

Proteomanalyse von Milzlymphozyten bei Fat-1 und Wildtypmäusen nach Endotoxinstimulation

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
im Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Michael Hühn
aus Asslar

Gießen 2012

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereiches Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. G. Lochnit

Gutachter: Prof. Dr. A. Bräuninger

Tag der Disputation: 17.09.2012

Veröffentlichung im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Poster

J. Grabitzki, J. Ott, M. Huehn, M. Hecker, B. Rosengarten, J. X. Kang, G. Lochnit, K. Mayer "PROTEOME ANALYSIS OF SPLEEN LYMPHOCYTES AFTER ENDOTOXIN CHALLENGE" 10th HUPO World Congress, 04.-07. September 2011, Genf, Schweiz

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1 Pathophysiologie des akuten Lungenversagens	1
1.2 LPS-induzierte Signaltransduktion	2
1.2.1 Biosynthese und Funktionen von LPS	2
1.2.2 Zytokinsynthese	6
1.3 Apoptose	7
1.3.1 Zelltod-morphologische Veränderungen/ Funktionen	8
1.3.2 Bedeutung der Apoptose	11
1.3.3 Signalkaskade der Apoptose	12
1.3.3.1 Extrinsische Apoptose	12
1.3.3.2 Intrinsische Apoptose	13
1.3.3.3 Apoptose-induzierender Faktor als Auslöser der Apoptose	14
1.4 Problemstellung	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.2 Chemikalien	18
2.3 Methoden	19
2.3.1 Proteinbestimmung	19
2.3.2 Proteinisolation	19
2.3.3 Proteinanalytik	20
2.3.3.1 Erste Dimension	20
2.3.3.2 Zweite Dimension	21
2.3.4 Proteinfärbung	23
2.3.4.1 Proteinfärbung mit Flamingo	23
2.3.4.2 Proteinmarkierung mit CyDye	23
2.3.5 Densitometrische Auswertung	25
2.3.6 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel	26
2.3.7 Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)	27

Inhaltsverzeichnis

3. Ergebnisse	28
3.1 Auswertungen der Gele	29
3.1.2 Qualitativ regulierte Proteine (on/off)	36
3.1.3 Quantitativ differentiell regulierte Proteine	51
4. Diskussion	63
4.1 Methodenoptimierung für zweidimensionale Gelelektrophorese	63
4.2 Einfluss von Lipiden in der Entzündung	67
4.3 Proteomanalyse der Milzlymphozyten von Wildtypmäusen und Fat-1-Mäusen unter LPS-Stimulation	69
4.4 Ausblick	72
5. Zusammenfassung	73
6. Summary	75
7. Literaturverzeichnis	77
Lebenslauf	84
Danksagung	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Diffuse Lungeninfiltrate im Röntgenbild	1
Abb. 2 Struktur des Lipopolysaccharids modifiziert nach Alexander und Rietschel	4
Abb. 3 Signalweg des Lipopolysaccharids	5
Abb. 4 Lichtmikroskopische Darstellung der Zelle unter Nekrose (A) und Apoptose (B)	9
Abb. 5 Schematische Darstellung einer gesunden Zelle und einer Zelle, die „Selbstmord“ begeht	10
Abb. 6 Schematische Darstellung der Signalkaskade der Apoptose	15
Abb. 7 Signalkaskade der Apoptose	16
Abb. 8 Proteinmarkierung mittels CyDye	24
Abb. 9 2D-DIGE-Gele von Wildtypmäusen und Fat-1-Mäusen	30
Abb. 10 2D-Gele von Wildtypmäusen angefärbt mit DIGE und Flamingo mit 4 Stunden 10 µg LPS Stimulation und ohne LPS Stimulation.	31
Abb. 11 Beginn der Auswertung der 2D-Gele in PD-Quest von BioRad	32
Abb. 12 Bestimmung der Quantität und Qualität einzelner Proteinspots	33
Abb. 13 Nähere Analyse während der Auswertung der 2D-Gele in PD-Quest	34
Abb. 14 Darstellung über die Quantität der Proteine in allen Gelen	35
Abb. 15 Funktionelle Klassifikation aller identifizierten Proteine aus Wildtypmäusen und FAT-1-Mäusen	37
Abb. 16 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von HSP90b1	39
Abb. 17 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von Tubulin alpha 1	40
Abb. 18 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von ATP5b	41
Abb. 19 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von Crk Protein	41
Abb. 20 Darstellung der Expression einzelner Proteine nach 4, 24 und 72 Stunden nach erfolgter LPS-Stimulation	53
Abb. 21 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von Rcan2	54
Abb. 22 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von Rgs4	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:

Identifizierte Proteine aus Milzlymphozyten von Fat-1-Mäusen und Wildtypmäusen eingeteilt in: qualitative Proteine, die exprimiert werden ohne eine LPS-Stimulation; qualitative Proteine die unter 10 µg LPS-Stimulation nach 4, 24 und 72 Stunden exprimiert werden.

43

Tabelle 2:

Quantitativ differentiell regulierte identifizierte Proteine Milzlymphozyten von Fat-1-Mäusen und Wildtypmäusen, die unter 10 µg LPS-Stimulation nach 4, 24 und 72 Stunden exprimiert werden. Die Werte der Hoch- bzw. Runterregulierung werden in der Tabelle 2 jeweils bei den entsprechenden Genen angegeben. Ein positiver Wert wird als Hochregulierung, ein negativer Wert als Runterregulierung bezeichnet.

56

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ACTH	Adreno-Corticotrope Hormon
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
ALI	<i>acute lung injury</i> -
AMPS	Ammoniumperoxidsulfat
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ÄSS	Äquilibrierungsstammlösung
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bzw	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
DIGE	<i>Differential in-Gel Electrophoresis</i>
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EPA	Eicosapentaensäure
etc	etcetera
EtOH	Ethanol
FADD	Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoff-Konzentration
ggf	gegebenenfalls
HAc	Essigsäure
H ₂ O	Wasser
HSP	Hitzeschockprotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPG	Immobilisierter PH-Gradient
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor–assoziierte Kinase
kVh	Kilovoltstunden
L	Liter
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein

Abkürzungsverzeichnis

LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight Massenspektrometrie
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometer
n3-Fettsäuren	Omega-3-Fettsäuren
n-6 Fettsäuren	Omega-6-Fettsäuren
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PI-3-K	Phosphoinositol-3 Kinase
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat/Polyacryamid Gelelektrophorese
TEMED	<i>N,N,N,N</i> - Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF 6	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
u.a.	unter anderem
Vh	Voltstunden
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
2D	zweidimensional
2D-SDS-PAGE	zweidimensionale Gelelektrophorese
sog	sogenannte

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie des akuten Lungenversagens

Das akute Lungenversagen stellt eine schwerwiegende Komplikation einer Lungenentzündung mit hoher Sterblichkeit dar. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 4/100 000 Menschen an einer Schocklunge, bei einer Letalität von 40–50 % (Esteban et al. 2002).

Das akute Lungenversagen (*acute lung injury* - ALI) ist charakterisiert durch schnelle alveolare Verletzungen, Entzündungsreaktionen, Zytokininduktionen und neutrophile Akkumulation. Es wird definiert als „Syndrom einer Entzündung mit gesteigerter Permeabilität der Blutgefäße, das mit klinischen, radiologischen und physiologischen Abnormalitäten und höchstwahrscheinlich mit einem lungenkapillären Hochdruck einhergeht“ (Zhou et al. 2005; Zhou et al. 2005).

Die Schocklunge (*acute respiratory distress syndrome* – ARDS; Abb. 1) ist die Reaktion der Lunge auf verschiedene schädigende Faktoren; unabhängig davon, ob die daraus resultierenden pulmonalen Entzündungsmechanismen primär pulmonal oder systemisch ausgelöst werden. In der Frühphase der Schocklunge treten Nekrosen der Typ-I Pneumozyten und alveolären Endothelzellen auf. Dadurch kommt es zu einem interstitiellen Lungenödem. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem fibrinreichen intraalveolären Lungenödem mit Auskleidung der Alveolarsepten durch hyaline Membranen. Diese hyalinen Membranen bestehen aus Fibrin und nekrotischem Material. Ausdruck der Endothelschädigung ist auch das Auftreten von hyalinen Mikrothromben. Die Schädigung der Pneumozyten Typ-II führt zur fehlenden Synthese von Surfactant und zu damit zu Atelektasen. In der Spätphase entwickelt sich schließlich eine Lungengerüstfibrose und im Gefolge eine irreversible Lungenfunktionsstörung. Dies ist etwa 10 bis 15 Tage nach Auftreten des ARDS der Fall. Das Verhältnis zwischen dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck (P_{aO_2}) und der inspiratorischen Sauerstoff-Konzentration (F_{iO_2}), den sog. Oxygenierungsindex (P_{aO_2}/F_{iO_2}), definiert den Unterschied zwischen ALI (<300 mm Hg) und ARDS (<200 mm Hg).

Es gibt pulmonale und extrapulmonale Auslöser dieser Lungenerkrankung. Zu den pulmonalen Auslösern gehören die bakterielle oder virale Pneumonie, Lungenkontusion, Inhalationstrauma oder auch Beatmungstrauma. Zu den extrapulmonalen Gründen zählen z.B. die Sepsis, entzündliche Erkrankungen von Organen, Mehrfachverletzungen nach Unfällen oder die Folge eines operativen Eingriffs.

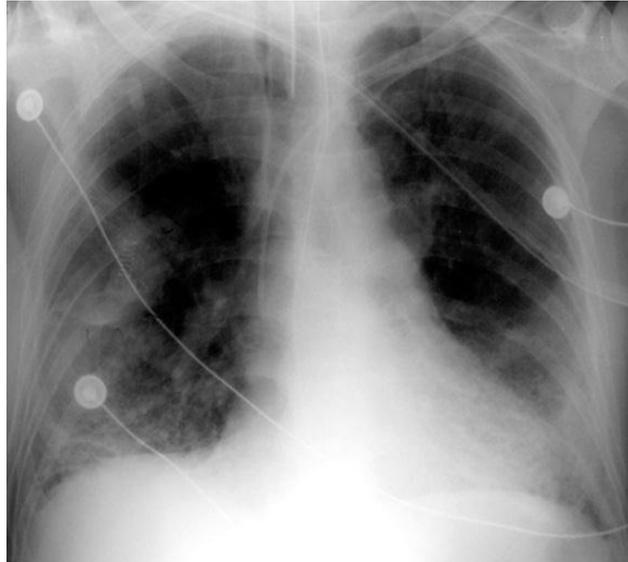


Abb. 1 Diffuse Lungeninfiltrate im Röntgenbild

(<http://images.emedicinehealth.com/images/4453/4453-13253-51571-51631.jpg>)

1.2 LPS-induzierte Signaltransduktion

1.2.1 Biosynthese und Funktionen von LPS

Lipopolysaccharide (LPS) sind thermostabile Verbindungen aus fettähnlichen Lipo- sowie Glyko-Bestandteilen (Polysacchariden). LPS sind Wandbestandteile gramnegativer Bakterien. Sie wirken als Antigene und dienen der serologischen Charakterisierung und Identifizierung der Bakterien. Beim Zerfall der Bakterien werden Teile davon frei und wirken toxisch. Diese Teile werden als Endotoxine bezeichnet und von intakten Bakterien nicht abgegeben.

LPS besteht aus einem Lipidteil, dem Lipid A und Polysaccharid-Seitenketten (Abb. 2):

Die Lipid A-Struktur bildet den inneren Bereich des LPS und ist für die immunologische Funktion verantwortlich und bei fast allen gramnegativen Bakterien identisch. Die Seitenketten können zwischen den verschiedenen gramnegativen Bakterien stark variieren. Jedoch zählen zu den häufigsten Fettsäuren die Palmitin- und Stearinsäure. Die Gabe des purifizierten Toxins in einen Organismus hat eine regelhafte Sequenz von Abläufen zur Folge (Christman et al. 1990). Die Kernregion ist an das Lipid A gebunden und besteht aus einer inneren und einer äußeren Kernregion. Sie besteht im Wesentlichen aus 2-Keto-3-desoxy-octonat sowie Heptosen, Glukose, Galaktose und N-Acetylglukosamin. Auch die Kernregion kann bei unterschiedlichen Bakterienarten verschieden sein. Lipid A und die Kernregion werden im Zytoplasma synthetisiert und dort aneinandergelagert. Dieser Verband wird dann durch die Zytoplasmamembran geklappt und lagert sich spontan in die äußere Membran der Zellwand ein (Lien et al. 2000).

Ein an den Kern gebundenes Polysaccharid bildet den dritten, äußeren Bereich. Es bildet eine Kette aus einem oder mehreren Hexosen (z.B. Galaktose, Glukose und Mannose) sowie einen oder mehrere Didesoxyzucker wie Abequose, Colitose, Paratose oder Tyvelose, zum Teil modifiziert. Durch die Wiederholung der Zuckersequenzen entsteht das lange Polysaccharid. Dieses Polysaccharid wird als O-Polysaccharid bezeichnet, weil es als O-Antigen des Bakteriums fungiert. Dieser Bereich ist je nach Bakterienart und -stamm verschieden und kann zur Unterscheidung der Bakterien genutzt werden. Die Polysaccharidketten können sehr kurz sein oder fehlen. Ein Fehlen der Kernregion kommt nicht vor. Polysaccharidketten werden auch im Zytoplasma synthetisiert. Für den Transport durch die Plasmamembran wird es an Undecaprenylphosphat gebunden. Dadurch bekommt es ein lipophiles Ende, durch das es durch die Zytoplasmamembran gezogen werden kann. Im periplasmatischen Raum werden nun durch Polymerasen Teilbereiche kopiert und an die vorhandenen Ketten gehängt. Nun werden die Polysaccharidketten mit dem Lipid A-Kernregion-Verband durch Ligasen verbunden.

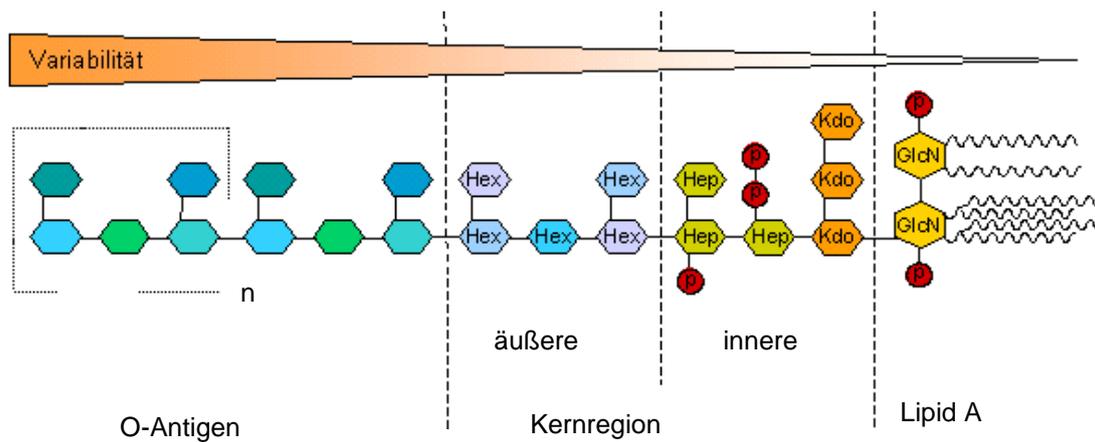


Abb. 2 Struktur des Lipopolysaccharids modifiziert nach Alexander und Rietschel

Im Blut wird LPS an das spezifische von der Leber gebildete Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP) gebunden. Dieser Komplex bindet an CD14, den LPS spezifischen Oberflächenrezeptor, und induziert über NF- κ B die Freisetzung von TNF und IL-1 β (Abb. 3). CD14 ist ein Glykoprotein, das als Oberflächenrezeptor fungiert und sich auf der Zelloberfläche reifer Leukozyten befindet. Es spielt eine wichtige Rolle bei der LPS-induzierten Zellantwort und kommt auf Monozyten, Makrophagen, aber auch neutrophilen Granulozyten vor. Die CD14-Expression wird wiederum durch TNF vorübergehend parakrin induziert. LPS kann durch die zirkumventrikulären Organe direkt in das Gehirn gelangen und von dort ausgehend, vor allem in der Mikroglia ihren eigenen Rezeptor, CD14, vermehrt induzieren, um dann lokal die nachfolgende Zytokinproduktion anzuregen (Schumann 1992; Rivest et al. 2000).

Der TLR4 ist der vorherrschende, dominante Rezeptor für die durch LPS ausgelösten Effekte (Andonegui et al. 2002; Andonegui et al. 2003). An diesen Rezeptor bindet der LPS-LBP/CD14-Komplex und löst eine Signalkaskade über die Aktivierung der Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK) und den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6) aus. Anschließend erfolgt eine Translokation von NF- κ B aus dem Zytosol in den Zellkern, wo die Transkription von Zielgenen initiiert wird. Dabei spielt NF- κ B eine Schlüsselrolle in der Genexpression von pro-inflammatorischen Mediatoren und

Zytokinen, wie z.B. TNF α oder Interleukin (IL)-8 (Beutler 2000; Han et al. 2002; Poynter et al. 2003).

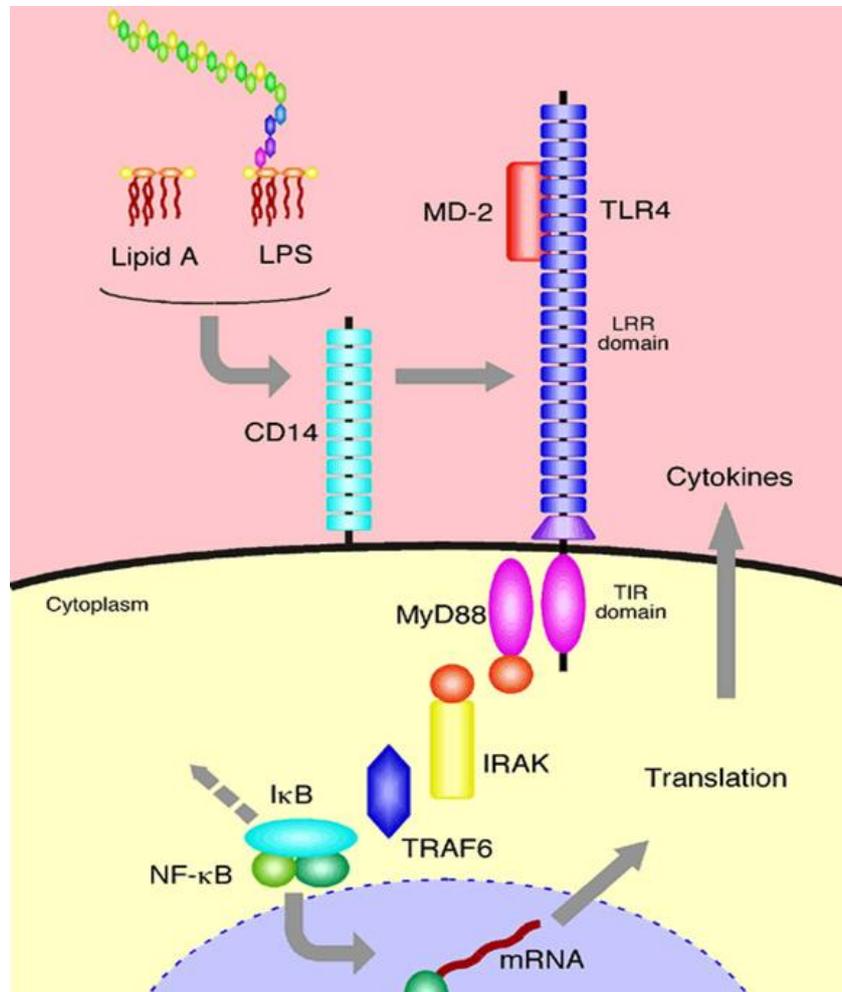


Abb. 3 Signalweg des Lipopolysaccharides

Die Lipid A-Struktur des LPS bindet an LBP und bildet einen Komplex. Dieser Komplex koppelt an CD14, den Rezeptor für bakterielles Endotoxin, und diese Verbindung interagiert mit dem TLR4. Die Signaltransduktion geht nun über MyD88, IRAK und TRAF6 zur Phosphorylierung von I κ B und somit zu einer Aktivierung von NF- κ B. Dieser transloziert in den Zellkern und löst letztendlich die Synthese von pro-inflammatorischen Mediatoren aus. (Darstellung erstellt von „GlycoWord“)

Beim sog *shedding* wird membranständiges CD14 nach LPS/LBP-Kontakt aufgrund einer Überstimulation von TNF α von der Zelloberfläche abgelöst werden, was zu einem Anstieg von löslichem CD14 in der Blutbahn führt .

1.2.2 Zytokinsynthese

Zytokine sind Glykoproteine, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren. Man unterscheidet fünf Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone, Interleukine, kolonie-stimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Es handelt sich um Proteine, die vor allem die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen einleiten oder regulieren und u.a. eine wichtige Rolle bei für immunologischen Reaktionen spielen.

Zu diesen Zellen gehören unter anderem auch die Monozyten und Alveolarmakrophagen. Alveolarmakrophagen befinden sich in den Alveolen und sind monozytärer Herkunft. Sie phagozytieren aerogen aufgenommenes oder örtlich freigesetztes Material und sind die initialen Aktivatoren der Entzündungskaskade. Monozyten transmigrieren bei Auslösung eines Lungenversagens verstärkt in die Alveolen. Nach Aktivierung der Monozyten durch LPS sezernieren diese TNF α .

TNF- α kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anregen. Es löst Fieber aus und ist an der Entstehung der Kachexie bei bestimmten Krankheiten beteiligt. Ferner hat es Effekte auf den Fettstoffwechsel, die Koagulation, die Insulinresistenz und die endotheliale Funktion (Beasley et al. 1989; Hehlhans et al. 2005). Dies geschieht über Bindung des TNF-Trimers an den TNF-Rezeptor 2. In Studien wurde gezeigt, dass die Enden, die für die Rezeptorbindung und biologische Aktivität wichtig sind, in den Untereinheiten des TNF-Trimers lokalisiert sind (Yamagishi et al. 1990; Van Ostade et al. 1994).

Der lösliche TNF wirkt auf zwei Rezeptoren, die er mit TNF β teilt, den TNF-R1 und den TNF-R2. Man nimmt an, dass der größte Teil der TNF-Aktivität über den TNF-R1 vermittelt wird. Beide Rezeptoren aktivieren den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dieses führt zu Zellaktivierung, Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion und Hemmung von Apoptose. Der TNF-R1 kann auch (bei Abwesenheit von TRAF2) einen intrazellulären apoptoseinduzierenden Komplex bilden, der über die Aktivierung spezifischer Caspasen die Apoptose auslöst. Viele seiner Funktionen hat der TNF mit Interleukin-1 β und Interleukin-6 gemeinsam .

TNF α stimuliert über die Ausschüttung von IL-1 β fast alle kernhaltigen Leukozyten, induziert die Bildung von IL-6 aus den Zellen des Immunsystems und

wirkt mit IL-6 synergistisch als Aktivator einiger Akut-Phase-Proteine und der Komplementkaskade. An dem Endothel fördert TNF- α zusammen mit IL-6 die Adhärenz von Granulozyten (Palluy et al. 1992; Rahman et al. 2006) und damit die Diapedese von weiteren Leukozyten in das Entzündungsgebiet. Interleukin-6 wird von den Zellen des Immunsystems sezerniert und wirkt auf alle peripheren Zielzellen (B-Zellen, Hepatozyten, Fibroblasten) pro-inflammatorisch (Damas et al. 1989; Steinmetz et al. 1995). Darüber hinaus steigert es die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Ausschüttung von Corticotropin-releasing Hormon (CRH), welches, vermittelt über das Adreno-Corticotrope Hormon (ACTH), in der Nebennierenrinde die Cortisol synthese und -sezernierung steigert. Cortisol bewirkt eine negative Rückkopplung auf IL-6 über eine Hemmung der Produktion von IL-6 aus Monozyten und Fibroblasten (Heinrich et al. 1990; Taylor et al. 1997; Ott 2008).

1.3 Apoptose

Apoptose oder auch programmierter Zelltod ist ein kontrollierter, durch Genexpression gesteuerter "Selbstmord" der Zelle. Im Gegensatz zur Nekrose wird hierbei keine Entzündungsreaktion auslöst. So können Zellen des Immunsystems, wie die T-Lymphozyten, mit Hilfe des CD95 (APO-1/Fas) und anderer „Todessysteme“ Selbstmord begehen und andere T-Lymphozyten töten. Die Apoptose sensitiver T-Lymphozyten ist von entscheidender Bedeutung für das Gleichgewicht des Immunsystems, für Selbsttoleranz, Immunsuppression und das Abschalten einer Immunantwort. Verminderte Apoptose kann zum Auftreten von Autoimmun- und Tumorerkrankungen führen. Große Fortschritte sind bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Apoptosesignalgebung gemacht worden. Diese Fortschritte sind von Bedeutung für die Erklärung der Pathogenese von Erkrankungen und in Zukunft auch für rationale Therapieansätze.

1842 erkannte bereits Carl Vogt, dass Zellen durch „programmierten“ Tod sterben können. Der Embryologe Glucksmann konnte 1951 den Tod embryonalen Gewebes auf den Tod einzelner Zellen zurückführen. 1972 veröffentlichten Kerr und Mitarbeiter eine Arbeit, bei der sie an toxinbehandelten Leberzellen eine den

sterbenden Embryonalzellen vergleichbare Morphologie beobachteten und prägten hierfür den umfassenden Begriff „Apoptose“ .

Im Bodennematoden *Caenorhabditis elegans* wurden Gene identifiziert, die die Apoptose negativ beeinflussen. Während der Entwicklung dieses Nematoden sterben genau 131 der 1090 somatischen Zellen durch Apoptose. Dabei sind es immer Zellen der gleichen Entwicklungslinie, die sterben. Durch Mutationsanalysen konnten Gene identifiziert werden, die für die Apoptose der entsprechenden Zellen wichtig sind: *ced-3* und *ced-4* sind für die Ausführung der Apoptose essenziell, während *ced-9* die Aktivität von *ced-3* und *ced-4* hemmt, und die Zellen somit vor Apoptose schützt. *EGL-1* wurde als Gen des Apoptoseprogramms identifiziert, das mit *CED-9* wechselwirken kann (Conradt et al. 1998). 2002 bekamen Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre wissenschaftlichen Arbeiten über den programmierten Zelltod.

1.3.1 Zelltod-morphologische Veränderungen/ Funktionen

Es gibt zwei verschiedene Arten von Zelltod: die Nekrose und die Apoptose. Bei der Nekrose schwellen die Zelle und der Zellkern aufgrund von Wassereinstrom an, Vakuolen werden gebildet, und es wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst mit Einströmen von Granulozyten in das Nekrosegebiet (Abb. 4). Bei der Apoptose schrumpft die Zelle und das Chromatin kondensiert. Die DNA wird durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen charakteristisch gespalten. Dadurch entstehen DNA-Fragmente von einer Länge von 200 Basenpaaren. Die Zellmembranstabilität geht verloren und es bilden sich membranumschlossene Ausstülpungen, sog. „membrane blebbing“. Parallel dazu wird ein Verlust der Membranasymmetrie beobachtet, der zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche führt. Bei der Apoptose gibt es keine Immunantwort, die toten Zellen werden über eine „reguläre“ Phagozytose entsorgt. Es kommt nicht zu einer Entzündungsreaktion. Die Apoptose ist die häufigste Form des Zelltodes im Organismus.

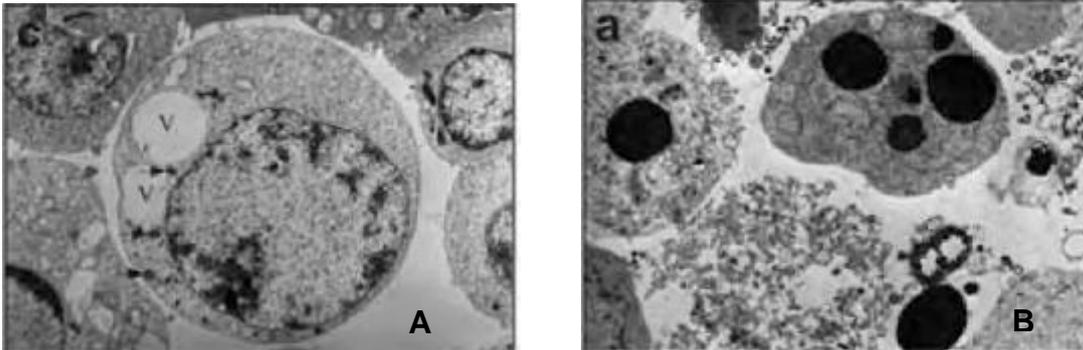


Abb. 4 Lichtmikroskopische Darstellung der Zelle unter Nekrose (A) und Apoptose (B)

A zeigt die Zelle bei einer Nekrose. Der Zellkern ist deutlich vergrößert und es haben sich Vakuolen gebildet. B zeigt den Zustand der Zelle bei einer Apoptose. Die Zelle ist sichtbar kleiner und es haben sich „Membrane blebs“ gebildet.
http://www.uniklinik-duesseldorf.de/img/ejbfile/Apoptose_web.pdf?id=9907

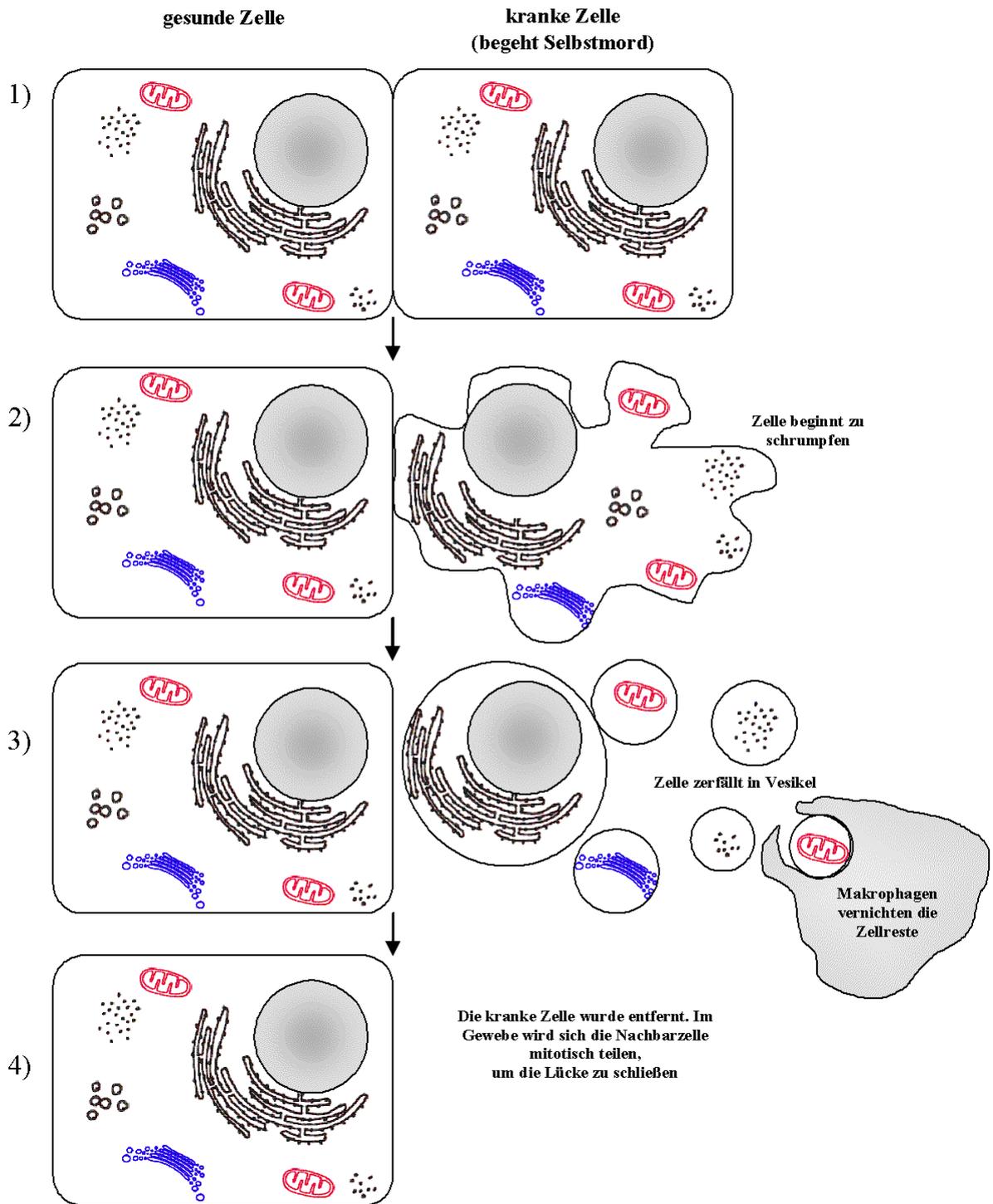


Abb. 5 Schematische Darstellung einer gesunden Zelle und einer Zelle, die „Selbstmord“ begeht

<http://www.omni.to/upload/krebs-killer/files-de/apoptose.png>

1.3.2 Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose ist für die normale Entwicklung und Funktion des Organismus unerlässlich. Sie erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben. Dazu zählen nicht nur die Elimination entarteter oder potentiell schädlicher Zellen und die Selektion genetisch intakter Keimzellen. Auch bei der Erhaltung der Gewebemöostase spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle. Es muss immer dafür gesorgt werden, dass neu entstehende Zellen und sterbende Zellen sich das Gleichgewicht halten. Sowohl zu viele neu gebildete wie zu wenig sterbende Zellen können zum Krebs führen. Bei der Embryogenese kann aufgrund der Apoptose durch die Entfernung bestimmter Zellen die Körpergestalt geformt werden, z. B. bei der Ausbildung der Finger und Zehen bei höheren Wirbeltieren. Zwischen ihnen befindet sich Gewebe, wenn sie gebildet werden, das dann aufgelöst werden muss, wenn keine Schwimmhaut vorhanden sein soll. Ferner wird durch apoptotischen Zelltod der Zellen von Glaskörper und Linse des Linsen Auges die Lichtdurchlässigkeit der Augenlinse erreicht. Apoptose findet in solchen Geweben statt, die einen hohen Turnover haben, wie z. B. das Riechepithel, Darmschleimhaut oder Gebärmutter Schleimhaut. Allerdings werden Zellen, die durch virale Infektion oder durch Mutation geschädigt sind, ebenso durch Apoptose entfernt. Bei unzureichender Apoptose kann es zu Autoimmunerkrankungen, Krebs oder Virusinfektionen kommen. Übermäßige Apoptose spielt eine Rolle etwa bei AIDS (Gandhi et al. 1998; Lehner et al. 2011), Lebererkrankungen, Schlaganfällen und neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Parkinson oder Alzheimer) (McCloskey et al. 1995; D'Souza et al. 1996). Im Immunsystem besteht die wichtigste Aufgabe der Apoptose in der Beseitigung potenziell autoreaktiver oder nutzloser Immunzellen. T-Zellen durchlaufen im Thymus die Prozesse der positiven und negativen Selektion. Durch negative Selektion findet die Eliminierung von T-Zellen statt, deren T-Zell-Rezeptoren mit Komplexen aus körpereigenen Peptiden und MHC reagieren und die damit potenziell autoreaktiv sind. Auf ähnliche Weise werden im Knochenmark B-Zellen mit einem nichtfunktionellen B-Zell-Rezeptor durch Apoptose beseitigt (Osmond 1993; Froelich et al. 1998). Gegenwärtig wird die Apoptose besonders im Zusammenhang mit der Krebsentstehung, neurodegenerativen Erkrankungen und verschiedenen Autoimmunerkrankungen erforscht. Ein Ziel der Krebsforschung ist

es, kontrollierte Apoptose bei entarteten Zellen auszulösen (Igoillo-Esteve et al. 2010; Calopa et al. 2010; Bivona et al. 2011).

1.3.3 Signalkaskade der Apoptose

Es gibt 3 unterschiedliche Mechanismen, die eine Apoptose auslösen:

- extrinsische Apoptose; Typ I, Apoptose durch externe Signale
- intrinsische Apoptose, Typ II, Apoptose durch interne Signale
- Apoptose durch den Apoptose-induzierenden Faktor

1.3.3.1 Extrinsische Apoptose

Die extrinsische Apoptose wird durch externe Signale ausgelöst. Dieser Signalweg wird über Ligandenbindung an sog. Todesrezeptoren der NGF-/TNF-Rezeptorsuperfamilie auf der Zellmembran vermittelt. Charakteristisch für die NGF-/TNF-Rezeptorfamilie sind zwei bis sechs extrazelluläre cysteinreiche Domänen. CD95 gehört zur NGF-/TNF-Rezeptorfamilie und ist in der Lage Apoptose auszulösen. CD95 wird in den meisten Säugetiergeweben exprimiert. Es ist ein glykosyliertes Transmembranprotein mit einer molekularen Masse um die 50 kDa (Yonehara et al. 1989; Itoh et al. 1991; Oehm et al. 1992). Allerdings wird von diesen Rezeptoren nicht nur Apoptose ausgelöst. Differenzierung und Proliferation gehören ebenso zu ihren Funktionen. Strukturell wichtig für die Auslösung von Apoptose ist eine ungefähr 80 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne der Todesrezeptoren, die als Todesdomäne (Death Domain) bezeichnet wird (Itoh et al. 1993). Der Komplex zwischen aktivierten CD95-Rezeptoren und den assoziierten Signalmolekülen wurde „den Tod induzierender Signalkomplex“ genannt (DISC, Tod induzierender Signalkomplex). An die Todesdomäne der Todesrezeptoren bindet das „Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD). FADD besitzt neben der Todesdomäne auch eine Todeseffektordomäne, über die Zymogen proCaspase 8 mit ihrer Todeseffektordomäne an den Komplex bindet. Diese wird daraufhin aktiviert. Die aktive Caspase 8 löst als sog Initiatorcaspase die Caspasen-Kaskade aus. Aufgrund eines Cysteins im aktiven Zentrum und der

besonderen Spezifität dieser Proteasen, nach einem Aspartat zu spalten, wurden sie Caspasen (Cystein-Aspartasen) genannt. So werden schließlich zelluläre Substrate (Todessubstrate) gespalten. Die Spaltung dieser zellulären Substrate bestimmt das morphologische und biochemische Bild der Apoptose (Abb. 4; Abb. 5). Zu diesen Substraten gehören viele Proteine, unter anderem Proteine des Zellgerüsts wie Aktin und Plektin. Darüber hinaus spalten und inaktivieren die Effektorcaspasen-Proteine, die DNA-spaltende Enzyme (Endonukleasen) hemmen. Dies bewirkt, dass diese Enzyme jetzt in den Zellkern wandern und dort die DNA „geordnet“ zerstückeln, nämlich zwischen den DNA-Schutzproteinen, den Nukleosomen. Da diese auf der DNA in definierten Abständen aufgereiht sind, stellt sich die zerstückelte DNA bei biochemischer Analyse auf einem Gel in charakteristischer Weise als „DNA-Leiter“ dar (Boldin et al. 1996; Liu et al. 1999; Krammer 2000).

1.3.3.2 Intrinsische Apoptose

Diese Form des Zelltods wird auf dem intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg eingeleitet. In Typ-II-Zellen ist die Caspase-8-Aktivierung aus bisher unbekanntem Gründen nicht ausreichend, um eine Caspasenkaskade zur Apoptosesignalgebung zu ermöglichen. Eine entscheidende Rolle in der Regulation der Apoptose in Typ-II-Zellen spielen die Proteine der Bcl-2-Familie. Die eigentliche Funktion von Bcl-2 besteht darin, Zellen vor Apoptose zu schützen. Die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine umfasst eine Reihe antiapoptotischer Moleküle (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1) und Moleküle, die Apoptose auslösen oder verstärken können (Bax, Bak, Bcl-xS, Bad, Bid, Bik, Bim, Hrk, Bok). Die Funktion von Bcl-2 wird durch die Entdeckung unterstrichen, dass CED-9 aus *C. elegans* und Bcl-2 homologe Proteine sind. Ebenso weist das *C. elegans*-Protein EGL-1 Homologien mit den pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern wie Bik, Bid oder Bad auf (Conradt et al. 1998). Obwohl bisher viele Funktionen für Bcl-2 beschrieben sind, ist der genaue Grund für die antiapoptotische Wirkung dieses Proteins bisher unverstanden. Bcl-2 besitzt eine Transmembran-Domäne am C-Terminus, die zu einer Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, die Kernmembran und das Endoplasmatische Retikulum führt (Monaghan et al. 1992; Shiraishi et al. 2006). Durch Deletion dieser Domäne verliert Bcl-2 weitgehend

seine antiapoptotische Wirkung (Tanaka et al. 1993). Beim intrinsischen Weg oder der Apoptose des Typs II kommt es durch noch nicht genau bekannte Mechanismen zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren (z.B. Smac/DIABLO) aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Cytochrom c bindet an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1). Durch die Ablösung von Apaf-1 von der Zellmembran der Mitochondrien, kommt es zur Bildung von Apoptosomen, das schließlich die Caspase-9 aktiviert. Caspase-9 aktiviert daraufhin weitere Caspasen. Es wirken jedoch viele toxische Substanzen wie z. B. Chemotherapeutika auch direkt auf die Mitochondrien und können so die Typ II Apoptose induzieren (Abb. 6; Abb. 7) (Aloya et al. 2006).

1.3.3.3 Apoptose-induzierender Faktor als Auslöser der Apoptose

Die dritte bisher bekannte Möglichkeit ist die Auslösung von Apoptose durch den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF). Der Apoptosis-Inducing Factor ist ein Protein, das bei gesunden Zellen im intermembranösen Raum der Mitochondrien vorkommt. Seine Freisetzung aus diesem Kompartiment führt zu morphologischen Veränderungen des Zellkerns, u.a. zur Kondensation des Chromatins und zur Fragmentierung der DNA. Darüber hinaus regt AIF die Freisetzung von Caspase-9 aus den Mitochondrien an (Damianovich et al. 2006).

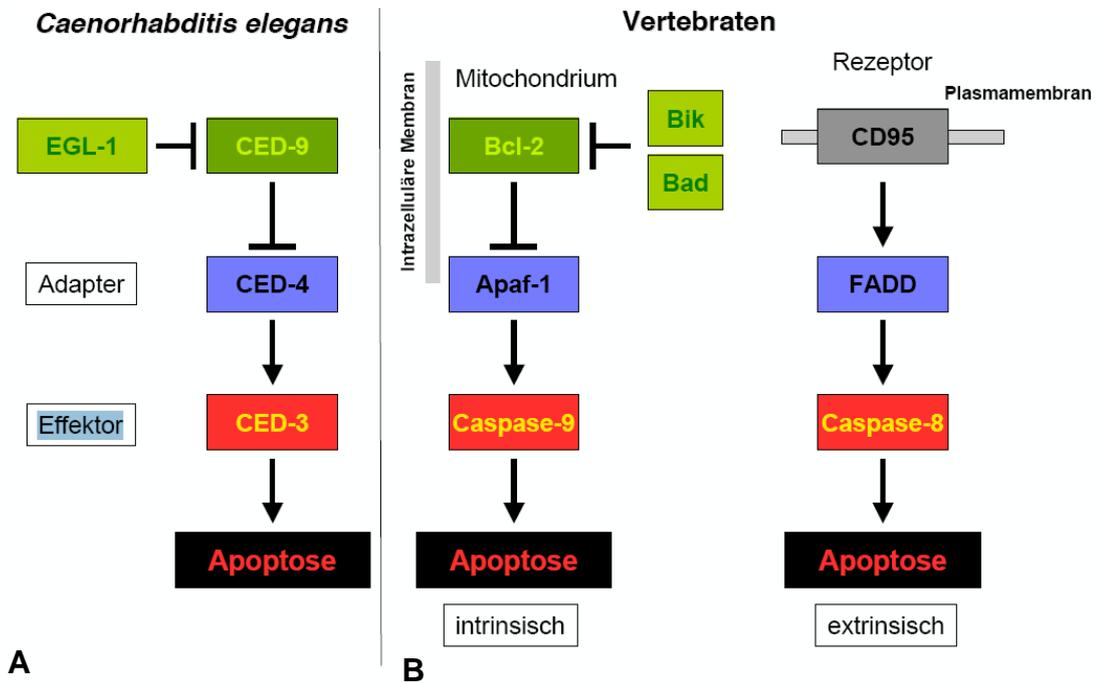


Abb. 6 Schematische Darstellung der Signalkaskade der Apoptose

Darstellung des Apoptoseauslösers bei *C. elegans* (A) sowie die Intrinsische und extrinsische Auslösung der Apoptose in Vertebraten (B)

http://www.uniklinik-duesseldorf.de/img/ejbfile/Apoptose_web.pdf?id=9907

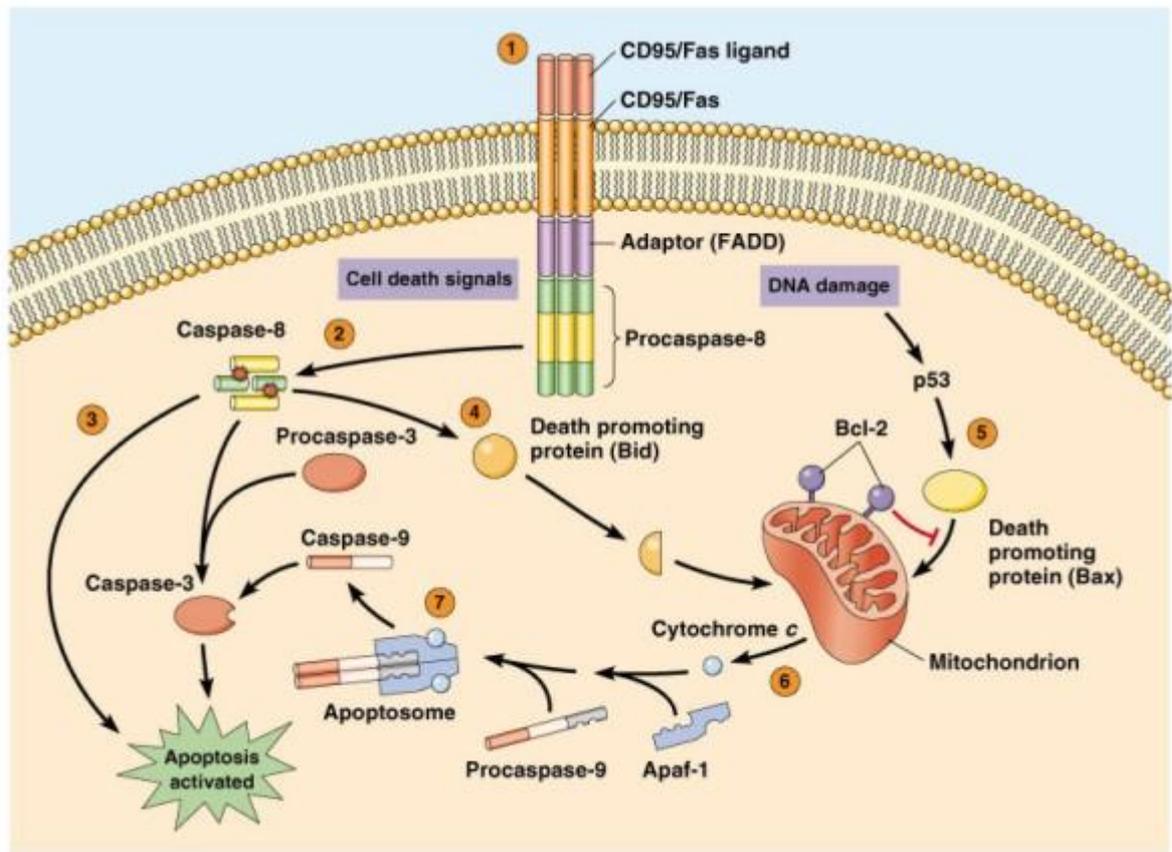


Abb. 7 Signalkaskade der Apoptose

Darstellung der intrinsischen sowie extrinsischen Signalkaskaden in einer Zelle über Aktivierung der Caspasen und schließlich die Auslösung der Apoptose.

<https://www.meduniwien.ac.at/pharmakologie/mitarbeiter/images/apoptosis.jpg>

1.4 Problemstellung

Akute infektiöse pulmonale Erkrankungen wie die Pneumonie und das parapneumonische akute Lungenversagen sind auch heute noch schwerwiegende Erkrankungen mit hoher Mortalität. Die Prävalenz des akuten Lungenversagens beträgt 12,5% aller Patienten, die länger als 24 Stunden auf der Intensivstation behandelt werden. Die Mortalitätsraten liegen zwischen 40 – 60% (Brun-Buisson et al. 2004).

Anhand einer Studie mit FAT-1-Mäusen, die vermehrt n3-Fettsäuren produzieren und Wildtypmäusen wird durch inhalative Applikation von Pathogenitätsfaktoren im Mausmodell eine alveoläre Inflammation induziert. Die Milzlymphozyten der Mäuse werden zu definierten Zeitpunkten nach der Applikation von LPS einer Proteomanalyse unterzogen. Hierzu werden Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie analysiert. Durch Vergleich der Proteome in verschiedenen biologisch und experimentell definierten Zuständen können die relevanten Proteine identifiziert und einer funktionellen Analyse zugeführt werden, um die zugrunde liegenden Mechanismen komplexer zellulärer Prozesse besser zu verstehen. Des Weiteren soll der Einfluss von n3-Fettsäuren auf die Proteinexpression bei einer akuten Lungenentzündung näher analysiert und charakterisiert werden. Diese Proteomdaten sollen neue Erkenntnisse zur Regulation der durch alveoläre Deposition von Endotoxin induzierten pulmonalen Entzündungsreaktionen auf Proteinebene liefern, die eine Identifizierung und Charakterisierung spezifischer Regulationsprozesse in der Lunge ermöglichen um schließlich neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Universal 32 R-Zentrifuge, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen

Ultraschallbad Badelin Sonorex TK 52, Roth, Karlsruhe

Digitale Einwaage Mettler AJ150, Mettler PB3000, Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese:

Netzgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL (GE Healthcare, Freiburg)

Elektrophoresekammer: Multiphor II (GE Healthcare)

Hoefer 600 (GE Healthcare)

Spotcutter ExQuest, Bio Rad

Typhoon Scanner 9200, GE Healthcare

Ultraflex I TOF/TOF Massenspektrometer, Bruker Daltonik, Bremen

Anchor-Target, Bruker Daltonik

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu Ulm; Serva, Heidelberg). Wasser wurde mit dem "Milli-Q Ultra-pure water system" (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

2.3 Methoden

Die Stimulation und Isolation der Milzlymphozyten der Wildtyp-Mäuse und FAT-1 Mäuse wurden von Dr. Juliane Ott aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Konstantin Mayer durchgeführt und uns zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proben wurden in Küvetten mit 200 μl H_2O gegeben. Anschließend wurde das Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio Rad) ein Teil zu vier Teilen mit H_2O verdünnt und 800 μl des Reagenzes in die Küvetten pipettiert. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, danach wurden 1000 μl H_2O hinzugegeben und die Absorption bei 578 nm gemessen.

Zusätzlich wurde zu jeder Probe eine Eichreihe mit einem Albumin-Standard (Pierce, Rockford) in den Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erstellt.

2.3.2 Proteinisolation

Um störende Agenzien oder Ionen zu entfernen, die die Gelelektrophorese stören könnten und um die Proteine aufzukonzentrieren, wurde eine Chloroform/Methanol – Fällung vollzogen (Wessel et al. 1984).

Die Zellen der Milzlymphozyten wurden in 500 μl PBS aufgenommen und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 μl Lysispuffer aufgenommen und 5 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend erfolgte eine Chloroform/Methanol-Fällung. Hierbei wurden die lysierten Zellen mit 400 Methanol und 100 μl Chloroform gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 μl H_2O hinzugefügt und erneut gemischt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurde diese Probe für 5 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die Probe mit weiteren 300 μl Methanol versetzt. Anschließend wurde die Probe erneut für 5 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde

für 5 Minuten in ein 40 °C warmes Wasserbad gestellt um das restliche Methanol abzdampfen.

Die Proben wurden nun entweder mit 100 µl Lysispuffer versetzt, im Ultraschallbad gelöst und standen somit für die Isoelektrische Fokussierung zur Verfügung (siehe 2.3.3.1), oder sie wurden mit CyDye 2 nmol Kit (GE Healthcare) behandelt (siehe 2.3.4.2).

Lysispuffer

6M Harnstoff	360 mg
2M Thioharnstoff	152 mg
4% CHAPS	40 mg
DTT	10 mg
Protease Inhibitor Cocktail	10 µl
Servalyte 3-10	30 µl
	ad 1 ml H ₂ O
Servalyte 3-10	30 µl

2.3.3 Proteinanalytik

2.3.3.1 Erste Dimension

Rehydratisierung

Je 250 µl der bereits in Lysispuffer gelösten Probe (siehe 2.3.2) wurden in das Reswelling Tray (GE Healthcare) mit einer Pipette perlenförmig eingefüllt, so dass möglichst keine Luftblasen entstanden. Auf dieses Lösungsbett wurde jeweils ein Gelstrip (13 cm, pH 3-10 nicht linear, GE Healthcare) mit der Acrylamidseite nach unten gelegt. Damit der Harnstoff aus der Lösung nicht auskristallisiert, wurde jede Spur mit 3 ml DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) bedeckt. Die Strips wurden über Nacht bei Raumtemperatur rehydratisiert.

Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Jeder gequollene Gelstreifen wurde aus dem Reswelling Tray herausgenommen, auf einem fussselfreien Papier getrocknet und mit der Gelseite nach oben auf eine Glasplatte mittig gelegt.

Auf jeden Gelstreifen wurde bei der Anode und Kathode ein mit H₂O getränkter Papierstreifen (0,5 cm x 8 cm) gelegt. Die Elektrodenklammern wurden aufgesteckt, so dass der Elektrodendraht auf dem Papierstreifen der Strips auflag. Die Gelstreifen wurden mit 80 ml Cover Fluid überdeckt. Der Deckel des Multiphor-Gerätes wurde aufgesetzt, und die Kabel wurden mit dem Spannungsgerät verbunden.

Das Spannungsgerät wurde für die IPG-Strips wie folgt programmiert:

100 V	50 mA	200 W	250 Vh
3500 V	50 mA	200 W	11 kWh
3500 V	50 mA	200 W	25 Vh

Nach Abschluss der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstrips herausgenommen und auf fussselfreiem Papier getrocknet. Die Strips wurden bei - 80°C gelagert.

2.3.3.2 Zweite Dimension

Die Natriumdodecylsulfat/Polyacryamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde basierend auf der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Es wurden hierbei 10 % Trenngele verwendet.

Elektrodenlaufpuffer: 100 ml Elektrodenstammpuffer, zehnfach
 10 ml SDS-Lösung
 ad 1 L H₂O

Pipettierschema für ein 10 % Trenngel:

<hr/>	
	Trenngel
	10%
<hr/>	
H ₂ O	29,9 ml
30 % Acrylamid	23 ml
2 M Tris/ HCl	17 ml
pH 8,8	
1 M Tris/ HCl	
pH 6,8	
10 % SDS	700 µl
10 % AMPS	350 µl
TEMED	35 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	70 ml
<hr/>	

Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit 0,1 % SDS überschichtet und über Nacht polymerisieren gelassen. Nach der Polymerisation wurde das 0,1 % SDS abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit einem Filterpapier getrocknet.

Die Gelstrips (siehe 2.3.3.1) wurden aufgetaut. Zunächst wurden die Strips 10 Minuten in 2 ml Äquibrierungspuffer (ÄSS; 6 M Urea 0,1 mM EDTA, 0.01 % Bromphenolblau, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 30 % Glycerin, v/v) gewaschen. Anschließend wurde 2 ml DTT-Lösung (100 mg 1,4-Dithio-DL-threitol (Fluka), 200 mg SDS in 10 ml ÄSS) auf die Gelstrips gegeben. Für weitere 15 Minuten wurden die Gelstrips anschließend in 5 ml Jodacetamid-Lösung (400 mg Jodacetamid (Fluka), 200 mg SDS in 10 ml ÄSS) äquilibriert. Die Strips wurden auf einem fusselreifen Tuch abgetrocknet und auf die Geloberkante gelegt. Auf ein 2 x 2 mm großes Probenplättchen wurde ein Precision Protein Standard (Bio Rad) aufgetragen und getrocknet. Der Gelstrip und der Standardmarker wurden mit Agarose (0,5 % IEF-Agarose (GE Healthcare), 2,5 ml 1 M Tris/ HCl pH 6,8, 7,5 ml H₂O) fixiert und in die Elektrophoreseapparatur (Hoefer 600, GE Healthcare) gestellt. Diese Kammer benötigt 5 L Elektrophorese-Laufpuffer. In die innere

Kammer wurden 1000 ml und in die äußere Kammer 4 L Elektrodenlaufpuffer eingefüllt.

Das Gel lief mit einer Spannung von 600 V, 90 mA und 50 W für 3 Stunden bei 15 °C. Danach wurden die Gele entnommen, mit Flamingo gefärbt (siehe 2.3.4.1) oder in den DIGE-Fixierer (siehe 2.3.4.2) gelegt.

2.3.4 Proteinfärbung

2.3.4.1 Proteinfärbung mit Flamingo

Das Gel wurde mit 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure und 50 % H₂O für zwei Stunden fixiert. Anschließend wurde das Flamingofärbereagenz (BioRad) 1:9 mit H₂O verdünnt und pro Gel 250 ml Färbelösung über Nacht auf das Gel gegeben. Anschließend wurde das Gel in H₂O gelegt und bei einer Auflösung von 100 Mikrometer mit einer Anregung von 532 nm mittels Typhoon 9200 (GE Healthcare) gescannt.

2.3.4.2 Proteinmarkierung mit CyDye

Die Fluoreszenzfarbstoffe [2 nmol of CyDye DIGE Fluor minimal labelling kit (GE Healthcare)] weisen ein Cyanin-Grundgerüst mit einem heterozyklischen aromatischen Ringsystem auf. Es können drei unterschiedliche Farbstoffe verwendet werden (CyTM2, CyTM3 und CyTM5), die sich durch Reste voneinander unterscheiden. Die Farbstoffe binden mit einer reaktiven NHS-Gruppe an die ε-Aminogruppe der proteinogenen L-Lysine.

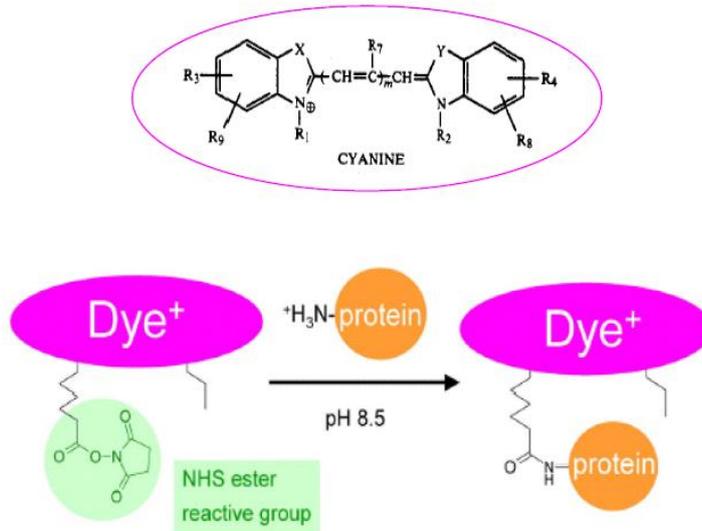


Abb. 8 Proteinmarkierung mittels CyDye

Bei dieser äußerst sensitiven Methode (~ 120 pg) werden zwei zu vergleichende Proteinproben zunächst separat von einander mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen (Cy3 und Cy5) markiert, dann gemischt und gemeinsam per 2-Dimensionaler SDS-Page Gelelektrophorese aufgetrennt und das resultierende 2-D Gel mittels Phosphoimager (Typhoon Scanner, GE Healthcare) eingescannt. Die gescannten Bilder lassen sich unmittelbar ohne „warp“-Prozess miteinander vergleichen und die Proteinmenge in Relation zueinander setzen.

Cy2	Zustand A + B (Interner Standard)
Cy3	Zustand A
Cy5	Zustand B

Die Probe wurde in 40 µl Probenpuffer 1 (4°C) gelöst, mit 1 µl CyDye DIGE Fluor (Cy2, Cy3 oder Cy5) versetzt und 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 µl 10 mM Lysin hinzu pipettiert, um die überschüssige Färbelösung abzufangen. Nach weiteren 10 Minuten im Dunkeln auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 42 µl Lysispuffer (*Stop buffer*) abgestoppt. Die Proben konnten nun vereint werden und entweder bei -80°C eingefroren oder direkt für IEF weiterverwendet werden.

Probenpuffer 1

8 M Harnstoff
2M Thioharnstoff
4% (v/v) CHAPS
20 mM Tris pH 8,5

Lysispuffer (Stop buffer)

8 M Harnstoff
2M Thioharnstoff
4% (v/v) CHAPS
20 mM Tris pH 8,5
2 mg/ml DTT
2 % (v/v) Pharmalye

Die Rehydratisierung, Isoelektrische Fokussierung und 2 D-Gele erfolgten nach Standardprotokoll (siehe 2.3.3.2).

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Gele in 40 % MeOH, 10 % HAc fixiert und eingescannt. Die Auswertung der Gele erfolgt mittels Typhoon Scanner: Cy2 (488 nm Anregung und 520BP40 Emissionsfilter); Cy3 (532 nm Anregung und 580BP30 Emissionsfilter); Cy5 (633 nm Anregung und 670BP30 Emissionsfilter).

2.3.5 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm PDQuest von BioRad. Hierbei wurden zunächst die einzelnen Zustände der DIGE-Gele miteinander verglichen. Es wurden quantitative und qualitative Unterschiede in die Auswertung mit einbezogen. Anschließend wurden die Ergebnisse auf die entsprechenden Flamingogele übertragen und die Spots aus diesen ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Spots standen nun für den tryptischen Verdau (siehe 2.3.6) zur Verfügung.

2.3.6 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel

Der *in situ*-Verdau erfolgte in Eppendorf LoBind Gefäßen. Die Spots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in die Eppendorf LoBind (Eppendorf, Hamburg) gegeben, mit 100 µl H₂O versetzt und 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Das Gel wurde zunächst 15 Minuten mit 100 µl 50 mM NH₄HCO₃/ ACN gewaschen und der Überstand abgenommen. Das Gelstück wurde mit 30 µl ACN vollständig bedeckt. Nach genau 1 Minute wurde das ACN entfernt. Anschließend wurde das Gelstück mit 50 µl 50 mM NH₄HCO₃ Puffer rehydriert. Nach 5 Minuten wurde es mit 50 µl ACN versetzt und weitere 15 Minuten geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurde das Gel durch Zugabe von 50 µl ACN und Speed Vac getrocknet.

Zur Trypsinbehandlung wurden 0,5 µg Trypsin in 250 µl 25 mM NaH₄HCO₃ gelöst. Das Gel wurde mit 50 µl der Trypsinlösung versetzt und zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Probe bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Proben mit 5 µl 1 % TFA versetzt und für 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Die resultierenden Peptide standen nun für massenspektrometrische Analysen zur Verfügung.

2.3.7 Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS Analysen wurden mit dem Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen) mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS Einheit gemessen. Die Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt. 10 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Sigma) in 10 mg/ml Methylendiphosphonsäure (Fluka) wurde als Matrix verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Peptid Kalibrierung Standard (~ 1000-4000 Da) von Bruker Daltonik. Es wurden jeweils 200–400 Einzelspektren addiert. Als Auswertungsprogramm wurden Compass 1.1 Software bestehend aus FlexControl 2.4, FlexAnalysis 2.4 und BioTools 3.0 verwendet. Proteine wurden mit Hilfe von Mascot Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) identifiziert. Hierbei wurde die MSDB Datenbank verwendet. Die Suche wurde auf *Mus musculus* mit einer Massentoleranz von 75 ppm und Carbamidomethylierung von Cystein als globale Modifikation und einer Oxidation von Methionin als variable Modifikation beschränkt.

Funktionen und Homologien der identifizierten Proteine wurden mittels *Expasy* (<http://expasy.ch/>) sowie *Mouse Genome Informatics* (<http://www.informatics.jax.org/>) bestimmt.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnisse zur Regulation der durch alveoläre Deposition von Endotoxin induzierten pulmonalen Entzündungsreaktion auf Proteinebene zu gewinnen. Hierzu wurden Proteine aus Milzlymphozyten von Wildtypmäusen des Stammes C57BL/7 und FAT-1-Mäusen untersucht, die mit LPS stimuliert waren. Die Mäuse (jeweils beiderlei Geschlechts) waren jeweils zwischen 12-16 Wochen alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 23-25 g. Sie wurden unter standardisierten, pathogenfreien Bedingungen mit einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Die Mäuse wurden anästhesiert, ein schmaler Katheter wurde in die Trachea eingeführt und 10 µg LPS in 50 µl Kochsalzlösung wurden injiziert. Die Milz wurde nach 0, 4, 24 und 72 Stunden entnommen, die Lymphozyten isoliert und in Flüssigstickstoff gelagert. Die Stimulation und Isolation der Milzlymphozyten erfolgte durch unsere Kollaborationspartnerin Dr. Juliane Ott von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Konstantin Mayer.

Zunächst wurden die Proteine aus den Milzlymphozyten mittels Lysispuffer extrahiert. Um Agenzien oder Ionen zu entfernen, die die Gelelektrophorese stören könnten und um die Milzlymphozyten-Proteine aufzukonzentrieren, wurde eine Chloroform/Methanol – Fällung vollzogen (siehe 2.3.2). Anschließend wurden die Proteine für densitometrische Zwecke mit einem CyDye Fluoreszenzfarbstoff markiert (siehe 2.3.4.2). Hierbei ist es möglich, zwei verschiedene Proben (z.B. stimuliert und unstimuliert) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Diese Proben wurden gemischt und mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt. Aufgrund von Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe konnte computergestützt eine Analyse unterschiedlich regulierter Proteine vorgenommen werden. Zusätzlich wurden für präparative Zwecke entsprechende 2D-Gele von Wildtypmäusen und Fat-1-Mäusen mit LPS 4, 24 und 72 Stunden stimuliert angefertigt, diese wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Flamingo (siehe 2.3.4.1) angefärbt.

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm PD-Quest von BioRad (siehe 2.3.5). Hierbei wurden zunächst die einzelnen Proteinspotmuster der DIGE-Gele miteinander verglichen. Es wurden quantitative und qualitative Unterschiede in die Auswertung mit einbezogen. Qualitative Unterschiede wurden

unterteilt in Spots, die nur exprimiert werden nach erfolgter LPS-Stimulation und Spots, die vorliegen ohne LPS-Stimulation. Zu den quantitativen Unterschieden wurden die Spotintensitäten analysiert, bei denen in den entsprechenden Zuständen eine Hoch- bzw. Runterregulierung der Proteinspots vorliegt.

Anschließend wurden die Ergebnisse auf die entsprechenden präparativen Flamingogele übertragen und die korrespondierenden Spots aus diesen ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut (siehe 2.3.6). Die Proteine wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS Peptide Mass Fingerprint und MASCOT Datenbank Suche (siehe 2.3.7) identifiziert.

3.1 Auswertungen der Gele

Es wurden insgesamt zweimal sechs DIGE-2D-Gele hergestellt. Jeweils drei Gele von WT-Mäusen und 3 Gele von Fat-1-Mäusen mit einer jeweiligen LPS-Stimulation von 4, 24 und 72 Stunden (Abb. 9). Mit dieser Fluoreszenzmethode ist es möglich, zwei Zustände (in unserem Fall: mit bzw. ohne LPS) optimal miteinander zu vergleichen. Ein Quenchen oder Verschieben der einzelnen Proteinspots von einem Zustand zu dem zu vergleichenden Zustand wird mit dieser Methode vermieden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gele eingeteilt in differentiell regulierte Proteine („Hoch- bzw. Runterregulierung“), „ohne LPS“ und „mit LPS“, d.h., dass die Proteinmuster, die mit LPS stimuliert wurden mit denen, die ohne Stimulierung blieben, verglichen wurden. Diejenigen Proteine, die nur in einem Gel vorlagen, also nur aufgrund des jeweiligen Zustands exprimiert bzw. hoch- oder runterreguliert werden, wurden ausgeschnitten und weiter analysiert.

Für eine densitometrische Auswertung der DIGE-Gele war es nötig, eine konstante Zellzahl (~2,5 Millionen Zellen) und Proteinmenge (~ 30 µg) zu nehmen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen und die Auswertung zu erleichtern. Hierfür wurden jeweils Milzlymphozyten von ein bis zwei Mäusen verwendet. Die Anzahl der Mäuse variierte aufgrund der LPS-Stimulation und des Genotypus (WT oder Fat-1). Für die präparativen Flamingogele wurden Milzlymphozyten von ~ fünf Mäusen isoliert, um eine Zellzahl von 10 Millionen (~ 130 µg Protein) zu erhalten.

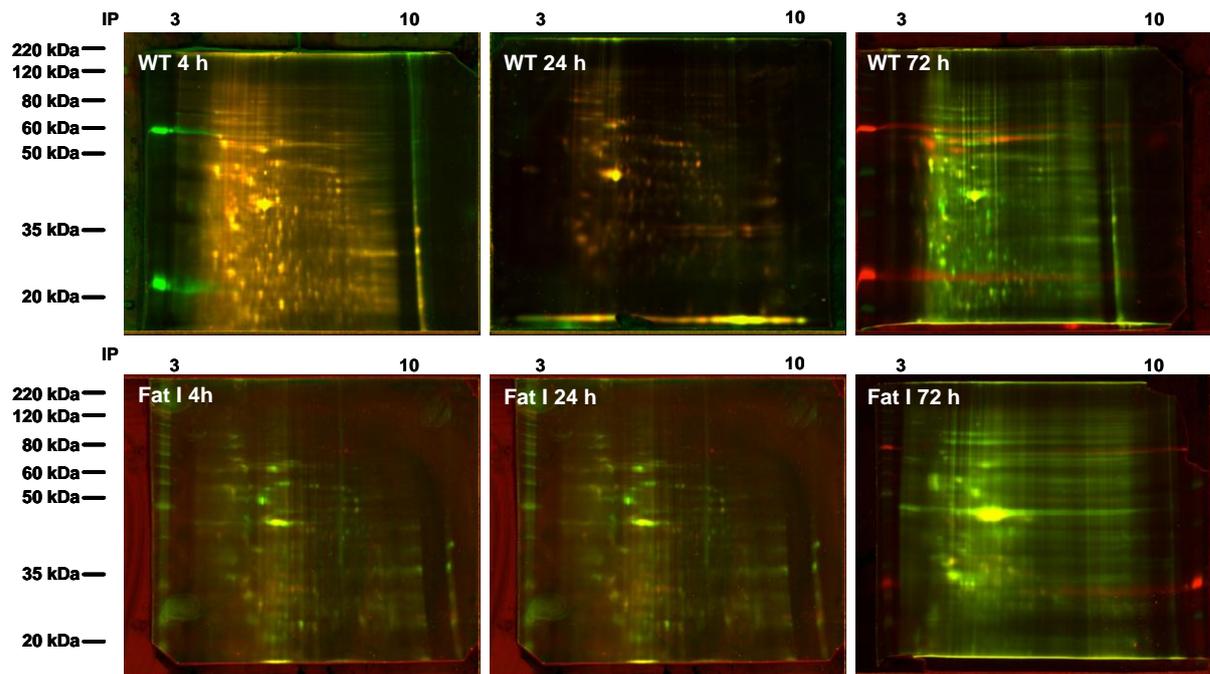


Abb. 9 2D-DIGE-Gele von Wildtypmäusen und Fat-1-Mäusen

Es sind jeweils die Kanäle Cy3 und Cy5 als Überlagerung dargestellt. Cy3 (rot) zeigt den Zustand nach 4 Stunden nach erfolgter 10 μ g LPS-Stimulation an. Cy5 (grün) ist ohne LPS-Gabe. Kommen Proteine jeweils in beiden Zuständen vor (mit LPS-Stimulation und ohne), so leuchten die Spots gelb.

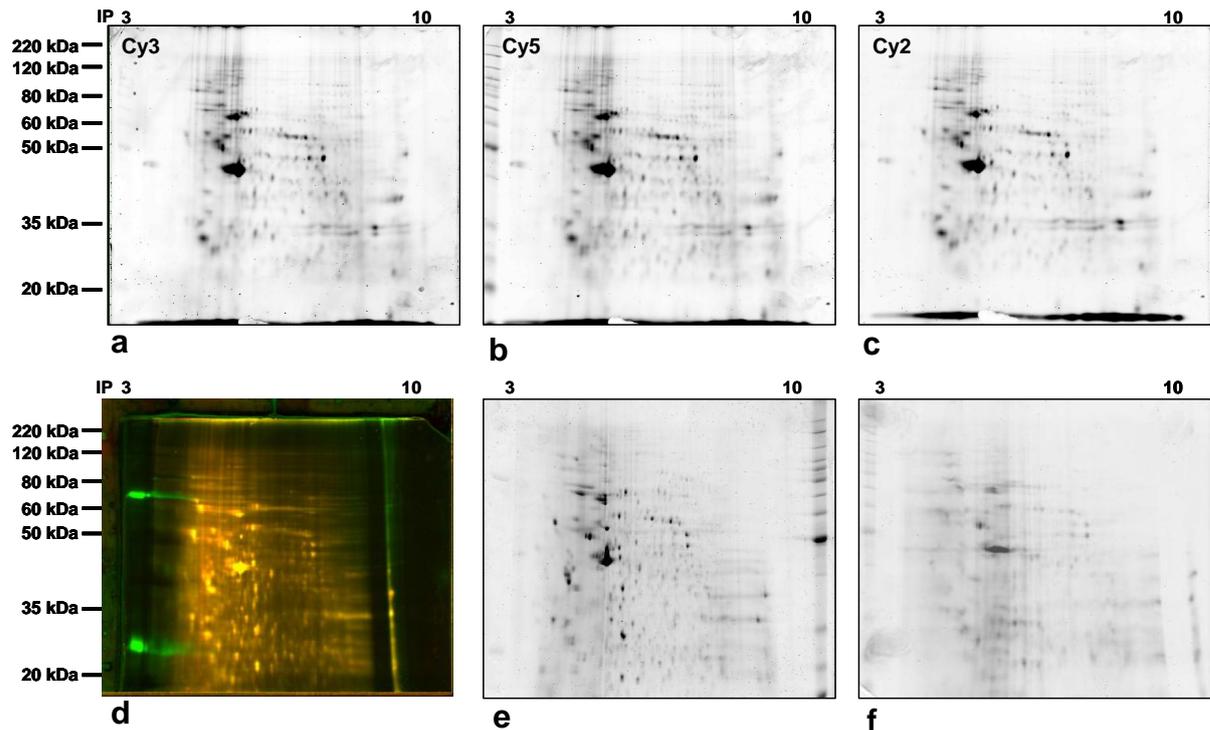


Abb. 10 2D-Gele von Wildtypmäusen angefärbt mit DIGE und Flamingo mit 4 Stunden 10 µg LPS Stimulation und ohne LPS Stimulation.

Fortsetzung Abb. 10

(a-c) zeigt die einzelnen Kanäle der DIGE-Zustände. Cy3 (rot) zeigt den Zustand nach 4 Stunden nach erfolgter 10 µg LPS-Stimulation an. Cy5 (grün) ist ohne LPS-Gabe und Cy2 ist das Gemisch aus beiden Zuständen hier dienend als interner Standard. In (d) sieht man die Überlagerung von Cy3 und Cy5. Proteine, die in beiden Zuständen vorkommen, leuchten gelb.

Die dazugehörigen präparativen Flamingogele sind in (e) und (f) zu sehen. E ist das für 4 Stunden mit 10 µg LPS stimulierte Gel. (f) ist das Kontrollgel ohne LPS.

Die zu vergleichenden, eingescannten Gele wurden in das Auswerteprogramm PDQuest von BioRad exportiert. Sie wurden in Gruppen eingeteilt („ohne LPS“ und „mit LPS“), um quantitative und qualitative Aussagen treffen zu können und Proteine eines Gels mit Proteinen eines anderen Gels innerhalb eines Matchsets zu vergleichen. Zusätzlich war es möglich, gleichwertige Gele als neue Mitglieder in ein Set aufzunehmen, zu bearbeiten oder auch wieder zu entfernen. Ein Mitglied dieses Matchsets wurde als Grundlage für ein Mastergel (Standardgel) verwendet. Es wurde, ausgehend von einem Mastergel, der feinste Spot, der größte Spot und Spotcluster festgelegt. Diese Bedingungen wurden auf die zu vergleichenden Gele übertragen. Zunächst wurden in jedem Gel die Proteinspots ermittelt und anschließend miteinander verglichen. Nach diesem Schritt war es

möglich, ausgehend von dem Mastergel einzelne Spots anzuklicken und zu sehen, in welchem Gel dieser Spot ebenfalls exprimiert wurde (Abb. 13). Es war allerdings auch jederzeit möglich und teilweise auch nötig, die Gele noch nachzuarbeiten. Artefakte auf dem Gel, nicht vollständig entfernte horizontale und vertikale Streifen, sehr dicht beieinander liegende, sehr große oder auch sehr schwache Spots werden häufig nicht richtig eingeordnet bzw. nicht erkannt. Ca. 3-5% der Proteine werden nicht als Spot erkannt und müssen manuell gesetzt werden oder falsch „gematchte“ Spots müssen richtig gematcht werden.

In den „Scatter Plots“ werden die Beziehungen der Gele zueinander verdeutlicht. Jedes „gematchte“ Protein fand sich als Punkt auf einer Skala wieder. War die Quantität eines Proteins in beiden Gelen identisch, so lag sein Punkt auf der Gerade mit einer Neigung von 1.00 (45° line). Zusätzlich wurden Angaben über die Anzahl aller „gematchten“ Proteine in beiden Gelen und dem Korrelationskoeffizienten gemacht (Abb. 12).

Anhand von diesen Werten war es möglich, eine Aussage zu treffen über eine Hochregulierung bzw. Runterregulierung von Proteinen. Allerdings konnten so auch qualitative Aussagen getroffen werden, welche Proteine nur in einem Zustand/Gruppe („ohne LPS“ oder „mit LPS“) exprimiert werden (siehe Tabelle 1).

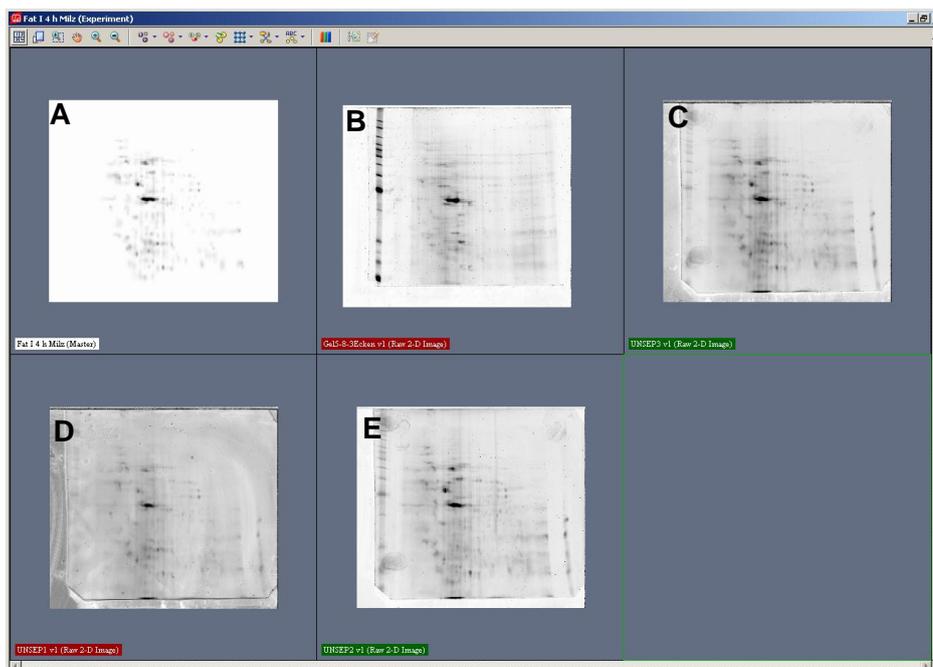


Abb. 11 Beginn der Auswertung der 2D-Gele in PD-Quest von BioRad

Fortsetzung zu Abb. 11

Alle erstellten Gele (DIGE und Flamingo [B-E]) werden in PD-Quest hochgeladen. Ein Gel wird als „Mastergel“ bestimmt (A). Anschließend werden die Spotintensitäten (stärkste Spots bzw. schwächster Spot) und Spotcluster ermittelt, um die Proteinspots in jedem Gel zu analysieren.

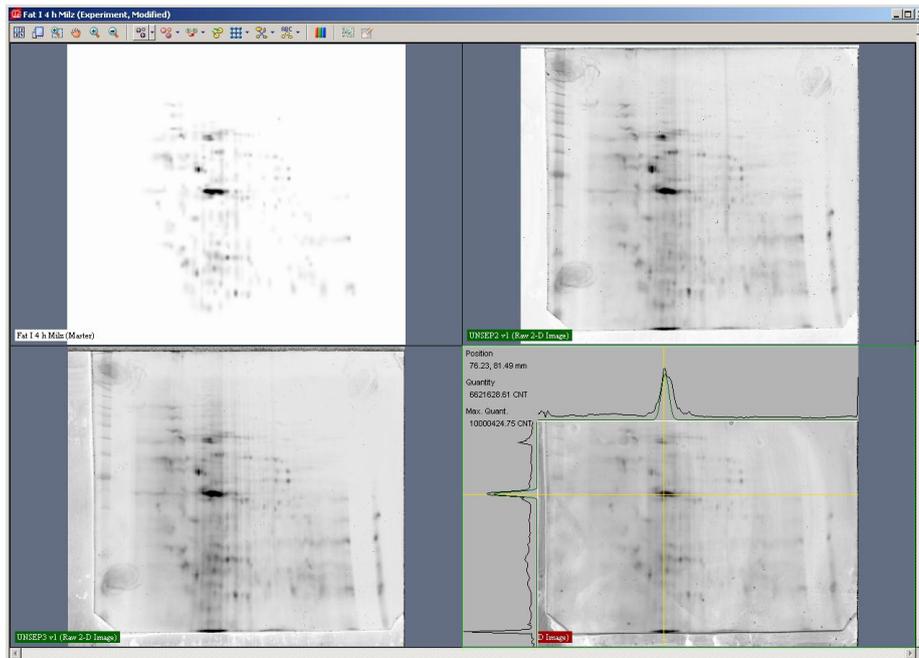


Abb. 12 Bestimmung der Quantität und Qualität einzelner Proteinspots

Mit Hilfe dieses Programms ist es möglich, Proteinspots genauer zu ermitteln und aufgrund der entstehenden Kurve „falschpositive Spots“ bzw. Artefakte auszuschließen, um nur die richtigen Spots zu matchen und quantitativ zu bestimmen.

Ergebnisse

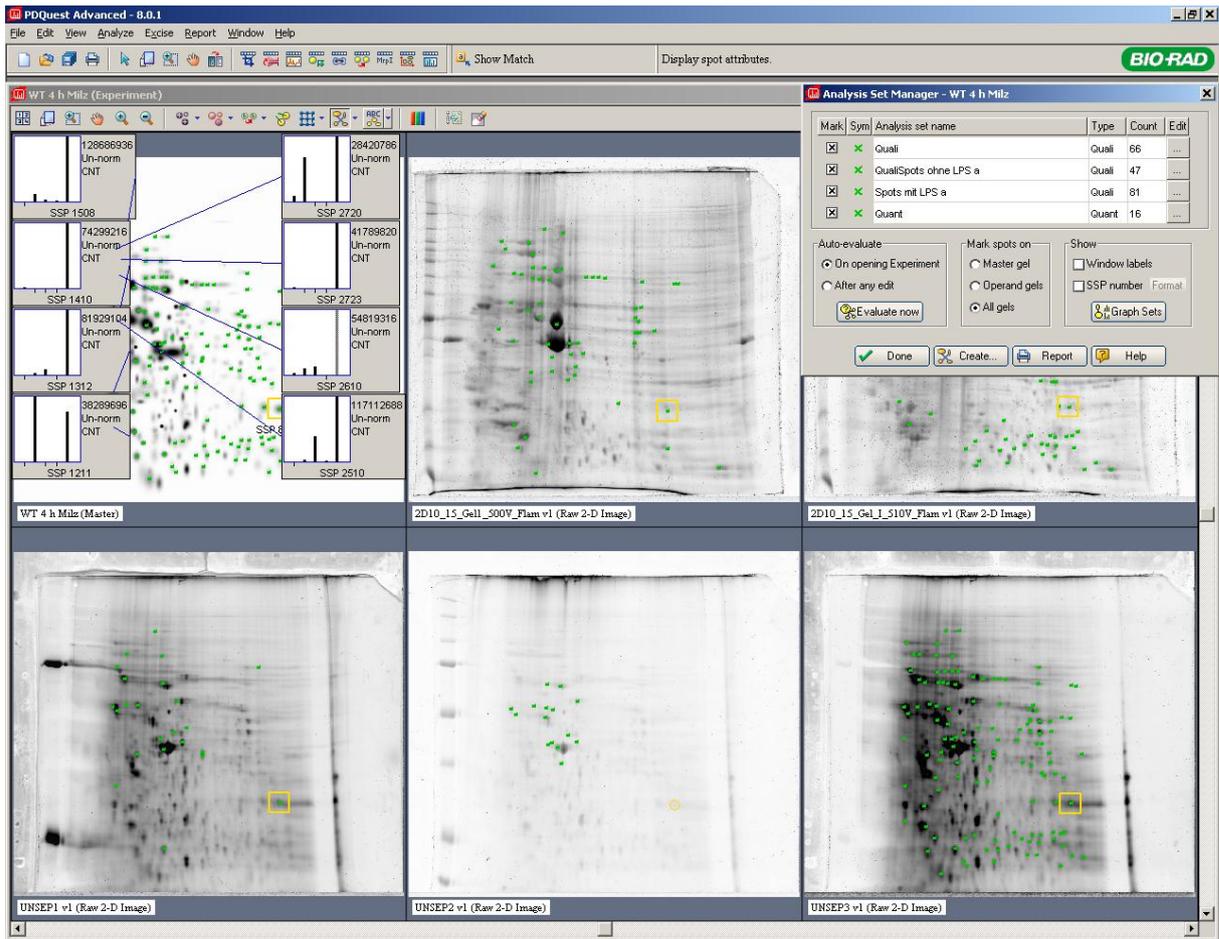
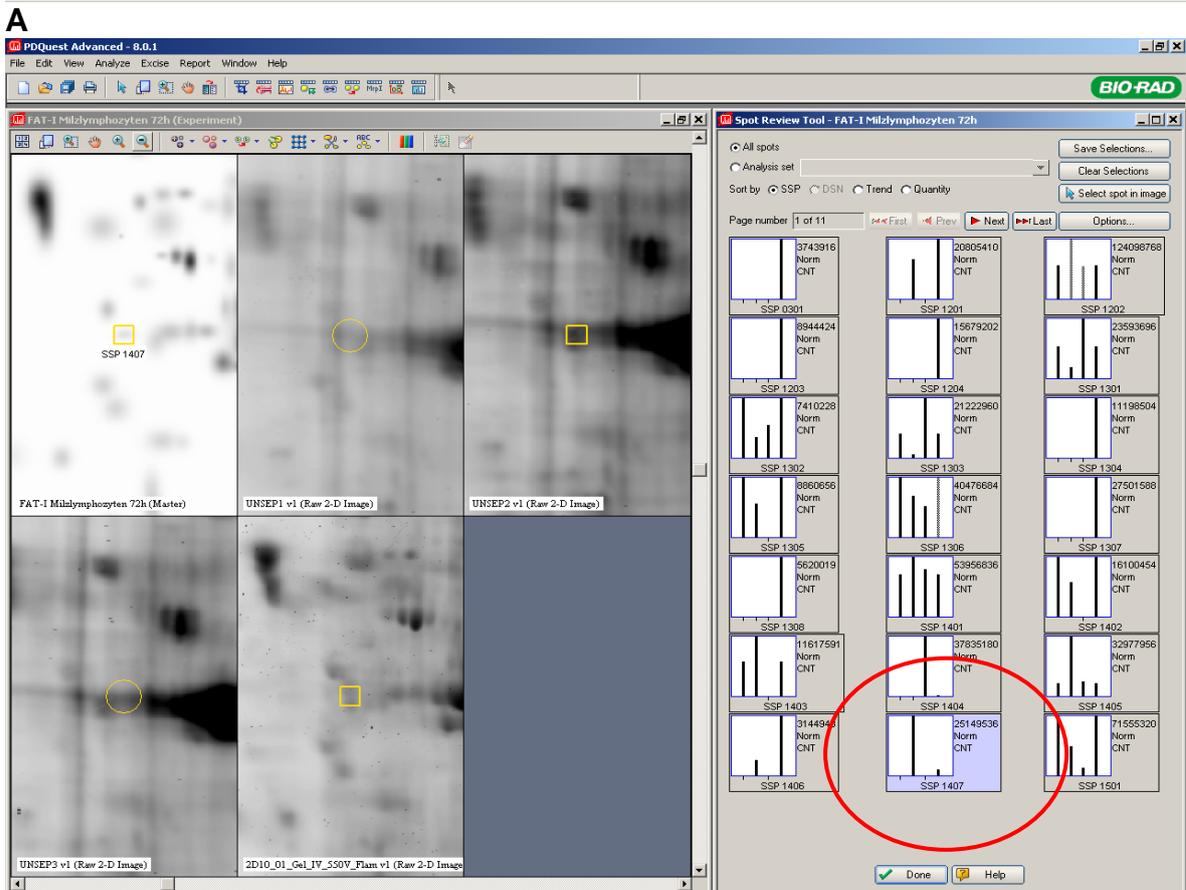
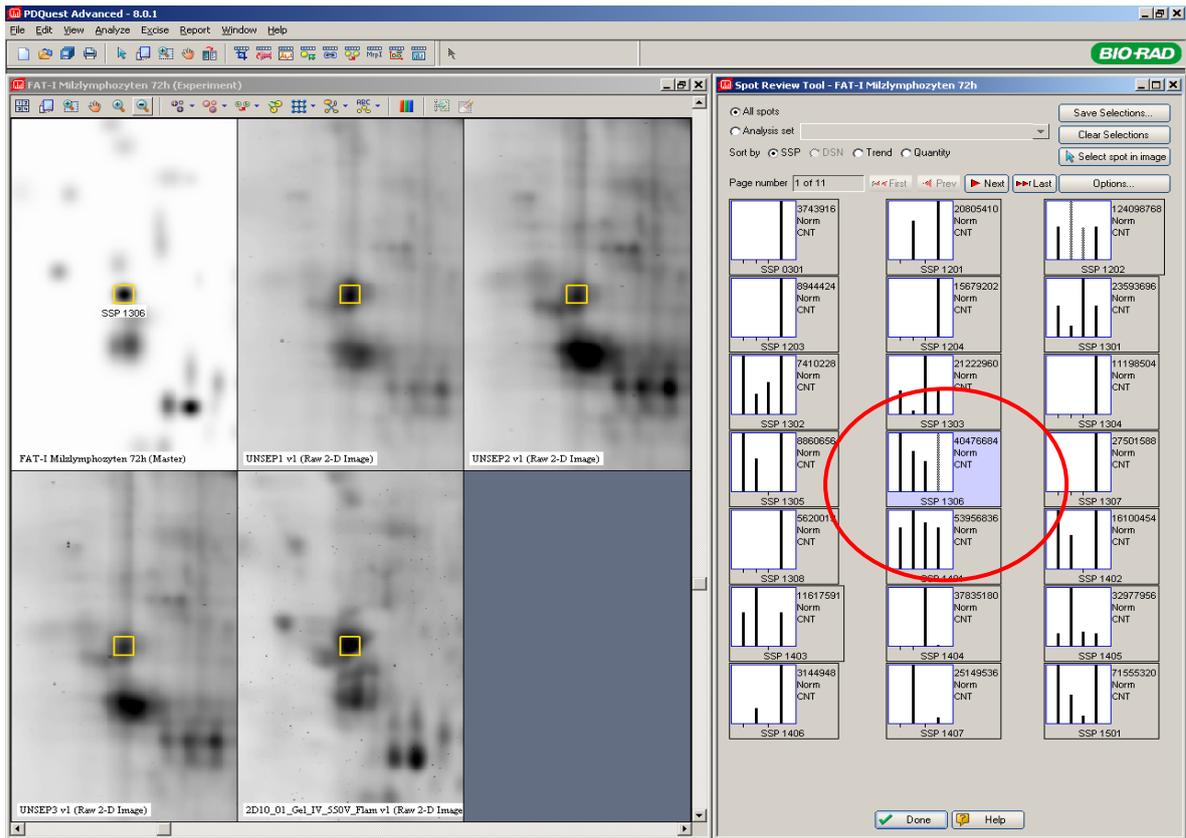


Abb. 13 Nähere Analyse während der Auswertung der 2D-Gele in PD-Quest

Alle Proteinmuster der in PD-Quest hochgeladenen 2D-Gele werden ausgehend von dem „Mastergel“ miteinander verglichen. Anschließend ist es möglich, die gematchten Gele bezüglich der Qualität und der Quantität näher zu analysieren.

Ergebnisse



B
 Abb. 14 Darstellung über die Quantität der Proteine in allen Gelen

Fortsetzung zu Abb. 14

(A) ist ein Beispiel für ein Protein, welches in allen Gelen zu finden ist, während in (B) dieses Protein nur in 2 Gelen gleichbedeutend exprimiert wird. Die Balkendiagramme geben einen Überblick über die Quantität jedes einzelnen Proteins in jedem Gel. So erhält man, ohne dass man jeden einzelnen Spot anklicken muss einen Überblick, um zu sehen, in welchem Gel dieses Protein vorliegt.

3.1.2 Qualitativ regulierte Proteine (on/off)

Es konnten mehr nach LPS-Stimulation exprimierte Proteine von Wildtypmäusen als von Fat-1-Mäusen identifiziert werden. Insgesamt wurden 285 Proteine identifiziert, 84 Proteine aus Wildtypmäusen wurden identifiziert, die nur nach LPS („mit LPS“) exprimiert wurden, sowie 47 Proteine von Wildtypmäusen, die exprimiert wurden ohne eine LPS-Stimulation („ohne LPS“). Bei den Fat-1-Mäusen wurden 26 Proteine identifiziert, die es nur nach erfolgter LPS-Stimulation („mit LPS“) und 13 Proteine, die nur ohne LPS („ohne LPS“) exprimiert werden. (siehe Tabelle 1).

Die identifizierten Proteine sind in verschiedene Stoffwechselwege involviert: Signalübertragung, Transkription, Proteinstoffwechsel, Immunsystem, Strukturbildung, Translation, Chaperone und allgemeiner Stoffwechsel. Einige Proteine konnten keiner der oben genannten Gruppen zugeordnet werden, da ihre Funktion noch nicht bekannt war. Sie erhielten die Bezeichnung „Unbekannt“. Einen Überblick über die funktionelle Klassifikation aller identifizierten Proteine aus Wildtypmäusen und FAT-1-Mäusen und deren Regulierung ist in Abb. 15 in Form von Kreisdiagrammen dargestellt.

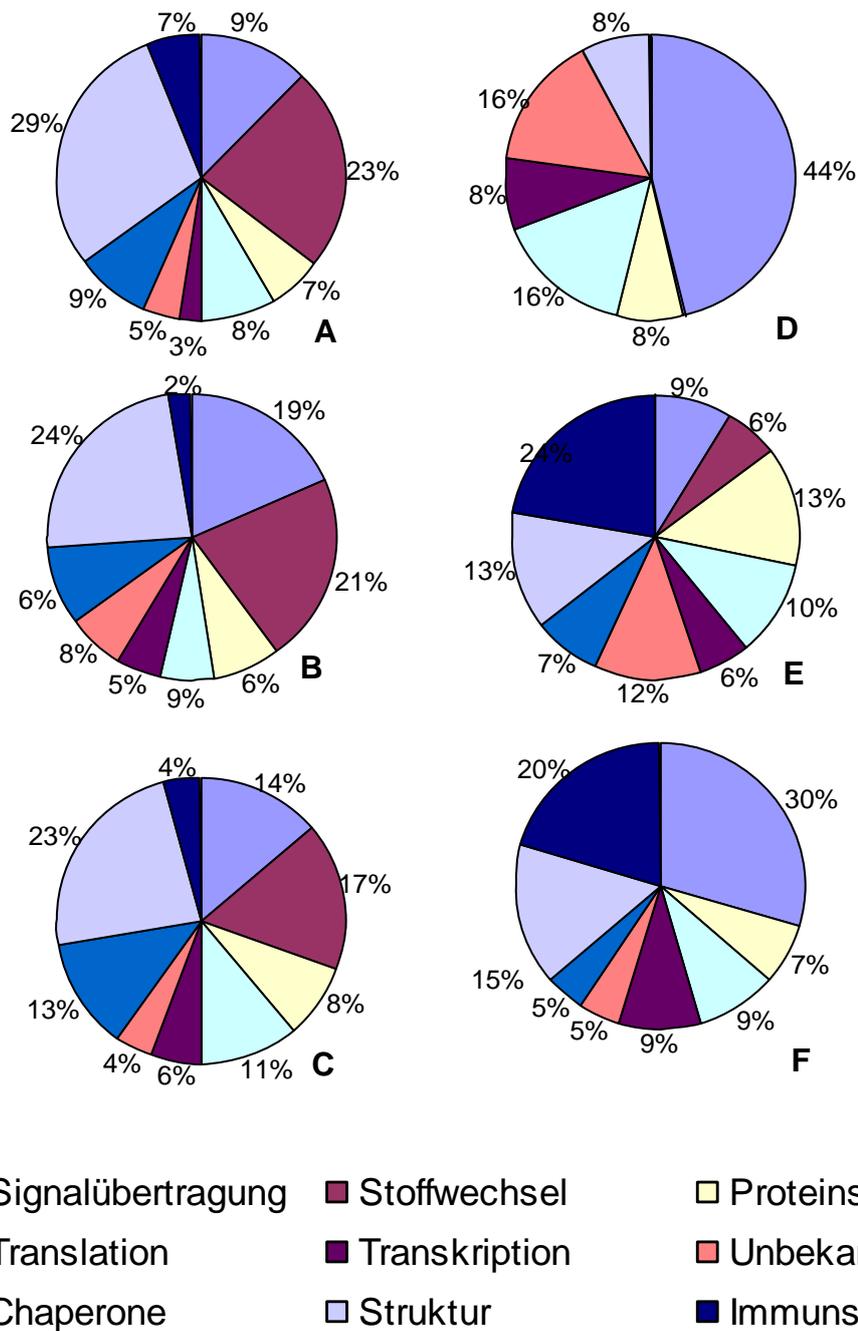


Abb. 15 Funktionelle Klassifikation aller identifizierten Proteine aus Wildtypmäusen und FAT-1-Mäusen

Die Kreisdiagramme (A-C) sind die Proteine aus Wildtypmäusen; (D-F) aus FAT-1-Mäusen. (A) und (D) sind alle identifizierten Proteine aus unstimulierten Milzlymphozyten. B und E zeigen eine Übersicht aller identifizierten Proteine, die mit LPS stimuliert wurden. (C) und (F) geben einen Überblick über die regulierten Proteine aus Wildtypmäusen (C) bzw. FAT-1-Mäusen (F).

Eine genaue Auflistung und Einteilung in funktionelle Gruppen findet sich in Tabelle 1 wieder. Es zeigt sich, dass die funktionelle Verteilung der identifizierten Proteine bei Wildtyp- und FAT-1-Mäusen sehr unterschiedlich ist. So sind insbesondere Proteine bei Wildtypmäusen aus dem strukturellen Bereich (z.B. *Beta-Actin*, *Tubulin*), Stoffwechselproteine (hauptsächlich aus dem Bereich des Glucosestoffwechsels: u.a. *Glyceraldehyde-3-phosphat Dehydrogenase*, *Acyl-coenzyme A Dehydrogenase*) und Chaperone (u.a. *HSP84*) analysiert worden.

Die identifizierten Proteine der FAT-1-Mäuse sind hauptsächlich an der Signalübertragung (z.B. *TNF α*), an Funktionen des Immunsystems (insbesondere Fragmente von Immunoglobulinen: *Ig heavy chain*) sowie an der Translation (z.B. *ATP5b*) beteiligt.

Proteine aus dem funktionellen Bereich des Proteinstoffwechsels finden sich in Wildtypmäusen und FAT-1-Mäusen nahezu zu gleichen Teilen. Allerdings kommen bei Wildtypmäusen hauptsächlich an Proteasomen beteiligte Proteine vor, während bei FAT-1-Mäusen andere Proteine aus diesem funktionellen Bereich identifiziert werden konnten (z.B. *Crk Protein*, *Usp 13* und *Calreticulin*).

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert. Bei genauerer Betrachtung erkennt man, wie vernetzt und verwoben viele der einzelnen identifizierten Proteine miteinander sind und welche Auswirkungen sie auf andere Proteine haben. Viele identifizierte Proteine fungieren als Initiatoren und aktivieren andere Stoffwechselforgänge. So wurden einige Proteine identifiziert, die an apoptotischen Vorgängen beteiligt sind. Folgend werden exemplarisch Proteine näher beschrieben und die funktionellen Interaktionspartner dargestellt.

Bei den Wildtypmäusen wurden viele Chaperone identifiziert. Dieses wird am Beispiel des Chaperons *HSP90b* verdeutlicht (Abb. 16).

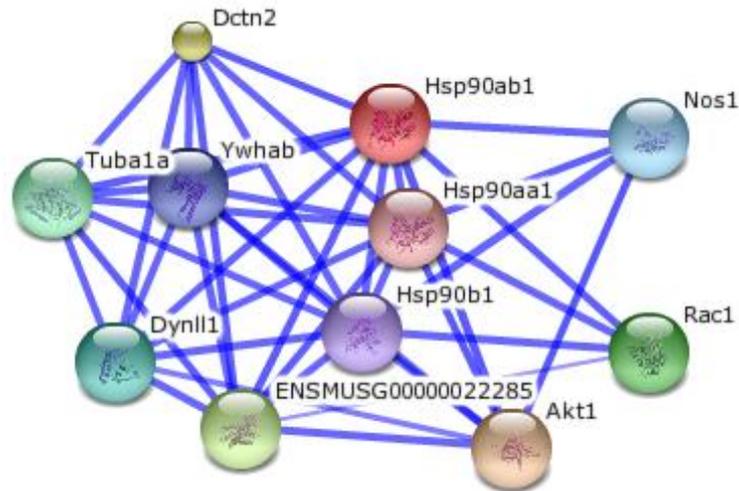


Abb. 16 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von HSP90b1
(<http://string-db.org>)

Das Hitzeschockprotein 90kDa beta ist ein molekulares Chaperon, welches zum einen Funktionen in Verarbeitung und Transport von sezernierten Proteinen und zum anderen ATPase-Aktivität hat. Es wird in embryonalen und adulten Geweben sowie unter Stress exprimiert. HSP90b1 hat Einfluss auf Ywhae. Dieses Protein wird u.a. nach 72 Stunden unter LPS-Stimulation bei Wildtypmäusen exprimiert, wird zu anderen Zeitpunkten allerdings auch differentiell reguliert. *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein* (Ywhae) ist an vielen biologischen Prozessen einschließlich der Zellzykluskontrolle, Proliferation und Apoptose beteiligt. Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle in der Neurogenese (Che et al. 2011). Es bindet an eine Anzahl von funktionellen Partnern unter Erkennung eines Phosphoserin oder Phosphothreonin Motif. Das Verknüpfen resultiert in einer Modulation und Aktivierung anderer Bindungspartner.

Ein möglicher Bindungspartner und auch von mir identifiziertes Protein ist Tubulin. Dieses bindet zwei Moleküle GTP und steht in Interaktion mit Dynaktin 2 und Dynein.

Dynaktin 2 (Dctn2) bindet an Organellen und spielt eine Rolle während der Spindelorganisation in der Prometaphase der Mitose. Dynein ist involviert in intrazellulären Transport und Beweglichkeit und spielt eine Rolle bei der räumlichen Verteilung der Zelle (Splinter et al. 2010).

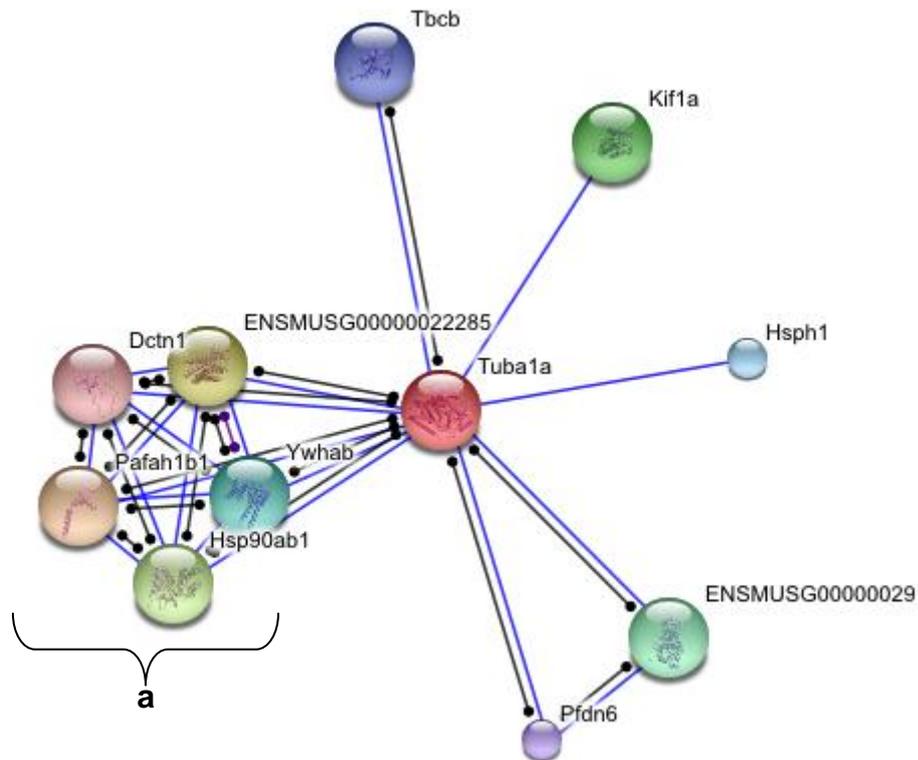


Abb. 17 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von Tubulin alpha 1 (<http://string-db.org>)

Abbildung 17 verdeutlicht einmal mehr das Ausmaß von Interaktion und funktioneller Vernetzung der Proteine miteinander. Zum einen erkennt man die Interaktionen von HSP90b1, welches in Abb. 17 mit einem **a** gekennzeichnet ist und zum anderen die weiteren Verbindungen von Tubulin.

Tbc1b ist ein tubulinfaltender Kofaktor, der an α -Tubulin bindet und interagiert mit dem cytosolischen Chaperonin. Es ist außerdem an der Regulation von Tubulin beteiligt und hat einen hemmenden Einfluss auf das axonale Wachstum. Tubulin hat außerdem noch Einfluss auf das Hitzeschockprotein 110 (Hsp1). Dieses verhindert das Aggregieren und Denaturieren von Proteinen in der Zelle unter Stressbedingungen. Es inhibiert u.a. HSPa8 Chaperonaktivitäten (dieses Protein wurde ebenfalls bei dieser Studie identifiziert) .

ATP5b wurde bei FAT-1-Mäusen nach 24 Stunden unter LPS-Stimulation identifiziert sowie nach 4 Stunden bei Wildtypmäusen ohne LPS-Stimulation. Abb. 18 zeigt die Interaktionen und funktionellen Partner von ATP5b. Diese Abbildung verdeutlicht die enge Verbindung der einzelnen ATP-Synthasen miteinander.

ATP5b ist ein differentiell reguliertes Protein, das insbesondere bei Wildtypmäusen herunterreguliert wird (siehe auch Abb. 20).

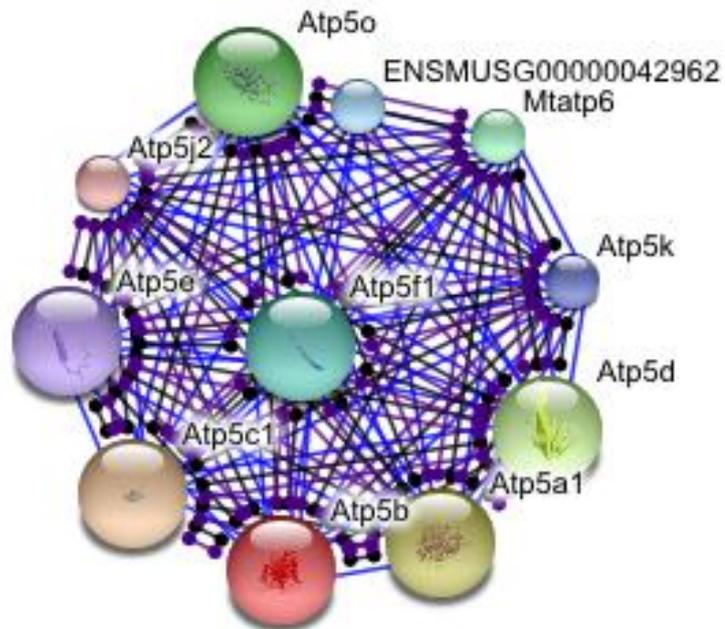


Abb. 18 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von ATP5b (<http://string-db.org>)

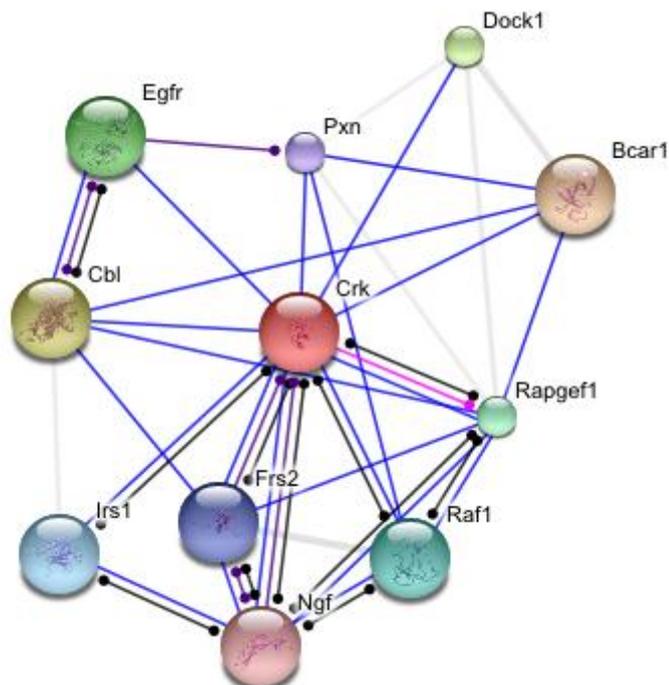


Abb. 19 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von Crk Protein (<http://string-db.org>)

Das am Proteinstoffwechsel beteiligte Protein Crk wurde nur in FAT-1-Mäusen ohne LPS-Stimulation identifiziert. Dieses Protein und auch einige der funktionellen Partner von Crk sind u.a. an apoptotischen Vorgängen beteiligt. Das Crk Protein liegt in zwei verschiedenen Formen vor Crk I und Crk II mit jeweils verschiedenen Aktivitäten. Crk-II hat weniger Transformaktivität als Crk-I. Allerdings ist Crk-II in der Lage als Mediator die MAPK8 zu aktivieren und Zellbeweglichkeit in einer Rac-abhängigen Weise zu schaffen. Eine Inaktivierung von Crk bewirkt in vivo neuromuskuläre Defekte an den motorischen Endplatten des Skelettmuskels (Hallock et al. 2010). Crk Protein hat als funktionellen Partner Dock1 (*Dedicator of cytokinesis 1*). Dieses Protein ist involviert in den Änderungen des Zytoskeletts, die für die Phagozytose von apoptotischen Zellen und Zellbewegungen benötigt werden. Bcar (*breast cancer antiestrogen resistance 1*) ist ein Interaktionspartner von Crk Protein und Dock 1. Dieses Protein spielt eine zentrale Rolle in der Koordination der tyrosinkinasebasierenden Signalübertragungen, die in Beziehung stehen zu Zelladhäsion und induzierten Zellmigrationen. Es ist außerdem noch essentiell für die kardiovaskuläre Entwicklung während der Embryogenese (Kim et al. 2011). Raf (*v-raf-leukemia viral oncogene 1*) ist an der Transduktion der mitogenen Signale von der Zellmembran zum Nukleus beteiligt. Dieser schützt die Zellen vor Apoptose, die durch STK3 vermittelt werden. Crk Protein steht noch in Interaktion mit weiteren Proteinen: Insulinrezeptorsubstrat 1 (Irs) hat eine Kontrollfunktion beim zellulären Prozessieren durch Insulin Nervenwachstumsfaktor (Ngf), der einen Einfluss auf die Entwicklung und auf das sensorische Nervensystem hat; der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptorsubstrat 2 ist an der Aktivierung der MAPKinase beteiligt. *Casitas B-lineage lymphoma* (Cbl) ist an der Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen beteiligt. Es fungiert als Adapterprotein als negativer Regulator für viele Signalwege, deren Start an der Zelloberfläche ausgelöst wird.

Tabelle 1:

Identifizierte Proteine aus Milzlymphozyten von Fat-1-Mäusen und Wildtypmäusen eingeteilt in: qualitative Proteine, die exprimiert werden ohne eine LPS-Stimulation; qualitative Proteine die unter 10 µg LPS-Stimulation nach 4, 24 und 72 Stunden exprimiert werden.

FAT-1-Mäuse					
Proteine, die exprimiert werden ohne LPS-Stimulation					
4 Stunden					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
BC046250 Dock9	<i>Dedicator of cytokinesis 9</i>	220	7,46	5%	Signal-übertragung
cenpf	<i>centromere protein F mitosin</i>	110,9	5,85	6%	Signal-übertragung
Beta actin Actb	<i>Beta-Actin</i>	39,5	5,78	27%	Struktur
phb	<i>Prohibitin</i>	23	5,97	22%	Translation
FAT-1-Mäuse					
Proteine, die exprimiert werden unter LPS-Stimulation					
4 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
BAB38993	<i>Ig heavy chain (Fragment)</i>	12	9,12	40%	Immunsystem
AAA37932	<i>Ig heavy chain VDJ region (Fragment)</i>	13,3	8,6	40%	Immunsystem
BAC56919	<i>Anti-glycyrrhetic acid Ig light chain</i>	13	8,64	20%	Immunsystem
FAT-1-Mäuse					
Proteine, die exprimiert werden ohne LPS-Stimulation					
24 Stunden					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
D88689 FLT1	<i>FMS-like tyrosine kinase 1</i>	152	8,62	7%	Signal-übertragung
Tgtp	<i>T-cell specific GTPase 1</i>	47,3	7,67	17%	Signal-übertragung
Mer5 protein Prdx3 E.C.1.11.1.15	<i>Peroxiredoxin 3</i>	28	7,15	15%	Signal-übertragung
Ftl-1	<i>Ferritin light chain</i>	20,7	5,66	36%	Signal-übertragung
D14Ert581e Dis3	<i>DIS3 mitotic control homolog</i>	60	5,57	12%	Transkription
Crk protein crk	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>	22,9	5,33	18%	Protein-stoffwechsel
Mdm-1	<i>Transformed mouse 3T3 cell double minute 1</i>	73	9,49	11%	Unbekannte Funktion

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
2410091C18RIK Q9CWG8	<i>S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase</i>	48,7	6,47	11%	Unbekannte Funktion
FAT-1-Mäuse Proteine, die exprimiert werden unter LPS-Stimulation 24 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Dnahc9	<i>Dynein, axonemal, heavy chain 9</i>	516	5,63	3%	Signalübertragung
Rp1h	<i>Retinitis pigmentosa 1</i>	236	7,89	6%	Signalübertragung
Slc9a10	<i>Solute carrier family 9, member 10</i>	103	8,6	9%	Signalübertragung
TNFa AAA72044	<i>Tumor necrosis factor a</i>	74	5,77	15%	Signalübertragung
Zfp63	<i>Zinc finger protein 260</i>	48	9,14	17%	Signalübertragung
Tubb1	<i>Tubulin Beta</i>	50	4,78	19%	Struktur
Tubb2c	<i>Tubulin Beta 2</i>	34,4	4,78	21%	Struktur
Atp5b	<i>ATP synthase</i>	56	5,25	10%	Translation
Mad111	<i>Mitotic arrest deficient 1-like 1</i>	33,6	5,44	29%	Translation
Usp13	<i>Ubiquitin specific protease 13</i>	97	5,33	5%	Proteinstoffwechsel
Cadps	<i>Ca²⁺-dependent secretion activator</i>	76,7	5,23	11%	Proteinstoffwechsel
calr	<i>Calreticulin</i>	42	4,57	14%	Proteinstoffwechsel
Aao19657	<i>Ig heavy chain (Fragment)</i>	12	8,7	23%	Immunsystem
IGH	<i>Ig heavy chain (Fragment)</i>	11	9,22	23%	Immunsystem
2410091C18RIK Q9CWG8	<i>S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase</i>	48,7	6,47	18%	Unbekannte Funktion
1700016H13Rik	<i>RIKEN cDNA 1700016H13 gene</i>	40	11,1	54%	Unbekannte Funktion
FAT-1-Mäuse Proteine, die exprimiert werden ohne LPS-Stimulation 72 Stunden					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Cux1	<i>Cut-like homeobox 1</i>	76,4	5,32	13%	Translation
FAT-1-Mäuse Spots, die exprimiert werden mit LPS-Stimulation 72 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Rp1h	<i>Renititis pigmentosa 1</i>	236	7,89	9%	Signalübertragung
Mad111	<i>Mitotic arrest deficient 1-like 1</i>	33,6	5,44	31%	Translation

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Cdk9	<i>Cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)</i>	43,2	9,05	14%	Transkription
Usp13	<i>Ubiquitin specific protease 13</i>	97	5,33	6%	Protein-stoffwechsel
2410091C18RIK Q9CWG8	<i>S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase</i>	48,7	6,47	18%	Unbekannte Funktion
A1132487	<i>Expressed sequence A1132487</i>	34,4	9,17	19%	Unbekannte Funktion
4930534B04Rik	<i>RIKEN cDNA 4930534B04 gene</i>	29,7	5,85	19%	Unbekannte Funktion
Wildtypmäuse Proteine, die exprimiert werden ohne LPS-Stimulation 4 Stunden					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Ywhae	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide</i>	27,9	4,72	62%	Signalübertragung
Arhgdia	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha</i>	23	4,97	44%	Signalübertragung
Lcp1	<i>Lymphocyte cytosolic protein 1</i>	70,6	5,2	48%	Struktur
Lmnb1	<i>Lamin B1</i>	66,8	5,11	34%	Struktur
Tubb6a	<i>Tubulin beta 6</i>	50,6	4,96	37%	Struktur
Capg	<i>Capping protein (actin filament), gelsolin-like</i>	32,9	5,34	38%	Struktur
Sfrs1	<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)</i>	22,4	7,72	47%	Transkription
Atp5b EC 3.6.3.14	<i>ATP synthase</i>	56,2	5,19	69%	Translation
Eno1 EC 4.2.1.11	<i>Enolase 1, alpha non-neuron</i>	47,3	6,36	21%	Stoffwechsel
Ppp1ca	<i>Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform</i>	37,9	6,67	23%	Stoffwechsel
Gapdh EC 1.2.1.12	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	36,1	8,44	33%	Stoffwechsel
Pdhb	<i>Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta</i>	35,1	5,63	46%	Stoffwechsel
Mpst EC 2.8.1.2	<i>Mercaptopyruvate sulfurtransferase</i>	33,1	6,12	38%	Stoffwechsel
Lipa	<i>Lysosomal acid lipase A</i>	22,4	8,26	49%	Stoffwechsel
Serpib1a	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a</i>	42,7	5,85	21%	Protein-stoffwechsel
Hsp84-2	<i>Heat shock protein, 2</i>	83,6	4,97	31%	Chaperon

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Hspa5	<i>Heat shock protein 5</i>	57	5,43	21%	Chaperon
Wildtypmäuse Proteine, die exprimiert werden unter LPS-Stimulation 4 Stunden nach LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Hcls1	<i>Hematopoietic cell specific Lyn substrate 1</i>	54,3	4,75	34%	Signal-übertragung
Npm1	<i>Nucleophosmin 1</i>	28,5	4,57	17%	Signal-übertragung
Mer5 protein Prdx3 E.C.1.11.1.15	<i>Peroxiredoxin 3</i>	28	7,15	24%	Signal-übertragung
Prdx6	<i>Peroxiredoxin 6</i>	24,8	5,72	59%	Signal-übertragung
Prdx1	<i>Peroxiredoxin 1</i>	22,4	8,26	39%	Signal-übertragung
Immt	<i>Inner membrane protein, mitochondrial</i>	75,8	6,31	25%	Struktur
Wdr1	<i>WD repeat domain 1</i>	72,8	8,66	26%	Struktur
Cap1	<i>CAP, adenylate cyclase-associated protein 1</i>	51,8	7,3	41%	Struktur
Coro1a	<i>Coronin, actin binding protein 1A</i>	51,5	6,05	29%	Struktur
Actb	<i>Actin, beta</i>	42,1	5,3	34%	Struktur
Tmod3	<i>Tropomodulin 3</i>	40	5,06	31%	Struktur
Prpf19	<i>PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog</i>	46,1	6,57	21%	Transkription
Hprt	<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>	24,8	6,51	39%	Transkription
Cmpk1 EC 2.7.4.14.	<i>Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1</i>	22,3	5,68	38%	Transkription
Ak2	<i>Adenylate kinase 2</i>	25,7	7,16	35%	Translation
Tkt	<i>Transketolase</i>	61,1	6,54	51%	Stoffwechsel
Aldh2 EC 1.2.1.3	<i>Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial</i>	57	7,53	39%	Stoffwechsel
Eno1 EC 4.2.1.11	<i>Enolase 1, alpha non-neuron</i>	47,3	6,36	23%	Stoffwechsel
Acads	<i>Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain</i>	45,2	8,68	27%	Stoffwechsel
AK003393	<i>Isocitrate dehydrogenate</i>	40,1	6,27	31%	Stoffwechsel
Akr1b3 EC 1.1.1.21	<i>Aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)</i>	36	6,79	42%	Stoffwechsel
Etfa	<i>Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide</i>	35,3	8,62	35%	Stoffwechsel

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Pgam1 EC 3.1.3.13	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	28,8	6,75	32%	Stoffwechsel
Car1 EC 4.2.1.1.	<i>Carbonic anhydrase 1</i>	28,4	6,44	66%	Stoffwechsel
Gstk1	<i>Glutathione S-transferase kappa 1</i>	23,6	8,13	35%	Stoffwechsel
Blvrb EC 1.5.1.30	<i>Biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))</i>	22,2	6,47	44%	Stoffwechsel
Psme2	<i>Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta</i>	23,2	6,15	47%	Protein-stoffwechsel
Cct8	<i>Chaperonin containing Tcp1, subunit 8 (theta)</i>	50,4	5,55	23%	Chaperon
P4hb	<i>Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide</i>	57	4,78	15%	Unbekannte Funktion
CQ815075	<i>Sequence 5 from Patent W02004040299</i>	38,3	9,11	22%	Unbekannte Funktion
2700060E02Rik	<i>RIKEN cDNA 2700060E02 gene</i>	28,3	6,4	34%	Unbekannte Funktion
Wildtypmäuse Proteine, die exprimiert werden ohne LPS-Stimulation 24 Stunden					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Ywhae	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide</i>	27,9	4,72	56%	Signalübertragung
Arhgdia	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha</i>	22,8	4,97	46%	Signalübertragung
Lcp1	<i>Lymphocyte cytosolic protein 1</i>	70,6	5,2	62%	Struktur
Tubb6a	<i>Tubulin beta 6</i>	50,6	4,96	35%	Struktur
Capg	<i>Capping protein (actin filament), gelsolin-like</i>	40	5,69	33%	Struktur
Tpm3	<i>Tropomyosin 3, gamma</i>	29	4,71	27%	Struktur
G6pd2	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase 2</i>	59,7	6,06	49%	Stoffwechsel
Pdhb	<i>Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta</i>	39,3	6,41	33%	Stoffwechsel
Psmd13	<i>Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13</i>	43,1	5,46	36%	Protein-stoffwechsel
Psmb10	<i>Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10</i>	29,4	6,67	28%	Protein-stoffwechsel
Hspa5	<i>Heat shock protein 5</i>	72,5	5,01	38%	Chaperon
Igh-7	<i>Immunoglobulin heavy chain 7 (heavy chain of IgE)</i>	19,6	4,76	28%	Immunsystem

Wildtypmäuse					
Proteine, die exprimiert werden unter LPS-Stimulation					
24 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Atp6v1b2	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V1 subunit B2</i>	56,7	5,57	41%	Signal-übertragung
Ppp2r4	<i>Protein phosphatase 2A, regulatory subunit B (PR 53)</i>	37	5,95	47%	Signal-übertragung
Npm1	<i>Nucleophosmin 1</i>	32,7	4,62	34%	Signal-übertragung
Ywhae	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide</i>	29,3	4,63	31%	Signal-übertragung
Gimap4	<i>GTPase, IMAP family member 4</i>	24,8	6,54	42%	Signal-übertragung
Lcp1	<i>Lymphocyte cytosolic protein 1</i>	70,6	5,2	22%	Struktur
MMVIMENT Y07738	<i>Vimentin</i>	51,6	4,96	57%	Struktur
Tubb6a	<i>Tubulin beta 6</i>	50,6	4,96	20%	Struktur
Actr2	<i>ARP2 actin-related protein 2 homolog</i>	44,9	6,31	19%	Struktur
Capza1	<i>Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1</i>	32,9	5,34	49%	Struktur
Capza2	<i>Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2</i>	32,9	5,34	49%	Struktur
Trappc4	<i>Trafficking protein particle complex 4</i>	21,8	6,43	51%	Struktur
Pnp	<i>Purine-nucleoside phosphorylase</i>	32,5	5,93	24%	Transkription
Phgdh	<i>3-Phosphoglycerate dehydrogenase</i>	57,4	6,29	21%	Stoffwechsel
Aldh2 EC 1.2.1.3	<i>Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial</i>	57	7,53	39%	Stoffwechsel
Eno1 EC 4.2.1.11	<i>Enolase 1, alpha non-neuron</i>	47,3	6,36	49%	Stoffwechsel
AK010065	<i>Isocitrate dehydrogenate</i>	40,1	6,27	36%	Stoffwechsel
Akr1b3	<i>Aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)</i>	35,9	6,79	36%	Stoffwechsel
Adprh EC 3.2.2.19	<i>ADP-ribosylarginine hydrolase</i>	40,3	5,46	35%	Protein-stoffwechsel
Psma3	<i>Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 3</i>	29,6	5,69	53%	Protein-stoffwechsel

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Psma5	<i>Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 5</i>	26,6	4,74	43%	Protein-stoffwechsel
Hsp90b1	<i>Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1</i>	92,7	4,74	25%	Chaperon
Hspa9	<i>Heat shock protein 9</i>	73,7	5,81	20%	Chaperon
Hsp84-2	<i>Heat shock protein, 2</i>	83,6	4,97	19%	Chaperon
Il33	<i>Interleukin 33</i>	30,4	8,83	20%	Immunsystem
P4hb	<i>Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide</i>	57,4	4,75	47%	Unbekannte Funktion
C1qbp	<i>Complement component 1, q subcomponent binding protein</i>	31,4	4,77	51%	Unbekannte Funktion
Gimap4	<i>GTPase, IMAP family member 4</i>	24,8	6,54	62%	Unbekannte Funktion
Fti1	<i>Feline leukemia virus T-cell integration 1</i>	20,8	5,98	61%	Unbekannte Funktion
Wildtypmäuse Proteine, die exprimiert werden ohne LPS-Stimulation 72 Stunden					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Lsp1	<i>Lymphocyte specific 1</i>	36,8	4,77	33%	Signalübertragung
Arhgdia	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha</i>	23	5,2	42%	Signalübertragung
Krt10	<i>Keratin 10</i>	57,9	5,01	19%	Struktur
Tuba1a	<i>Tubulin</i>	50,6	4,96	24%	Struktur
Actb	<i>Actin-beta</i>	42,1	5,3	28%	Struktur
Actb	<i>Actin, beta</i>	39,5	5,78	43%	Struktur
Anxa5	<i>Annexin A5</i>	35,8	4,79	55%	Struktur
Eef2	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2</i>	96,2	6,41	22%	Translation
Mad1l1	<i>Mitotic arrest deficient 1-like 1</i>	33,6	5,44	31%	Translation
Rpia	<i>Ribose 5-phosphate isomerase A</i>	26,1	6,09	37%	Translation
Eno1 EC 4.2.1.11	<i>Enolase 1, alpha non-neuron</i>	47,3	6,36	25%	Stoffwechsel
	<i>Cat eye syndrome chromosome region</i>	46,6	7,75	21%	Stoffwechsel
Gapdh EC 1.2.1.12	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	36,1	8,44	32%	Stoffwechsel
Hsp84-2	<i>Heat shock protein, 2</i>	83,6	4,97	20%	Chaperon
Psme1	<i>Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha</i>	28,7	5,48	38%	Immunsystem

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
AAG30630	<i>Rearranged immunoglobulin heavy chain variable region (fragment)</i>	11,5	9,07	50%	Immunsystem
rp23-81e16.4-001	<i>Novel protein</i>	42,1	11,3 2	16%	Unbekannte Funktion
Ccdc54	<i>Coiled-coil domain containing 54</i>	37,8	8,97	26%	Unbekannte Funktion
Wildtypmäuse Proteine, die exprimiert werden unter LPS-Stimulation 72 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Uqcrc1	<i>Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1</i>	53,5	5,81	28%	Signal-übertragung
Ahcy	<i>S-adenosylhomocysteine hydrolase</i>	48	6,08	30%	Signal-übertragung
Ppp2r4 EC 5.2.1.8.	<i>Protein phosphatase 2A, regulatory subunit B (PR 53)</i>	37	5,95	48%	Signal-übertragung
Prps2	<i>Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2</i>	35	6,17	31%	Signal-übertragung
Ywhaq	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide</i>	29,3	4,63	64%	Signal-übertragung
Prdx3 EC 1.11.1.15.	<i>Peroxiredoxin 3</i>	28,3	7,15	24%	Signal-übertragung
Gimap4	<i>GTPase, IMAP family member 4</i>	24,8	6,54	45%	Signal-übertragung
Pycard	<i>PYD and CARD domain containing</i>	21,5	5,26	34%	Signal-übertragung
Ftl2	<i>Ferritin light chain 2</i>	20,9	5,66	68%	Signal-übertragung
MMVIMENT Y07738	<i>Vimentin</i>	53,6	5,06	36%	Struktur
Cap1	<i>CAP, adenylate cyclase-associated protein 1</i>	51,8	7,3	30%	Struktur
Actb	<i>Actin, beta</i>	42	5,3	49%	Struktur
Actg1	<i>Actin, gamma, cytoplasmic 1</i>	41,3	5,56	54%	Struktur
Anxa1	<i>annexin A1</i>	38,9	7,15	41%	Struktur
Capza2	<i>Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2</i>	33	5,58	53%	Struktur
Tpm3	<i>Tropomyosin 3, gamma</i>	28,9	4,71	25%	Struktur

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
G6pd2	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase 2</i>	59,7	6,06	37%	Stoffwechsel
Pgk1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	44,9	8,02	33%	Stoffwechsel
Taldo1	<i>Transaldolase 1</i>	37,6	6,57	25%	Stoffwechsel
Akr1b3 EC 1.1.1.21	<i>Aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)</i>	35,9	6,79	34%	Stoffwechsel
Pdhb	<i>Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta</i>	35,1	5,63	36%	Stoffwechsel
Psmb10	<i>Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10</i>	29,4	6,67	28%	Protein- stoffwechsel
Psma6	<i>Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6</i>	27,8	6,34	38%	Protein- stoffwechsel
Hspa9	<i>Heat shock protein 9</i>	73,8	5,91	25%	Chaperon

SC: Sequenzabdeckung; MW: Molekulargewicht; pl: Isoelektrischer Punkt

3.1.3 Quantitativ differentiell regulierte Proteine

In der vorliegenden Arbeit konnten neben der qualitativen Aussage „wann werden welche Proteine exprimiert und bei wem“ auch quantitative Aussagen getroffen werden, durch die gezeigt werden konnte, welche Proteine während ersten 72 Stunden hoch- bzw. herunterreguliert werden. Aus Tabelle 2 sind die verschiedenen Proteine zu entnehmen, die unter einer LPS-Stimulation reguliert werden. Ein negativer Wert entspricht einer Herunterregulierung, ein positiver Wert einer Hochregulierung des entsprechenden Proteins.

Von 285 identifizierten Proteinen wurden 30 Proteine aus Fat-1-Mäusen und 24 Proteine aus Wildtypmäusen identifiziert, die nach LPS Stimulation hochreguliert wurden. 12 Proteine von Fat-1-Mäusen und 20 Proteine von Wildtypmäusen regulieren ihre Expression herunter. Die identifizierten Proteine sind in verschiedenen Stoffwechselwegen involviert: Signalübertragung, Transkription, Proteinstoffwechsel, Immunsystem, Strukturbildung, Translation, Chaperone und allgemeiner Stoffwechsel. Einige Proteine konnten keiner der oben genannten Gruppen zugeordnet werden, da ihre Funktion noch nicht bekannt war. Sie erhielten die Bezeichnung „Unbekannt“.

In Abb. 20 ist exemplarisch dargestellt, wie die Regulierung der einzelnen Proteine im zeitlichen Verlauf erfolgt. So zeigt *Ig heavy chain* bei den Fat-1-Mäusen eine starke Hochregulierung (Abb. 20). Im Vergleich zu den Wildtypmäusen, die dieses Protein ebenfalls exprimieren, ist ein deutlicher Unterschied in der Stärke zu sehen. Bei Wildtypmäusen steigt dieses Protein weniger stark und im Besonderen deutlich zeitversetzt an. Erst ab 72 Stunden nach erfolgter LPS-Stimulation werden anscheinend Immunglobuline vermehrt gebildet. *ATP5b* aus Wildtypmäusen zeigt über alle drei von uns gemessenen Zeitpunkte hinweg eine Herunterregulierung. Diese ist besonders in den ersten 24 Stunden deutlich zu sehen. *Beta-Actin* aus Fat-1 zeigt ebenfalls nur in den ersten 24 Stunden eine gesonderte Reaktion, während man bei demselben Protein in Wildtypmäusen einen schwächeren Verlauf sieht, dafür aber zu allen gemessenen Zeitpunkten. *Mad 1/1* aus Fat-1 zeigt beispielsweise eine starke Hochregulierung nach 24 Stunden, wobei man nach 4 Stunden noch keine Aussagen über eine Regulierung dieses Proteins treffen konnte, und zeigt eine Normalisierung nach 72 Stunden.

Weitere Unterschiede zwischen Fat-1-Mäusen und Wildtypmäusen finden sich in dem strukturgebenden Protein *tubulin 1a*. Dieses wird bei Fat-1 nach 24 Stunden hochreguliert, während bei Wildtypmäusen nach 72 Stunden eine schwache Herunterregulierung zu verzeichnen ist. Bei *Lamin* sieht man einen ähnlichen Effekt. Nach 24 Stunden wird dieses Protein bei Fat-1 vermehrt exprimiert, bei Wildtypmäusen nach 4 Stunden herunterreguliert. Das Chaperon *Heat Shock protein 1* wird in Fat-1 nach 24 Stunden herunterreguliert, in Wildtypmäusen erst nach 72 Stunden.

Die meisten Proteine allerdings werden nur zu einem speziellen Zeitpunkt hoch- bzw. herunterreguliert. Diese Regulation ist immer unterschiedlich stark bzw. schwach. So werden die regulierten Proteine von Fat-1-Mäusen deutlich stärker hoch- bzw. herunterreguliert (z.B. *Rgs4* 0,51; *Rcan2* -0,56). Die Werte werden in der Tabelle 2 jeweils bei den entsprechenden Genen angegeben. Ein positiver Wert wird als Hochregulierung, ein negativer Wert als Runterregulierung bezeichnet.

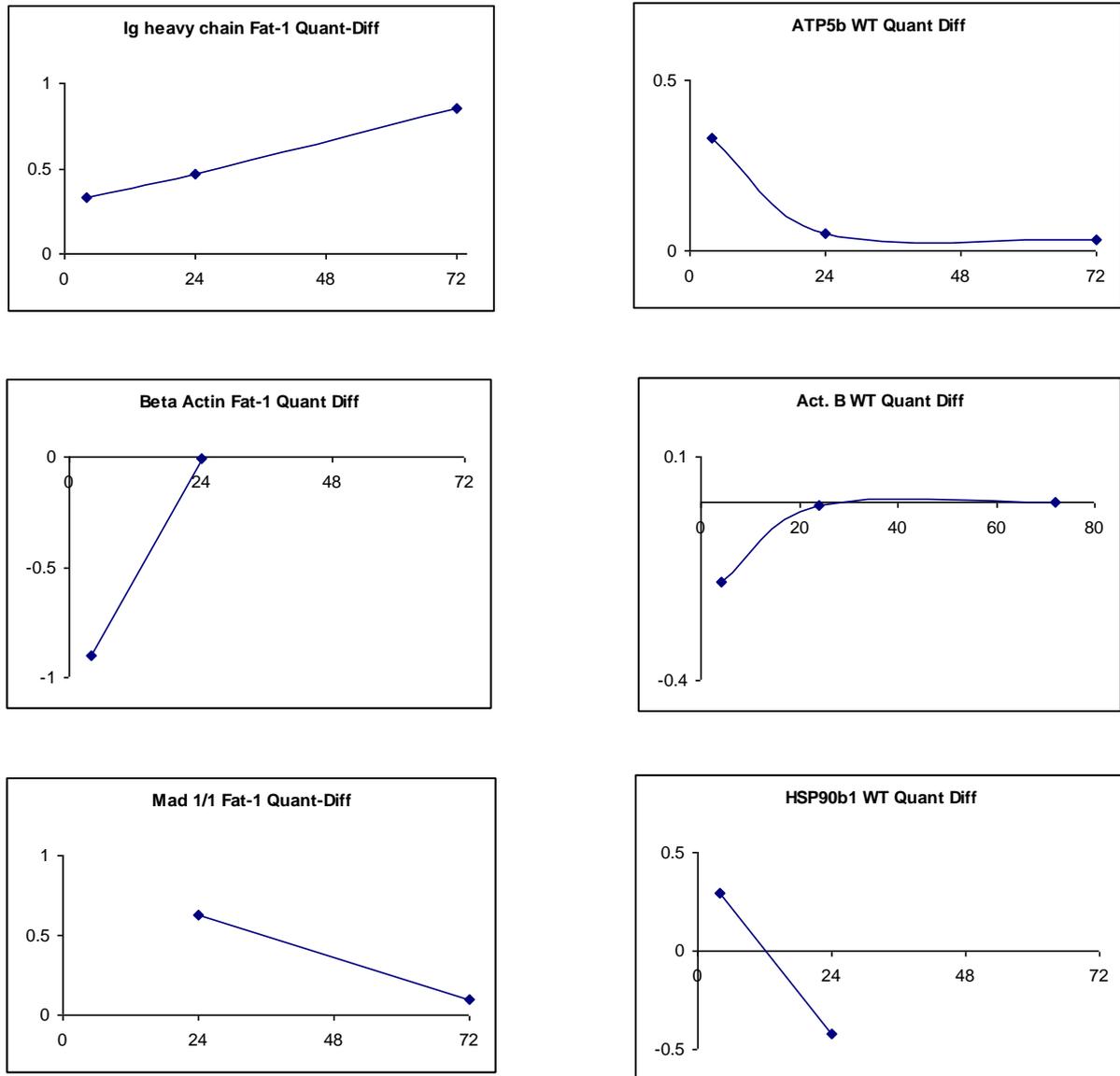


Abb. 20 Darstellung der Expression einzelner Proteine nach 4, 24 und 72 Stunden nach erfolgter LPS-Stimulation

In Abb. 21 sind am Beispiel des hochregulierten Proteins Rgs4 und des runterregulierten Proteins Rcan2 die Interaktionen, Beziehungen zu anderen Proteinen und funktionellen Partner bei Fat-1-Mäusen 72 Stunden nach LPS-Stimulation dargestellt.

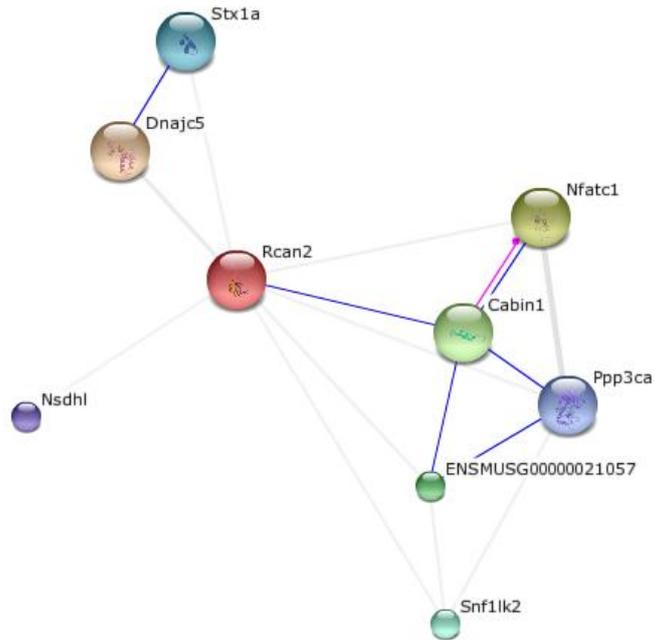


Abb. 21 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von Rcan2 (<http://string-db.org>)

72 Stunden nach LPS-Stimulation wird Rcan2 (*Regulator of calcineurin*) besonders stark herunterreguliert. Rcan2 reguliert die Bildung von Calcineurin 2 und spielt eine Rolle während der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Bei einem Fehlen von Rcan2 tritt eine Verzögerung des Wachstums in den ersten Wochen auf. Der *Nuclear factor activated T-cells cytoplasmic calcineurin-dependent 1* spielt eine Rolle bei der Expression von Zytokinen der T-Zellen besonders für die Induktion von Transkriptionsgenen von IL-2 oder IL-4. Diese könnten für die Regulierung, Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und den programmierten Zelltod verantwortlich sein. Ppp3ca ist ein Regulator von Calmodulin.

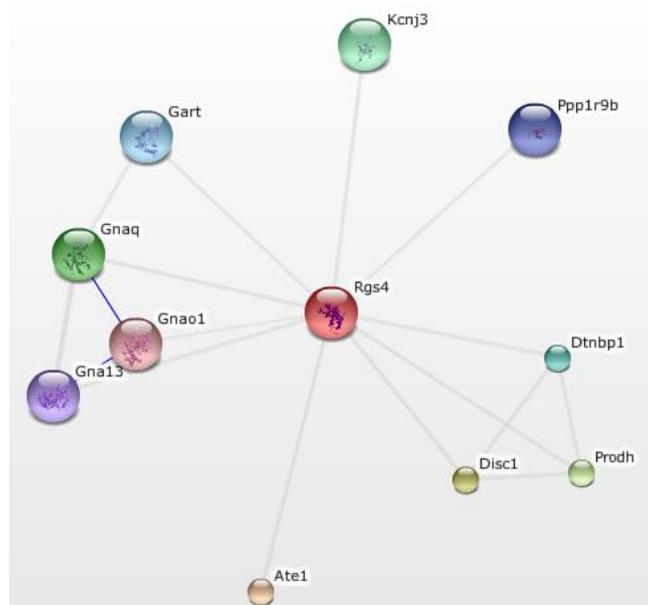


Abb. 22 Funktionelle Partner, Beziehungen und Interaktionen von Rgs4
(<http://string-db.org>)

Besonders stark hochreguliert wird 72 Stunden nach LPS-Stimulation Rgs4 (*Regulator of G-protein signalling 4* – welches den vaskulären Tonus reguliert). Dieser steht in Beziehung zu Gnaq, welcher involviert ist in das Transmembransignalsystem. *Dystrobrevin binding protein 1* (Dtnb) spielt eine Rolle in der Biosynthese von Lysosom-ähnlichen Organellen wie Melanosomen und *Platelets dense granule*. Proline Dehydrogenase (prodh) wandelt Prolin zu delta-Pyrrolin-5-carboxylase um. Rgs4 kontrolliert auch den Kaliumkanal (Kcnj3) durch das G-Protein. Gart ist eine Phosphoribosyl-glycinamid-formyltransferase. Weiterhin besteht eine Interaktion zu Ppp1r9b (Proteinphosphatase 1), welche wiederum auch in verschiedenen Signalwegen involviert ist. Sie bindet Aktinfilamente und zeigt Kreuzaktivitäten und ist somit am Aktinzytoskelett der Plasmamembran beteiligt.

Tabelle 2:

Quantitativ differentiell regulierte identifizierte Proteine Milzlymphozyten von Fat-1-Mäusen und Wildtypmäusen, die unter 10 µg LPS-Stimulation nach 4, 24 und 72 Stunden exprimiert werden. Die Werte der Hoch- bzw. Runterregulierung werden in der Tabelle 2 jeweils bei den entsprechenden Genen angegeben. Ein positiver Wert wird als Hochregulierung, ein negativer Wert als Runterregulierung bezeichnet.

FAT-1-Mäuse					
Quantitativ differentiell regulierte Proteine					
4 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
BC046250 Dock9 0,00	<i>Dedicator of cytokinesis 9</i>	220	7,46	4%	Signal- übertragung
A930021H16RI K mFLJ00139 -0,58	<i>Micall 2</i>	106	9,65	12%	Signal- übertragung
AB072336 Mib-1 0,00	<i>Skelektrophin</i> <i>Mindbomb homolog</i>	103	8,26	10%	Signal- übertragung
Brap 0,74	<i>BRCA1 associated protein</i>	65	5,51	10%	Signal- übertragung
Gzmb -0,51	<i>Granzyme b</i>	27,9	9,79	21%	Signal- übertragung
Spata2 0,01	<i>Spermatogenesis associated 2</i>	47	8,67	17%	Signal- übertragung
X03765 Actb -0,9	<i>Beta-Actin</i>	39,5	5,78	30%	Struktur
Anxa8 0,10	<i>Annexin A8</i>	33,9	5,44	13%	Struktur
Npat -0,99	<i>Npat</i> <i>nuclear protein in the AT region</i>	37	9,52	15%	Transkription
Htatsf1 protein 0,08	<i>HIV TAT specific factor 1</i>	17,8	3,61	29%	Transkription
Lek1 Cenpf 0,10	<i>Centromere protein F</i> <i>mitosin</i>	345	5,11	8%	Protein- stoffwechsel
Cenpf 0,08	<i>Centromere protein F</i>	110	5,85	6%	Protein- stoffwechsel
Senp3 0,92	<i>SUMO/sentrin specific peptidase 3</i>	17	11,6	32%	Protein- stoffwechsel

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
0,33 IGHVDJ	<i>Immunoglobulin heavy chain</i>	12	9,12	40%	Immunsystem
BAB38993 0,45	<i>Ig heavy chain (Fragment)</i>	12	9,12	40%	Immunsystem
Mdm-1 -0,86	<i>Transformed mouse 3T3 cell double minute 1</i>	73	9,49	15%	Unbekannte Funktion
FAT-1-Mäuse Quantitativ differentiell regulierte Proteine 24 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Dnahc9 0,26	<i>Dynein, axonemal, heavy chain 9</i>	516	5,63	3%	Signal-übertragung
Zfp63 -0,03	<i>Zinc finger protein 260</i>	48	9,14	17%	Signal-übertragung
Ncald 0,23	<i>Neuralcin</i>	22	5,11	32%	Signal-übertragung
Lmnb1 0,28	<i>Lamin B1</i>	66,8	5,11	19%	Struktur
Tuba1a 0,05	<i>Tubulin</i>	50,6	4,96	25%	Struktur
Tuba4a 0,43	<i>Tubulin beta 4</i>	50	4,78	10%	Struktur
MMACTBR2 Actb -0,01	<i>Beta-Actin</i>	39,5	5,78	26%	Struktur
Stoml2 -0,12	<i>Stomatin (Epb7.2)-like 2</i>	38,5	8,95	30%	Struktur
Bcl11a 0,05	<i>B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)</i>	45,3	5,26	14%	Transkription
Hnrnpa2b1 0,01	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1</i>	32,6	7,79	19%	Transkription
Atp5b 0,48	<i>ATP synthase</i>	56	5,25	23%	Translation
Mad1l1 0,63	<i>Mitotic arrest deficient 1-like 1</i>	33,6	5,44	25%	Translation
Hspd1 -0,08	<i>Heat shock protein 1 (chaperonin)</i>	59,6	8,09	13%	Chaperon
Cxcl15 0,02	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 15</i>	19,4	6,89	18%	Immunsystem
BAB38993 0,47	<i>Ig heavy chain (Fragment)</i>	12,5	9,25	34%	Immunsystem
VH186.2/JH2 0,22	<i>Ig heavy chain (Fragment)</i>	12	8,93	29%	Immunsystem
Mdm-1 -0,10	<i>Transformed mouse 3T3 cell double minute 1</i>	73	9,49	14%	Unbekannte Funktion

FAT-1-Mäuse					
Quantitativ differentiell regulierte Proteine					
72 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Dnahc9 0,19	<i>Dynein, axonemal, heavy chain 9</i>	516	5,63	3%	Signal- übertragung
Casp3 -0,01	<i>Caspase 3</i>	31,9	6,45	23%	Signal- übertragung
Rcan2 -0,56	<i>Regulator of calcineurin 2</i>	27,7	5,44	21%	Signal- übertragung
Rgs4 0,51	<i>Regulator of G-protein signaling 4</i>	23,9	8,79	31%	Signal- übertragung
Mad111 0,10	<i>Mitotic arrest deficient 1-like 1</i>	33,6	5,44	31%	Translation
Mbd4 0,01	<i>Methyl-CpG binding domain protein 4</i>	13	6,19	48%	Translation
Usp13 0,19	<i>Ubiquitin specific protease 13</i>	97	5,33	5%	Protein- stoffwechsel
V186.2 0,85	<i>IG Ig heavy chain (Fragment)</i>	11	9,48	37%	Immunsystem
0,39	<i>IG Ig heavy chain (Fragment)</i>	11,5	9,1	18%	Immunsystem
0,10	<i>IG Ig heavy chain variable region (Fragment)</i>	12,9	9,52	33%	Immunsystem
0,13	<i>IG Ig heavy chain VHQ52-JH4 Region (Fragment)</i>	11,5	8,72	29%	Immunsystem
Wildtypmäuse					
Quantitativ differentiell regulierte Proteine					
4 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
P4hb 0,23	<i>Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide</i>	57	4,78	50%	Signal- übertragung
Lcp1 -0,14	<i>Lymphocyte cytosolic protein 1</i>	70,6	5,2	15%	Struktur
Lmnb1 -0,09	<i>Lamin B1</i>	66,8	5,11	20%	Struktur
Coro1a 0,46	<i>Coronin, actin binding protein 1A</i>	51,5	6,05	28%	Struktur
Actb -0,18	<i>Actin, beta</i>	42,1	5,3	48%	Struktur
Hnrnpa2b1 0,31	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1</i>	32,5	8,74	27%	Transkription
Atp5b EC 3.6.3.14 0,33	<i>ATP synthase</i>	56,2	5,25	69%	Translation

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Aldh2 EC 1.2.1.3 0,23	<i>Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial</i>	57	7,53	24%	Stoffwechsel
Eno1 EC 4.2.1.11 0,28	<i>Enolase 1, alpha non-neuron</i>	47,3	6,36	48%	Stoffwechsel
Hsp90b1 0,29	<i>Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1</i>	92,7	4,74	43%	Chaperon
Hspa8 0,00	<i>Heat shock protein 8</i>	71,1	5,28	45%	Chaperon
Hspa5 -0,09	<i>Heat shock protein 5</i>	72,5	5,07	51%	Chaperon
Chia 0,32	<i>Cchitinase, acidic</i>	44,8	5,42	28%	Unbekannte Funktion
Wildtypmäuse Quantitativ differentiell regulierte Proteine 24 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Lsp1 0,41	<i>Lymphocyte specific 1</i>	36,8	4,77	26%	Signal-übertragung
Grb2 0,79	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>	25,3	5,89	48%	Signal-übertragung
Lcp1 0,00	<i>Lymphocyte cytosolic protein 1</i>	70,6	5,2	62%	Struktur
Lmnb1 0,79	<i>Lamin B1</i>	67,1	5,11	36%	Struktur
Tubb6a 0,08	<i>Tubulin beta 6</i>	50,6	4,96	35%	Struktur
Actg1 -0,02	<i>Actin, gamma, cytoplasmic 1</i>	42,1	5,23	26%	Struktur
Actb -0,01	<i>Actin, beta</i>	42,1	5,3	44%	Struktur
1810058I24Rik -0,02	<i>RIKEN cDNA 1810058I24 gene Annexin-related sequence</i>	32,9	4,8	27%	Struktur
Tpm1 -0,59	<i>Tropomyosin 1, alpha</i>	29,2	4,75	43%	Struktur
Anp32a 0,41	<i>Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A</i>	28,7	3,99	35%	Transkription
Cmpk1 EC 2.7.4.14. 0,04	<i>Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1</i>	22,3	5,68	53%	Transkription
Ada EC 3.5.4.4 -0,88	<i>adenosine deaminase</i>	40,1	5,48	23%	Transkription
Atp5b EC 3.6.3.14 0,05	<i>ATP synthase</i>	56,2	5,25	37%	Translation

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Gtpbp1 0,10	<i>GTP binding protein 1</i>	47,1	5,49	47%	Translation
Phb -0,02	<i>Prohibitin</i>	29,8	5,57	65%	Translation
Aldh2 0,83	<i>Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial</i>	57	7,53	49%	Stoffwechsel
Taldo1 -0,42	<i>Transaldolase 1</i>	37,5	6,57	27%	Stoffwechsel
Ndufs3 0,63	<i>NADH dehydrogenase (Ubiquinone)</i>	30	6,67	51%	Stoffwechsel
Pgls -0,59	<i>6-phospho- gluconolactonase</i>	27,5	5,55	33%	Stoffwechsel
Calr 0,71	<i>Calreticulin</i>	42,3	4,57	22%	Protein- stoffwechsel
Psmb4 0,02	<i>Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4</i>	29,2	5,47	39%	Protein- stoffwechsel
Psmc2 0,1	<i>Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta</i>	27,1	5,55	51%	Protein- stoffwechsel
Hsp84-2 -0,42	<i>Heat shock protein, 2</i>	83,6	4,97	31%	Chaperon
Hspa5 -0,86	<i>Heat shock protein 5</i>	72,5	5,12	35%	Chaperon
Hspa8 -0,88	<i>Heat shock protein 8</i>	68,2	5,32	22%	Chaperon
Wildtypmäuse					
Quantitativ differentiell regulierte Proteine					
72 Stunden nach 10 µg LPS-Stimulation					
Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Rutbc1 Sgsm2 0,05	<i>Small G protein Run and TBC domain containing</i>	113, 5	6,33	11%	Signal- übertragung
Zfp63 -0,06	<i>Zinc finger protein 260</i>	47,9	9,1	21%	Signal- übertragung
Pnp -0,06	<i>Purine-nucleoside phosphorylase</i>	32,5	5,78	65%	Signal- übertragung
Vdac2 0,09	<i>Voltage-dependent anion channel 2 (TIB-55)</i>	32	7,44	29%	Signal- übertragung
Dguok -0,03	<i>Deoxyguanosine kinase</i>	28,8	6,0	39%	Signal- übertragung
Ywhaq 0,07	<i>Tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide</i>	27,9	4,7	48%	Signal- übertragung
Grb2 -0,03	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>	25,3	5,89	48%	Signal- übertragung

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Lcp1 -0,06	<i>Lymphocyte cytosolic protein 1</i>	70,6	5,2	17%	Struktur
MMVIMENT Y07738 0,08	<i>Vimentin</i>	51,6	4,96	33%	Struktur
Tuba1a -0,07	<i>Tubulin</i>	50,6	4,96	26%	Struktur
ActB -0,08	<i>Beta-Actin</i>	42	5,3	39%	Struktur
Acta1 0,01	<i>Actin, alpha 1, skeletal muscle (fragment)</i>	39,5	5,83	26%	Struktur
MMACTBR2 Beta-Actin 0,00	<i>Beta-Actin</i>	39	5,78	40%	Struktur
Eef2 -0,04	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2</i>	96,2	6,31	19%	Translation
Atp5b EC 3.6.3.14 0,03	<i>ATP synthase</i>	56	5,25	30%	Translation
Mri1 2410018C20Rik -0,02	<i>Methylthioribose-1-phosphate isomerase homolog</i>	39,5	5,5	25%	Translation
Atp5b EC 3.6.3.14 0,02	<i>ATP synthase (Fragment)</i>	18,6	5,52	35%	Translation
Anp32a 0,00	<i>Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A</i>	28,7	3,99	33%	Transkription
Ndufs1 0,03	<i>NADH dehydrogenase (Ubiquinone)</i>	80,7	5,51	14%	Stoffwechsel
Eno1 EC 4.2.1.11 -0,02	<i>Enolase 1, alpha non-neuron</i>	47,3	6,36	26%	Stoffwechsel
Taldo1 -0,08	<i>Transaldolase 1</i>	37,5	6,57	32%	Stoffwechsel
AK003393 0,07	<i>Isocitrate dehydrogenate</i>	31,9	5,7	32%	Stoffwechsel
Ndufs3 0,01	<i>NADH dehydrogenase (Ubiquinone)</i>	30	6,67	34%	Stoffwechsel
Pgam1 0,01	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	28,8	6,75	58%	Stoffwechsel
Psmd13 -0,02	<i>Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13</i>	43,1	5,46	47%	Protein- stoffwechsel
Psme1 0,08	<i>Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha</i>	28,8	5,48	63%	Protein- stoffwechsel

Ergebnisse

Gen	Name	kDa	IP	SC	Funktion
Psma3 E.C 3.4.25.1 0,02	<i>Proteasome subunit a type 3</i>	28,5	5,29	37%	Protein- stoffwechsel
Hspa84-2 -0,01	<i>Heat shock protein 8</i>	83,6	4,97	38%	Chaperon
Hsp70-ps1 -0,02	<i>Heat shock protein 70, pseudogene 1</i>	73,7	5,81	25%	Chaperon
Hspd1 -0,06	<i>Heat shock protein 1 (chaperonin)</i>	61	5,67	52%	Chaperon
Ngp -0,09	<i>Neutrophile granule protein</i>	19,7	5,37	40%	Immunsystem
AAK07893 0,00	<i>Immunglobulin heavy chain variable region</i>	10,4	8,08	35%	Immunsystem
VH7183 0,02	<i>Ig heavy chain V region</i>	7,7	7,93	64%	Immunsystem
2410091C18RIK Q9CWG8 -0,01	<i>S-adenosyl-l-methionine- dependent methyltransferase</i>	48,7	6,47	23%	Unbekannte Funktion

SC: Sequenzabdeckung; MW: Molekulargewicht; pI: Isoelektrischer Punkt

4. Diskussion

4.1 Methodenoptimierung für zweidimensionale Gelelektrophorese

Das „Proteom“ bezeichnet die Gesamtheit des Proteinbestandes, also das vollständige Proteinmuster einer Zelle, eines Organismus oder einer komplexen Körperflüssigkeit zu einem Zeitpunkt unter definierten Bedingungen. Ein Proteom reflektiert die Proteinexpression und ist somit ein sehr dynamisches Gebilde, dessen unterschiedliche intra- sowie extrazelluläre Bedingungen zur Bildung unterschiedlicher Proteinmuster führen. Eine Proteomanalyse stellt somit einen „Schnappschuss“ des zellulären Funktionszustandes dar (Wilkins et al. 1997; Dove 1999).

Die differenzielle Proteomanalyse erlaubt es, einen Einblick in verschiedene zelluläre Lebensvorgänge unter bestimmten Bedingungen zu gewinnen. Im Gegensatz zum Proteom ist das Genom ein statisches Gebilde, das durch die genaue Abfolge, Art und Anzahl der Nukleotide definiert ist (Lottspeich 1999). Das Konzept der Proteomanalytik basiert auf der Technik der Proteintrennung und ermöglicht somit eine Differenzierung in die einzelnen Proteinspezies. Seit über 25 Jahren ist die 2D-SDS-PAGE das Instrument, um komplexe Proteingemische zu trennen. Sie erlaubt es, verschiedene Proteinspezies zu visualisieren und sie somit identifizierbar zu machen. Obwohl auch mRNAs viele Informationen über das An- und Ausschalten von Genen liefern, kann man durch mRNAs keine Zusammenhänge von Proteinprozessen, Degradationen, translationalen Kontrollen und posttranslationalen Modifikationen von Proteinen erhalten (Lottspeich 1999). Molekularbiologische Methoden reichen daher nicht aus, um die multiplen, komplexen biologischen Prozesse genauer zu entschlüsseln. Aus diesem Grund ist die Proteomanalytik ein unverzichtbares Instrument in der Forschung geworden.

Es bestehen viele standardisierte Methoden in der Proteinanalytik. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Proteine nicht erfasst werden können. Die Methoden müssen für jede Probe optimiert und angepasst werden, damit das Proteom so vollständig wie nur möglich dargestellt werden kann. Auch dann

bestehen jedoch weiter Fehlerquellen. Viel Ausgangsmaterial sorgt zwar für ausreichende Mengen für eine zweidimensionale SDS-PAGE und die anstehenden Auswertungen der Proteinmuster. Allerdings ist es teilweise schwierig und vor allem sehr teuer genügend Probenmaterial zu erhalten. Aus diesem Grund sind Färbemethoden mit Fluoreszenzfarbstoffen und die kovalente Modifikation von Proteinen mit fluoreszierenden Molekülen wie im DIGE-System unverzichtbar, die mit nur sehr wenig Ausgangsmaterial eine Auswertung in Bezug auf die qualitative und quantitative Regulierung der Proteine ermöglichen. Ob ein Proteom vollständig erfasst werden kann und welche Proteine detektiert werden können, ist ferner von der Prozessierung der Zelle und dem Entwicklungsstadium des Organismus abhängig. Die Dynamik der Proteinmodifikation sowie die Proteinkonzentration des Entwicklungsstadiums spielen hierbei eine wichtige Rolle für die Analyse des Proteoms. Seltene Proteinspezies lassen sich in einem Proteom schlecht erfassen. Diese Proteine kann man zwar anreichern und sensitiv anfärben, allerdings sind Proteinspots eines 2D-SDS-PAGE mengenmäßig nach einer Gauss-Kurve verteilt. Proteine hoher Konzentration können daher die Flecken von Proteinspezies niedriger Konzentrationen verdecken. So besteht die Möglichkeit, dass Proteine andere Proteinspezies mit demselben bzw. einem ähnlichen isoelektrischen Punkt und einer ähnlichen Masse überdecken. Mit diesem Hintergrundwissen wurde die Methode der Analyse der Proteome, die dieser Dissertation zugrunde lagen soweit optimiert, dass diese Fehlerquellen weitgehend minimiert wurden.

Zur Untersuchung, welche Auswirkungen Lipopolysaccharid (LPS), das Endotoxin gramnegativer Bakterien, auf das Proteom der Milzlymphozyten aus Wildtypmäusen und Fat-1-Mäusen hat, wurden zunächst Milzlymphozyten nach intratrachealer Instillation von 10 µg LPS nach 4, 24 und 72 Stunden separiert und anschließend diese in einem Standardlysispuffer homogenisiert.

Das Proteinlysate wurde zunächst direkt für die zweidimensionale Gelelektrophorese eingesetzt. In der SDS-PAGE zeigte sich jedoch sowohl ein horizontales als auch vertikales Streaking, sowie nur schwache Spots. Aufgrund der nicht optimalen Auftrennung der Proteinprobe musste die Aufarbeitung modifiziert werden. Daher wurde die Proteinprobe mittels einer Chloroform/Methanol-Fällung aufkonzentriert, störende Agenzien und Blutbestandteile entfernt und das Proteinpellet anschließend in dem Probenpuffer

(siehe 2.3.2.) aufgenommen. Mit Hilfe dieser Proteinfällung konnte das Streaking vermieden und die Auftrennung der Proteinspezies deutlich verbessert werden. Allerdings konnte man auch diesmal nur wenige schwache Spots erkennen. Für eine ausgiebige Analyse waren diese Gele nicht brauchbar, da man nur einen sehr kleinen Teil des Proteoms visualisieren konnte. Um für die Untersuchungen nicht eine Vielzahl an Mäusen verwenden zu müssen, wurde das DIGE-System für diese Versuche eingeführt und für diese Proben optimiert. Mittels DIGE war es möglich mit nur geringen Proteinmengen die zwei zu untersuchenden Zustände (mit LPS stimuliert und nicht stimuliert) miteinander zu vergleichen. Ein großer Vorteil hierbei war außerdem, dass es kein *Quenchen* oder Verschieben der Proteinspots gab. So war es möglich die Proteinspotmuster direkt miteinander zu vergleichen, indem man die einzelnen Farbkanäle der verwendeten Fluoreszenzmarker aufzeichnet und densitometrisch vergleicht. Durch Farbüberlagerung konnte man die Unterschiede der Proteome aus den Mäusen, die mit LPS stimuliert wurden und den Mäusen, die nicht stimuliert wurden direkt visuell darstellen. Des Weiteren ermöglicht diese Methode auch Aussagen über eine differentielle Regulierung (Hoch- und Runterregulierung) von Proteinen. Aus diesen Gründen sind die DIGE-Gele die Methode der Wahl bei dieser geringen Menge an Probenmaterial. Allgemeine Fehler die auftreten können aufgrund ungenauen Pipettierens oder inkonstanter Färbezeiten, können mit Hilfe von Software ausgeglichen werden. In dem Programm „PD-Quest“ wurden die Gele daher „normalisiert“. 2D-Gele sind nie völlig deckungsgleich. Abweichungen ergeben sich aus Inhomogenitäten während des Gießvorganges in der zweiten Dimension, minimalen Laufzeitänderungen oder Störungen in der Elektrophorese und auch durch divergierende Wahl des Ausschnitts beim Scannvorgang. Auch diese Probleme konnten mit der DIGE auf ein Minimum reduziert werden, da jeweils zwei Proteome auf ein und demselben Gel aufgetrennt wurden

Um verschiedene Zustände direkt miteinander zu vergleichen ist DIGE eine geeignete Methode. Allerdings besteht für die massenspektrometrische Auswertung ein Problem, wenn ein Proteinspot zu wenig Material repräsentiert. Die Proteinmengen in den meisten Spots waren zu gering für eine massenspektrometrische Identifizierung. Dieses Problem wurde durch die Herstellung von präparativen Gelen umgangen. Diese Gele wurden mit dem Massenspektrometrie-kompatiblen Fluoreszenzfarbstoff Flamingo angefärbt. Die

Flamingofärbung hat den Vorteil, dass sie sehr gut in Kombination mit DIGE benutzt werden kann. Sie ist sehr einfach in der Durchführung und auch die Hintergrundfärbung ist sehr gering. DIGE-Gele und Flamingogele konnten daher zusammen mit dem Programm PD-Quest densitometrisch ausgewertet werden. Ein Verschieben der Proteinspots wurde mit dieser Methode auf ein Minimum reduziert.

Des Weiteren zeigten Vorversuche, dass die Benutzung eines 10 %igen Trenngels optimal ist, da hierdurch die Proteine besser in der zweiten Dimension getrennt wurden verglichen mit höheren oder niedrigeren Trenngelkonzentrationen.

Die mit Hilfe von PD-Quest ausgewählten Proteinspots wurden tryptisch verdaut und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Für die erfolgreiche Identifizierung spielte dabei die richtige Wahl der Matrix eine wichtige Rolle. Daher wurden verschiedene Matrices im Vorfeld getestet. Dabei wurde festgestellt, dass mittels der „dry droplet“ Methode unter Verwendung von einer Dihydroxybenzoesäure/Methylendiphosphonsäure-Matrix auf einem Anchor-Target eine optimale Ionisierung der Peptide erreicht wurde. Die Peptide konnten durch die Anchor-Technologie des Targets auf einem sehr kleinen Punkt fokussiert werden, was die Probe stark konzentrierte und in einer höheren massenspektrometrischen Sensitivität resultierte. Verglichen mit den anderen getesteten Matrices (DHB/ACN/Phosphorsäure auf einem Edelmetalltarget; Prespotted-Target mit HCCA-Matrix oder HCCA auf einem Anchorchip-Target) lag die bessere Identifizierung der Proteine auch in einem geringeren Matrixabtrag begründet. Als Konsequenz der optimierten Probenpräparation wurden bei der Auswertung der Spektren höhere Mowse Scores erreicht, da mehr Peptide detektiert und zugeordnet werden konnten. Bei der Mascot-Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com/>) wird für die Suche ein Schwellenwert (Mascot-Mowse-Threshold) errechnet. Liegt das Ergebnis (Mascot-Mowse-Score) einer Proteinidentifizierung bei der Datenbanksuche über diesem Schwellenwert, so ist das Ergebnis statistisch signifikant von einem zufälligen Treffer zu unterscheiden. Für die Identifizierungen wurde die Wahrscheinlichkeit für eine falsch-positive Identifizierung kleiner als 5% gewählt ($p < 0,05$).

Ende der 80er Jahre wurden die ersten Proteindatenbanken auf der Basis von 2D-Gelanalysen angelegt. Seitdem ist ein explosives Wachstum sowohl der Protein-

als auch der Gendatenbanken zu verzeichnen. Dadurch ist die Grundlage für immer schnellere und spezifischere Identifizierung von Proteinen aus Proteomanalysen geschaffen. Grundlage für die Proteinidentifizierungen sind in erster Linie genomische Datenbanken aus verschiedensten Sequenzierungsprojekten. Diese sind frei zugänglich. Die unterschiedlichen Suchmaschinen können diese unterschiedlichen Datenbanken für die Proteinidentifizierungen verwenden. Hierbei werden die experimentell erhaltenen Massenlisten der tryptischen Peptide mit den theoretischen Peptidmassen aus allen Proteineinträgen der Datenbank verglichen.

4.2 Einfluss von Lipiden in der Entzündung

Das LPS-induzierte Modell des akuten Lungenversagens in der Maus ist gut charakterisiert. 1997 konnten Szarka et al bereits zeigen, dass eine intratracheale LPS-Gabe von 10 µg eine Lungenschädigung schweren Grades bewirkt. 2005 zeigten Delayre-Orthez et al. , dass bereits eine intratracheal instillierte Dosis von 1 µg LPS ausreicht um eine mittelgradige Lungenschädigung hervorzurufen.

Bereits in verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass LPS eine Lungenschädigung hervorruft. Welchen Einfluss LPS auf die Proteinexpression von Milzlymphozyten hat, nachdem LPS intratracheal instilliert wurde, sollte in dieser Untersuchung ermittelt werden. Für diese Versuche wurden Wildtypmäuse (WT) und transgene Fat-1-Mäuse verwendet. Diese transgenen Fat-1-Mäuse tragen die Erbinformation für eine n-3 Fettsäure-Desaturase, die eine Umwandlung von n-6-mehrfach ungesättigten Fettsäuren in n-3 Fettsäuren bewirkt. Die n-3 Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) sowie deren Metabolite bewirken eine Reduzierung von Entzündungsprozessen (Kang et al. 2004; D'Alessio et al. 2009; Mayer et al. 2009).

Zahlreiche Lipide besitzen eine immunmodulatorische Wirkung. So ist z.B. ein antiinflammatorischer Effekt der n-3 Fettsäuren (EPA und DHA) in experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen worden. Im Vergleich dazu wurde eine

Verstärkung der Entzündungsparameter durch die n-6 Fettsäure Arachidonsäure erreicht. Die Wirkung der n-3 Fettsäuren liegt zum einen in der Konkurrenz mit der Arachidonsäure um die Verstoffwechslung durch gleiche Enzymsysteme (Gadek et al. 1999; Mayer et al. 2003; Calder 2006; Fritsche 2006; Heller et al. 2006; Mayer et al. 2009). In Versuchen wurde gezeigt, dass es in Thrombozyten nach Zufuhr von EPA zu einer kompetitiven Konkurrenz um die Metabolisierung durch die Cyclooxygenase kommt, wobei EPA im Vergleich zu AA bevorzugt wird und vermehrt zu TxA₃ metabolisiert wird. Experimente an neutrophilen Granulozyten ergaben, dass bei gleichem Angebot EPA im Vergleich zu AA besser zu dem Eicosanoid LTB₅ metabolisiert wurde. LTB₅ hingegen besitzt im Vergleich zu LTB₄ eine signifikant verminderte Potenz bezüglich der Bildung proinflammatorischer Mediatoren.

Die n-3 Fettsäuren entfalten weitere hypoinflammatorische Wirkungen über ihre Metabolite, die Eicosanoide. Diese umfassen die Gruppen der Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane. Fettsäuren werden durch den Cyclooxygenase-, Lipoxygenase- oder den Cytochrom- P 450-Weg verstoffwechselt, wobei als Produkte die Eicosanoide entstehen. Diese wirken sowohl als parakrine Mediatoren in einer Entzündung als auch als intrazelluläre Botenstoffe (Pacheco et al. 2002; Ott 2008).

Zudem wird die Metabolisierung zu den Eicosanoiden durch die Inkorporation der unterschiedlichen Fettsäuren in die Zellmembran beeinflusst. Im Fall einer Entzündung werden durch die Phospholipase A₂ die Fettsäuren aus dem Membranphospholipid-Pool mobilisiert und stehen den Enzymsystemen zur Verfügung. Bei einer höheren Anreicherung von n-3 Fettsäuren in diesem Pool können auch vermehrt antiinflammatorisch wirkende Metabolite gebildet werden, die daraufhin den lipid-abhängigen intrazellulären Signalereignissen („*lipid signaling*“) zur Verfügung stehen (Fowler et al. 1993; Denys et al. 2005; Mayer et al. 2009).

4.3 Proteomanalyse der Milzlymphozyten von Wildtypmäusen und Fat-1-Mäusen unter LPS-Stimulation

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung von Proteinen, die involviert sind in spezifischen Regulationsprozessen bedingt durch eine intratracheale Applikation von Pathogenitätsfaktoren im Mausmodell (Wildtyp- und FAT-1-Mäuse) und darauf folgende Induzierung einer alveolären Inflammation oder akuten Lungenversagens. Durch die Analyse der Expression zellulärer Proteine in Milzlymphozyten sollten spezifische Signalwege identifiziert werden.

Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Konstantin Mayer hatten gezeigt, dass es nach intratrachealer Instillation von LPS in Mäusen zu einer definierten und reproduzierbaren alveolären Inflammation kommt. Über eine Zeitspanne von 72 Stunden kommt es in diesem Modell zu einer kontinuierlichen Invasion von Leukozyten aus dem Gefäßkompartiment in den Alveolarraum und zu einem interstitiellen Ödem. Neben einem massiven Granulozyten (polymorph-nukleären Zellen, PMN) Influx war im alveolären Kompartiment auch eine deutlich höhere Anzahl von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten nachweisbar. Nach 72 Stunden fanden sich erste Hinweise für eine Terminierung der pulmonalen Entzündungsreaktion. Bei noch ansteigender Zahl der Leukozyten in der BALF nahmen die interstitiell und in das pulmonale Gefäßbett rekrutierten PMN bereits wieder ab. Im peripheren Blut konnte eine leichte Reduktion der Gesamt-Leukozytenzahl nachgewiesen werden. Interessanterweise fiel die Anzahl der Lymphozyten zum Zeitpunkt 24 h um fast 25% ab. Im Vergleich der Lymphozytenanzahl im peripheren Blut zur Anzahl der Lymphozyten in der Milz wurde eine noch deutlichere Veränderung in der Milz der Mäuse nachgewiesen. Es kommt zu einem deutlichen Abfall der Anzahl der Milzlymphozyten um fast 30% verglichen mit unstimulierten Tieren. Außerdem steigt die Apoptoserate der Milzlymphozyten gemessen als Annexin V-positive, 7AAD-negative Zellen von etwa 3% (unstimulierte Mäuse) auf 22% nach 4 h und 16% nach 24 h an. Die Arbeitsgruppe Mayer konnte des Weiteren in isolierten Lymphozyten eine transiente Erhöhung der cleaved Caspase 9 sowie einen progredienten Anstieg der cleaved Caspase 8 sowie der Effektorcaspase 3 als Zeichen der Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Weges der Apoptose nachweisen. Auf Proteinebene wiesen sie eine erhöhte Translokation des proapoptotischen

Proteins Bax an die Mitochondrienmembran nach, sowie eine transiente Phosphorylierung der Phosphoinositol-3 Kinase (PI-3K) und zu späteren Zeitpunkten eine Phosphorylierung der nachgeschalteten Proteinkinase B (Akt) als Zeichen der Aktivierung antiapoptotischer Signaltransduktionswege. Die Apoptose von Milzlymphozyten ist ein entscheidender pathophysiologischer Schritt der Sepsis und wurde zum ersten Mal von Mayer *et al* für das Endotoxininduzierte akute Lungenversagen beschrieben.

Phänotypisch ist bekannt, dass FAT-1-Mäuse nach erfolgter LPS-Stimulation bereits nach 2 Tagen deutlich aktiver sind und sie auch weniger gesträubtes Fell haben als die korrespondierende Wildtypkontrollgruppe.

Ziel dieser Untersuchung war nun die Identifizierung von Signalkaskaden durch Proteomanalysen, die zur Erklärung dieser beobachteten Phänomene nach LPS-Gabe beitragen können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Wildtypmäuse und FAT-1-Mäuse mit jeweils 10 µg LPS intratracheal stimuliert, nach definierten Zeitpunkten wurde die Milz entnommen und deren Milzlymphozytenproteine analysiert. Die Proteomanalyse zeigte, dass durch eine intratracheale LPS-Stimulation eine Regulierung der Proteinexpression in den Milzlymphozyten erfolgt. Zum einen fanden sich Proteine, die hoch- bzw. herunterreguliert wurden, zum anderen gab es auch einzelne Proteine, die nur nach Stimulation mit LPS exprimiert wurden bzw. nur exprimiert wurden, wenn keine Stimulation mit LPS stattgefunden hatte. Es fanden sich signifikante Unterschiede in den Proteinmustern der zwei untersuchten Mausmodelle. Es konnte gezeigt werden, dass eine intratracheale LPS-Instillation einen Einfluss auf die Proteinexpression der Milzlymphozyten hat. Dabei exprimieren Wildtypmäuse andere Proteine in dieser Stresssituation als Fat-1-Mäuse.

Wildtypmäuse bilden zu den gemessenen Zeitpunkten vermehrt Hitzeschockproteine (HSP). Eines davon ist das HSP90b1. Dieses hat direkten Einfluss auf die Expression von *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein* (Ywhae). Nach 72 Stunden unter LPS-Stimulation wurde dieses Protein bei Wildtypmäusen identifiziert. Ywhae ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt einschließlich der Zellzykluskontrolle, Proliferation und der Apoptose (Che et al. 2011). Des Weiteren wurden auch viele Plasmamembranstabilisatoren wie Beta-Aktin und Vimentin, aber auch wichtige

Transporter wie Dynein identifiziert. Diese sind ebenfalls am programmierten Zelltod beteiligt.

Viele der identifizierten Proteine der Wildtypmaus sind direkt oder indirekt an Apoptosevorgängen beteiligt. Die gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass Wildtypmäuse auf eine LPS-Stimulation vermehrt mit dem programmierten Zelltod reagieren.

Die Identifizierung der Proteine bei den Fat-1-Mäusen zeigt, dass schneller und vermehrt Immunglobuline freigesetzt werden. Daraus könnte man schließen, dass aufgrund des höheren Gehalts an n-3 Fettsäuren, die Mäuse eine effizientere Immunabwehr besitzen.

Vielleicht haben aber diese Mäuse auch eine bessere Stresstoleranz, indem sie vermehrt Proteine aus dem Bereich der Signaltransduktion exprimieren, da diese direkt und indirekt z.B. an der Signalübertragung an dem NOD Rezeptor Signalübertragungsweg, Zellzyklus und p53 Signalübertragungsweg beteiligt sind. Außerdem reagieren Fat-1-Mäuse schneller auf Entzündungsmediatoren, um Entzündungen effektiver zu bekämpfen als Wildtypmäuse. Nach 24 Stunden unter LPS-Stimulation wurde bei FAT-1-Mäusen das proinflammatorische Zytokin Tumor-Nekrose Faktor α (TNF α) identifiziert. TNF α wird zur Regulation der Caspasegene benötigt. Bei FAT-1-Mäusen wird nach 72 Stunden differentiell Caspase 3 leicht runterreguliert.

Die Daten deuten an, dass die Abwehrreaktion bei einem Lungenversagen bei Wildtypmäusen zeitlich später einsetzt als bei FAT-1-Mäusen. D'Alessio und seine Mitarbeiter untersuchten das akute Lungenversagen nach intratrachealer Verabreichung von LPS an den Mausmodellen Rag1 und an Wildtypmäusen. Dabei konnten sie zeigen, dass der Krankheitsverlauf ähnlich verläuft, allerdings die Abwehrreaktionen deutlich schneller bei Rag1-Mäusen eintreten als bei Wildtypmäusen (D'Alessio et al. 2009).

4.4 Ausblick

Diese Untersuchung lieferte erste Erkenntnisse darüber, dass n-3 Fettsäuren einen Einfluss auf die Proteinexpression haben. Es fehlen allerdings noch weitere Versuche u.a auf RNA-Ebene um genau abschätzen zu können, inwieweit dieser Einfluss positiv verläuft. Und nicht zuletzt fehlen natürlich noch ergänzende Daten, inwieweit ein n-3 angereichertes Präparat Einfluss auf eine Lungenentzündung bei einem Menschen hat und darüber hinaus welche Mengen und in welcher Applikation an n-3 zum Einsatz kommen müssten.

Neben der Anwendung in der klinischen Ernährung bieten sich weitere Möglichkeiten der Nutzung von Lipidemulsionen an. Im Hinblick auf die immunmodulatorischen Effekte könnten Lipidemulsionen präventiv eingesetzt werden, z.B. bei Operationen. Mit diesem Konzept wäre eine klinische pharmakologische Intervention zur Prävention einer überschießenden Immunreaktion nach Operationen möglich, wenn eine parenterale Ernährung der Patienten nötig ist. Zudem bietet sich die Möglichkeit, die Ernährung von kritisch kranken Patienten mit einer pharmakologischen Intervention zu verbinden. Als Beispiel könnte der Einsatz von n-3 reichen Lipidemulsionen bei Intensivpatienten eine zusätzliche entzündungshemmende Therapie bedeuten.

Weitere Felder der Forschung sind der Einsatz von n-3 für die Behandlung von Tumoren (Arshad et al. 2011), kardialen (Nodan et al. 2011) und rheumatischen (Gheita et al. 2011) Erkrankungen.

Nachteilig könnte sich die Gabe von n-3 Präparaten durch Erschwerung der Diagnostik bei z.B. ARDS Patienten auswirken, da diese zum Teil auf der Messung der Entzündungsantwort basiert.

Welche Mengen von n-3 sinnvoll sind, für welchen Patienten und in welcher Form steht zur Diskussion genauso wie die Frage nach dem Einsatz von Kombipräparaten mit z.B. n-6 Fettsäuren.

Zusammenfassung

Akute infektiöse pulmonale Erkrankungen wie die Pneumonie und das parapneumonische akute Lungenversagen sind auch heute noch schwerwiegende Erkrankungen mit hoher Mortalität. Die Prävalenz des akuten Lungenversagens beträgt 12,5% aller Patienten, die länger als 24 Stunden auf der Intensivstation behandelt werden. Die Mortalitätsraten liegen zwischen 40 – 60%

Anhand von einer Studie mit Wildtypmäusen und FAT-1-Mäusen, die vermehrt n3-Fettsäuren produzieren, wurde durch inhalative Applikation von Pathogenitätsfaktoren im Mausmodell eine alveoläre Inflammation induziert. Die Milzlymphozyten der Mäuse wurden vor und zu definierten Zeitpunkten (4, 24 und 72 Stunden) nach der Applikation einer Proteomanalyse unterzogen. Hierzu werden Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Insgesamt wurden 285 Proteine identifiziert, 82 Proteine davon aus Fat-1-Mäusen und 203 Proteine aus Wildtypmäusen. Davon wurden 30 Proteine aus Fat-1 Mäusen und 24 Proteine aus Wildtypmäusen identifiziert, die nach LPS Stimulation hochreguliert wurden. Die Expression von 12 Proteinen von Fat-1-Mäusen und 20 Proteinen von Wildtypmäusen wird herunterreguliert. 84 Proteine aus Wildtypmäusen wurden identifiziert, die nur nach LPS („mit LPS“) exprimiert wurden, sowie 47 Proteine von Wildtypmäusen, die nur ohne eine LPS-Stimulation exprimiert wurden („ohne LPS“). Bei den Fat-1-Mäusen wurden 26 Proteine identifiziert, die es nur nach erfolgter LPS-Stimulation („mit LPS“) und 13 Proteine, die nur ohne LPS („ohne LPS“) exprimiert werden. Die identifizierten Proteine sind in verschiedenen Stoffwechselwegen involviert: Signalübertragung, Transkription, Proteinstoffwechsel, Immunsystem, Strukturbildung, Translation, Chaperone und allgemeiner Stoffwechsel. Die identifizierten Proteine der FAT-1-Mäuse sind hauptsächlich an der Signalübertragung oder an der Translation beteiligt, oder stammen aus dem Bereich des Immunsystems. Die identifizierten Proteine der Wildtpmäuse haben hauptsächlich Funktionen als Hitzeschockprotein oder sind Teil des proteosomalen Abbaus. Die Proteomanalyse konnte zeigen, dass durch eine intratracheale LPS-Stimulation eine Regulierung der Proteinexpression in den Milz-Lymphozyten erfolgt.

Die intratracheale Instillation von LPS erzeugt in Mäusen eine definierte und reproduzierbare alveoläre Inflammation, bei der es über 72 Stunden zu einer kontinuierlichen Invasion von Leukozyten aus dem Blut in das alveoläre Kompartiment kommt. Nach 72 h konnten in der Milz der intratracheal mit LPS behandelten Tiere auf Proteomebene erste Hinweise auf eine Apoptose-Induktion in Lymphozyten festgestellt werden. Die Identifizierung der Proteine bei den Fat-1-Mäusen zeigt, dass schneller und vermehrt Immunglobuline freigesetzt werden.

Diese Proteomdaten liefern neue Erkenntnisse zur Regulation der durch alveoläre Deposition von Endotoxin induzierten pulmonalen Entzündungsreaktion auf Proteinebene liefern, die eine Identifizierung und Charakterisierung spezifischer Regulationsprozesse in der Lunge ermöglichen um schließlich neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

6. Summary

Acute lung injury (ALI) as well as pulmonary diseases like pneumonia and sepsis remain important causes of mortality in intensive care units. The early stage of sepsis is characterized by a massive inflammatory answer, whereas apoptosis of lymphocytes is a sign of late sepsis.

Prevalence of acute lung failure is 12.5% of all patients treated in intensive care units for more than 24 hours. Mortality ranges from 40 to 60%.

To get a deeper insight into the molecular changes in immune cells during ALI we investigated proteome profiles of spleen lymphocytes of *fat-1* and wild-type (C57BL/7) mice after intratracheal instillation of LPS at various time points.

Transgenic *fat-1* mice encoding n-3 fatty acid desaturase, are capable of converting n-6 polyunsaturated fatty acids to n-3 polyunsaturated fatty acids. The n-3-fatty acid eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) and mediators derived from EPA and DHA possess reduced inflammatory potency.

The proteomes of the murine spleen-lymphocytes were analysed before application and at defined times (4, 24 and 72 hours) afterwards.

Proteins were separated by 2D-gel electrophoresis and visualized either by DIGE-labeling or Flamingo staining. Densitometric analyses were performed and differentially expressed protein species were identified by MALDI-TOF mass spectrometry.

In total we identified 285 differentially expressed proteins: 82 proteins from *fat-1* mice and 203 from wild-type mice. Interestingly, a higher number of differentially regulated proteins involved in immune reactions were found in *fat-1* mice within the first 72 hours after LPS challenge compared to wild-type mice. 30 proteins that had been upregulated after stimulation with LPS were identified from *fat-1* mice, 24 from wild-type mice. Expression of 12 proteins from *fat-1* mice and of 20 proteins from wild-type mice were downregulated. From wild-type mice, 84 proteins could be identified that were expressed only after LPS-stimulation ("with LPS"), as well as 47 proteins that were expressed only without LPS-stimulation ("without LPS").

From *fat-1* mice, 26 proteins could be identified that were expressed only after LPS-stimulation ("with LPS"), as well as 13 proteins that were expressed only without LPS-stimulation ("without LPS").

The identified proteins have a variety of different functions. They are involved in signal transduction, transcription, protein metabolism, immune system, structure, translation or general metabolism, they function as chaperones or their function is unknown.

The identified proteins from *fat-1* mice are mainly involved in signal transduction and the immune system. Most of the identified proteins of the wild-type mice are chaperones or part of proteasomes. This analysis shows a regulation of protein expression of the spleen-lymphocytes after LPS-stimulation.

Intratracheal instillation of LPS generates a defined and reproducible alveolar inflammation. Within 72 hours there is a continuous invasion of leukocytes from blood into the alveolar compartment.

After 72 hours first signs of an induction of apoptosis could be found in spleen-lymphocytes. Identification of proteins in *fat-1* mice showed a quicker and greater release of immunoglobulins.

These proteomic data provide new insights on protein level about the regulation of pulmonary inflammation induced by alveolar deposition of endotoxin and thus allow identification and characterisation of regulatory processes in the lung and eventually the development of new therapies.

7. Literaturverzeichnis

- Arshad, A., D. Al-Leswas , J. Stephanson, M. Metcalfe and A. Dennison (2011). "Potential applications of fish oils rich in n-3 fatty acids in the palliative treatment of advanced pancreatic cancer." Br J Nutr **106**(6): 795-800.
- Alcaraz-Garcia, M. J., N. Ruiz-Lafuente, S. Sebastian-Ruiz, M. J. Majado, C. Gonzalez-Garcia, M. V. Bernardo, M. R. Alvarez-Lopez and A. Parrado (2011). "Human and mouse DOCK10 splicing isoforms with alternative first coding exon usage are differentially expressed in T and B lymphocytes." Hum Immunol. Jul;72(7):531-7
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**(2): 171.
- Aloya, R., A. Shirvan, H. Grimberg, A. Reshef, G. Levin, D. Kidron, A. Cohen and I. Ziv (2006). "Molecular imaging of cell death in vivo by a novel small molecule probe." Apoptosis **11**(12): 2089-101.
- Andonegui, G., C. S. Bonder, F. Green, S. C. Mullaly, L. Zbytniuk, E. Raharjo and P. Kubes (2003). "Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs." J Clin Invest **111**(7): 1011-20.
- Andonegui, G., S. M. Goyert and P. Kubes (2002). "Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels." J Immunol **169**(4): 2111-9.
- Ashbaugh, D., D. Bigelow, T. Petty and B. Levine (1967). "Acute respiratory distress in adults." Lancet **2**(7511): 319-23.
- Banner, D. W., A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher and W. Lesslauer (1993). "Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation." Cell **73**(3): 431-45.

- Bazil, V. and J. L. Strominger (1991). "Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes." J Immunol **147**(5): 1567-74.
- Beasley, D., R. A. Cohen and N. G. Levinsky (1989). "Interleukin 1 inhibits contraction of vascular smooth muscle." J Clin Invest **83**(1): 331-5.
- Berth, M., F. M. Moser, M. Kolbe and J. Bernhardt (2007). "The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images." Appl Microbiol Biotechnol **76**(6): 1223-43.
- Beutler, B. (2000). "Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor." Curr Opin Immunol **12**(1): 20-6.
- Bialy, J. (2000). "Neues Diagnoseverfahren des akuten Lungenversagens." Nachrichten-Forschungszentrum Karlsruhe **32**(1-2/2000): 15-18.
- Bivona, T. G., H. Hieronymus, J. Parker, K. Chang, M. Taron, R. Rosell, P. Moonsamy, K. Dahlman, V. A. Miller, C. Costa, G. Hannon and C. L. Sawyers (2011). "FAS and NF-kappaB signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR." Nature **471**(7339): 523-6.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev and D. Wallach (1996). "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." Cell **85**(6): 803-15.
- Bone, R. C. (1996). "Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation." Crit Care Med **24**(1): 163-72.
- Boujrad, H., O. Gubkina, N. Robert, S. Krantic and S. A. Susin (2007). "AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die." Cell Cycle **6**(21): 2612-9.
- Brun-Buisson, C., C. Minelli, G. Bertolini, L. Brazzi, J. Pimentel, K. Lewandowski, J. Bion, J. A. Romand, J. Villar, A. Thorsteinsson, P. Damas, A. Armaganidis and F. Lemaire (2004). "Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study." Intensive Care Med **30**(1): 51-61.
- Calder, P. C. (2006). "n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): 1505S-1519S.
- Calopa, M., J. Bas, A. Callen and M. Mestre (2010). "Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients." Neurobiol Dis **38**(1): 1-7.

- Che, X. H., H. Chen, Z. M. Xu, C. Shang, K. L. Sun and W. N. Fu (2011). "14-3-3epsilon contributes to tumour suppression in laryngeal carcinoma by affecting apoptosis and invasion." BMC Cancer **10**: 306.
- Christman, B. W., P. L. Lefferts, I. A. Blair and J. R. Snapper (1990). "Effect of platelet-activating factor receptor antagonism on endotoxin-induced lung dysfunction in awake sheep." Am Rev Respir Dis **142**(6 Pt 1): 1272-8.
- Coleman, M. L., E. A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar and M. F. Olson (2001). "Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I." Nat Cell Biol **3**(4): 339-45.
- Conradt, B. and H. R. Horvitz (1998). "The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9." Cell **93**(4): 519-29.
- Cory, S. (1995). "Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family." Annu Rev Immunol **13**: 513-43.
- Coyne, C. B., M. K. Vanhook, T. M. Gambling, J. L. Carson, R. C. Boucher and L. G. Johnson (2002). "Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines." Mol Biol Cell **13**(9): 3218-34.
- D'Alessio, F. R., K. Tsushima, N. R. Aggarwal, E. E. West, M. H. Willett, M. F. Britos, M. R. Pipeling, R. G. Brower, R. M. Tuder, J. F. McDyer and L. S. King (2009). "CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury." J Clin Invest **119**(10): 2898-913.
- D'Souza, S. D., B. Bonetti, V. Balasingam, N. R. Cashman, P. A. Barker, A. B. Troutt, C. S. Raine and J. P. Antel (1996). "Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death." J Exp Med **184**(6): 2361-70.
- Damas, P., A. Reuter, P. Gysen, J. Demonty, M. Lamy and P. Franchimont (1989). "Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans." Crit Care Med **17**(10): 975-8.
- Damianovich, M., I. Ziv, S. N. Heyman, S. Rosen, A. Shina, D. Kidron, T. Aloya, H. Grimberg, G. Levin, A. Reshef, A. Bentolila, A. Cohen and A. Shirvan (2006). "ApoSense: a novel technology for functional molecular imaging of cell death in models of acute renal tubular necrosis." Eur J Nucl Med Mol Imaging **33**(3): 281-91.

- Delayre-Orthez, C., J. Becker, I. Guenon, V. Lagente, J. Auwerx, N. Frossard and F. Pons (2005). "PPARalpha downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse." Respir Res **6**: 91.
- Denys, A., A. Hichami and N. A. Khan (2005). "n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF-kappaB signaling pathway." J Lipid Res **46**(4): 752-8.
- Dove, A. (1999). "Proteomics: translating genomics into products?" Nature Biotechnology **17**: 233-236.
- Ebmeyer, J., A. Leichtle, M. Hernandez, U. Ebmeyer, J. Husseman, K. Pak, H. Sudhoff, D. Broide, S. I. Wasserman and A. F. Ryan (2011). "TNFA deletion alters apoptosis as well as caspase 3 and 4 expression during otitis media." BMC Immunol **12**: 12.
- Ellis, H. M. and H. R. Horvitz (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*." Cell **44**(6): 817-29.
- Esteban, A., A. Anzueto, F. Frutos, I. Alia, L. Brochard, T. E. Stewart, S. Benito, S. K. Epstein, C. Apezteguia, P. Nightingale, A. C. Arroliga and M. J. Tobin (2002). "Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study." Jama **287**(3): 345-55.
- Fowler, K. H., D. N. McMurray, Y. Y. Fan, H. M. Aukema and R. S. Chapkin (1993). "Purified dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter diacylglycerol mass and molecular species composition in concanavalin A-stimulated murine splenocytes." Biochim Biophys Acta **1210**(1): 89-96.
- Fritsche, K. (2006). "Fatty acids as modulators of the immune response." Annu Rev Nutr **26**: 45-73.
- Froelich, C. J., V. M. Dixit and X. Yang (1998). "Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases." Immunol Today **19**(1): 30-6.
- Gadek, J. E., S. J. DeMichele, M. D. Karlstad, E. R. Pacht, M. Donahoe, T. E. Albertson, C. Van Hoozen, A. K. Wennberg, J. L. Nelson and M. Noursalehi (1999). "Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral Nutrition in ARDS Study Group." Crit Care Med **27**(8): 1409-20.

- Galle, P. R., W. J. Hofmann, H. Walczak, H. Schaller, G. Otto, W. Stremmel, P. H. Krammer and L. Runkel (1995). "Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage." J Exp Med **182**(5): 1223-30.
- Gandhi, R. T., B. K. Chen, S. E. Straus, J. K. Dale, M. J. Lenardo and D. Baltimore (1998). "HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism." J Exp Med **187**(7): 1113-22.
- Gheita, T., S. Kamel, N. Helmy, N. El-Laithy and A. Monir (2011). "Omega-3 fatty acids in juvenile idiopathic arthritis: effect on cytokines (IL-1 and TNF-?), disease activity and response criteria." Clin Rheumatol **Sep 16**.in press
- Glucksmann, A. (1951). "Local factors in the histogenesis of hypertrophic scars." Br J Plast Surg **4**(2): 88-103.
- Goyert, S. M., E. M. Ferrero, S. V. Seremetis, R. J. Winchester, J. Silver and A. C. Mattison (1986). "Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens." J Immunol **137**(12): 3909-14.
- Grimminger, F., U. Durr and W. Seeger (1992). "Ligand-operated synthesis of 4-series and 5-series leukotrienes in human neutrophils: critical dependence on exogenous free fatty acid supply." Mol Pharmacol **41**(4): 757-66.
- Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett and S. I. Miller (1997). "Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ." Science **276**(5310): 250-3.
- Han, S. J., H. M. Ko, J. H. Choi, K. H. Seo, H. S. Lee, E. K. Choi, I. W. Choi, H. K. Lee and S. Y. Im (2002). "Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)." J Biol Chem **277**(47): 44715-21.
- Hehlgans, T. and K. Pfeffer (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." Immunology **115**(1): 1-20.
- Heinrich, P. C., J. V. Castell and T. Andus (1990). "Interleukin-6 and the acute phase response." Biochem J **265**(3): 621-36.
- Heller, A. R., S. Rossler, R. J. Litz, S. N. Stehr, S. C. Heller, R. Koch and T. Koch (2006). "Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome." Crit Care Med **34**(4): 972-9.

- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**(1313): 243-6.
- Hermann, C., I. Spreitzer, N. W. Schroder, S. Morath, M. D. Lehner, W. Fischer, C. Schutt, R. R. Schumann and T. Hartung (2002). "Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species--role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release." Eur J Immunol **32**(2): 541-51.
- Horvitz, H. R., S. Shaham and M. O. Hengartner (1994). "The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 377-85.
- Igoillo-Esteve, M., E. N. Gurzov, D. L. Eizirik and M. Cnop (2010). "The transcription factor B-cell lymphoma (BCL)-6 modulates pancreatic {beta}-cell inflammatory responses." Endocrinology **152**(2): 447-56.
- Itoh, N. and S. Nagata (1993). "A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen." J Biol Chem **268**(15): 10932-7.
- Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto and S. Nagata (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." Cell **66**(2): 233-43.
- Kang, J. X., J. Wang, L. Wu and Z. B. Kang (2004). "Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids." Nature **427**(6974): 504.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kramer, H. J., J. Stevens, F. Grimminger and W. Seeger (1996). "Fish oil fatty acids and human platelets: dose-dependent decrease in dienoic and increase in trienoic thromboxane generation." Biochem Pharmacol **52**(8): 1211-7.
- Krammer, P. H. (2000). "Apoptose." Deutsches Ärzteblatt **97**(25): A-1752-A-1759.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lehner, T., Y. Wang, T. Whittall and T. Seidl (2011). "Innate Immunity and HIV-1 Infection." Adv Dent Res **23**(1): 19-22.

- Lien, E., T. K. Means, H. Heine, A. Yoshimura, S. Kusumoto, K. Fukase, M. J. Fenton, M. Oikawa, N. Qureshi, B. Monks, R. W. Finberg, R. R. Ingalls and D. T. Golenbock (2000). "Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide." J Clin Invest **105**(4): 497-504.
- Liu, X., H. Zou, P. Widlak, W. Garrard and X. Wang (1999). "Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1." J Biol Chem **274**(20): 13836-40.
- Lopez, A. F., T. R. Hercus, P. Ekert, D. R. Littler, M. Guthridge, D. Thomas, H. S. Ramshaw, F. Stomski, M. Perugini, R. D'Andrea, M. Grimbaldston and M. W. Parker (2010). "Molecular basis of cytokine receptor activation." IUBMB Life **62**(7): 509-18.
- Lottspeich, F. (1999). "Proteom Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins." Angew. Chem. Int. Ed. **38**: 2476-2492.
- Mayer, K., C. Fegbeutel, K. Hattar, U. Sibelius, H. J. Kramer, K. U. Heuer, B. Temmesfeld-Wollbruck, S. Gokorsch, F. Grimminger and W. Seeger (2003). "Omega-3 vs. omega-6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation." Intensive Care Med **29**(9): 1472-81.
- Mayer, K., S. Gokorsch, C. Fegbeutel, K. Hattar, S. Rosseau, D. Walmrath, W. Seeger and F. Grimminger (2003). "Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis." Am J Respir Crit Care Med **167**(10): 1321-8.
- Mayer, K., A. Kiessling, J. Ott, M. B. Schaefer, M. Hecker, I. Henneke, R. Schulz, A. Gunther, J. Wang, L. Wu, J. Roth, W. Seeger and J. X. Kang (2009). "Acute lung injury is reduced in fat-1 mice endogenously synthesizing n-3 fatty acids." Am J Respir Crit Care Med **179**(6): 474-83.
- McCloskey, T. W., N. Oyaizu, M. Kaplan and S. Pahwa (1995). "Expression of the Fas antigen in patients infected with human immunodeficiency virus." Cytometry **22**(2): 111-4.
- Monaghan, P., D. Robertson, T. A. Amos, M. J. Dyer, D. Y. Mason and M. F. Greaves (1992). "Ultrastructural localization of bcl-2 protein." J Histochem Cytochem **40**(12): 1819-25.

- Nodan, S., M. Triggiani, A. Manerba, G. Milesi and D. C. L. (2011). "Effects of supplementation with polyunsaturated fatty acids in patients with heart failure." Intern Emerg Med **6**(Suppl 1): 37-44.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins." J Biol Chem **250**: 4007-4021.
- Oehm, A., I. Behrmann, W. Falk, M. Pawlita, G. Maier, C. Klas, M. Li-Weber, S. Richards, J. Dhein, B. C. Trauth and et al. (1992). "Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen." J Biol Chem **267**(15): 10709-15.
- Osmond, D. G. (1993). "The turnover of B-cell populations." Immunol Today **14**(1): 34-7.
- Ott, J. (2008). "Einfluss von n-3- versus n-6-basierten Lipidemulsionen für die parenterale Ernährung auf den Verlauf eines akuten Lungenversagens der Maus." Laufersweiler Verlag **1. Auflage**.
- Pacheco, P., F. A. Bozza, R. N. Gomes, M. Bozza, P. F. Weller, H. C. Castro-Faria-Neto and P. T. Bozza (2002). "Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism." J Immunol **169**(11): 6498-506.
- Palluy, O., L. Morliere, J. C. Gris, C. Bonne and G. Modat (1992). "Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion." Free Radic Biol Med **13**(1): 21-30.
- Poynter, M. E., C. G. Irvin and Y. M. Janssen-Heininger (2003). "A prominent role for airway epithelial NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation." J Immunol **170**(12): 6257-65.
- Rahman, M. M. and G. McFadden (2006). "Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens." PLoS Pathog **2**(2): e4.
- Rehm, H. (2002). "Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics." Spektrum Akademischer Verlag **4. Aufl.**
- Rivest, S., S. Lacroix, L. Vallieres, S. Nadeau, J. Zhang and N. Laflamme (2000). "How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli." Proc Soc Exp Biol Med **223**(1): 22-38.

- Schmidt, A., J. Kellermann and F. Lottspeich (2005). "A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels." Proteomics **5**(1): 4-15.
- Schumann, R. R. (1992). "Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review." Res Immunol **143**(1): 11-5.
- Schumann, R. R., N. Lamping, C. Kirschning, H. P. Knopf, A. Hoess and F. Herrmann (1994). "Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis." Biochem Soc Trans **22**(1): 80-2.
- Shiraishi, H., H. Okamoto, A. Yoshimura and H. Yoshida (2006). "ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1." J Cell Sci **119**(Pt 19): 3958-66.
- Shong, M., H. K. Ro, Y. K. Kim, C. J. Yoo, J. H. Lee, C. U. Song and B. Y. Cho (1994). "The cytokines, interleukin-1 beta, interleukin-6 and interferon-gamma upregulate the expression of intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in rat thyroid cell line, FRTL-5." Korean J Intern Med **9**(2): 88-92.
- Smith, C. A., T. Farrar and R. G. Goodwin (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-62.
- Steinmetz, H. T., A. Herberich, M. Bertram and V. Diehl (1995). "Increase in interleukin-6 serum level preceding fever in granulocytopenia and correlation with death from sepsis." J Infect Dis **171**(1): 225-8.
- Szarka, R. J., N. Wang, L. Gordon, P. N. Nation and R. H. Smith (1997). "A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation." J Immunol Methods **202**(1): 49-57.
- Tanaka, S., K. Saito and J. C. Reed (1993). "Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival." J Biol Chem **268**(15): 10920-6.
- Taylor, N. M., S. Lacoumenta and G. M. Hall (1997). "Fentanyl and the interleukin-6 response to surgery." Anaesthesia **52**(2): 112-5.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.

- Tonks, A. J., A. Tonks, R. H. Morris, K. P. Jones and S. K. Jackson (2003). "Regulation of platelet-activating factor synthesis in human monocytes by dipalmitoyl phosphatidylcholine." J Leukoc Biol **74**(1): 95-101.
- Van Ostade, X., J. Tavernier and W. Fiers (1994). "Structure-activity studies of human tumour necrosis factors." Protein Eng **7**(1): 5-22.
- Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer (1999). "Cell death in development." Cell **96**(2): 245-54.
- Vogt, C. (1842). "Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricians). ." Solothurn.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and S. Nagata (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." Nature **356**(6367): 314-7.
- Watanabe, S., M. Doshi, K. Akimoto, Y. Kiso and T. Hamazaki (2001). "Suppression of platelet-activating factor generation and modulation of arachidonate metabolism by dietary enrichment with (n-9) eicosatrienoic acid or docosahexaenoic acid in mouse peritoneal cells." Prostaglandins Other Lipid Mediat **66**(2): 109-20.
- Wessel, D. and U. Flügge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Anal Biochem **138**: 141-143.
- Wilkins, M. R., K. L. Williams, R. D. Appel and D. F. E. Hochstrasser (1997). "Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics." Springer-Verlag Heidelberg.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch and J. C. Mathison (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**(4975): 1431-3.
- Yamagishi, J., H. Kawashima, N. Matsuo, M. Ohue, M. Yamayoshi, T. Fukui, H. Kotani, R. Furuta, K. Nakano and M. Yamada (1990). "Mutational analysis of structure--activity relationships in human tumor necrosis factor-alpha." Protein Eng **3**(8): 713-9.
- Yonehara, S., A. Ishii and M. Yonehara (1989). "A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor." J Exp Med **169**(5): 1747-56.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Günter Lochnit für die interessante Themenstellung, die ausgezeichnete Betreuung, Diskussionsfreudigkeit und große Hilfe und natürlich die Möglichkeit, in seinem Team diese Dissertation durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Konstantin Mayer und Frau Dr. Juliane Ott für die Bereitstellung der Proben und deren Hilfe bei der Bewältigung anstehender Probleme, die sehr beim Anfertigen dieser Arbeit geholfen haben.

Den Mitarbeitern der Proteinanalytik Christina Schmidt, Michael Dreisbach und Hans-Günter Welker.

Meinen Eltern und meiner gesamten Familie für die außergewöhnliche Unterstützung während meiner ganzen Ausbildungszeit und dass sie immer Vertrauen hatten, dass ich es schon schaffen werde.

Und meiner Liebsten Julia für so viel mehr, als ich hier schreiben könnte.