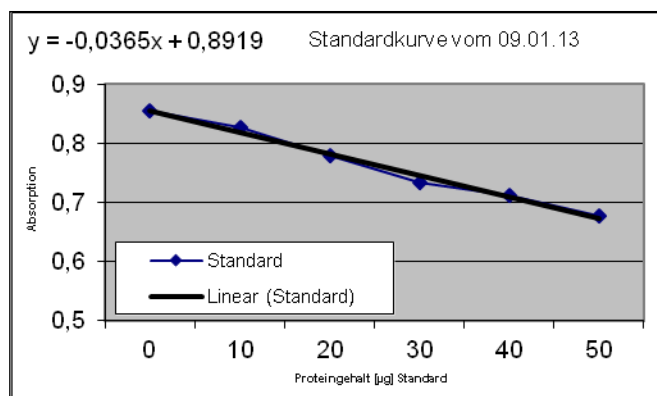


Abbildung 5: Darstellung der Standardkurve für die Proteinbestimmung vom 09.01.13

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung werden im Folgenden nicht weiter erörtert, da sie für die Durchführung des Projekts nicht genutzt wurden. Sie wären notwendig gewesen, wenn während des Projekts ein 2D- Gelelektrophorese durchgeführt worden wäre. Bei dieser muss man die aufgetragene Proteinmenge kennen, um sie noch gut mit der Isoelektrischen Fokussierung auftrennen zu können.

### 2.2.5 SDS- PAGE mit Minigelen

Zur Auftrennung der Proben wurde die SDS-PAGE verwendet. Es wurden fertige NuPAGE©- Gele der Firma Invitrogen verwendet, die einen Polymerisierungsgradienten von 4 – 12 % aufweisen. Die Gele befinden sich in Gelkassetten, die für das Einspannen in die Elektrophoresekammer von Invitrogen (G8) geeignet sind. Hier bilden zwei Gelkassetten eine Kammer, die mit Laufpuffer gefüllt wird. An der Außenseite der Kassetten befindet sich ein Gelfuß, der den Kontakt zur Anode ermöglicht.

Um die Proben im Gel aufzutrennen, müssen diese nach der Fällung erst wieder in Flüssigkeit gelöst werden. Dies wurde während des Projekts mit unterschiedlichen Lösungen gemacht. Zu Beginn wurden die Proteinpellets in 100 µl selbsthergestelltem 2x SDS- Probenpuffer (L11) resuspendiert. Es zeigte sich, dass diese Art der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE nicht korrekt war. Durch die große Menge an Probenpuffer wurden die Proteine sehr stark verdünnt und es lässt sich nicht genau sagen, wie viel Protein aufgetragen wurde. Daher wurde der selbstgemachte Probenpuffer durch fertigen 4x LDS- Puffer (L5) ausgetauscht und dieser in korrekter Weise verwendet. LDS steht für Lithium-Dodecyl Sulfat, eine Substanz, die sich in höheren Konzentrationen lösen lässt als SDS. Die Pellets wurden nun mit Homogenisierungspuffer (L22) ohne Proteaseinhibitor resuspendiert und die Proben wurden für das Auftragen auf das Gel extra zusammengemischt. Der LDS- Probenpuffer wurde in entsprechender Verdünnung eingesetzt und von der resuspendierten Proteinlösung wurden entsprechend kleinere Volumina verwendet, um diesen zu verdünnen. Da die Proteine auch weiterhin komplett denaturiert und reduziert vorliegen sollen, wird fertiges „Reducing Agent“ (L4) entsprechend hinzugegeben.

Die Proben, die mit dem selbstgemachten SDS- Puffer versetzt waren, wurden bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Für die Proben mit LDS- Puffer reichten 10 Minuten bei 70°C.

Während die Proben gekocht wurden, wurden die benötigten Gele für den Lauf vorbereitet. Sie wurden aus ihrer Verpackung mit Lagerungspuffer herausgenommen und kurz mit Wasser abgespült. Dann wurde der Kamm aus den Taschen herausgezogen und diese mehrmals mit Laufpuffer gespült. Zum Schluss wurden die Taschen mit Laufpuffer gefüllt und in die Elektrophoresekammer gestellt zum Befüllen der Taschen. Bis auf den Anfang des Projekts, wo ein selbsthergestellter Laufpuffer (L12) verwendet wurde, wurden alle Gele mit entsprechend verdünntem MOPS- Fertiglaufpuffer (L1) von Invitrogen durchgeführt. Dieser Puffer ist für eine Auftrennung von mittelgroßen Proteinen bei neutralem pH- Wert gut geeignet. (23)

Es wurden während dieses Projekts zwei verschiedene Marker verwendet. Am Anfang wurde der Marker „BenchMark Prestained Proteinladder“ der Firma Invitrogen verwendet. Nachdem der Verdacht aufkam, dass dieser die Molekulargewicht nicht richtig anzeigt, wurde der Marker „Novex Sharp Prestained Protein Standard“ der Firma Invitrogen verwendet. Die entsprechenden Molekulargewichte sind in Tabelle 1 dargestellt.

| BenchMark |         | Novex Sharp |               |
|-----------|---------|-------------|---------------|
| 1         | 180 kDa | 1           | 260 kDa       |
| 2         | 115     | 2           | 160           |
| 3         | 82      | 3           | 110           |
| 4         | 64      | 4           | 80            |
| 5         | 49      | 5           | 60            |
| 6         | 37      | 6           | 50            |
| 7         | 26      | 7           | 40            |
| 8         | 19      | 8           | 30            |
| 9         | 15      | 9           | 20            |
| 10        | 6       | 10          | 15            |
|           |         | 11          | 10            |
|           |         | 12          | 3,5 (bei MES) |

**Tab. 1: Darstellung der Molekulargewichte der verwendeten Marker**

Für das Pipettieren der Proben gibt es unterschiedlichen Methoden. Bei der einen werden die Gele eingespannt und die innere Kammer mit Laufpuffer gefüllt, bevor die Proben pipettiert werden. Bei der anderen wurden die Proben in das stehende Gel pipettiert und dieses danach in die hintere Position gebracht. Dies war möglich, da meistens nur ein Gel verwendet wurde und dieses in der hinteren Position besser gekühlt wurde. Nach dem Pipettieren wurde das Gel eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Methoden und die letztere wurde meistens verwendet. In die Geldaschen passen je nach Taschenanzahl 10 – 20 µl Probenvolumen.

Nachdem die äußere Kammer mit Laufpuffer gefüllt wurde und der Laufpuffer in der inneren Kammer noch mit Antioxidant (L3) versetzt wurde, konnte die Elektrophoresekammer (G8) an die Spannungsquelle (G7) angeschlossen und der Lauf gestartet werden. Für den Lauf wurden 200 V, 250 mA, 30 W eingestellt und er dauerte bis zu 57 Minuten, so lange bis die Farblinie den Gelfuß erreicht hatte. Dann wird die Spannung ausgemacht und die Kammer von den Kontakten getrennt. Der Laufpuffer wird verworfen und die Gelkassetten entspannt und kurz mit Wasser abgewaschen.

Nach der SDS- PAGE werden die Gele entweder direkt für den Proteintransfer im WesternBlot verwendet oder sie werden mit Coomassie (L23) gefärbt.

### 2.2.6 Westernblot der Mini- Gele

Da sich die Proteine nicht weiter im Gel analysieren lassen, müssen diese da heraus geholt werden. Dies wird mit einem WesternBlot gemacht. Bei diesem werden die Proteine auf eine Membran übertragen, binden an diese und können dann auf der Membran weiter untersucht werden.

Zur Vorbereitung des WesternBlots wird die Gelkassette geöffnet und vom Gel die Taschen sowie der Gelfuß abgetrennt. Zur Orientierung wird die linke obere Ecke ebenfalls entfernt. Das Gel wird dann für 20 Minuten im Transferpuffer (L2) gewaschen. Während dieser Zeit werden die Membran und das benötigte Filterpapier zugeschnitten. Die Membran wird anschließend mit Methanol befeuchtet und mit Reinstwasser abgespült. Dann wird sie für fünf Minuten ebenfalls in Transferpuffer gelegt.

Zur Proteinübertragung muss eine Spannung angelegt werden, die die Proteine aus dem Gel auf die Membran zieht. Dazu werden Gel und Membran zu einem Blottingstapel zusammengesetzt. Dieser wird in die Transferkassette gelegt, so dass die Membran zur Anode gerichtet ist. Die Transferkassette wird in die

Transferkammer (G8) gestellt und entsprechend zusammengedrückt. Dann wird die innere Kammer mit dem Blottingstapel mit Transferpuffer gefüllt. In die äußere Kammer muss nur mit Wasser zur Kühlung gefüllt werden.

Die Spannungsquelle (G7) wird auf 30 V, 200 mA, 30 W eingestellt und der Transfer nach einer Stunde beendet. Nach dem Ende des Transfers wird die Kassette auseinander genommen und die Schichten des Stapels entsprechend verteilt, die Membran wird mit Wasser gewaschen und anschließend detektiert und das Gel wird in Coomassielösung (L23) über Nacht gefärbt.

Bei diesem Schritt gab es am Anfang des Projekts das Problem, dass der Blottingstapel in der falschen Reihenfolge aufgebaut wurde und die Proteine nicht auf die Membran transferierten. Auch wurden die ersten Transfers ohne Methanol im Transferpuffer durchgeführt, was zu einer ungenaueren Proteinübertragung führte.

### **2.2.7 Detektion der Membran**

Die Detektion wurde meistens mit dem fertigen Kit „WesternBreeze“ von der Firma Invitrogen durchgeführt.

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF- Membran wird diese zweimal mit Reinstwasser gewaschen. Dann wird die Membran für 30 Minuten in der aus dem Kit vorbereiteten Blocking- Lösung inkubiert. Diese wird wieder zweimal mit Reinstwasser abgespült und kommt danach in die vorbereitete Primärantikörperlösung, in der der Primärantikörper verdünnt wurde. Für das Projekt wurde zumeist eine Verdünnung von 1:1000 verwendet, aber es wurde auch mit anderen Verdünnungen experimentiert.

In dieser Lösung wurde die Membran für eine Stunde inkubiert und danach viermal mit der entsprechend hergestellten Waschlösung für 5 Minuten gewaschen. Dann wurden 10 ml der fertigen Sekundärantikörperlösung auf die Membran gegeben und diese für 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Auch der Sekundärantikörper wurde je viermal 5 Minuten mit der Waschlösung abgewaschen. Anschließend wurde die Membran noch mehrmals mit Reinstwasser gewaschen. Auf die nun mit Antikörpern fertig versehene Membran wurden 5 ml des fertigen Farbreagens gegeben. Eine Färbung trat zwischen 15 und 30 Minuten auf.

Zu Beginn des Projekts wurden die Waschschrte nicht genau eingehalten, was dazu führte, dass die Membran stark rosa gefärbt wurde. Auch wurden während des Projekts andere Inkubationszeiten ausprobiert, da sich bei dem damaligen Zielprotein Tubulin kein Signal zeigte.

### **2.2.8 Strippen der Membran und Färben mit Tinte**

Die Membran konnte nach der Detektion mit einem Antikörper weiter verwendet werden. Sie konnte gestrippt, d. h. von den Antikörpern befreit, und neu detektiert werden oder sie konnte gefärbt werden, um zu überprüfen, wie gut die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen wurden. Beide Verfahren wurden zeitweise während des Projekts angewandt.

Zu Beginn des Projekts wurden die detektierten Membranen gefärbt, um den Proteintransfer einzuschätzen. Dafür wurde die Membran, wenn sie trocken war, erst wieder mit Methanol und Wasser angefeuchtet und dann mit einer Lösung aus TBS-T Puffer und indischer Tinte (L16) gefärbt. Die Farbmoleküle der Indischen Tinte binden sich an die Proteine und macht diese dadurch sichtbar.

Es stellte sich heraus, dass die Proteine auf den Membranen direkt nach der Detektion noch von den Antikörpern verdeckt wurden und daher von der

Tintenlösung nur schlecht angefärbt wurden. Deswegen wurde entschieden, die Membran vor dem Färben zu strippen.

Für das Strippen der Antikörper gibt es verschiedene Methoden. Für dieses Projekt wurde ein saurer Stripping Puffer mit Glyzin, SDS und Tween20 (L20) verwendet. Die Membran wurde in diesem Puffer für zweimal 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Membran in TBS und TBS-T Puffer (L15) geschüttelt und konnte danach mit der Tintenlösung gefärbt werden.

### **2.2.9 Behandlung des Gels nach der SDS- PAGE**

Nach der SDS- PAGE wurden die Gelkassetten geöffnet und die Taschen sowie der Gelfuß von Gel abgetrennt. Zur Orientierung wurde bei allen Gelen die obere linke Ecke abgetrennt.

Nach der SDS- PAGE wurde das Gel entweder für den Proteintransfer im WesternBlot vorbereitet (s. 2.2.6) oder direkt in der vorher hergestellten Coomassielösung (L23) gefärbt.

In dieser Färbelösung wurde das Gel über Nacht auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gefärbt. Am nächsten Tag wurde die Coomassie- Lösung zur Wiederverwendung aufbewahrt und das Gel kurz mit Wasser von überschüssigem Coomassie befreit.

Um die Banden gut sehen zu können, musste das Gel nach dem Färben etwas entfärbt werden. Dafür wurde es für zweimal 15 Minuten in eine Entfärbelösung (L19) aus Essigsäure, Methanol und Wasser gelegt.

Wenn das Gel erst nach dem Blot gefärbt wurde, waren meistens keine oder nur sehr wenige Banden auf dem Gel geblieben. Dann wurde auf das Trocknen des Gels verzichtet, da darauf nichts aussagekräftiges zu sehen war, außer das der Proteintransfer auf die Membran sehr gut gewesen ist.

Für eine längere Aufbewahrung konnte das Gel getrocknet werden. Das ausreichend entfärbte Gel, in dem die Banden gut sichtbar waren und der Hintergrund relativ klar, wurde für 20 Minuten in eine Lösung aus Ethanol, Glycerin und Wasser (L18) gelegt. Diese Lösung ist gut geeignet, damit das Gel auch nach dem Trocknen noch flexibel bleibt. Während das Gel in dieser Lösung lag, wurden zwei Cellophanblätter in Wasser eingeweicht. Zum Trocknen wurde dann ein nasses Cellophanblatt auf eine geschlossene Plastikplatte gelegt und die eingeschlossenen Luftblasen herausgedrückt. Auf dieses Blatt wurde das eingelegte Gel gelegt und mit der Geltrocknungslösung übergossen. Dann wurde das zweite Cellophanblatt darauf gelegt und wieder alle Luftblasen herausgedrückt. Um zu gewährleisten, dass sich das Gel beim Trocknen nicht zusammenzieht, wird auf diesen Stapel eine zweite Plastikplatte mit einer Öffnung in der Mitte gelegt. Diese wird mit Clips an der ersten befestigt und die ganze Apparatur über Nacht horizontal bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Morgen werden die Clips entfernt und das überflüssige Cellophan abgeschnitten. Das Gel kann nun eingescannt oder abgeheftet werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Anmerkungen zu den dargestellten Ergebnissen

Wenn in den folgenden Ausführungen von Überstand und Pellet die Rede ist, so sind mit Überstand alle Proteine gemeint, die sich durch die Homogenisationsmethode aus dem jeweiligen Gewebe extrahieren ließen, wie in Abschnitt 2.2.2 beschreiben, und mit Pellet sind all die Proteine gemeint, die sich aus einem Anteil des abzentrifugierten Pellets fällen und resuspendieren ließen. Für die Homogenisation wurde das gewogene Gewebestück klein geschnitten. Dies reichte aber nicht aus, damit das Gewebe vollständig durch die Glasperlen oder den Turrax aufgelöst wurde. Daher blieben immer die klein geschnittenen Gewebestücke zurück. Ein solches Stückchen wurde dann für die Fällung verwendet. Gerade der Umgang mit dem Pellet ist keine genau zu quantifizierende Methode, da es nicht messbar ist, wie viel Protein sich aus dem Pellet wieder gelöst hat und wie viel vorher darin war.

Das Pellet der abzentrifugierten Proben wurde trotzdem untersucht, weil es möglich war, dass das gesuchte Zielprotein  $\alpha$ -Tubulin durch die angewendete Methode zur Probenaufbereitung nicht gelöst wurde und deswegen auch nicht detektiert werden konnte, wie in Abb. 21 zu sehen bzw. entsprechend nicht zu sehen ist. Die Untersuchungen der Pellets zeigten deutliche Signale in den entsprechenden Proben, allerdings ließen sich diese nicht genau als  $\alpha$ -Tubulin identifizieren, da die verwendete Positivkontrolle eines Tubulin-Peptids nicht markiert wurde.

Weiterhin ist anzumerken, dass die detektierten Membranen für die Verwendung in dieser Arbeit eingescannt wurden und durch das bildgebende Scanverfahren zum Teil wichtige, auf jeden Fall aber interessante Informationen verloren gingen, da die teils schwach sichtbaren Banden vom Scanner nicht erfasst wurden. An den relevanten Stellen wird auf die Originalmembranen verwiesen.

#### 3.2 Verbesserung der Durchführung

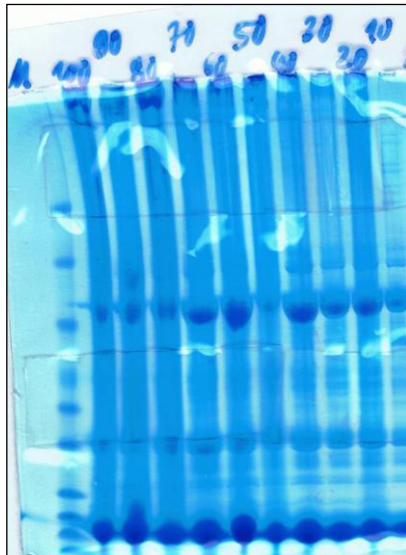
Während des Projekts wurden einige Versuche durchgeführt, die vor allem der Verbesserung der verwendeten Methode dienen. Die entsprechenden Versuche und die daraus gewonnenen Erkenntnisse werden in diesem Abschnitt kurz dargestellt, da sie für das Erreichen einer aussagekräftigen Visualisierung notwendige Schritte gewesen sind.

Zu Beginn des Projekts war es wichtig eine Methode zu entwickeln. Durch ein vorhergehendes Projekt zur Untersuchung der Proteindegradation gab es eine Methode, die für dieses Projekt als Grundlage verwendet und entsprechend angepasst wurde. So wurden die selbst hergestellten Lösungen aus diesem Protokoll während des Projekts gegen Fertiglösungen der Firma Invitrogen ausgetauscht.

Auch mussten die Protokolle für die Homogenisierung und die Fällung der Proteine angepasst werden. So waren die Bahnen der Gele mit einer Proteinlösung aus 200  $\mu$ l resuspendiertem Überstand stark überladen und es fand keine Auftrennung in Banden statt.

Um hier die optimale Menge zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen angesetzt und geguckt, ab wann die beste Auftrennung der Proteine erreicht war. Eine solche Verdünnungsreihe sieht man für Blutproben in Abb.6.

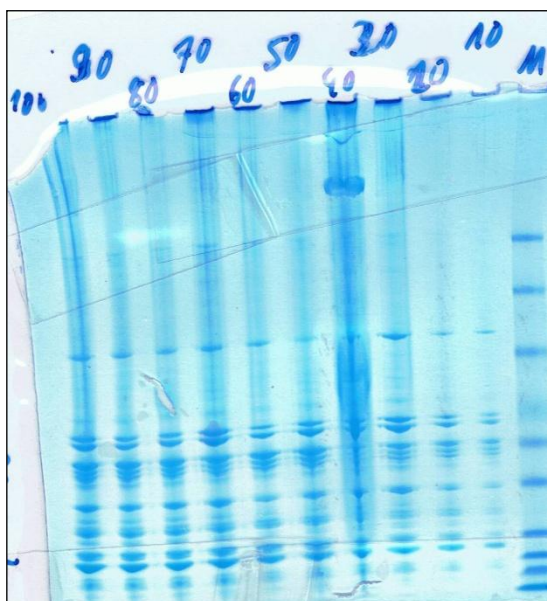




**Abbildung 6: Auftragung einer Verdünnungsreihe von Blut; Mischung aus alten Blutprobenaliquots hergestellt und homogenisiert; für die Verdünnungsreihe jeweils 100, 90, 80 etc. µl Überstand des Homogenisats mit Chloroform und Methanol gefällt und in 100 µl SDS- Probenpuffer resuspendiert**

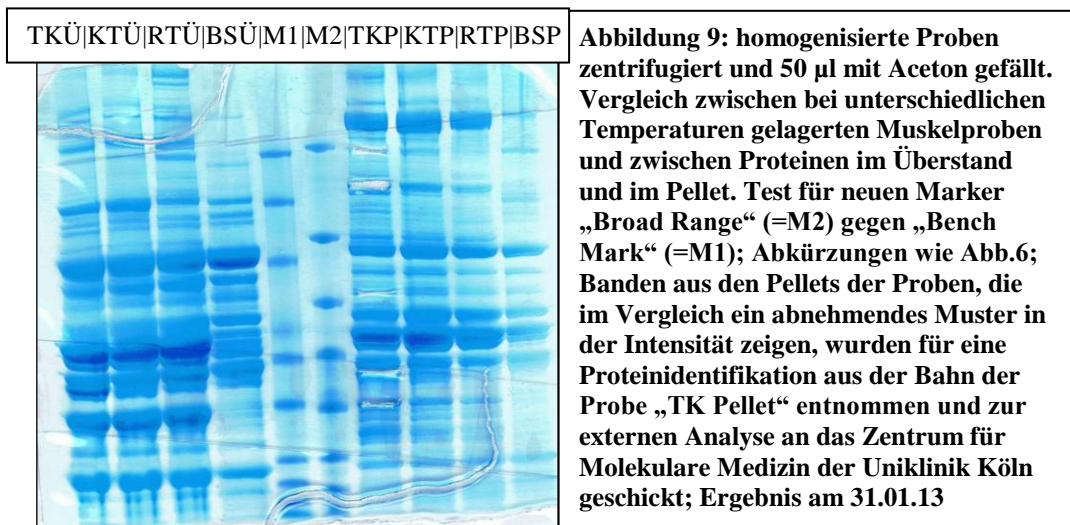
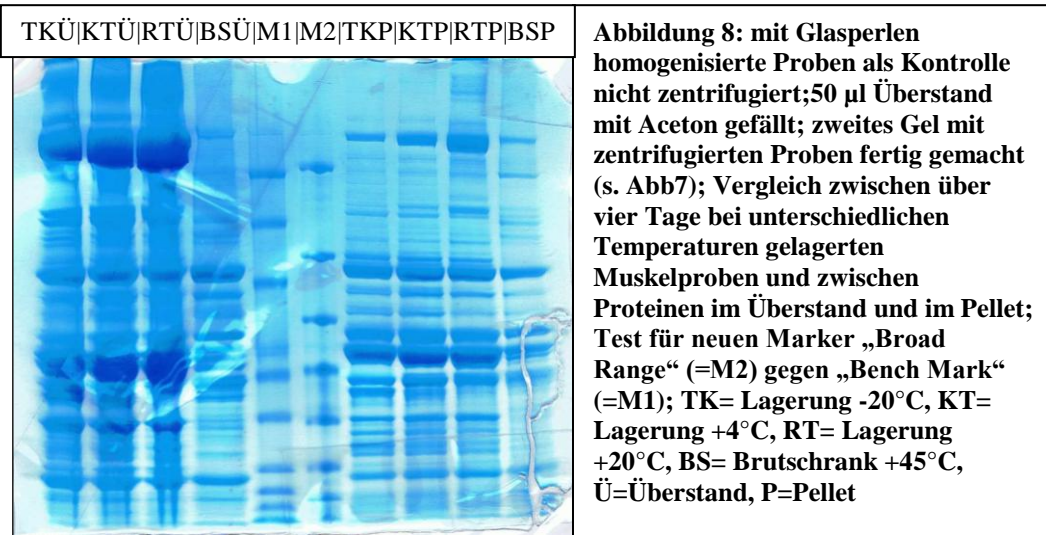
Es zeigt sich, dass sich die Blutproben erst bei einer Verwendung von 50 µl oder weniger anfangen sich aufzutrennen. Daher wurden für die folgenden Versuche mit Blutproben nur noch maximal 50 µl gefällt.

Da sich mit der Verwendung von Blut keine Signale bei  $\alpha$ - Tubulin finden ließen, wurde als weiteres Gewebe der Hüftbeugermuskel hinzugenommen. Um die Versuche von Anfang an mit der richtigen Menge an Homogenisat durchzuführen, wurde als erstes eine Verdünnungsreihe nach demselben Prinzip wie beim Blut durchgeführt. Es wurde ein Stück Muskel mit dem Turrax homogenisiert und von dem Überstand des abzentrifugierten Homogenisats wurden entsprechend 100, 90, 80, 70 usw. µl abgenommen und gefällt. Das Ergebnis dieser Verdünnungsreihe zeigt sich in Abb. 7. Wie zu sehen ist, gibt es auch bei dem Einsatz von 100 µl Homogenisat keine Probleme mit der Auftrennung. Für die nächsten Versuche wurden dann zunächst auch 100 µl eingesetzt. Allerdings zeigte sich, dass die Auftrennung bei 50 µl besser reproduzierbar war und es wurden dann nur noch 50 µl Homogenisat gefällt.



**Abbildung 7: Durchführung einer Verdünnungsreihe einer Muskelprobe zur Bestimmung der optimalen Menge an Überstand zum Auftragen auf ein Gel, mit dem eine gute Auftrennung erreicht werden kann. Als Marker wurde BenchMark verwendet**

Zu einer optimierten Auftrennung war die Zentrifugation der homogenisierten Proben ein wichtiger Bestandteil, wie Abb. 8 und 9 im Vergleich zeigen. Beide Gele haben dieselbe Probenreihenfolge, der einzige Unterschied zwischen ihnen besteht darin, dass die Proben in Abb. 8 nach der Homogenisierung nicht zentrifugiert wurden, sondern der Überstand gleich mit Aceton gefällt wurde. Es zeigt sich, dass die Auftrennung gerade in den Proben des Überstandes sehr viel klarer ist, wenn die Proben vorher abzentrifugiert wurden.

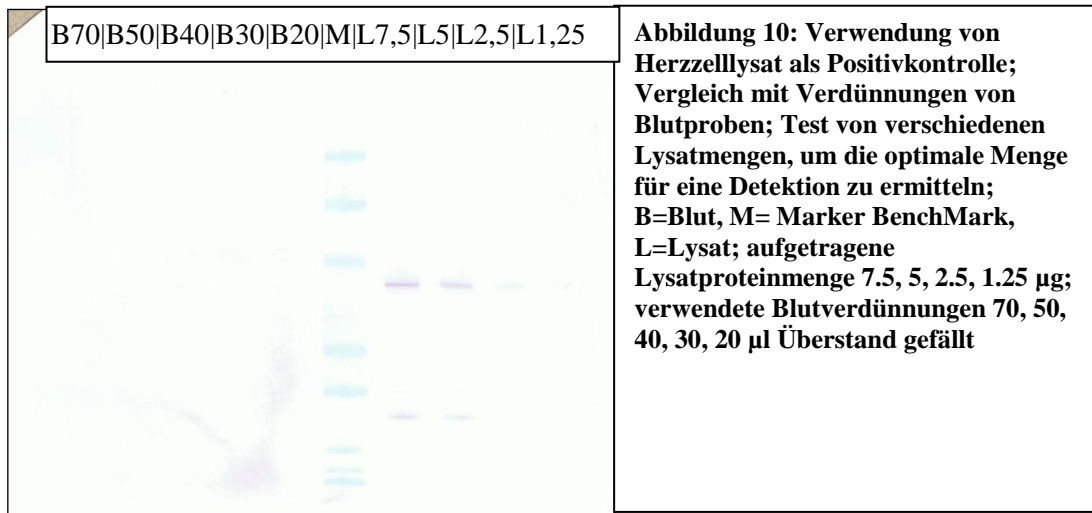


Lange gab es bei diesem Projekt das Problem, dass sich bei der Detektion mit dem  $\alpha$ -Tubulin-Primärantikörper kein Signal zeigte. Um die Funktionsfähigkeit der Detektion sicherzustellen, wurde das Herzzelllysate einer Maus als Positivkontrolle eingesetzt. In diesem sollte  $\alpha$ -Tubulin enthalten sein. Um sicherzustellen, dass genug Protein für eine Detektion aufgetragen wird, wurden unterschiedliche Mengen des Lysats aufgetragen. Zum Vergleich wurden mehrere Verdünnungen von Blutproben verwendet.

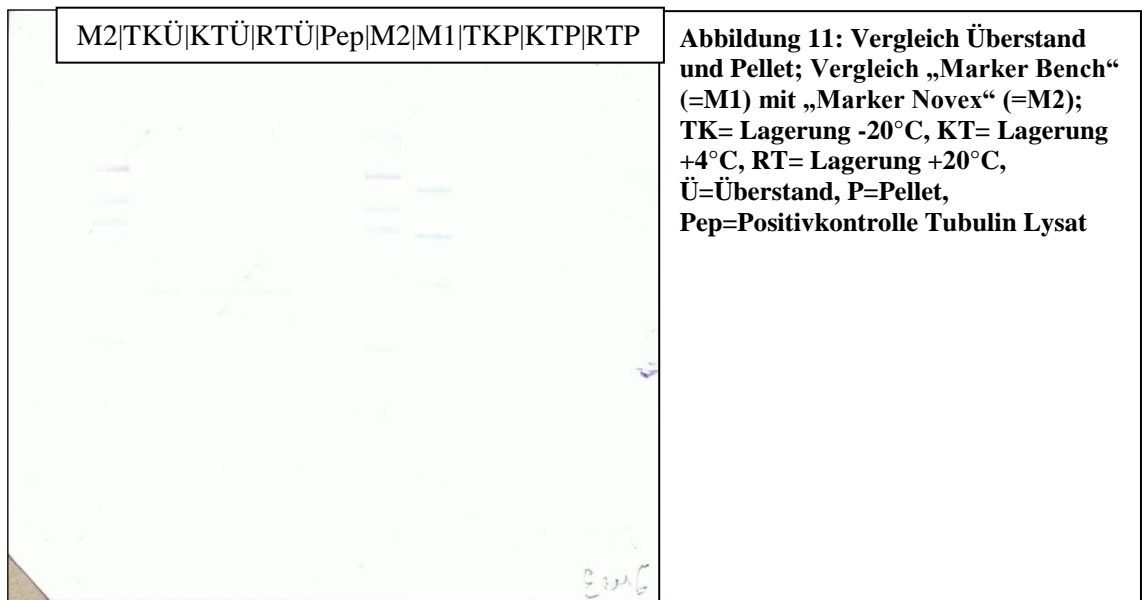
Wie Abb. 10 zeigt, gab es in dem Lysat gleich zwei Signale in den Bahnen mit 7,5 und 5 µg Proteinauftrag. Auffällig ist, dass bei beiden Bahnen zwei Banden markiert wurden. Laut Marker liegt die obere Bande zwischen 64 und 82 kDa. Dies wäre eigentlich für Tubulin von 55 kDa zu hoch. Allerdings befindet sich die Bande, die auch stärker markiert wurde als die untere zwischen 26 und 37 kDa, auf der Höhe, wo man ein Protein der mittleren Größe wie Tubulin erwarten



würde. Daher kam der Verdacht auf, dass der Marker keine korrekten Molekularmassen anzeigt und die Proteine in diesem Marker vielleicht schon etwas denaturiert sind.

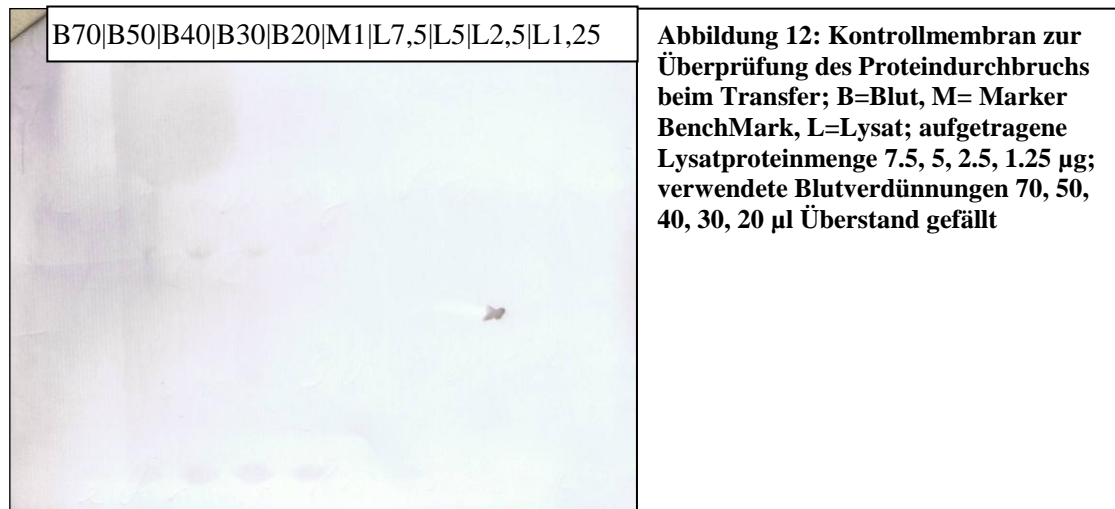


Ein späterer Versuch mit einem Vergleich zwischen dem alten Marker „BenchMark“ und einem bisher weniger genutzten bestätigte diesen Verdacht. Wie in Abb. 11 zu sehen ist, ist der alte Marker mit den blauen Banden gegen den neuen mit rosa Banden stark versetzt. Auf der Originalmembran liegt die erste Bande des alten Markers (180 kDa) zwischen der zweiten und dritten Bande des neuen (160- 110 kDa). Diese Verschiebung bleibt bis zum Ende bestehen, ist aber bei den niedrigeren Gewichten ab 30 kDa nicht mehr so ausgeprägt. Nach diesem Versuch wurde nur noch der neue Marker „Novex Sharp“ für die weiteren Versuche verwendet.



Da es über einen langen Zeitraum des Projekts kein eindeutiges Signal bei der Detektion gab, kam der Verdacht auf, dass die Zeit für den Proteintransfer auf die Membran vielleicht zu lange sein könnte und die Proteine durch die Membran hindurchgewandert sein könnten. Diese Theorie wurde mit einer zweiten Membran, die direkt hinter die erste gelegt wurde, überprüft. Wie Abb. 12 zeigt, sind von den Blutproben nur die mengenstärksten Proteine

durchgeblottet. Dies war also auch nicht die Ursache für die fehlgeschlagene Detektion von  $\alpha$ - Tubulin.



Da im Laufe des Projekts auch unterschiedliche Homogenisierungsmethoden angewendet wurden, wurde ein Versuch zur Ermittlung der besten Methode durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 13 zu sehen.

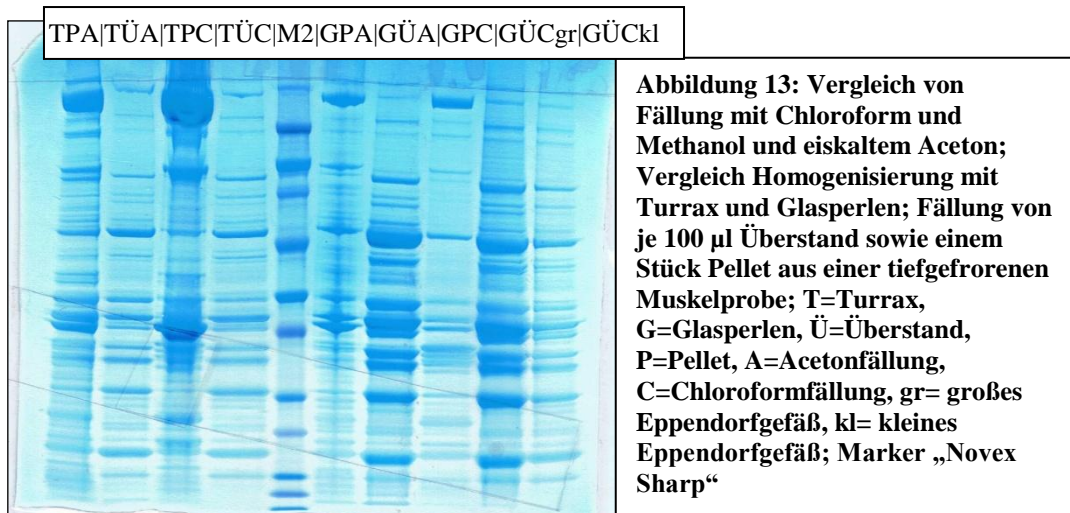
Zur Durchführung wurden von einer Muskelprobe zwei Aliquots abgewogen. Das eine wurde mit dem Turrax und anschließend mit Ultraschall behandelt, das andere wurde mit Glasperlen versetzt und in dem entsprechenden Schüttler (G14) homogenisiert. Für die Untersuchung der besten Fällungsmethode wurden dann von beiden Proben jeweils zweimal Überstand und ein Stück vom Pellet genommen und entweder mit Methanol und Chloroform oder mit eiskaltem Aceton gefällt. Dies ergab insgesamt acht Proben. Die neunte ergab sich daraus, dass überprüft werden sollte, welche Auswirkungen es auf die Auftrennung hatte, wenn man die Proben statt in einem großen 1,5 ml- Eppendorfgefäß in einem kleinen 0,5 ml- Eppendorfgefäß kocht. Der Heizblock ist für 1,5 ml- Eppendorfgefäße ausgelegt und viele der vorhergehenden Versuche wurden mit den kleinen Eppendorfgefäßen durchgeführt. Dadurch konnte es sein, dass die angestrebte Temperatur von 95 bzw. 70°C in den Proben auf Grund des fehlenden Materialschlusses nicht erreicht wurde.

Es zeigt sich, dass durch die Glasperlen mehr Proteine aus dem Muskel herausgelöst werden können als mit dem Turrax, da die Banden bei den Proben aus den Überständen mit Glasperlenhomogenisierung intensiver sind und auch zahlreicher aufgetrennt wurden. Bei den Proben, die mit dem Turrax homogenisiert wurden, sind in den Proben aus den Überständen nur relativ wenige Banden zu sehen. Dies lässt darauf schließen, dass der Turrax die Zellen im Gewebe nicht gut aufschließt und weniger Proteine in Lösung bringt. Es sind noch sehr viele Proteine in den Pellets zu sehen, während sich bei den Proben mit der Glasperlenhomogenisierung genau das Gegenteil zeigt. Hier sind wenige Banden im Pellet der Proben zu sehen und sehr viele im Überstand der Proben. Dies führte zu der Entscheidung, dass für alle weiteren Versuche die Proben mit Glasperlen homogenisiert wurden.

Zwischen den Fällungsarten gibt es keinen klaren Favoriten. Bei der Acetonfällung sind die Banden etwas schärfer, weshalb die Proben für weitere Versuche mit Aceton gefällt wurden.

Der Vergleich zwischen großem und kleinem Eppendorfgefäß zeigt deutlich, dass mehr Proteine im großen Eppendorfgefäß denaturiert wurden als im kleinen. Für

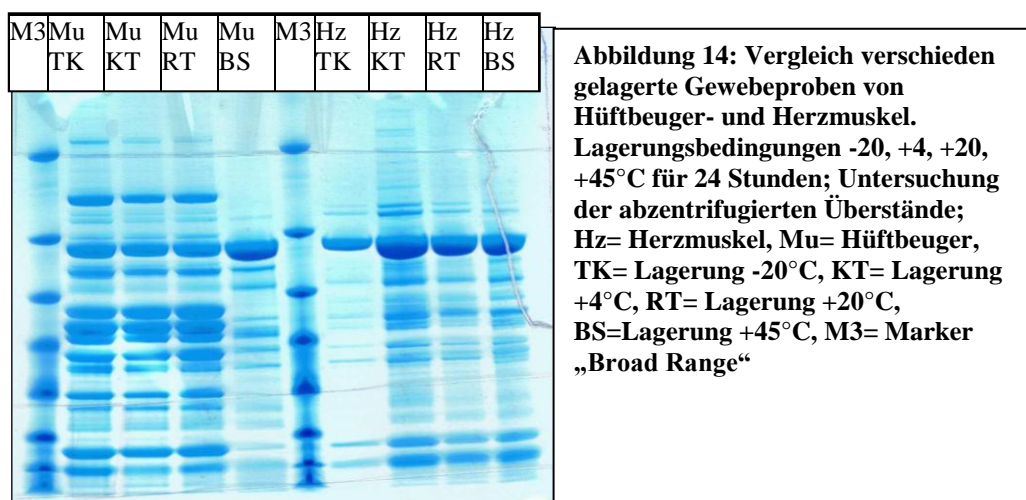
die weiteren Versuche wurden 1,5 ml Eppendorfgefäße für die Denaturierung verwendet.



### 3.3 Aussagen über das Proteinverhalten in den Gelen

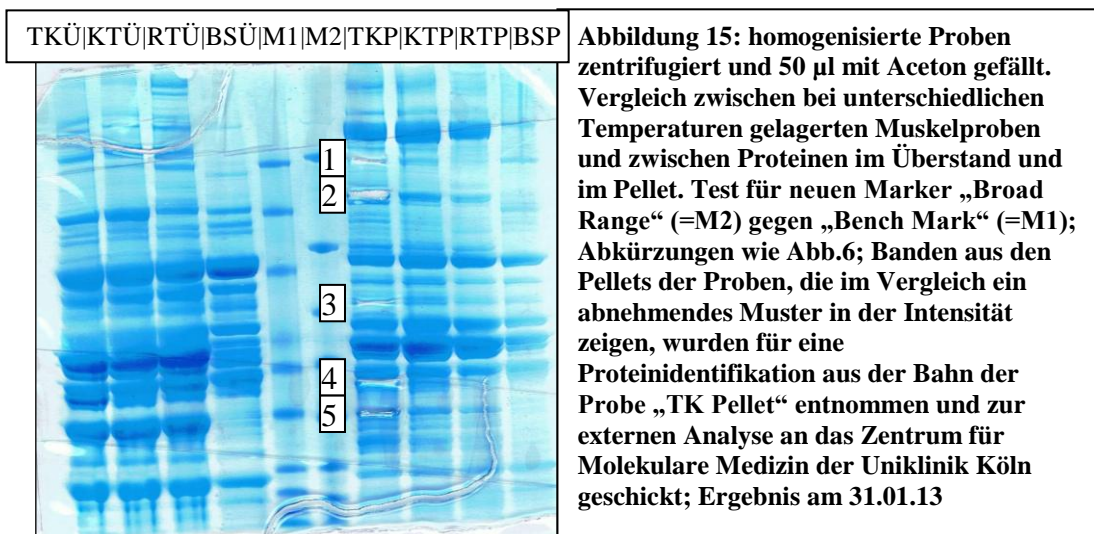
Ziel dieses Projekts war es, die Degradation von  $\alpha$ -Tubulin zu untersuchen. Nachdem die Auftrennung der Proteine im Gel sichergestellt war, konnten die Untersuchungen zum Proteinabbau durchgeführt werden.

Als erste Zeitspanne wurde eine Lagerung über 24 Stunden vorgenommen. Das Gel in Abb. 14 zeigt die aufgetrennten Proben. Wie zu sehen ist, verändern sich die Proteine innerhalb dieses relativ kurzen Zeitraums nur sehr wenig. Nur bei den Proben, die im Brutschrank gelagert wurden, ist eine deutliche Abnahme der Proteinmenge zu erkennen. Die Banden in den Proben des Herzmuskels sind von ihrer Intensität nicht so stark ausgeprägt wie die bei den Proben des Hüftbeugers. Dies könnte daran liegen, dass sich die Proteine aus dem Herzmuskel nicht so gut in Lösung bringen ließen. Außerdem wurden die Proben für diesen Versuch mit Aceton gefällt. Vielleicht wurden dabei nicht so viele gefällt und diese wenigen dann nur resuspendiert.



Es zeigte sich, dass bei einer Lagerung über 24 Stunden kaum Veränderungen auftreten. Daher wurde eine neue Versuchsreihe mit einer Lagerung bei denselben Temperaturen über fünf Tage durchgeführt. Ein weiteres Ziel dieser Versuchsreihe war auch ein Screening für weitere Proteine, die ein abnehmendes

Verhalten über diesen Zeitraum zeigen, da sich bei der Detektion von Tubulin weiterhin kein eindeutig als Tubulin identifizierbares Signal zeigte. Für diese Versuchsreihe wurden nur noch Proben vom Hüftbeuger gelagert. Es wurden auch die Unterschiede zwischen den Proteinen im Überstand des Homogenisats sowie den Proteinen, die sich noch aus dem zurückbleibenden Pellet fällen ließen, untersucht. Das Ergebnis zeigt Abb. 15. Die erkennbaren Löcher im Gel stammen von der Entnahme der entsprechenden Banden für eine externe Proteinidentifikation. Wie zu sehen ist, nimmt die Menge dieser Proteine innerhalb der Zeitspanne kontinuierlich ab. Dieses Gel zeigt auch deutlich, dass sich im Überstand sehr viele Proteine befinden, die auch über diesen längeren Zeitraum stabil geblieben sind.

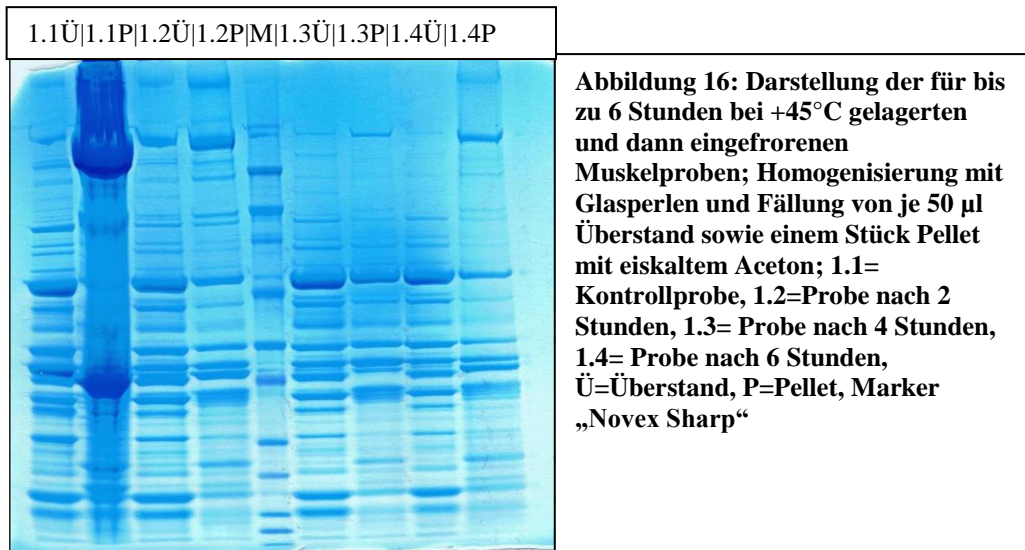


Die Proteinidentifikation ergab, dass es sich bei den Proteinen (im Gel, von oben) um Myosin Binding Protein C (MYBP, 1),  $\alpha$ - Actinin (ACTN, 2), Dihydrolipoyl Dehydrogenase (DLD, 3), Malat- Dehydrogenase (4) und Karbonische Anhydrase (5) handelt. Für die weiteren Untersuchungen wurden Antikörper gegen MYBP, ACTN und DLD sowie passende Positivkontrollen bestellt und für die letzten Versuchsreihen verwendet.

Nach der Untersuchung über fünf Tage wurden die weiteren Untersuchungen auf die zwei Temperaturen mit dem meisten Veränderungspotential konzentriert. Es wurde eine Versuchsreihe bei Raumtemperatur über acht Tage und eine Untersuchung im Brutschrank über drei Tage durchgeführt.

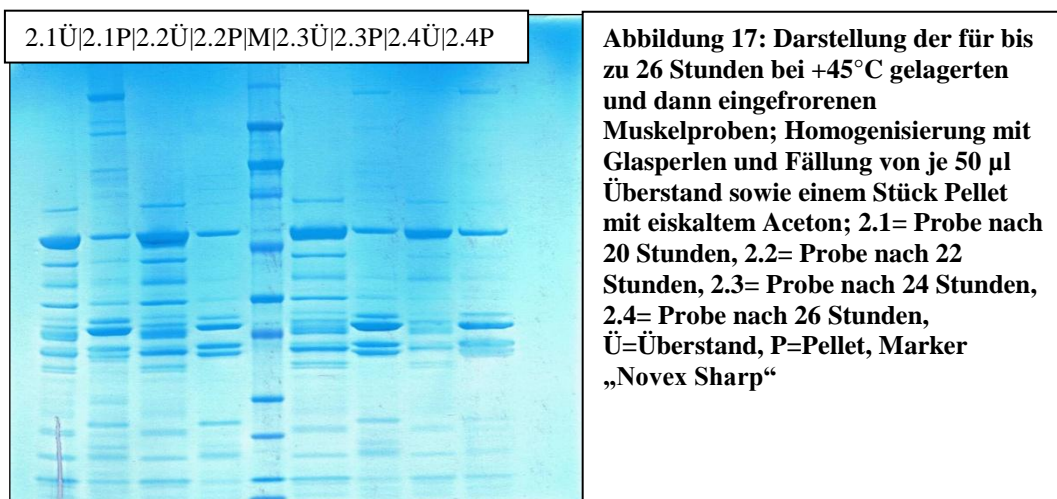
Die Abb. 16, 17 und 18 zeigen die Ergebnisse der Versuchsreihe aus dem Brutschrank. Für diese Versuchsreihe wurden Proben vom Hüftbeugermuskel aliquotiert und bei +45°C im Brutschrank gelagert. Alle zwei Stunden wurde dann eine Probe genommen und sofort eingefroren. Am nächsten Tag wurden dann alle Proben eines Tages gemeinsam homogenisiert und analysiert. Auch wurden wieder die Proteine vom Überstand und Pellet miteinander verglichen.



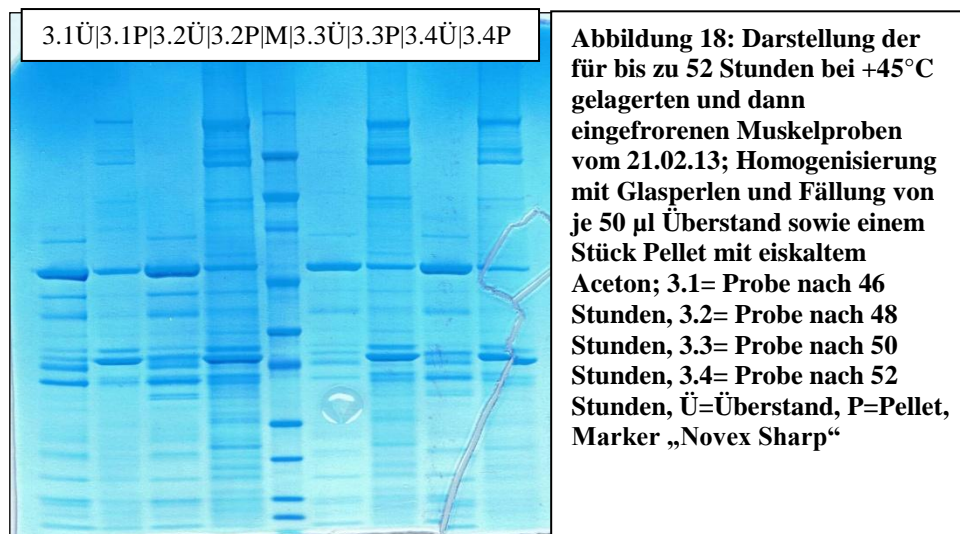


Es zeigt sich in Abb.16, dass die Proteinabnahme am ersten Tag noch sehr gering ist. Sie zeigt sich zuerst in den Pelletproben ab 1.2 und nicht sehr ausgeprägt in den Überstandproben ab 1.3.

Zwischen der letzten Probe des ersten Tages, die sechs Stunden nach Versuchsbeginn genommen wurde, und die ersten Probe des zweiten Tages liegen 18 Stunden. Wie in Abb.17 zu sehen ist, findet in dieser Zeit ein starker Abbau der Proteine sowohl im Überstand als auch im Pellet statt. Auch der Abbau innerhalb der beobachteten sechs Stunden ist, besonders in den Proben aus dem Überstand, auffällig. Dort nehmen zwischen den Proben 2.3 und 2.4 sehr viele Proteinbanden sehr stark an Intensität ab. Dieser starke Abbau ist in den Proben aus den Pellets bereits zwischen den Proben 2.1 und 2.2 zu sehen. Es scheint, dass die Proteine im Pellet nicht ganz so stabil sind wie die im Überstand. Ebenfalls auffällig ist, dass die Proteine im oberen sowie im unteren Drittel des Gels nur sehr schwach zu sehen sind. Dies könnte allerdings am verwendeten Laufpuffer liegen. Der MOPS- Laufpuffer ist für eine gute Auftrennung der Proteine mit mittlerem relativem Molekulargewicht geeignet. (23) Dies kann dazu führen, dass sich die großen und kleinen Proteine nicht so gut auftrennen. Interessant ist auch, dass sich die Intensitäten bei den kleinen Proteinen während der Lagerung von 20 bis 26 Stunden in Pellet und Überstand kaum verändern. Diese sind anscheinend stabiler als die großen und mittleren Proteine.



Die ersten Proben des dritten Tages wurden 46 Stunden nach Beginn der Versuchsreihe genommen. Im Vergleich zu den Proben vom zweiten Versuchstag haben sich nur wenige Proteine verändert, wie in Abb. 18 zu sehen ist. Es zeigen sich im Pellet bei den Proben 3.2, 3.3 und 3.4 im oberen Bereich des Gels Proteinbanden, die zuletzt bei der Probe 2.1 zu sehen war. Vermutlich handelt es sich hier um eine jener Ungenauigkeiten, mit denen durch die Verwendung von Pelletstückchen zu rechnen ist. Da sich aus diesen Gewebestücken bei der Fällung immer noch Proteine herauslösen können, die sich vorher nicht gelöst haben, könnte es zu einem solchen erneuten Auftauchen von Proteinbanden kommen. Vielleicht zeigen sich hier aber auch nur Proteine, die durch den Garungsprozess, der im Brutschrank stattgefunden hat, heraus lösbar wurden.

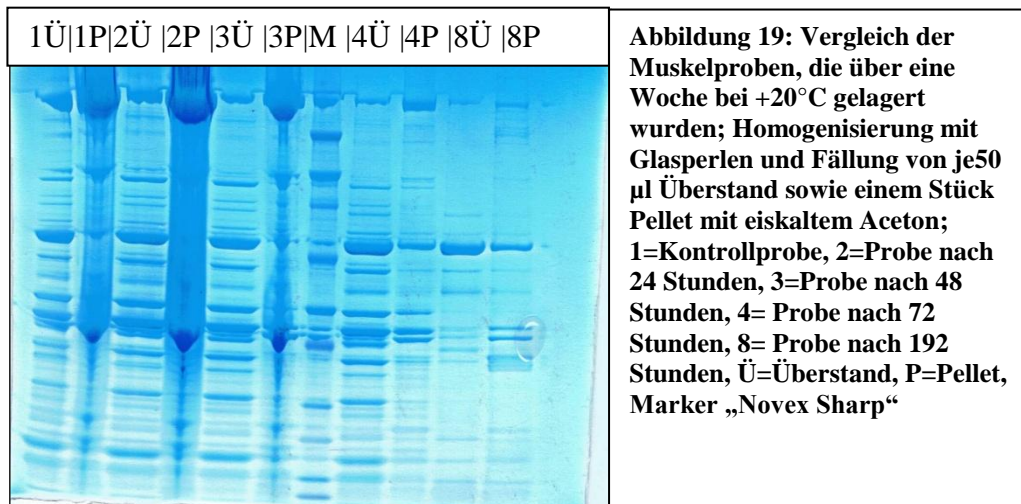


Bei diesen Proben ist ebenfalls interessant zu sehen, dass mehr Banden im unteren Drittel des Gels zu sehen sind als bei den Proben vom Vortag. Hier könnte es sich um Abbauprodukte größerer Proteine, wie z.B. Albumin, handeln. Albumin hat eine Molekülmasse von ca. 66 kDa. (24, 25) Es ist möglich, dass es sich bei den Banden, die etwas oberhalb der fünften Markerbande (60 kDa) liegen, um Albumin handeln könnte, auch weil dieses nicht nur im Blut als Transportmolekül, sondern auch im Muskel vorkommt. (26) Über die gesamte Versuchsdauer sind diese Banden vorhanden und schwanken nur sehr gering in ihrer Intensität. Dieses Protein lässt sich gut im Homogenisierungspuffer lösen und es ist eher wenig im Pellet zu finden, was dafür sprechen könnte, dass es sich um ein bereits im Gewebe gelöstes Protein handeln könnte. Die größte Veränderung findet zwischen dem ersten und zweiten Tag statt. Danach ist in diesen Banden keine Veränderung mehr zu sehen. Allerdings sind die Banden der kleinen Proteine sehr schwach in ihrer Intensität. Dies bedeutet, dass sich auch nur wenig Protein soweit abgebaut hat.

Eine weitere Auffälligkeit in den Abb. 16 – 18 sind die Proteinbanden, die sich um die siebte Markerbande (40 kDa) herum verteilen und in ihrer Intensität und Anzahl nur wenig schwanken. Besonders bei den Proben des dritten Tages (Abb. 18) fällt eine sehr intensive Bande in den Pellets der Proben auf. Um welches Protein es sich dabei handelt, wurde nicht weiter untersucht.

Das Gel in Abb. 19 zeigt die Proben aus der bei Raumtemperatur durchgeführten Versuchsreihe. Auch hier wurden wieder die Proteine aus dem Überstand und

dem Pellet miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass die Proteine erst am vierten Tag anfangen zu degenerieren und nach acht Tagen kaum noch Proteine zu finden sind. Die Schlieren in den Pelletproben 1P, 2P und 3P kommen vermutlich daher, dass das Eppendorfgefäß mit der resuspendierten Probe vor der Entnahme für die SDS-PAGE geschüttelt wurde und dadurch zu viel Protein in die Tasche pipettiert wurde. Für weitere Versuche wurden die Proben vor dem Pipettieren kurz abzentrifugiert, so dass der Überstand klar war. Dies führte wieder zu einer besseren Auftrennung der Proben und zu schärferen Banden.



Wie auch bei den Proben aus der Versuchsreihe bei +45°C gibt es hier eine auffällige Bande. Sie liegt wieder etwas oberhalb der fünften Markerbande (60 kDa) und es dürfte sich um dasselbe Protein handeln wie bei den Proben aus dem Brutschrank. Ob es wirklich Albumin ist, kann nur eine Proteinidentifikation eigen, wie sie zum Auffinden der weiteren Proteinmarker dieses Projekts durchgeführt wurde. Auf jeden Fall ist es ein sehr stabiles Protein, welches sich hauptsächlich im Überstand der homogenisierten Proben befindet.

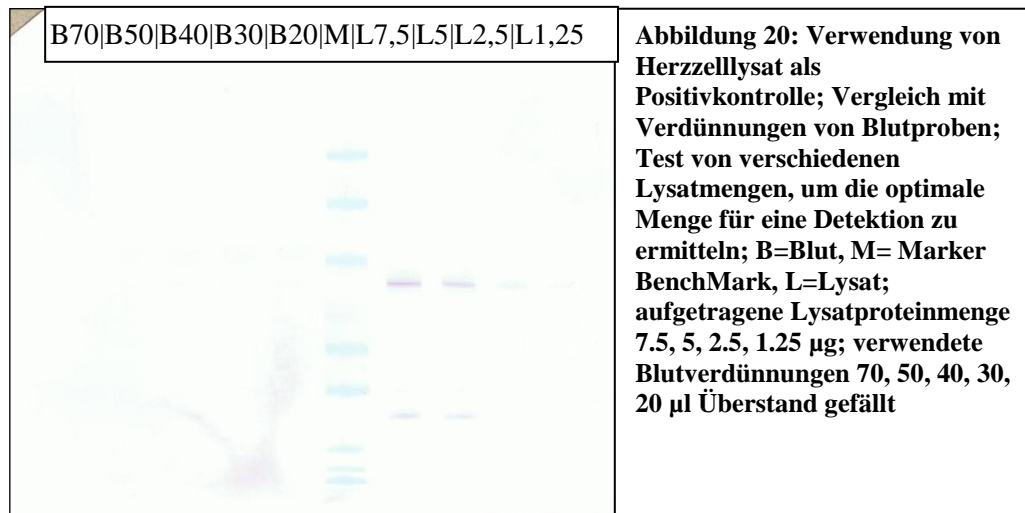
### 3.4 Untersuchungen für $\alpha$ -Tubulin

Das erste Zielprotein dieses Projekts war  $\alpha$ -Tubulin. Dieses sollte mit einer chromogenen Detektion nachgewiesen werden. Für einen langen Zeitraum des Projekts gab es kein Signal. Die aufgetretenen Signale waren sämtlich nicht eindeutig als Tubulin zu identifizieren, da die verwendete Positivkontrolle nicht mit angefärbt wurde. Dies führte zu einer Neuorientierung und Untersuchung von anderen Proteinen, deren Ergebnisse in folgenden Kapiteln noch gezeigt werden.

Bei den ersten Versuchen ging es zunächst darum, die Auftrennung der Proteine im Gel sowie die Übertragung der Proteine auf die Membran sicher zu stellen. Nachdem dies geschehen war und sich bei der Detektion nur sehr unspezifische Signale mit einer starken rosa Färbung der Membran zeigten, wurde eine Positivkontrolle eingesetzt, um sicher zu stellen, dass Tubulin auch garantiert vorhanden ist. Als erste Positivkontrolle wurde ein Herzzellysate von einer Maus verwendet. Dieses wurde in einer Verdünnungsreihe verwendet, damit auf jeden Fall die Proteinmenge für eine Detektion ausreichen würde.

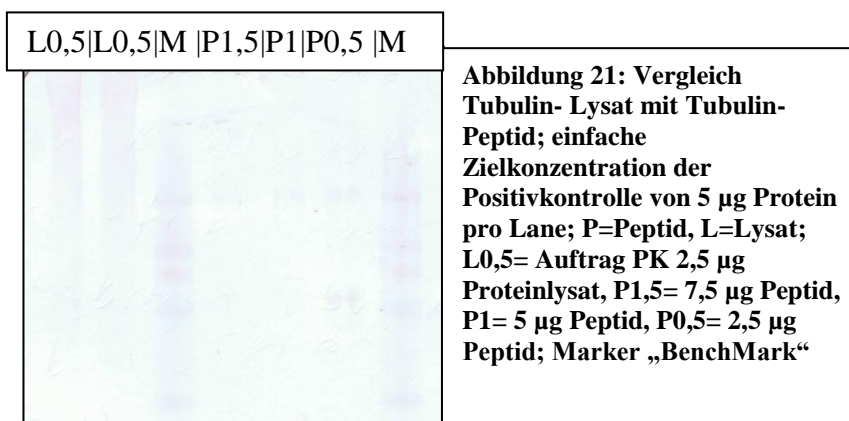
Das Ergebnis ist in Abb. 20 zu sehen. Es zeigt sich, dass in zwei Verdünnungen im Herzzellysate jeweils zwei Signale auftreten. Das obere Signal entspricht einem Protein mit einer relativen Molekülmasse von laut verwendetem Marker 64-82 kDa. Das zweite Signal befindet sich auf einer Höhe von 26-37 kDa. Tubulin

weist eine relative Molekülmasse von ca. 55 kDa auf. Mit diesem Gewicht ist ein Signal in der Mitte einer Membran zu erwarten. Dies würde auf das obere Signal zutreffen und von daher, wie oben beschrieben, die Frage aufwerfen, warum das durch den Marker angezeigte Gewicht so viel höher ist. Wegen der Zweifachmarkierung wurde eine Anfrage die Firma des verwendeten Antikörpers geschickt. Die Antwort war, dass der Antikörper falsch gelagert war und deswegen wahrscheinlich ein falsches Signal erzeugte.



Für Tubulin gab es neben dem extra verwendeten Herzzelllysate der Maus zwei weitere Positivkontrollen. Bei der einen handelte es sich um ein Tubulin- Lysate und die andere war ein Tubulin- Peptid.

Nach dem Kontrollversuch mit dem Herzzelllysate wurden ein neuer Antikörper sowie weitere Positivkontrollen, das Tubulin- Lysate sowie das Tubulin- Peptid, bestellt. Diese wurden mit dem neuen Primärantikörper versucht zu detektieren. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 21 zu sehen. Wie zu erkennen ist, trennt sich das Lysate im Gel nicht auf und bildet einen Schmier. Sowohl das Lysate wie auch das Peptid wurden aber wieder nicht vom Primärantikörper erkannt. Sichtbar ist das Lysate nur durch die Anfärbung der Membran mit Tinte.



Es wurden viele Versuche gemacht, um ein Signal in der Positivkontrolle zu bekommen, die bis auf einen alle erfolglos blieben. Das Ergebnis des erfolgreichen Versuchs ist in Abb. 22 zu sehen. Es wurde nochmal ein Versuch mit einem Aliquot des Tubulin- Peptids sowie den Resten des Tubulin- Lysats durchgeführt.



M|Lys|Pep|TKHz|RTHz|BSHz



**Abbildung 22: Signal in Positivkontrollen Peptid und Lysat; Verwendung von bereits resuspendierten Proben vom Herzmuskel; Lys= Tubulin-Lysat, Pep= Tubulin-peptid, Hz= Herzmuskel, TK= Lagerung -20°C, RT= Lagerung +20°C, BS= Lagerung +45°C**

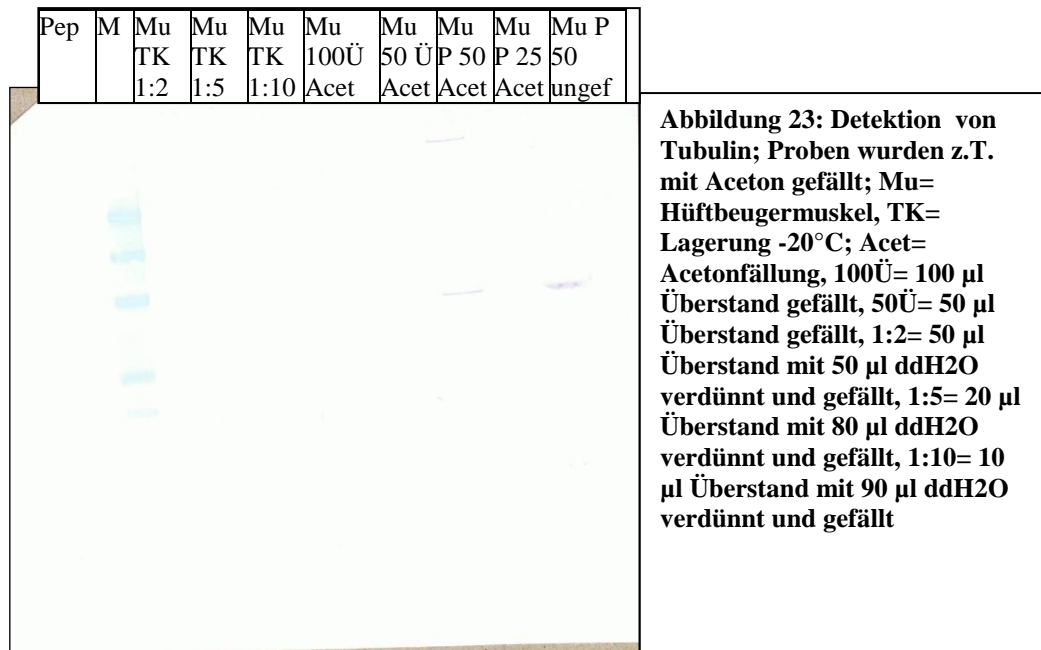
In diesem Versuch zeigten sich die gewünschten spezifischen Signale, die dann aber trotz intensiven Bemühungen nicht reproduziert werden konnten. Für eine genaue Ursachenerforschung reichte die Zeit dieses Projekts nicht aus.

Was erreicht wurde, waren Signale in den Proben, vor allem in den Pellets der Proben, die aber nicht genau als  $\alpha$ -Tubulin bezeichnet werden können, da die mitgelaufene Positivkontrolle, das Tubulin-Peptid, nicht markiert wurde.

Dies zeigt sich z.B. in Abb. 23. Hier wurde ein Vergleich zwischen mit Chloroform/ Methanol und Aceton gefällten Überständen sowie mit Aceton gefällten Pellets durchgeführt. Im eingescannten Bild sind noch die Markierungen in den Pellets zu sehen. Auf der Originalmembran befinden sich auch bei den mit Aceton gefällten Überständen schwache Markierungen auf derselben Höhe wie in den Pellets.

Der in Abb. 23 dargestellte Versuch handelt es sich um den ersten Versuch, bei dem auch das Pellet untersucht wurde. Tubulin ist der Bestandteil einer stabilen Struktur in den Zellen. Es bildet dort die Mikrotubuli. Für die Untersuchung von Tubulin musste dieses aus den Mikrotubuli herausgelöst werden und diese disaggregiert werden. Durch das weitere Fehlen eines Signals in den vorhergehenden Versuchen kam der Verdacht auf, dass dies mit der verwendeten Probenaufarbeitung nicht erreicht wurde, weshalb die Pellets auf Anwesenheit von Tubulin untersucht wurden.

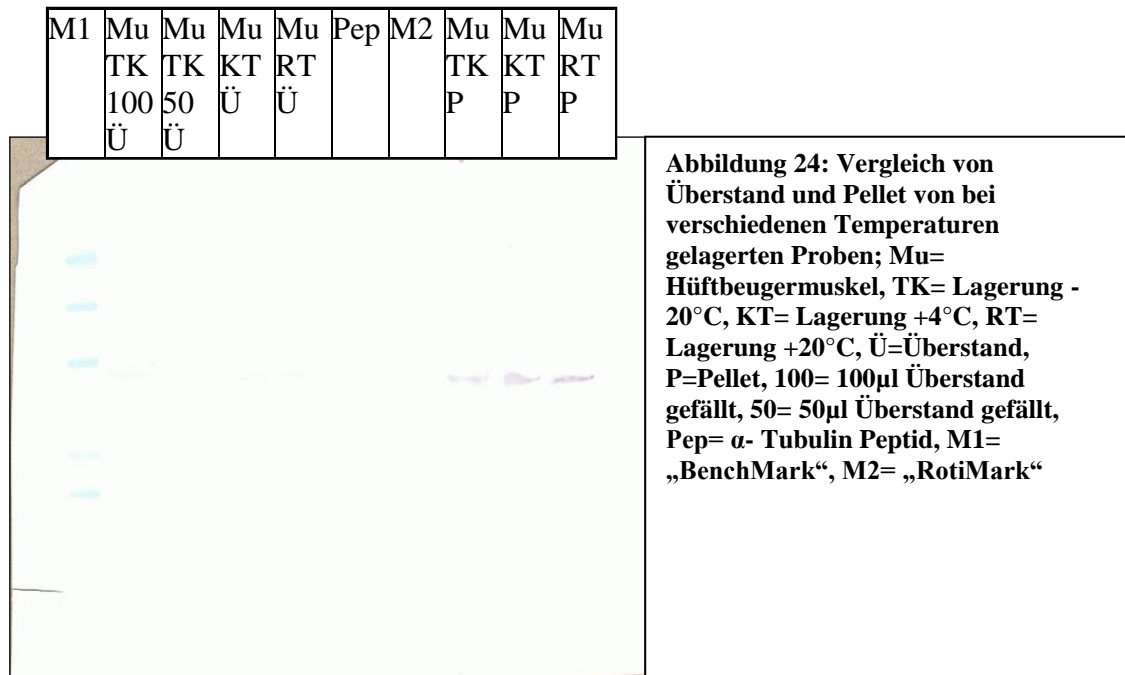
Wie in Abb. 23 zu sehen, war die Vermutung mit dem ungelösten Tubulin korrekt. Es stellt sich die Frage, warum Tubulin sich so verhält. Die Arbeit von Richard Weisenberg (27) zeigt, dass Kalzium eine wichtige Rolle beim Zusammenbau der Mikrotubuli als Regulator innehat. Bei der Probenaufarbeitung wurde ein Homogenisierungspuffer mit Kalium- und Magnesiumionen verwendet. Es ist möglich, dass sich das Tubulin wegen dem fehlenden Kalzium nicht löst.



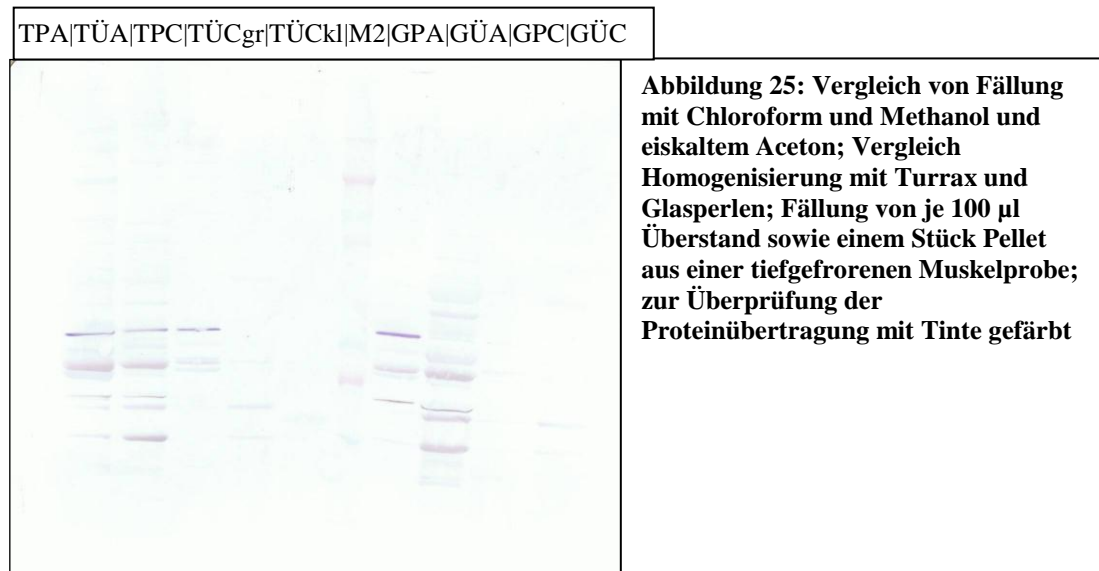
Allerdings sind bei den Proben aus dem Überstand in Abb. 23 mehrere Banden schwach markiert, was an der Selektivität des Primärantikörpers zweifeln lässt. Auch das weitere Fehlen eines Signals in der Positivkontrolle, dem Tubulin-Peptid, ist weiterhin ein Problem.

In Abb. 24 wurden Überstände und Pellets von bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Proben verwendet. Auf der Originalmembran sind auch in den Überständen schwache Banden zu sehen, allerdings scheinen sie dort sehr unspezifisch markiert worden zu sein, da fast alle Banden sichtbar sind, mit einer leicht stärkeren Markierung auf Höhe der im Scan sichtbaren Banden in den Pelletproben.

Da weiterhin kein Signal in der Positivkontrolle erscheint, ist es weiterhin nur eine Annahme, dass der verwendete Primärantikörper  $\alpha$ -Tubulin markiert. Daher ist es nicht gesichert, ob die sichtbaren Banden in Abb. 24 das Tubulin im Pellet von 24 Stunden bei -20°C, +4°C und +20°C gelagerten Proben anzeigen. Wie bereits in der Abb. 14 zu sehen ist, wurden die Proteine in dieser kurzen Zeitspanne kaum abgebaut und daher zeigt sich auch bei der Detektion kein großer Unterschied in der Intensität und Größe der markierten Banden.



Für den letzten Versuch zur Detektion von  $\alpha$ - Tubulin wurde ein Durchlauf mit denselben Proben wie für das Gel in Abb. 25 in derselben Reihenfolge verwendet. Es zeigt also einen Vergleich der verschiedenen Homogenisierungsmethoden und einen Vergleich der unterschiedlichen Fällungsmethoden. Die obersten vier Banden wurden vom Primärantikörper bei der Detektion markiert. Die restlichen Banden sind durch die Anfärbung mit Tinte sichtbar geworden. In diesem Gel wurde keine Positivkontrolle verwendet, da der Schwerpunkt dieses Versuchs darauf lag, die Proteinfreisetzung der Methoden zu vergleichen. Zu diesem Zeitpunkt des Projekts war es nicht mehr das primäre Ziel  $\alpha$ -Tubulin zu finden, da das Problem mit der nicht markierten Positivkontrolle nicht gelöst werden konnte.

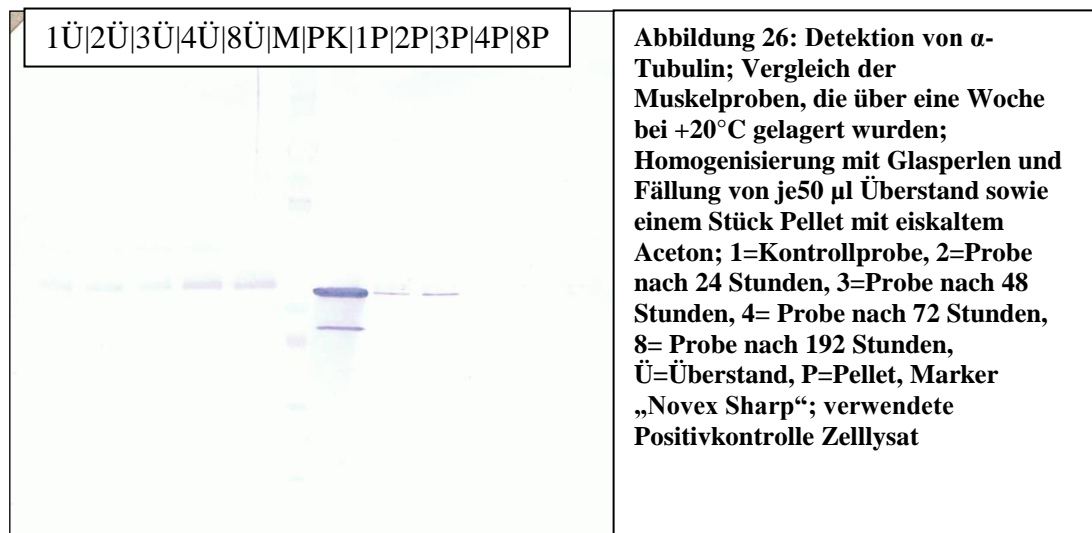


Die markierten Banden in diesem Gel geben keinen so guten Hinweis über eine Präferenz der Methoden, wie es das Gel aus Abb. 15 getan hat. Es zeigt sich für das vermeintliche Tubulin, dass dieses besser mit Aceton gefällt werden müsste und sich hier besser im Pellet nachweisen lässt. Wie bereits oben erwähnt, könnte es an fehlenden Kalziumionen im Homogenisierungspuffer liegen, dass sich das Tubulin nicht aus den Mikrotubuli gelöst hat. (27)

Zum Abschluss des Projekts wurden nochmal Versuche zur Detektion von Tubulin mit einer anderen Positivkontrolle durchgeführt. In der Zwischenzeit war für die Überprüfung der Detektion von  $\alpha$ -Actinin ein Zelllysate als Positivkontrolle eingetroffen. Mit diesem wurden Vergleiche mit den Proben aus den Versuchsreihen bei Raumtemperatur und im Brutschrank durchgeführt.

Das Ergebnis des Vergleichs der bei Raumtemperatur gelagerten Proben sieht man in Abb. 26. Wie zu sehen ist, wird das Zelllysate sehr deutlich markiert. Die Höhe der Markierung liegt zwischen der fünften und sechsten Markerbande (50-60 kDa). In den ersten beiden Proben 1P und 2P sieht man noch ein deutliches Signal. Auf der Originalmembran sind auch noch in allen Proben aus dem Überstand Markierungen auf der Höhe der Positivkontrolle zu sehen. Wie bei den vorhergehenden Versuchen sind hier aber auch wieder Banden oberhalb von Tubulin markiert. Diese liegen zwischen der vierten und fünften Markerbande (60-80 kDa). Es scheint, als ob sich an das Tubulin ein weiteres Protein angelagert hat, welches Tubulin etwa 10 kDa schwerer macht. Dieses Phänomen tritt bei den meisten Proben, die mit dem Tubulin-Primärantikörper detektiert wurden, auf. Es kann sich hierbei um eine wiederkehrende Unspezifität des Antikörpers handeln.

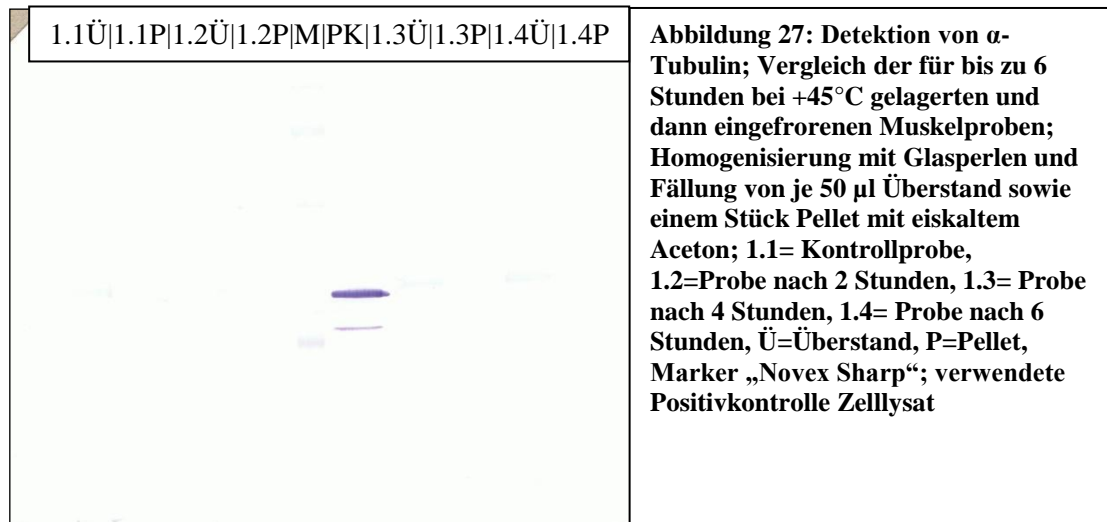
Eine weitere Auffälligkeit in Abb. 26 ist die zweite Bande in der Positivkontrolle, die unterhalb der starken Bande liegt und etwa 10 kDa leichter ist als diese. Sie taucht auch bei den zwei weiteren Versuchen mit dem Zelllysate als Positivkontrolle auf (s. Abb. 27 und 28). Da die Positivkontrolle aus dem Lysate ganzer Zellen besteht, ist es möglich, dass es sich bei dieser Bande ein Fragment von Tubulin handelt, das sich gebildet hat.



Für Tubulin wurden auch noch die Untersuchungen der Proben aus der Versuchsreihe im Brutschrank durchgeführt. Das Ergebnis für die Proben, die bis zu sechs Stunden im Brutschrank gelagert wurden, ist in Abb. 27 zu sehen. Wieder wurde das Zelllysate als Positivkontrolle sehr deutlich zwischen der fünften und sechsten Markerbande (50-60 kDa) markiert. Die auf der Originalmembran schwach markierten Banden befinden sich vor allem in den Proben aus den Überständen der homogenisierten Proben. Es gibt eine leichte Markierung in der Lane 1.1P. Ansonsten wurde Tubulin nur in den Überständen markiert mit der oben bereits erwähnten Doppelmarkierung oberhalb der Tubulinbanden. Hier


scheint sich zu zeigen, was bei der Untersuchung der Fällungsmethoden zu sehen war. In Abb. 13 ist zu sehen, dass mit den Glasperlen mehr Proteine aus dem Gewebe herausgelöst werden können. Anscheinend können mit den Glasperlen auch die Mikrotubuli aufgelöst werden. Diese Vermutung deckt sich auch mit der Tatsache, dass sich bei der Proteinidentifikation das Protein Dihydrolipoyl Dehydrogenase, ein Enzym aus dem inneren der Mitochondrien, gefunden werden konnte. Die Glasperlen zerschlagen nicht nur die Zellen, sondern auch deren Organellen.

Auf der Membran ist keine Abnahme des Proteins in den markierten Banden zu erkennen. Es scheint, dass Tubulin über den hier gezeigten Zeitraum stabil ist.



In Abb. 28 ist die Detektion von Tubulin in den Proben aus der Versuchsreihe im Brutschrank vom zweiten Tag zu sehen. Es wurde wieder da Zelllysate als Positivkontrolle verwendet und wieder sehr deutlich markiert. In den Proben zeigt sich auf der Originalmembran ein ähnliches Bild wie für die vorhergehenden Proben. Es sind schwache Markierungen auf derselben Höhe wie in der Positivkontrolle zu sehen, sowie die zweite Markierung oberhalb der Tubulinbande.

Allerdings verteilen sich die Signale etwas anders. Die Signale befinden sich in den Proben 2.1Ü, 2.2Ü, 2.3P und 2.4Ü. Auffällig ist die Markierung im Pellet. Es ist möglich, dass die beiden Proben 2.3Ü und 2.3P unbemerkt vertauscht wurden. Auch hier zeigt sich kein Muster in der Proteinentwicklung, was darauf hindeutet, dass Tubulin auch über 26 Stunden stabil ist.

|   |   |
|---|---|
| 2.1Ü 2.1P 2.2Ü 2.2P PK M 2.3Ü 2.3P 2.4Ü 2.4P                                      | <b>Abbildung 28: Detektion von <math>\alpha</math>-Tubulin; Vergleich der für bis zu 26 Stunden bei +45°C gelagerten und dann eingefrorenen Muskelproben; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 <math>\mu</math>l Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 2.1= Probe nach 20 Stunden, 2.2= Probe nach 22 Stunden, 2.3= Probe nach 24 Stunden, 2.4= Probe nach 26 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zellysat</b> |
|  |   |

Es wäre interessant zu sehen wie sich Tubulin in den Proben, die 46 – 52 Stunden nach Beginn des Versuchs genommen wurden, verhält. Diese wurden nicht weiter untersucht, da die erneuten Versuche mit Tubulin am Ende des Projekts durchgeführt wurden und die Zeit für eine Untersuchung der Proben nicht ausreichte.

Die Untersuchungen von  $\alpha$ - Tubulin haben für die Fragestellung des Projekts nach der Proteindegradation nach dem Tod des Organismus kein eindeutiges Ergebnis gebracht. Dies lag vor allem an der fehlenden Detektion der Positivkontrolle und der damit einhergehenden geringen Untersuchung von längeren Zeitspannen. Da jetzt eine Positivkontrolle gefunden ist, die auch detektiert wird, können die Untersuchungen über  $\alpha$ - Tubulin in einem weiteren Projekt fortgeführt werden.

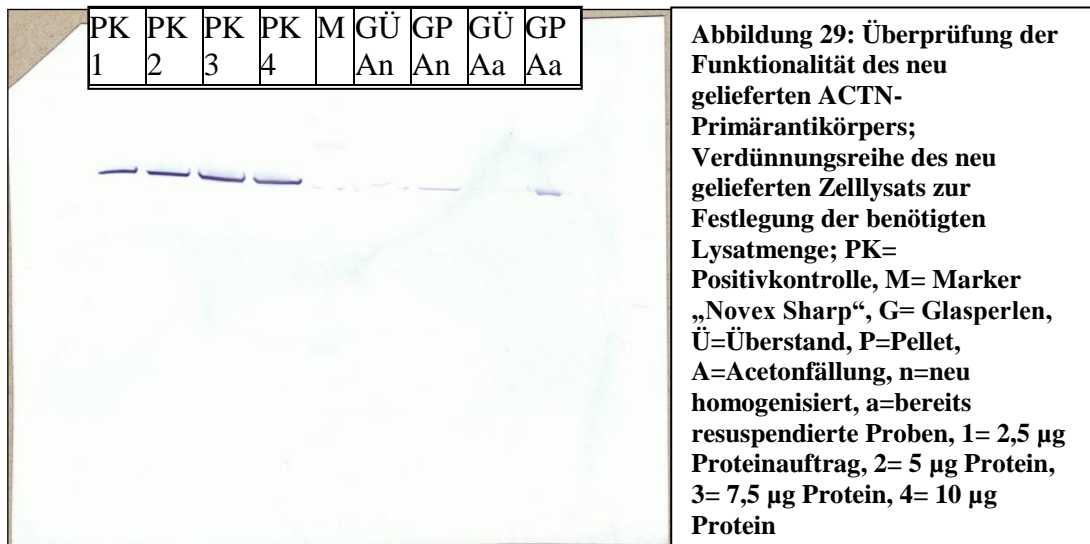
### 3.5 Untersuchungen über $\alpha$ - Actinin

Nachdem die Suche nach einem eindeutigen Signal für  $\alpha$ - Tubulin nicht mehr Erfolg versprechend war, wurde eine Probenauftrennung durchgeführt, um nach alternativen Proteinen zu screenen (s. Abb. 15). Dafür wurden die Proben fünf Tage bei den bekannten Temperaturen gelagert, anschließend homogenisiert und in der SDS- PAGE aufgetrennt. Nachdem Anfärben des Gels zeigten sich fünf Banden, die über den Zeitraum und die Temperaturen ein abnehmendes Verhalten zeigen. Diese fünf Banden wurden jeweils ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine extern analysiert. Die drei ausgewählten Proteine wurden mit den in Abschnitt 2.5 bis 2.7 beschriebenen Methoden untersucht.

Eines der identifizierten Proteine war  $\alpha$ - Actinin 2. Für dieses wurde als erstes ein Funktionalitätstest durchgeführt, um sicher zu gehen, dass der Antikörper auch richtig detektiert. Von der Positivkontrolle, einem Zellysat, wurden verschiedene Mengen eingesetzt, um die optimale Einsatzmenge zu ermitteln.

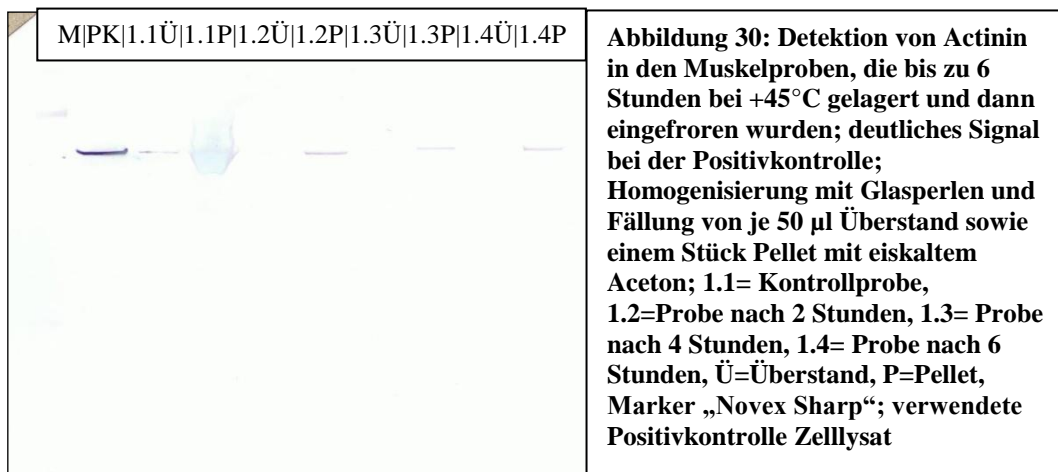
Neben dem Zellysat als Positivkontrolle wurden auch bereits homogenisierte sowie neu homogenisierte Proben, jeweils im Vergleich von Überstand und Pellet, als Test verwendet.

Wie in Abb. 29 zu sehen, wurde die Positivkontrolle mit steigender Intensität entsprechend der eingesetzten Proteinmenge sowie das Protein in den Pellets der Proben markiert. Der Test zeigte, dass der Primärantikörper funktioniert und für weitere Untersuchungen verwendet werden kann.



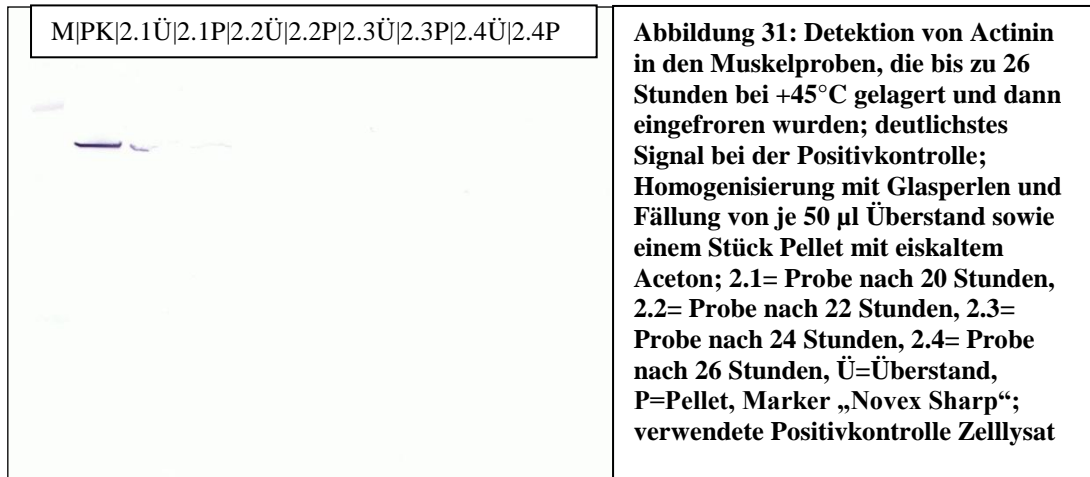
Nach der erfolgreichen Detektion konnten weitere Versuchsreihen für die Untersuchung von Actinin durchgeführt werden. Für diese Versuchsreihen wurden aliquotierte Muskelproben zum einen über eine Woche bei Raumtemperatur, zum anderen über drei Tage im Brutschrank bei +45°C gelagert. Diese beiden Temperaturen wurden gewählt, weil bei ihnen mit einer schnelleren und messbaren Änderung zu rechnen war.

In Abb. 30 ist ein Vergleich der ersten Proben aus dem Versuch mit dem Brutschrank zu sehen. Die Positivkontrolle wurde gut markiert und in den Proben gibt es auch einige Markierungen. Actinin wurde vor allem in den Pellets der Proben gefunden. In den Proben aus dem Überstand der Homogenisate wurde Actinin nur sehr schwach markiert. Auch wenn sich die Größe der Markierung bei der Kontrollprobe aus dem Tiefkühlschrank nicht genau abschätzen lässt, da sich in dieser keine scharfe Bande gebildet hat, so zeigt sich doch, dass die Intensität der markierten Banden etwas abnimmt.

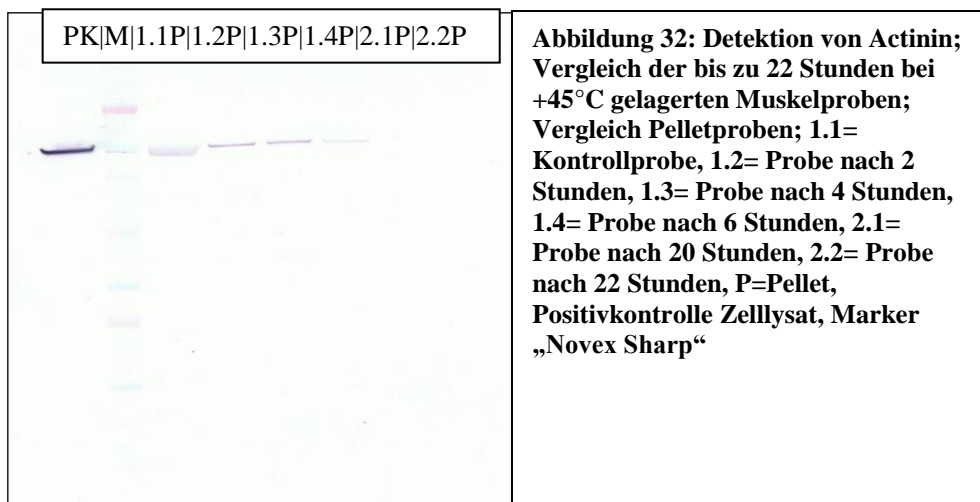


Da in den Proben des ersten Tages noch Actinin zu finden war, wurden auch die Proben des zweiten Tages vergleichend aufgetrennt und detektiert. Wie in Abb. 31 zu sehen ist, wird die Positivkontrolle wieder sehr gut markiert. Darüber hinaus gibt es noch ein gutes Signal im Pellet der Probe, die 20 Stunden nach Beginn des Versuchs genommen wurde. Da die letzten Proben des zweiten Versuchstages kein Signal aufweisen, wurde darauf verzichtet, die Proben des dritten Tages zusätzlich zu detektieren.



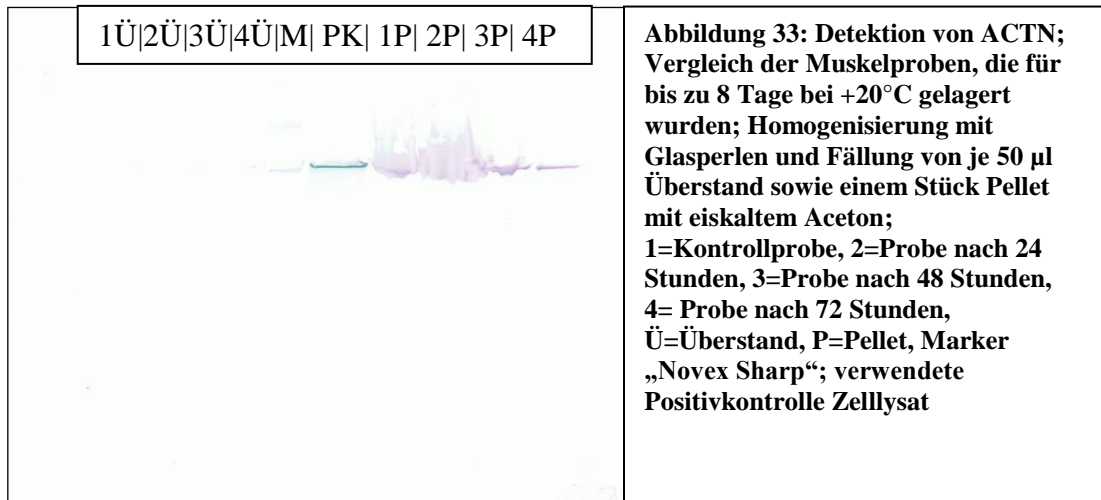


Es wurde ein Vergleich der Proben durchgeführt, die bisher detektiert wurden. Für diesen Vergleich wurden auch nur die Pellets der Proben genommen, da Actinin anscheinend bei dieser Homogenisierungsmethode nicht gelöst wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 32. Hier zeigt sich über den Zeitraum von 22 Stunden eine stetige Abnahme der Intensität der markierten Banden. Im Vergleich findet sich bei den letzten beiden Proben von nach 20 und 22 Stunden kein Signal mehr. Vielleicht lag bei der Detektion der Proben vom zweiten Versuchstag ein Pipettierfehler vor, durch den die Proben ineinander gelaufen sind und ein falsches Ergebnis ergeben haben. Oder bei der Auftragung der Proben für den Vergleich ist ein Fehler passiert. Außerdem wurden die resuspendierten Proben vom ersten Versuchstag für 48 Stunden, die Proben vom zweiten Versuchstag über Nacht im Kühlschrank gelagert. Möglicherweise haben sich in dieser Zeit die Proteine abgebaut.

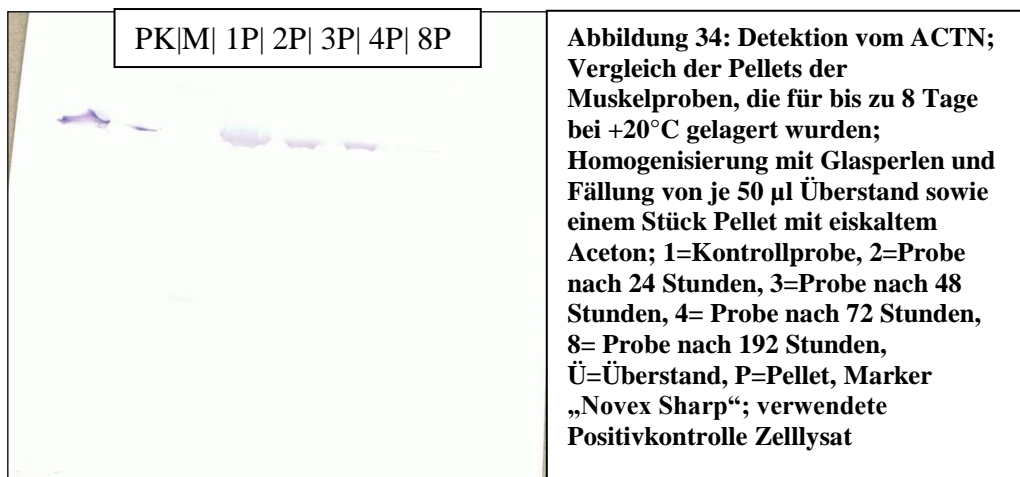


Nach der abgeschlossenen Detektion der Proben aus dem Brutschrank wurden die Proben der bei Raumtemperatur durchgeführten Versuchsreihe untersucht. Für diese Untersuchung wurden zunächst die fünf Proben im Vergleich, jeweils mit Überstand und Pellet, aufgetragen und detektiert. Dieser Vergleich ist in Abb. 33 zu sehen.





Wie zu erwarten, wurde Actinin nur in den Pellets der Proben nachgewiesen und auf Grund der schlechten Auftrennung wurde ein weiterer Durchlauf nur mit den Pelletproben im Vergleich durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 34 zu sehen. Es zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme bis zur vierten Probe, die auf der Originalmembran noch schwach markiert ist.

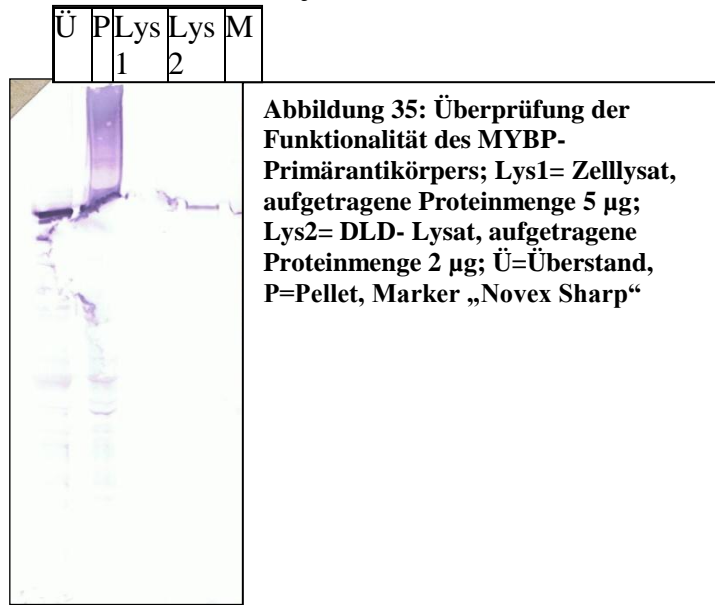


Die Untersuchungen von  $\alpha$ - Actinin zeigen sehr interessante Entwicklungen. Gerade die Untersuchung der Entwicklung bei Raumtemperatur ist interessant. Hier müssten weitere Untersuchungen mit kleineren Zeitintervallen durchgeführt werden, die dann auch quantitativ ausgewertet werden. Dies ist hier nur qualitativ gemacht worden und bedarf noch intensiverer Untersuchung. Weitere Untersuchungen sollten versuchen  $\alpha$ - Actinin bei der Probenaufarbeitung in Lösung zu bringen, da die hier verwendete Methode zum Umgang mit dem Pellet sehr ungenau ist und besser durch die Verwendung des Überstandes mit dem gelösten Protein ersetzt werden sollte. Zu beachten ist auch, dass  $\alpha$ - Actinin bei fortschreitendem Abbau des Gewebes freigesetzt wird (28) und sich dadurch besser im Überstand finden lassen kann, wenn die richtigen Pufferbedingungen angewendet werden.

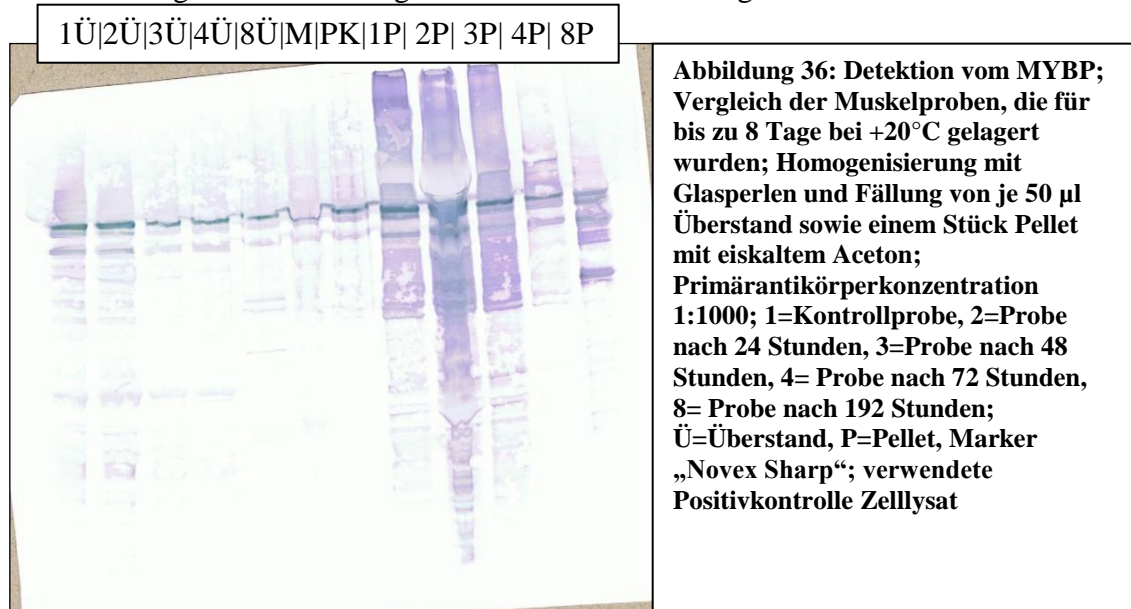
### 3.6 Untersuchungen über das Myosin bindende Protein

Ein weiteres der identifizierten Proteine ist das Myosin bindende Protein. Auch für dieses wurde als erstes ein Versuch zur Überprüfung der Funktionalität durchgeführt. Wie das Ergebnis in Abb. 35 zeigt, war auch dieser Test erfolgreich.

Die Positivkontrolle DLD- Lysat sowie die Proben wurden markiert. Ob die Positivkontrolle Zelllysate markiert wurde, lässt sich nicht genau sagen, da die Bande stark verwischt ist. Es zeigt sich aber schon ein Problem, was sich bei fast allen MYBP- Detektionen zeigt. Die Lane mit der Probe aus dem Pellet ist sehr stark und unspezifisch markiert. Für die komplette Lösung dieses Problems reichte die Zeit des Projekts nicht aus.

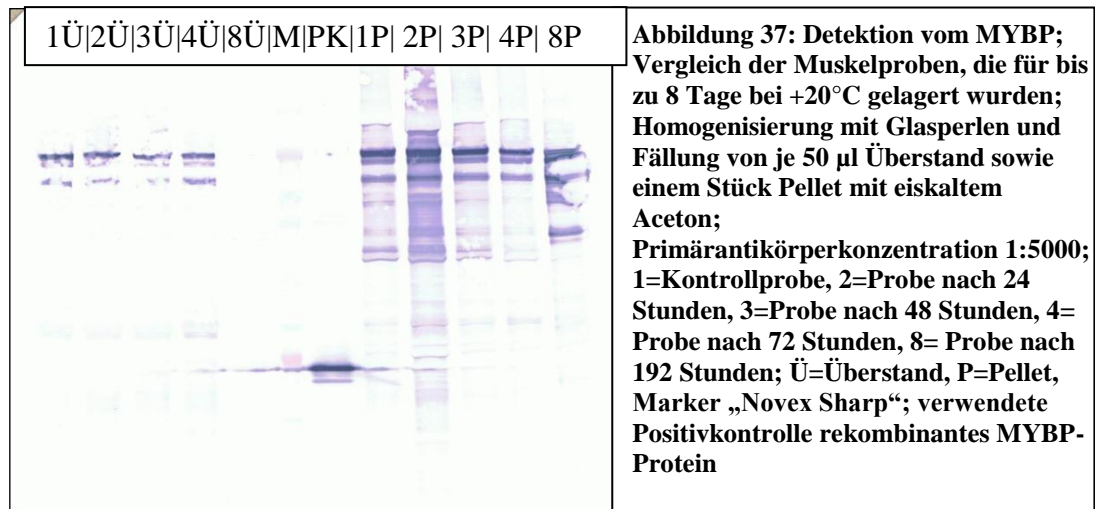


Das Myosin bindende Protein ist im Überstand wie auch im Pellet zu finden, wie die Abb. 36 zeigt. Hier wurden die Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, gegeneinander aufgetragen. Hier scheint die Konzentration des Primärantikörpers mit 1:1000 zu hoch gewesen zu sein und es wurde noch eine Wiederholung mit einer niedrigeren Konzentration durchgeführt.



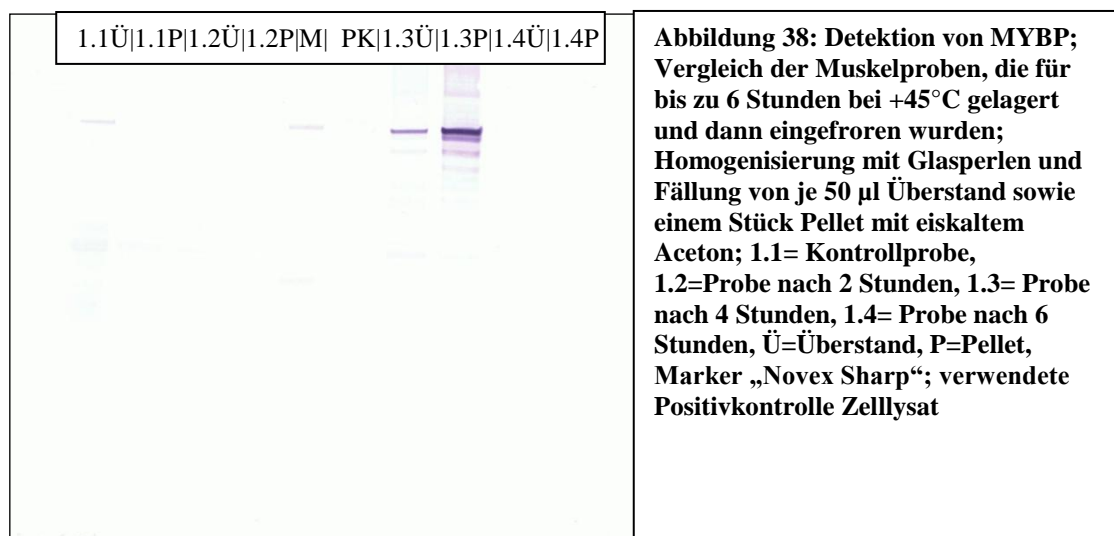
Die zweite Detektion der Proben aus der Versuchsreihe bei Raumtemperatur wurde mit einer Primärantikörper- Konzentration von 1:5000 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das neue MYBP- Protein mit 0,12 µg Protein verwendet. Das Ergebnis ist in Abb. 37 zu sehen. Es zeigt sich, dass sehr viele Banden unspezifisch markiert werden und dass die Positivkontrolle sehr weit im Gel

gelaufen ist. Dies liegt daran, dass es sich bei dieser Positivkontrolle um ein rekombinantes Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 36,52 kDa handelt. Innerhalb des untersuchten Zeitraums zeigt sich weder in den Überständen noch im Pellet eine deutliche Änderung. Es ist auffällig, dass sich im Überstand der letzten Probe nach 192 Stunden kein Protein mehr befindet, aber wie die Entwicklung der Abnahme bis dahin aussieht, kann auf Grund des großen Intervalls zwischen der vierten und der letzten Probe nicht bestimmt werden.



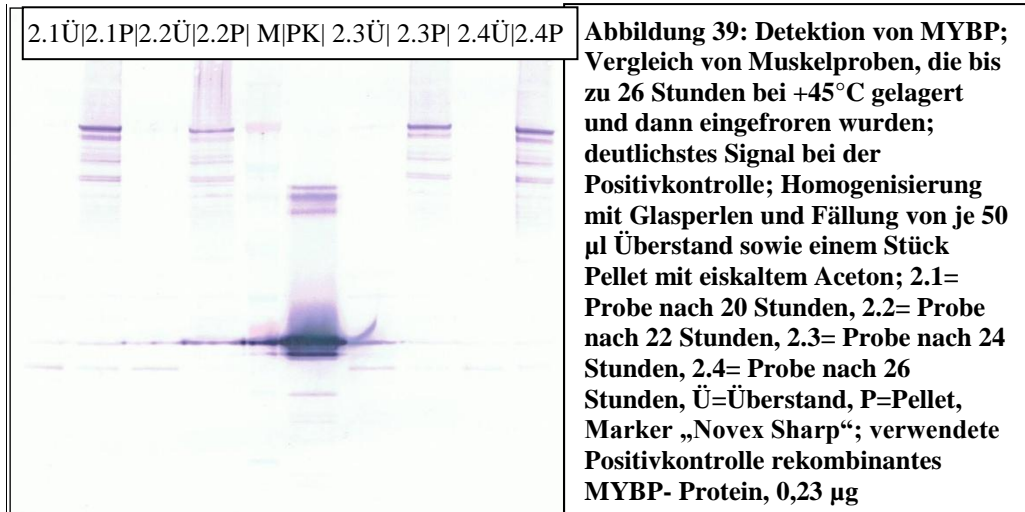
Die Reduktion der Konzentration des Primärantikörpers wurde zuerst bei der Detektion der ersten Proben aus der Versuchsreihe im Brutschrank ausprobiert. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 38 zu sehen. Die Konzentration des Primärantikörpers wurde auf 1:5000 reduziert. Wie zu sehen ist, werden die Proben hier nur sehr schwach markiert. Es gibt starke unspezifische Markierungen bei den Proben 1.3Ü und 1.3P sowie eine leichte Markierung von 1.1Ü auf der Originalmembran.

Die hier verwendete Positivkontrolle war das Zelllysate. Dieses wurde hier nur äußerst schwach markiert und hätte in größerer Konzentration verwendet werden müssen.



Die Detektion der Proben des zweiten Tages der Versuchsreihe im Brutschrank wurde mit dem rekombinanten MYBP- Protein mit einer Menge von 0,23 µg und

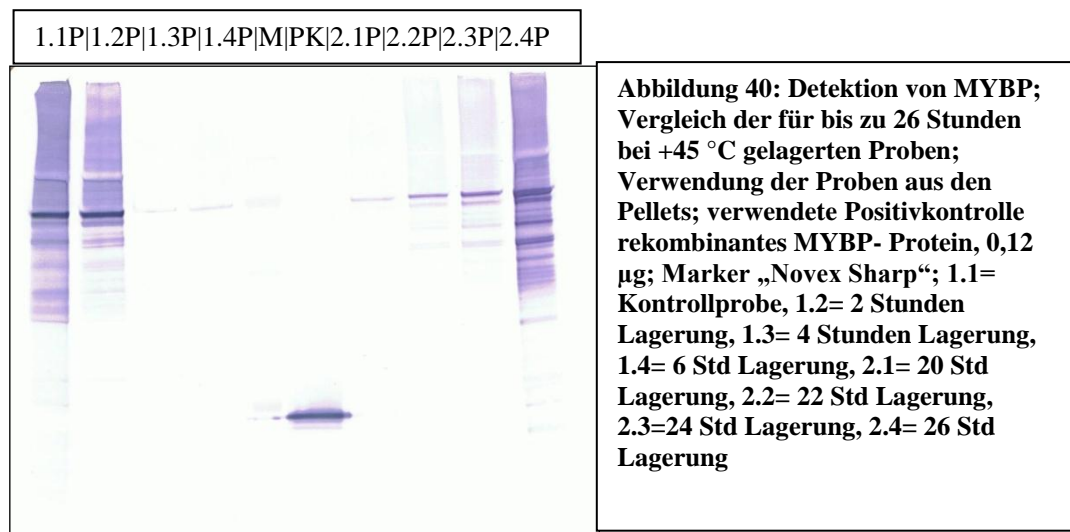
einer Primärantikörper- Konzentration von 1:5000 durchgeführt. Hier wurden vor allem Banden in den Pelletproben 2.1, 2.2, 2.3 und 2.4 markiert. In Abb. 39 ist zu sehen, dass die verwendete Menge der Positivkontrolle zu hoch war. Diese wurde für weitere Detektionen auf 0,12 µg halbiert. Es sind weitere Banden in den Proben der Pellets unspezifisch markiert.



Zum Abschluss der Untersuchungen der Entwicklung von MYBP bei erhöhter Lagerungstemperatur wurde ein Vergleich der Proben durchgeführt. Es wurden nur die Proben aus den Pellets verwendet, da sich auch hier zeigte, dass sich das MYBP nicht im Überstand gelöst hatte.

Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Abb. 40 zu sehen. Wieder sind in einigen Bahnen die Banden sehr unspezifisch markiert, wie besonders bei den Proben 1.1P, 1.2P und 2.4P zu sehen ist. Die Verringerung der eingesetzten Menge an Positivkontrolle ist sehr gut, da das rekombinante Protein nicht so weit auseinander diffundiert wie es in Abb. 39 zu sehen ist.

Die markierte Proteinentwicklung zeigt nicht das erwartete Verhalten einer stetigen Abnahme. Die äußeren Proben sind sehr deutlich, die inneren eher schwächer markiert. Es ist keine kontinuierliche Abnahme zu erkennen.



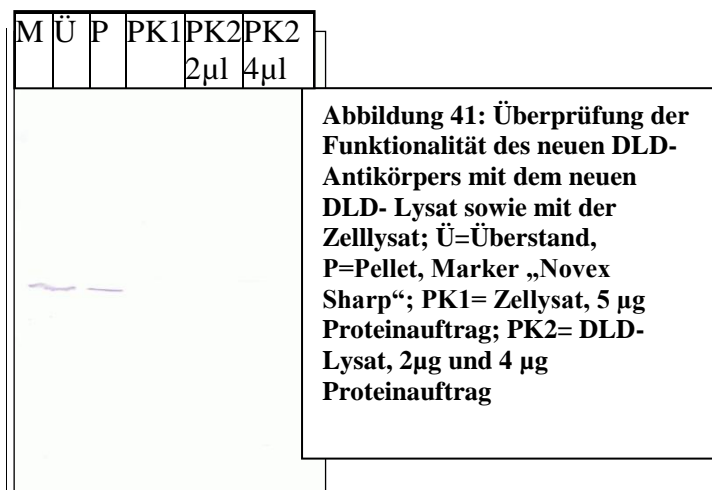
Bei der Untersuchung von MYBP zeigen sich vor allem Probleme in der Durchführung. So muss die Konzentration des Primärantikörpers besser

eingestellt und ermittelt werden. Auch die verwendete Menge des rekombinanten Proteins als Positivkontrolle kann noch optimiert werden.

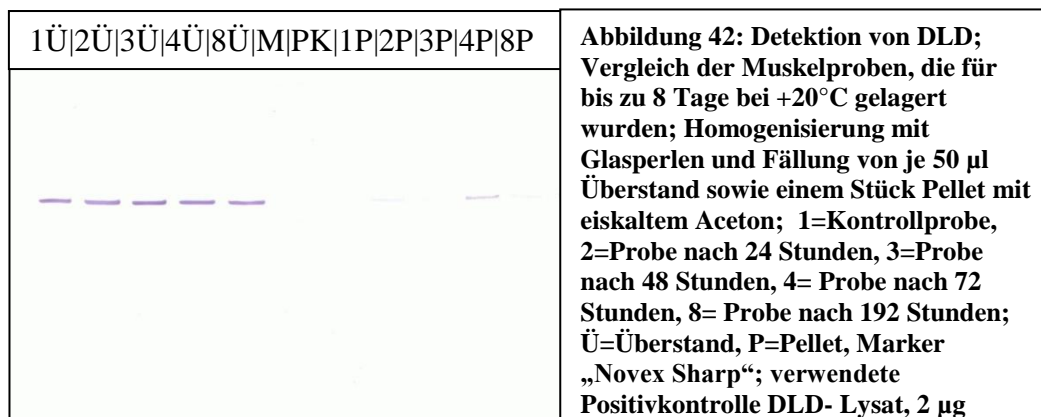
Für die Fragestellung des Projekts nach der Entwicklung von MYBP lassen sich auf Grund der methodischen Komplikationen keine Empfehlungen machen. So weit sich eine Aussage treffen lässt, zeigen die durchgeführten Versuche, dass eine Abnahme von MYBP erst nach längeren Zeiträumen als den hier untersuchten stattfindet.

### 3.7 Untersuchungen über die Dihydrolipoyl Dehydrogenase

Das letzte der näher untersuchten Proteine ist die Dihydrolipoyl Dehydrogenase. Auch für diese wurde zunächst ein Funktionstest durchgeführt. Bei diesem wurde neben dem Zelllysate als Positivkontrolle auch ein DLD- Lysat überprüft. Das Ergebnis dieses Tests sieht man in Abb. 41. Die sichtbaren Banden stammen von den verwendeten Proben, aber auf der Originalmembran sind noch weitere schwächere Banden in den Positivkontrollen zu sehen. Dabei ist auffällig, dass die Markierung im DLD- Lysat etwas höher liegt als im Zelllysate. Dies liegt daran, dass das Enzym in dem Lysat mit einem Tag versehen wurde, was das Protein schwerer macht als in seiner natürlichen Form. Dieser Versuch bestätigt, dass der verwendete Primärantikörper DLD markiert.

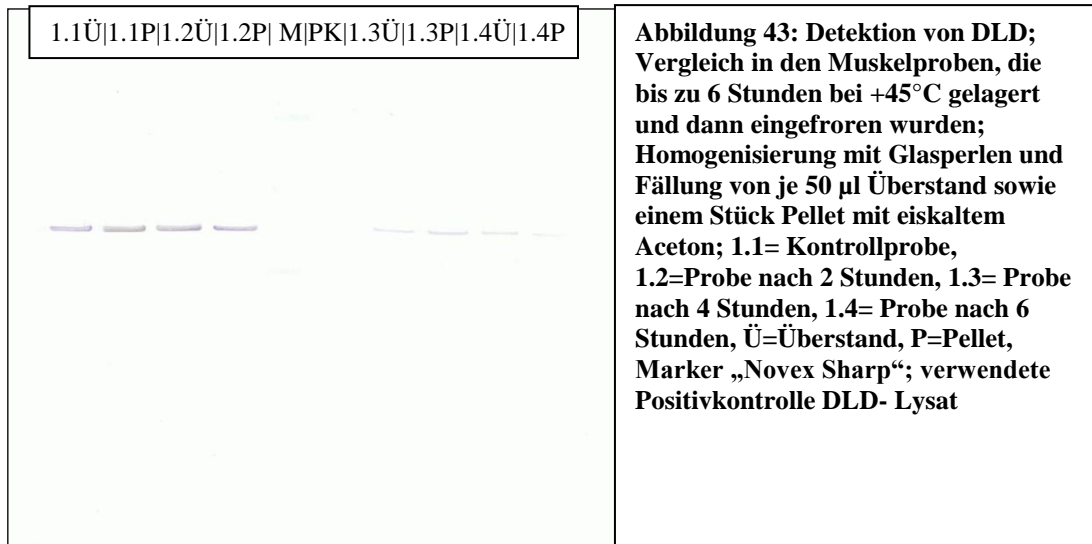


Für dieses Protein wurde ein Vergleich der Proben aus dem Versuch bei Raumtemperatur durchgeführt. In Abb. 42 ist das Ergebnis für die Detektion von DLD zu sehen. Es zeigen sich keine großen Änderungen in den Proben aus den Pellets und bei den Schwankungen in den Proben aus dem Überstand scheinen hier eher durch eine ungleiche Aufarbeitung entstanden zu sein.

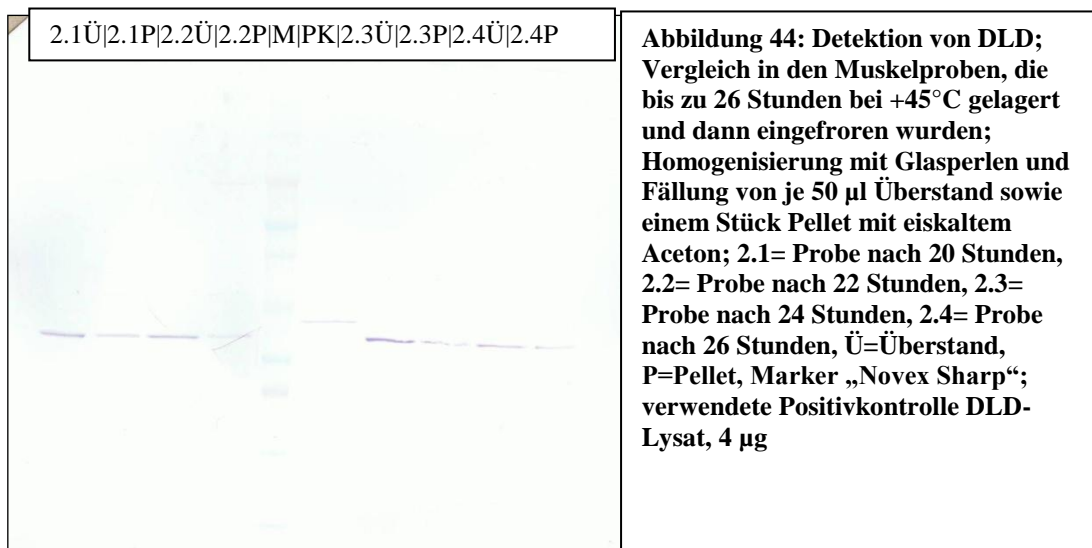


Als nächste Versuche für die Untersuchung des Verhaltens von DLD wurden die Proben der Versuchsreihe, die für drei Tage bei +45°C im Brutschrank durchgeführt wurde, untersucht.

In Abb. 43 zeigt sich der erste Versuch mit den Proben, die für bis zu sechs Stunden gelagert wurden. DLD wurde in beiden Probenarten, dem Pellet wie dem Überstand nachgewiesen. Allerdings sind die Banden im Pellet deutlicher zu sehen. Es zeigt sich keine Änderung der markierten Proteinmenge.



Der Vergleich der Proben des zweiten Versuchstages ist in Abb. 44 zu sehen. Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Proben des ersten Tages. Die Intensität der markierten Banden ist relativ konstant. Die Banden im Überstand sind insgesamt schwächer markiert und zeigen eine leicht abnehmende Tendenz. Die Menge an eingesetztem DLD- Lysat als Positivkontrolle wurde auf 4 µg verdoppelt und ist auf der Originalmembran deutlich zu erkennen.

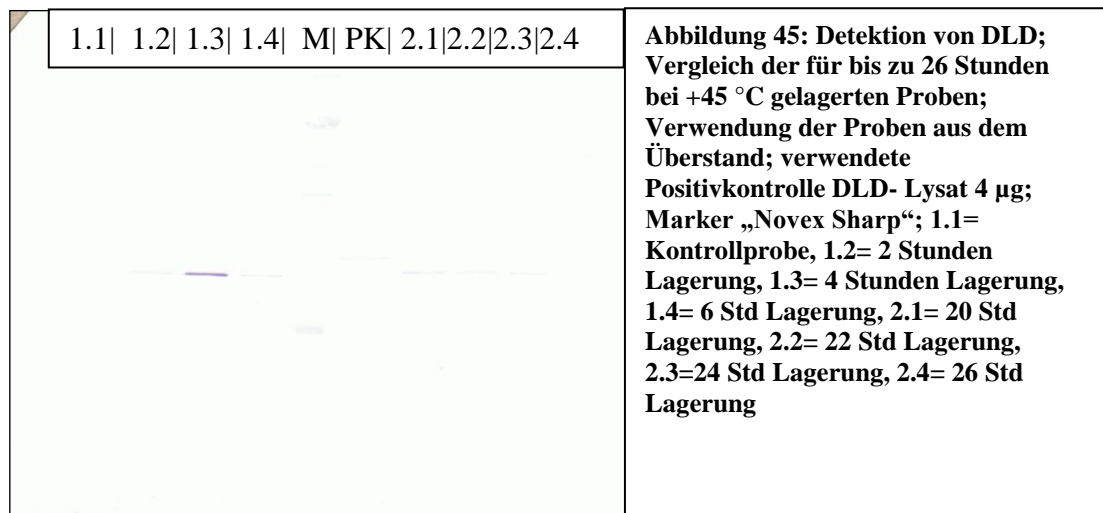


Um die Entwicklung über den Zeitraum von 26 Stunden gut vergleichen zu können, wurden zwei Vergleiche zwischen den Proben aus den Pellets und denen aus dem Überstand durchgeführt.

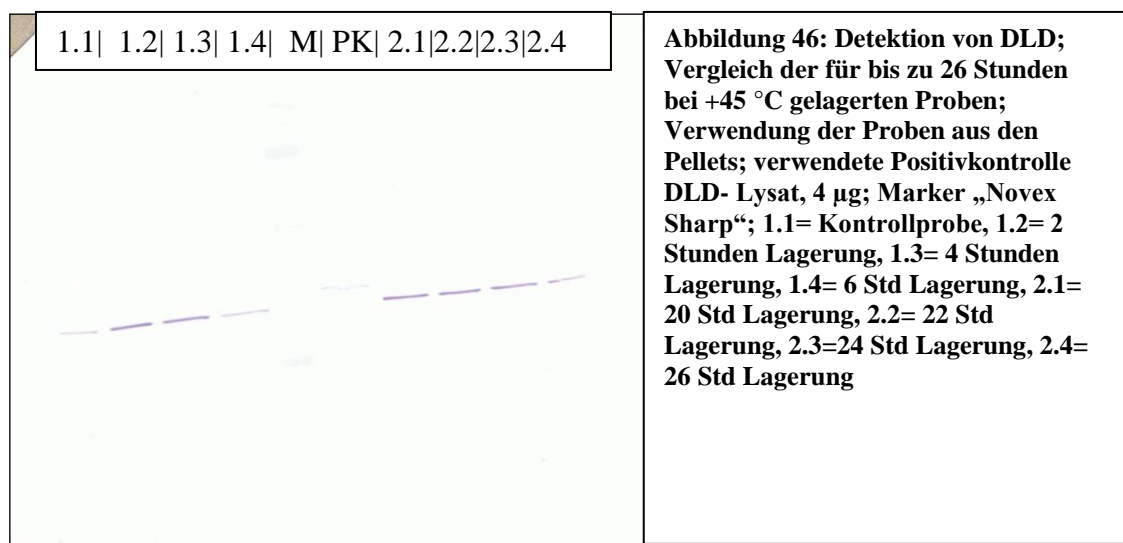
Den Vergleich der Proben aus dem Überstand ist in Abb. 45 zu sehen. Auf der Originalmembran ist neben der hier sichtbaren Bande in allen andern Lanes eine



schwache Markierung zu sehen. Sie zeigt bis auf unspezifische Schwankungen keinen Entwicklungstrend.



In Abb. 46 ist der Vergleich der Proben aus den Pellets zu sehen. In allen Proben zeigen sich deutliche Signale. Allerdings sind auch hier keine Entwicklungen zu sehen. Die schwächeren Banden scheinen eher von einer ungenauen Probenaufarbeitung und Zusammenmischung der SDS- Proben zu stammen.



Die für DLD durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass in den kurzen Zeiträumen keine Abnahme des Proteingehalts feststellbar ist. Es müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

#### 4. Fazit

Das abschließende Fazit dieses Projekts ist sehr durchwachsen. Es gab im Laufe des Projekts viele Fehler, die sehr viel Zeit verbraucht haben, während dessen keine zielführenden Untersuchungen zur Beantwortung der Fragestellung des Projekts gemacht wurden.

Die Fragestellung des Projekts war die Untersuchung des Verhaltens von Proteinen nach dem Tod eines Organismus. Dafür wurde als erster Marker  $\alpha$ -Tubulin ausgewählt. Wegen fehlender Zeit haben die Untersuchungen von  $\alpha$ -Tubulin für die Fragestellung des Projekts nach der Proteindegradation nach dem Tod des Organismus kein eindeutiges Ergebnis gebracht. Es konnte in diesem

Projekt nicht gezeigt werden, ob  $\alpha$ - Tubulin in den beobachteten Zeitspannen überhaupt abnimmt.

Da die Untersuchung von  $\alpha$ - Tubulin wegen der ungenügenden Detektion nicht fortgeführt werden konnte, wurden andere Proteine gesucht und gefunden.  $\alpha$ - Actinin, Myosin bindendes Protein und Dihydrolipoly Dehydrogenase zeigen über einen Zeitraum von vier Tagen ein abnehmendes Verhalten. Der beobachtete Zeitraum, der zu der Entscheidung für diese Proteine untersucht wurde, wurde in die weitere Planung der Versuche nicht einbezogen. Daher waren die Versuchsreihen, die bei +20°C und bei +45°C durchgeführt wurden, jeweils zu kurz um fundierte Ergebnisse und Entwicklungen zu erreichen.

Dieser Planungsfehler zeigt sich bei allen drei Proteinen sowie den zuletzt durchgeführten Versuchen für  $\alpha$ - Tubulin. Dazu kam dann noch, wie beim Myosin bindendem Protein, mangelnde Zeit für die Feineinstellungen in der Detektion. Von den in diesem Projekt untersuchten Proteinen zeigt  $\alpha$ - Actinin noch am ehesten das erwartete abnehmende Verhalten.

## 5. Ausblick

Wie das Screening der Proteine gezeigt hat, sind  $\alpha$ - Actinin, MYBP und DLD durchaus gute Kandidaten zur Untersuchung der Abnahme nach dem Tod eines Organismus. Allerdings müssen die Versuchsreihen in späteren Projekten eine entsprechend größere Zeitspanne untersuchen, als es hier getan wurde.

Für  $\alpha$ - Tubulin lässt sich sagen, dass jetzt, wo es eine detektierbare Positivkontrolle gibt, die Untersuchungen gezielt fortgeführt werden können. Es sollte zunächst durch ein grobes Probennahmeschema überprüft werden in welchem Zeitraum  $\alpha$ - Tubulin abnimmt und dieser Zeitraum dann durch eine feinere Probennahme genau untersucht werden.

Auch die Methoden müssen noch überarbeitet werden. Es sollte versucht werden Proteine wie  $\alpha$ - Tubulin und MYBP aus ihren Strukturen herauszulösen, damit die Untersuchung besser quantifizierbar wird.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Keith W., Walker J., Practical biochemistry- Principles and techniques, Cambridge, 5. Auflage, 2000
2. Anderson N.L., Anderson N.G., Proteome and proteomics: new Technologies, new concepts and new words, Electrophoresis, 1998, S. 1853- 1861
3. Cleveland D.W., Sullivan K.F., MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF TUBULIN, Ann. Rev. Biochem., 1985, 54:331—65
4. Zambito A.M., Knipling L., Wolff J., Charge variants of tubulin, tubulin S, Membrane-bound and palmitoylated tubulin from brain and pheochromocytoma cells, Biochimica et Biophysica Acta 1601 (2002) 200– 207
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Walter, P. „Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie“, Wiley-CH, 2001
6. Hong Y.S. et al., Deficiency of dihydrolipoamide dehydrogenase due to two mutant alleles *E340K* and *G101del*/ Analysis of a family and prenatal testing, Biochimica et Biophysica Acta 1362, 1997, S. 160– 168
7. Prasad C., Rupar T., Prasad A.N., Pyruvate dehydrogenase deficiency and epilepsy, Brain & Development 33 (2011) 856–865
8. Craigen W.J., Leigh Disease With Deficiency of Lipoamide Dehydrogenase: Treatment Failure With Dichloroacetate, PEDIATRIC NEUROLOGY Vol. 14 No. 1, 1996, S. 69-71
9. Hohmann A., Lames M., Letzelter M., Einführung in die Trainingswissenschaft, 2010, Wiebelsheim, Limpert.
10. Landon F., Olomucki A., ISOLATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF BLOOD PLATELET  $\alpha$ -ACTININ, Biochimica et Biophysica Acta, Elsevier Biomedical Press, 742 (1983) 129-134
11. Lek M., North K.N., Are biological sensors modulated by their structural scaffolds? The role of the structural muscle proteins  $\alpha$ -actinin-2 and  $\alpha$ -actinin-3 as modulators of biological sensors, FEBS Letters 584, 2010, S. 2974–2980
12. Chiu C. et. al. Mutations in  $\alpha$ -Actinin-2 Cause Hypertrophic Cardiomyopathy - A Genome-Wide Analysis, Journal of the American College of Cardiology Vol. 55, No. 11, 2010
13. Hengstenberg C., Genetik der familiären hypertrophischen Kardiomyopathie, Deutsches Ärzteblatt **93**, Heft 9, 1996, S. 532- 536
14. Maruoka N.D. et al, K-Actinin-2 couples to cardiac Kv1.5 channels, regulating current density and channel localization in HEK cells, FEBS Letters 473, 2000, 188-194
15. Wyszynski M. et al. Competitive binding of  $\alpha$ - actinin and calmodulin to the NMDA receptor, Nature, Vol. 385, 1997, S. 439- 442
16. Oakley C.E., Hambly B.D., Curmi P.M.G., Brown L.J., Myosin binding protein C: Structural abnormalities in familial hypertrophic Cardiomyopathy, Cell research, 2004, 14 (2): 95-110
17. Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins during Assembly of the head of Bacteriophage T4, Nature, Vol. 227, 1970, S. 680- 685
18. Towbin H., Stähelin T., Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76, Nr. 9, 1979, S. 4350-4354

19. Rehm H., Der Experimentator- Proteinbiochemie/ Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag, 2006
20. Knecht D.A., Dimond R.L., Visualization of antigenic proteins on Western blots, Analytical Biochemistry, Vol.136, 1984, S. 180-184
21. Wessel D., Flügge U.I., A Method of the quantitative recovery of Protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, Analytical Biochemistry, 1984, S. 141-143
22. Lowry O.H. et al, PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT, J. Biological Chemistry, 1951, S. 265- 275
23. Good, Norman E.; Winget, G. Douglas; Winter, Wilhelmina; Connolly, Thomas N.; Izawa, Seikichi; Singh, Raizada M. M. (1966). "Hydrogen Ion Buffers for Biological Research". Biochemistry **5** (2): 467–77
24. Oliva A, Santoveña A, Llabres M, Fariña JB, Stability study of human serum albumin pharmaceutical preparations, J Pharm Pharmacol., 1999, 51(4):385-92
25. Lin J.J., Meyer J.D., Carpenter J.F., Manning M.C., Stability of Human Serum Albumin During Bioprocessing: Denaturation and Aggregation During Processing of Albumin Paste, Pharmaceutical Research, Vol. 17, 2000, Ausgabe 4, S. 391-396
26. Demant B., Über das Serumalbumin in den Muskeln (1880), Zeitschrift für physiologische Chemie. Band 4, Heft 5, 2009, Seiten 384–386,
27. Weisenberg R.C., Decry W.J., THE MECHANISM OF CALCIUM-INDUCED MICROTUBULE DISASSEMBLY, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol.102,No.3,1981, S. 924-931
28. Sugita H., Mechanism of Muscle Protein Degradation In Progressive Muscular Dystrophy, Brain & Development, Vol 5, No 2, 1983, S. 115
29. NuPAGE Systeminformation, Invitrogen, 2010

## 7. Abkürzungen

|         |                                     |
|---------|-------------------------------------|
| µg      | Mikrogramm                          |
| µl      | Mikroliter                          |
| 2D      | zwei dimensional                    |
| Abb.    | Abbildung                           |
| A/ Acet | Acetonfällung                       |
| AK      | Antikörper                          |
| ATP     | Adenosintriphosphat                 |
| B       | Blutproben                          |
| BCIP    | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat    |
| BS      | Lagerung bei +45°C, Brutschrank     |
| BSA     | Bovine serum albumin                |
| C       | Celsius                             |
| dd      | double distilled/ Reinstwasser      |
| DLD     | Dihydrolipoyl Dehydrogenase         |
| DTT     | Dithiothreitol                      |
| EDTA    | <b>Ethylendiamintetraessigsäure</b> |
| et al.  | et aliter                           |
| g       | Gramm                               |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| G                               | Glasperlen                                 |
| GTP                             | Guanidintriphosphat                        |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>  | Phosphorsäure                              |
| HCl                             | Salzsäure                                  |
| Hz                              | Herzmuskel                                 |
| KCl                             | Kaliumchlorid                              |
| kDa                             | Kilodalton                                 |
| KT                              | Lagerung bei +4°C, Kühlschrank             |
| l                               | Liter                                      |
| L/ Lys                          | Lysat                                      |
| LDS                             | Lithium Dodecyl Sulfat                     |
| M (1)                           | Marker                                     |
| M (2)                           | Molarität                                  |
| mA                              | Milliampere                                |
| MES                             | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure           |
| MgCL                            | Magnesiumchlorid                           |
| mm                              | Millimeter                                 |
| MOPS                            | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure         |
| Mu                              | Hüftbeugermuskel                           |
| MYBPC                           | Myosin bindendes Protein C                 |
| NaCl                            | Natriumchlorid                             |
| NBT                             | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid               |
| NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> | Ammoniumsulfat                             |
| nm                              | Nanometer                                  |
| P                               | Pellet                                     |
| PAGE                            | Polyacrylamid Gelelektrophorese            |
| pH                              | Potentia hydrogenii                        |
| PK                              | Positivkontrolle                           |
| PVDF                            | Polyvinylidenfluorid                       |
| rpm                             | rounds per minute                          |
| RT                              | Lagerung bei +20°C, Raumtemperatur         |
| SDS                             | Sodium Dodecyl Sulfate                     |
| T                               | Ultraturrax                                |
| TBS                             | Tris Puffer                                |
| TBST                            | Tris Puffer mit Tween 20                   |
| TK                              | Lagerung bei -20°C, Tiefkühlschrank        |
| Tris                            | Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan            |
| Tween 20                        | Polyoxyethylen (20) Sorbitan<br>Monolaurat |
| Ü                               | Überstand                                  |
| usw.                            | und so weiter                              |
| V                               | Volt                                       |
| W                               | Watt                                       |
| WB                              | Western Blot                               |
| well                            | Geltasche                                  |
| z.B.                            | zum Beispiel                               |
| α                               | alpha                                      |
| α- ACTN 2                       | α- Actinin 2                               |
| β                               | beta                                       |

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 47: Die Struktur von Mikrotubuli und ihrer Untereinheiten

(A) Protofilamente bestehen aus Tubulin Heterodimeren, die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Tubulin Monomeren gebildet werden. Diese binden GTP (rot).

(B) Jedes Protofilament besteht aus Tubulin Heterodimeren mit benachbarten Untereinheiten.

(C) 13 parallel ausgerichtete Protofilamente bilden eine Mikrotubuli Röhre. (aus 5)

Abbildung 48: Darstellung der Atmungskette mit den benötigten Reaktionswegen und wichtigen Reaktionsschritten. (aus 7)

Abbildung 49: Darstellung der hierarchischen Struktur eines Muskels (aus 9)

Abbildung 50: (A) Schematische Darstellung von  $\alpha$ - Actinin mit seinen Bestandteilen Actin-bindende Domäne, vier Spektrin- Wiederholungen sowie den EF- Händen (B) Darstellung der Oberflächenstruktur von  $\alpha$ - Actinin mit der Actin- Bindenden Domäne links bis zur vierten Spektrinwiederholung (aus 11)

Abbildung 51: Darstellung der Standardkurve für die Proteinbestimmung vom 09.01.13

Abbildung 52: Auftragung einer Verdünnungsreihe von Blut; Mischung aus alten Blutprobenaliquots hergestellt und homogenisiert; für die Verdünnungsreihe jeweils 100, 90, 80 etc.  $\mu$ l Überstand des Homogenisats mit Chloroform und Methanol gefällt und in 100  $\mu$ l SDS- Probenpuffer resuspendiert

Abbildung 53: Durchführung einer Verdünnungsreihe einer Muskelprobe zur Bestimmung der optimalen Menge an Überstand zum Auftragen auf ein Gel, mit dem eine gute Auftrennung erreicht werden kann. Als Marker wurde BenchMark verwendet

Abbildung 54: mit Glasperlen homogenisierte Proben als Kontrolle nicht zentrifugiert; 50  $\mu$ l Überstand mit Aceton gefällt; zweites Gel mit zentrifugierten Proben fertig gemacht (s. Abb7); Vergleich zwischen über vier Tage bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerten Muskelproben und zwischen Proteinen im Überstand und im Pellet; Test für neuen Marker „Broad Range“ (=M2) gegen „Bench Mark“ (=M1); TK= Lagerung  $-20^{\circ}\text{C}$ , KT= Lagerung  $+4^{\circ}\text{C}$ , RT= Lagerung  $+20^{\circ}\text{C}$ , BS= Brutschrank  $+45^{\circ}\text{C}$ , Ü=Überstand, P=Pellet

Abbildung 55: homogenisierte Proben zentrifugiert und 50  $\mu$ l mit Aceton gefällt. Vergleich zwischen bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerten Muskelproben und zwischen Proteinen im Überstand und im Pellet. Test für neuen Marker „Broad Range“ (=M2) gegen „Bench Mark“ (=M1); Abkürzungen wie Abb.6; Banden aus den Pellets der Proben, die im Vergleich ein abnehmendes Muster in der Intensität zeigen, wurden für eine Proteinidentifikation aus der Bahn der Probe „TK Pellet“ entnommen und zur externen Analyse an das Zentrum für Molekulare Medizin der Uniklinik Köln, Ergebnis am 31.01.13

Abbildung 56: Verwendung von Herzzelllysate als Positivkontrolle; Vergleich mit Verdünnungen von Blutproben; Test von verschiedenen Lysatmengen, um die optimale Menge für eine Detektion zu ermitteln; B=Blut, M= Marker BenchMark, L=Lysat; aufgetragene Lysatproteinmenge 7.5, 5, 2.5, 1.25  $\mu$ g; verwendete Blutverdünnungen 70, 50, 40, 30, 20  $\mu$ l Überstand gefällt

Abbildung 57: Vergleich Überstand und Pellet; Vergleich „Marker Bench“ (=M1) mit „Marker Novex“ (=M2); TK= Lagerung  $-20^{\circ}\text{C}$ , KZ= Lagerung  $+4^{\circ}\text{C}$ , RT= Lagerung  $+20^{\circ}\text{C}$ , Ü=Überstand, P=Pellet, Pep=Positivkontrolle Tubulin Lysat

Abbildung 58: Kontrollmembran zur Überprüfung des Proteindurchbruchs beim Transfer; B=Blut, M= Marker BenchMark, L=Lysat; aufgetragene Lysatproteinmenge 7.5, 5, 2.5, 1.25  $\mu$ g; verwendete Blutverdünnungen 70, 50, 40, 30, 20  $\mu$ l Überstand gefällt

Abbildung 59: Vergleich von Fällung mit Chloroform und Methanol und eiskaltem Aceton; Vergleich Homogenisierung mit Turrax und Glasperlen; Fällung von je 100  $\mu$ l Überstand sowie einem Stück Pellet aus einer tiefgefrorenen Muskelprobe; T=Turrax, G=Glasperlen,



Ü=Überstand, P=Pellet, A=Acetonfällung, C=Chloroformfällung, gr= großes Eppendorfgefäß, kl= kleines Eppendorfgefäß; Marker „Novex Sharp“

Abbildung 60: Vergleich verschieden gelagerte Gewebeproben von Hüftbeuger- und Herzmuskel. Lagerungsbedingungen -20, +4, +20, +45°C für 24 Stunden; Untersuchung der abzentrifugierten Überstände; Hz= Herzmuskel, Mu= Hüftbeuger, TK= Lagerung -20°C, KT= Lagerung +4°C, RT= Lagerung +20°C, BS=Lagerung +45°C, M3= Marker „Broad Range“

Abbildung 61: homogenisierte Proben zentrifugiert und 50 µl mit Aceton gefällt. Vergleich zwischen bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerten Muskelproben und zwischen Proteinen im Überstand und im Pellet. Test für neuen Marker „Broad Range“ (=M2) gegen „Bench Mark“ (=M1); Abkürzungen wie Abb.6; Banden aus den Pellets der Proben, die im Vergleich ein abnehmendes Muster in der Intensität zeigen, wurden für eine Proteinidentifikation aus der Bahn der Probe „TK Pellet“ entnommen und zur externen Analyse an das Zentrum für Molekulare Medizin der Uniklinik Köln geschickt; Ergebnis am 31.01.13

Abbildung 62: Darstellung der für bis zu 6 Stunden bei +45°C gelagerten und dann eingefrorenen Muskelproben; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1.1= Kontrollprobe, 1.2=Probe nach 2 Stunden, 1.3= Probe nach 4 Stunden, 1.4= Probe nach 6 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“

Abbildung 63: Darstellung der für bis zu 26 Stunden bei +45°C gelagerten und dann eingefrorenen Muskelproben; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 2.1= Probe nach 20 Stunden, 2.2= Probe nach 22 Stunden, 2.3= Probe nach 24 Stunden, 2.4= Probe nach 26 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“

Abbildung 64: Darstellung der für bis zu 52 Stunden bei +45°C gelagerten und dann eingefrorenen Muskelproben vom 21.02.13; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 3.1= Probe nach 46 Stunden, 3.2= Probe nach 48 Stunden, 3.3= Probe nach 50 Stunden, 3.4= Probe nach 52 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“

Abbildung 65: Vergleich der Muskelproben, die über eine Woche bei +20°C gelagert wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1=Kontrollprobe, 2=Probe nach 24 Stunden, 3=Probe nach 48 Stunden, 4= Probe nach 72 Stunden, 8= Probe nach 192 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“

Abbildung 66: Verwendung von Herzzelllysate als Positivkontrolle; Vergleich mit Verdünnungen von Blutproben; Test von verschiedenen Lysatmengen, um die optimale Menge für eine Detektion zu ermitteln; B=Blut, M= Marker BenchMark, L=Lysat; aufgetragene Lysatproteinmenge 7.5, 5, 2.5, 1.25 µg; verwendete Blutverdünnungen 70, 50, 40, 30, 20 µl Überstand gefällt

Abbildung 67: Vergleich Tubulin- Lysat mit Tubulin- Peptid; einfache Zielkonzentration der Positivkontrolle von 5 µg Protein pro Lane; P=Peptid, L=Lysat; L0,5= Auftrag PK 2,5 µg Proteinlysate, P1,5= 7,5 µg Peptid, P1= 5 µg Peptid, P0,5= 2,5 µg Peptid; Marker „BenchMark“

Abbildung 68: Signal in Positivkontrollen Peptid und Lysat; Verwendung von bereits resuspendierten Proben vom Herzmuskel; Lys= Tubulin- Lysat, Pep= Tubulin- peptid, Hz= Herzmuskel, TK= Lagerung -20°C, RT= Lagerung +20°C, BS= Lagerung +45°C

Abbildung 69: Detektion von Tubulin; Proben wurden z.T. mit Aceton gefällt; Mu= Hüftbeugermuskel, TK= Lagerung -20°C; Acet= Acetonfällung, 100Ü= 100 µl Überstand gefällt, 50Ü= 50 µl Überstand gefällt, 1:2= 50 µl Überstand mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und gefällt, 1:5= 20 µl Überstand mit 80 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und gefällt, 1:10= 10 µl Überstand mit 90 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und gefällt

Abbildung 70: Vergleich von Überstand und Pellet von bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Proben; Mu= Hüftbeugermuskel, TK= Lagerung -20°C, KT= Lagerung +4°C, RT= Lagerung +20°C, Ü=Überstand, P=Pellet, 100= 100µl Überstand gefällt, 50= 50µl Überstand gefällt, Pep=  $\alpha$ - Tubulin Peptid, M1= „BenchMark“, M2= „RotiMark“

Abbildung 71: Vergleich von Fällung mit Chloroform und Methanol und eiskaltem Aceton; Vergleich Homogenisierung mit Turrax und Glasperlen; Fällung von je 100 µl Überstand sowie einem Stück Pellet aus einer tiefgefrorenen Muskelprobe; zur Überprüfung der Proteinübertragung mit Tinte gefärbt

Abbildung 72: Detektion von  $\alpha$ - Tubulin; Vergleich der Muskelproben, die über eine Woche bei +20°C gelagert wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1=Kontrollprobe, 2=Probe nach 24 Stunden, 3=Probe nach 48 Stunden, 4= Probe nach 72 Stunden, 8= Probe nach 192 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 73: Detektion von  $\alpha$ - Tubulin; Vergleich der für bis zu 6 Stunden bei +45°C gelagerten und dann eingefrorenen Muskelproben; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1.1= Kontrollprobe, 1.2=Probe nach 2 Stunden, 1.3= Probe nach 4 Stunden, 1.4= Probe nach 6 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 74: Detektion von  $\alpha$ - Tubulin; Vergleich der für bis zu 26 Stunden bei +45°C gelagerten und dann eingefrorenen Muskelproben; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 2.1= Probe nach 20 Stunden, 2.2= Probe nach 22 Stunden, 2.3= Probe nach 24 Stunden, 2.4= Probe nach 26 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 75: Überprüfung der Funktionalität des neu gelieferten ACTN- Primärantikörpers; Verdünnungsreihe des neu gelieferten Zelllysats zur Festlegung der benötigten Lysatmenge; PK= Positivkontrolle, M= Marker „Novex Sharp“, G= Glasperlen, Ü=Überstand, P=Pellet, A=Acetonfällung, n=neu homogenisiert, a=bereits resuspendierte Proben, 1= 2,5 µg Proteinauftrag, 2= 5 µg Protein, 3= 7,5 µg Protein, 4= 10 µg Protein

Abbildung 76: Detektion von Actinin in den Muskelproben, die bis zu 6 Stunden bei +45°C gelagert und dann eingefroren wurden; deutliches Signal bei der Positivkontrolle; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1.1= Kontrollprobe, 1.2=Probe nach 2 Stunden, 1.3= Probe nach 4 Stunden, 1.4= Probe nach 6 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 77: Detektion von Actinin in den Muskelproben, die bis zu 26 Stunden bei +45°C gelagert und dann eingefroren wurden; deutlichstes Signal bei der Positivkontrolle; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 2.1= Probe nach 20 Stunden, 2.2= Probe nach 22 Stunden, 2.3= Probe nach 24 Stunden, 2.4= Probe nach 26 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 78: Detektion von Actinin; Vergleich der bis zu 22 Stunden bei +45°C gelagerten Muskelproben; Vergleich Pelletproben; 1.1= Kontrollprobe, 1.2= Probe nach 2 Stunden, 1.3= Probe nach 4 Stunden, 1.4= Probe nach 6 Stunden, 2.1= Probe nach 20 Stunden, 2.2= Probe nach 22 Stunden, P=Pellet, Positivkontrolle Zelllysate, Marker „Novex Sharp“

Abbildung 79: Detektion von ACTN; Vergleich der Muskelproben, die für bis zu 8 Tage bei +20°C gelagert wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1=Kontrollprobe, 2=Probe nach 24 Stunden, 3=Probe nach 48 Stunden, 4= Probe nach 72 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 80: Detektion vom ACTN; Vergleich der Pellets der Muskelproben, die für bis zu 8 Tage bei +20°C gelagert wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1=Kontrollprobe, 2=Probe nach 24 Stunden, 3=Probe nach 48 Stunden, 4= Probe nach 72 Stunden, 8= Probe nach 192 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 81: Überprüfung der Funktionalität des MYBP- Primärantikörpers; Lys1= Zelllysate, aufgetragene Proteinmenge 5 µg; Lys2= DLD- Lysate, aufgetragene Proteinmenge 2 µg; Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“

Abbildung 82: Detektion vom MYBP; Vergleich der Muskelproben, die für bis zu 8 Tage bei +20°C gelagert wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; Primärantikörperkonzentration 1:1000; 1=Kontrollprobe, 2=Probe nach 24 Stunden, 3=Probe nach 48 Stunden, 4= Probe nach 72 Stunden, 8= Probe nach 192 Stunden; Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 83: Detektion vom MYBP; Vergleich der Muskelproben, die für bis zu 8 Tage bei +20°C gelagert wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; Primärantikörperkonzentration 1:5000; 1=Kontrollprobe, 2=Probe nach 24 Stunden, 3=Probe nach 48 Stunden, 4= Probe nach 72 Stunden, 8= Probe nach 192 Stunden; Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle rekombinantes MYBP- Protein

Abbildung 84: Detektion von MYBP; Vergleich der Muskelproben, die für bis zu 6 Stunden bei +45°C gelagert und dann eingefroren wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1.1= Kontrollprobe, 1.2=Probe nach 2 Stunden, 1.3= Probe nach 4 Stunden, 1.4= Probe nach 6 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle Zelllysate

Abbildung 85: Detektion von MYBP; Vergleich von Muskelproben, die bis zu 26 Stunden bei +45°C gelagert und dann eingefroren wurden; deutlichstes Signal bei der Positivkontrolle; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 2.1= Probe nach 20 Stunden, 2.2= Probe nach 22 Stunden, 2.3= Probe nach 24 Stunden, 2.4= Probe nach 26 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle rekombinantes MYBP- Protein, 0,23 µg

Abbildung 86: Detektion von MYBP; Vergleich der für bis zu 26 Stunden bei +45 °C gelagerten Proben; Verwendung der Proben aus den Pellets; verwendete Positivkontrolle rekombinantes MYBP- Protein, 0,12 µg; Marker „Novex Sharp“; 1.1= Kontrollprobe, 1.2= 2 Stunden Lagerung, 1.3= 4 Stunden Lagerung, 1.4= 6 Std Lagerung, 2.1= 20 Std Lagerung, 2.2= 22 Std Lagerung, 2.3=24 Std Lagerung, 2.4= 26 Std Lagerung

Abbildung 87: Überprüfung der Funktionalität des neuen DLD- Antikörpers mit dem neuen DLD- Lysate sowie mit der Zelllysate; Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; PK1= Zelllysate, 5 µg Proteinauftrag; PK2= DLD- Lysate, 2µg und 4 µg Proteinauftrag

Abbildung 88: Detektion von DLD; Vergleich der Muskelproben, die für bis zu 8 Tage bei +20°C gelagert wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1=Kontrollprobe, 2=Probe nach 24 Stunden, 3=Probe nach 48 Stunden, 4= Probe nach 72 Stunden, 8= Probe nach 192 Stunden; Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle DLD- Lysate, 2 µg

Abbildung 89: Detektion von DLD; Vergleich in den Muskelproben, die bis zu 6 Stunden bei +45°C gelagert und dann eingefroren wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 1.1= Kontrollprobe, 1.2=Probe nach 2 Stunden, 1.3= Probe nach 4 Stunden, 1.4= Probe nach 6 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle DLD- Lysate

Abbildung 90: Detektion von DLD; Vergleich in den Muskelproben, die bis zu 26 Stunden bei +45°C gelagert und dann eingefroren wurden; Homogenisierung mit Glasperlen und Fällung von je 50 µl Überstand sowie einem Stück Pellet mit eiskaltem Aceton; 2.1= Probe nach 20 Stunden, 2.2= Probe nach 22 Stunden, 2.3= Probe nach 24 Stunden, 2.4= Probe nach 26 Stunden, Ü=Überstand, P=Pellet, Marker „Novex Sharp“; verwendete Positivkontrolle DLD-Lysat, 4 µg

Abbildung 91: Detektion von DLD; Vergleich der für bis zu 26 Stunden bei +45 °C gelagerten Proben; Verwendung der Proben aus dem Überstand; verwendete Positivkontrolle DLD-Lysat 4 µg; Marker „Novex Sharp“; 1.1= Kontrollprobe, 1.2= 2 Stunden Lagerung, 1.3= 4 Stunden Lagerung, 1.4= 6 Std Lagerung, 2.1= 20 Std Lagerung, 2.2= 22 Std Lagerung, 2.3=24 Std Lagerung, 2.4= 26 Std Lagerung

Abbildung 92: Detektion von DLD; Vergleich der für bis zu 26 Stunden bei +45 °C gelagerten Proben; Verwendung der Proben aus den Pellets; verwendete Positivkontrolle DLD- Lysat, 4 µg; Marker „Novex Sharp“; 1.1= Kontrollprobe, 1.2= 2 Stunden Lagerung, 1.3= 4 Stunden Lagerung, 1.4= 6 Std Lagerung, 2.1= 20 Std Lagerung, 2.2= 22 Std Lagerung, 2.3=24 Std Lagerung, 2.4= 26 Std Lagerung

## Danksagung

Ich möchte mich bei Dr. Martin Jübner bedanken, der mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Bachelorarbeit gegeben hat. Vielen Dank auch für die gute Betreuung und den konkreten Hinweisen bei der Ausformulierung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Christoph Maas bedanken, der freundlicherweise meine Betreuung als Erstgutachter übernommen hat und mir mit seinen positiven Kommentaren bei der Ausarbeitung der Arbeit sehr geholfen hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Freundinnen Tatjana Brock und Herlinda Martinez für die Mühe, die sie sich mit dem Korrekturlesen meiner Arbeit gemacht haben.

Außerdem möchte ich mich noch bei Peter Cierniak bedanken für die Hilfe beim Zurechtfinden im Labor und den gegebenen Tipps.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Labormitarbeitern bedanken für die freundliche und offene Atmosphäre.