

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
(Prof. Dr. Eckhard Wolf)
und dem
Laboratorium für funktionale Genomanalyse
Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abteilung Proteomics
(Dr. G. J. Arnold)

Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. A. Höflich und Dr. G. J. Arnold

Holistische Proteomanalyse der Nebennieren bGH und IGFBP-2 transgener Mäuse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Hannelore Breitsameter
aus Fürstenfeldbruck

München 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichtersteller: Priv.-Doz. Dr. Höflich
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Gabius

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Literatur | 3 |
| 2.1 | Überblick über die Komponenten der GH/IGF-Achse | 3 |
| 2.1.1 | Wachstumshormon (GH), GH-Rezeptor und GH-Bindungsprotein | 3 |
| 2.1.2 | Insulin-like Growth Factors (IGF-I und IGF-II) | 4 |
| 2.1.3 | Insulin-like Growth Factor Rezeptoren | 4 |
| 2.1.4 | Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins (IGFBPs) | 5 |
| 2.2 | Wachstumskontrolle durch das IGF-System | 6 |
| 2.2.1 | Somatomedinhypothese | 6 |
| 2.2.2 | Transgene Tiermodelle und Knockout Modelle | 7 |
| 2.2.2.1 | GH-transgene und GH-defiziente Mäuse | 7 |
| 2.2.2.2 | IGF-I/-II und IGF-IR/-IIR transgene und defiziente Mäuse | 9 |
| 2.2.2.3 | IGFBP transgene Mäuse..... | 10 |
| 2.2.2.4 | Signalübertragung durch den IGF-I Rezeptor | 11 |
| 2.3 | Die Nebennieren | 15 |
| 2.3.1 | Anatomie und Physiologie der Nebenniere | 15 |
| 2.3.2 | Einfluss der GH-IGF-Achse auf die Entwicklung der Nebennieren | 17 |
| 2.3.2.1 | Effekte des Wachstumshormons (GH) auf Wachstum und Funktion | 17 |
| | der Nebenniere | 17 |
| 2.3.2.2 | Effekte der IGFs auf Wachstum und Funktion der fetalen und..... | |
| | adulten Nebenniere | 18 |
| 2.3.2.3 | Effekte des IGF-I und -II Rezeptors auf Wachstum und Funktion | |
| | der Nebenniere | 19 |
| 2.3.2.4 | Effekte der IGFBPs auf Wachstum und Funktion der Nebenniere | 19 |
| 2.4 | Proteomanalyse | 21 |
| 2.4.1 | Techniken der Proteomanalyse..... | 21 |
| 2.5 | Proteomstudien über die Nebennieren..... | 24 |
| 2.6 | Vorarbeit und Zielsetzung | 25 |
| 3 | Material und Methoden | 27 |
| 3.1 | Material | 27 |
| 3.1.1 | Chemikalien | 27 |
| 3.1.2 | Verbrauchsmaterialien, Kits | 28 |
| 3.1.3 | Geräte | 28 |
| 3.1.4 | Software | 29 |
| 3.1.5 | Wasser | 29 |
| 3.2 | Versuchstiere und Methoden | 30 |
| 3.2.1 | Versuchstiere | 30 |
| 3.2.2 | Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen..... | 31 |
| 3.2.3 | Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 32 |
| 3.2.4 | Agarosegelelektrophorese | 34 |
| 3.2.4.1 | TAE-Agarosegele..... | 34 |
| 3.3 | Nebennierenpräparation | 35 |
| 3.3.1 | Zellaufschluss der Nebennieren..... | 35 |
| 3.3.2 | Proteinbestimmung nach Bradford | 36 |
| 3.4 | Proteinauftrennung mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektro- | |
| | phorese (PAGE)..... | 38 |
| 3.4.1 | Eindimensionale SDS-PAGE | 38 |
| 3.4.2 | Hochauflösende 2D-SDS-PAGE | 39 |
| 3.4.2.1 | Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung..... | 40 |
| 3.4.2.2 | Zweite Dimension: SDS-PAGE | 42 |
| 3.4.2.2.1 | Vorbereitung der IPG-Streifen für die 2. Dimension | 43 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.5 | Qualitative Proteomanalyse der Nebennieren mittels 2D-Nano-LC-MS/MS..... | 46 |
| 3.5.1 | Prinzip der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie (2D-LC) | 46 |
| 3.5.2 | Prinzip der ESI-Massenspektrometrie | 46 |
| 3.5.3 | Durchführung der qualitativen Proteomanalyse der Nebennieren ohne Vorfraktionierung..... | 47 |
| 3.5.4 | Durchführung der qualitativen Proteomanalyse der Nebennieren mit Vorfraktionierung | 47 |
| 3.6 | Quantitative Proteomanalyse der Nebennieren mittels 2D-DIGE | 48 |
| 3.7 | Identifikation der differenziell abundanten Proteinspots mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) | 50 |
| 3.7.1 | Prinzip einer MALDI-TOF/TOF Analyse | 50 |
| 3.7.2 | Probenvorbereitung für die MALDI-TOF/TOF Analyse..... | 50 |
| 3.7.3 | Durchführung der MALDI-TOF/TOF Analyse | 52 |
| 4 | Ergebnisse | 53 |
| 4.1 | Genotypisierung der Versuchstiere | 53 |
| 4.1.1 | bGH- und IGFBP-2-PCR..... | 53 |
| 4.1.2 | Optimierung der IGFBP-2 PCR..... | 53 |
| 4.1.3 | Bilder der PCR-Ergebnisse der eingesetzten Versuchstiere | 54 |
| 4.2 | Körpergewicht der Versuchstiere | 55 |
| 4.3 | Nebennierengewicht der Versuchstiere | 57 |
| 4.4 | Proteinbestimmung der Nebennieren..... | 57 |
| 4.5 | Qualitative Proteomanalyse der Nebennieren mittels Nano-LC-MS/MS | 58 |
| 4.5.1 | Ergebnis ohne Vorfraktionierung des Proteinlysats:..... | 63 |
| 4.5.2 | Ergebnis mit Vorfraktionierung des Proteinlysats..... | 63 |
| 4.6 | 2D-DIGE Vorversuch | 67 |
| 4.7 | 2D-DIGE Hauptversuch | 68 |
| 4.7.1 | PEPCK-bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse..... | 70 |
| 4.7.2 | PEPCK-bGH transgene Mäuse versus PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgener Mäuse..... | 76 |
| 4.8 | Identifizierung der differentiell abundanten Proteine durch MALDI-TOF/TOF Analyse | 79 |
| 4.8.1 | Anfertigung präparativer Gele für die Analyse..... | 79 |
| 4.8.2 | Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF Analyse..... | 81 |
| 5 | Diskussion..... | 88 |
| 5.1 | Qualitative Proteomanalyse der Nebennieren..... | 89 |
| 5.1.1 | Diskussion der Methode..... | 89 |
| 5.1.2 | Diskussion der Ergebnisse..... | 91 |
| 5.2 | Quantitative Proteomanalyse der Nebennieren..... | 95 |
| 5.2.1 | Diskussion der Methode..... | 97 |
| 5.2.2 | Diskussion der Ergebnisse in der Nebennierenproteomstudie bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse..... | 99 |
| 5.2.3 | Diskussion der Ergebnisse der Nebennierenproteomstudie bGH transgener versus bGH/mIGFBP-2 transgener Mäuse..... | 114 |
| 6 | Zusammenfassung | 118 |
| 7 | Summary..... | 119 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 120 |
| 9 | Abbildungsverzeichnis | 122 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----|---------------------------|-----|
| 10 | Tabellenverzeichnis | 125 |
| 11 | Literaturverzeichnis..... | 127 |
| 12 | Danksagung..... | 144 |
| 13 | Lebenslauf | 145 |

1 Einleitung

Die Wachstumshormon/Insulin-like Growth Factor (GH/IGF)-Achse spielt in der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen eine zentrale Rolle⁹⁵. Das IGF-System besteht aus den Peptidhormonen IGF-I und IGF-II, sechs hochaffinen IGF-Bindungsproteinen (IGFBP-1 bis -6) und zwei IGF-Rezeptoren⁸³. IGF-Bindungsproteine sind in verschiedensten Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten anzutreffen¹⁴². Die Funktionen der IGF-Bindungsproteine wurden initial vor allem in vitro untersucht. IGFBP-2 zeigte in diversen in vitro Studien einen IGF-abhängigen, negativen Effekt auf Zellproliferation⁶⁶.

Um die Funktionen der IGFBPs in vivo aufzuklären, wurden in den letzten dreizehn Jahren zahlreiche IGFBP-transgene Mausmodelle generiert¹⁸⁷. So wurde 1999 das erste Mausmodell beschrieben, das IGFBP-2 unter der Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV)-Promotors überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei diesen transgenen Mäusen das Körpergewicht postnatal deutlich reduziert war⁶⁶. Um zu klären, ob IGFBP-2 diese wachstumshemmende Funktion auch bei hohen GH und IGF-I Spiegeln ausübt, wurden weibliche hemizygoter CMV-mIGFBP-2 transgene mit männlichen hemizygoten PEPCK-bGH transgenen Mäusen gekreuzt, woraus vier genetische Gruppen von Nachkommen resultierten: Doppeltransgene (GB), bGH transgene (G), mIGFBP-2 transgene (B) sowie nichttransgene (WT) Mäuse. Das Körpergewicht war bei den 15 Wochen alten männlichen Nachkommen der Gruppe GB im Vergleich zur Gruppe G um 17% und der Gruppe B im Vergleich zur Gruppe WT um 13% reduziert. So konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass IGFBP-2 das GH-stimulierte Wachstum hemmt⁶⁷. Das Wachstumshormon und auch IGF-I können zelluläre Hypertrophie und/oder Hyperplasie auslösen. Eine chronische Überexpression von GH in transgenen Mäusen bewirkt einen systemischen und lokalen Anstieg des IGF-I Spiegels und ein überproportionales Wachstum diverser Organe⁶⁷. In den PEPCK-bGH transgenen Mäusen (G) konnte gezeigt werden, dass eine Vergrößerung der Nebennierenrinde sowohl durch eine Hypertrophie als auch durch eine Hyperplasie der Zellen der Zona fasciculata in der Nebennierenrinde entstand. Bei GB Mäusen war im Vergleich zu G Mäusen eine signifikante Verkleinerung des Nebennierengewichts festzustellen. Um zu klären, ob diese

Verkleinerung des Nebennierengewichts aus einer Veränderung der Zellzahl oder der Zellvolumina resultiert, wurden umfangreiche stereologische Untersuchungen an den Nebennieren von G, GB, B und WT Mäusen durchgeführt. Dabei ergab sich der hochinteressante Befund, dass die GH-induzierte Hypertrophie der Zona fasciculata-Zellen durch die gleichzeitige Überexpression von mIGFBP-2 signifikant reduziert wurde, wohingegen die Hyperplasie der Zellen nicht beeinflusst wurde⁶⁵.

Dieses Mausmodell eignet sich daher hervorragend, um Mechanismen, die bei der Kontrolle des Wachstums der Nebennierenrinde involviert sind, zu charakterisieren.

Ziel dieser Studie war es, eine holistische Proteomanalyse der Nebennieren von Mäusen durchzuführen und zu versuchen, Kandidatenproteine mit Relevanz für das Nebennierenwachstum zu identifizieren. Für die Erstellung des Panels an zu untersuchenden Mäusen wurden weibliche hemizygote CMV-mIGFBP-2 transgene Mäuse mit männlichen hemizygoten PEPCK-bGH transgenen Mäusen verpaart. Für die Proteomstudien wurden nur Nebennieren von männlichen Nachkommen verwendet, um eine starke Streuung der Daten aufgrund der variablen Größe der sogenannten X-Zone der Nebenniere bei weiblichen Tieren zu vermeiden. Um die Effekte von GH und IGFBP-2 hinsichtlich des Nebennierenwachstums auf Proteomebene zu charakterisieren, wurden folgende Vergleiche vorgenommen:

bGH transgene Mäuse (**G**) versus nichttransgene Mäuse (**WT**)

bGH transgene Mäuse (**G**) versus bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse (**GB**)

2 Literatur

2.1 Überblick über die Komponenten der GH/IGF-Achse

Die GH/IGF-Achse ist ein komplexes endogenes System, das durch die Wechselwirkung der einzelnen Komponenten zusammen mit exogenen Umwelteinflüssen an der Steuerung des Wachstums eines Organismus beteiligt ist⁴.

2.1.1 Wachstumshormon (GH), GH-Rezeptor und GH-Bindungsprotein

Das Wachstumshormon, Somatotropin (STH) (engl.: Growth Hormone, GH) gehört zur großen Familie der Peptidhormone^{118,129}. GH wird von den somatotropen Zellen der Adenohypophyse gebildet und gespeichert⁹⁵. Die Freisetzung dieses Hormons erfolgt pulsatil¹⁷³. Die Aminosäuresequenz des Wachstumshormons ist bei den verschiedenen Spezies hochkonserviert, zum Beispiel weist das murine GH (mGH) eine 92%ige Homologie mit dem bovinen GH (bGH) auf²⁴. Die Expression und Sekretion des Wachstumshormons wird prinzipiell von zwei Hormonen der Neurohypophyse, dem Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) und dem Somatostatin (SST) reguliert³³. Aber auch andere Hormone, wie z. B. IGF-I, Leptin, Ghrelin und Stoffwechselprodukte, wie z. B. freie Fettsäuren wirken regulierend auf die GH-Freisetzung⁹⁵. Während der Fetalperiode unterliegt die GH-Konzentration nicht dem negativen Feedback-Mechanismus von IGF-I³³. Erst postnatal reduziert zirkulierendes IGF-I die GH-Sekretion, indem die GH-Pulsfrequenz und die Amplitude verringert werden¹¹.

Der GH-Rezeptor ist ein Mitglied der Zytokinrezeptor-Superfamilie und wird auf der Oberfläche vieler Zellen exprimiert. Er wird durch die Bindung von GH aktiviert und vermittelt so die Wirkung von GH. Stöchiometrisch reagiert ein GH-Molekül mit zwei GH-Rezeptormolekülen, wobei eine Rezeptor-Dimerisierung stattfindet¹⁹⁶. Die GH-Signalübertragung erfolgt intrazellulär über die Phosphorylierung der Tyrosinkinase JAK2 (Janus Kinase 2), die wiederum die Tyrosine verschiedener STAT Proteine phosphoryliert. GH kann auch Insulin-Rezeptorsubstrat 1 und 2 (IRS 1 und 2) aktivieren und damit indirekt den PI3-Kinase bzw. den MAP-Kinase Weg in Gang setzen. SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) Proteine wirken als Inhibitoren der GH-Signalübertragung, indem sie an JAK2 binden¹¹⁹.

Der Mechanismus, der zur Bildung eines löslichen GH-Bindungsproteins (GHBP) im Serum führt, ist Spezies abhängig. Bei Ratten und Mäusen wird das GH-Bindungsprotein (GHBP) anhand einer alternativ gespleißten GHR mRNA synthetisiert³⁰. Bei Menschen, Kaninchen und verschiedenen anderen Spezies ist das GH-Bindungsprotein (GHBP) die lösliche Form der extrazellulären Domäne des GH-Rezeptors (GHR), die durch proteolytische Spaltung entsteht¹⁷⁴.

GHBP bindet bis zu 60% des zirkulierenden GH⁵. Es wird vermutet, dass GHBP als eine Art Reservoir wirkt, um so die sekretorischen GH-Peaks zu puffern⁹⁰. Durch die Bindung von GH im Serum wird die Halbwertszeit von zirka 20 Minuten auf mehrere Stunden erhöht⁷¹.

2.1.2 Insulin-like Growth Factors (IGF-I und IGF-II)

Die Struktur der einkettigen Polypeptide IGF-I bzw. IGF-II wurde erst in den 70er Jahren, fast 20 Jahre nach ihrer hypothetischen Vorhersage von Salmon und Daughaday, aufgeklärt^{147,148}. Die Erkenntnis, dass die Peptidhormone eine dem Insulin ähnliche Proteinstruktur besitzen und auch die Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen stimulieren, führte zu der Bezeichnung „Insulin-like Growth Factors“. IGF-I ist ein basisches Polypeptid, das aus 70 Aminosäuren besteht, die durch drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das Molekulargewicht beträgt 7649 Dalton^{147,185}. Die Struktur des Peptids hat sowohl Ähnlichkeit mit der des Nerve Growth Factors (NGF), als auch mit der des Epidermal Growth Factors (EGF) und insbesondere mit Proinsulin, sowie der übrigen Insulinfamilie (einschließlich dem Relaxin). IGF-I wird in vielen Geweben synthetisiert und freigesetzt. Postnatal wird die Hauptmenge an IGF-I unter der Kontrolle von GH in der Leber synthetisiert und anschließend in den Blutstrom sezerniert³³. Die IGF-II Expression ist im Gegensatz zu IGF-I nicht durch GH reguliert³⁹. IGF-II ist ein saures Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 7471 Dalton¹⁴⁸. Es besteht aus 67 Aminosäuren, die zu über 60% mit denen des IGF-I übereinstimmen¹⁸⁵.

2.1.3 Insulin-like Growth Factor Rezeptoren

Der IGF-I Rezeptor (IGF-IR) und der IGF-II Rezeptor (IGF-IIR) sind spezifische Zelloberflächenrezeptoren⁸³. Der IGF-I Rezeptor ist ein heterotetrameres Molekül, das aus zwei α - und aus zwei β -Einheiten besteht und die Mehrzahl der biologischen Signale der IGFs vermittelt¹⁰³. Der IGF-IR interagiert mit höchster Affinität mit IGF-I.

Im Gegensatz zum IGF-II Rezeptor bindet der IGF-I Rezeptor auch Insulin, allerdings mit einer zirka 500-fach geringeren Affinität als die beiden IGFs⁸³. Der IGF-I Rezeptor wird ubiquitär in Zellen exprimiert und nimmt eine wichtige Stellung bei der Regulation des normalen Wachstums sowie bei der malignen Transformation ein⁶⁴. Der IGF-II Rezeptor der Säugetiere ist strukturell mit dem Kationen-unabhängigen Mannose 6-Phosphat Rezeptor identisch und wurde daher IGF-II/Mannose 6-Phosphat Rezeptor genannt. Der IGF-IIR interagiert mit höchster Affinität mit IGF-II. Die Funktion des IGF-II Rezeptors ist einerseits der gerichtete Transport lysosomaler Enzyme nach der Synthese im Golgi-Apparat zu den Lysosomen bzw. aus dem extrazellulären Raum über Endozytose in das Zellinnere. Andererseits kontrolliert der IGF-II Rezeptor die extrazelluläre Konzentration von IGF-II, was ebenfalls durch Endozytose und Proteolyse in den Lysosomen bewerkstelligt wird⁶⁴.

2.1.4 Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins (IGFBPs)

Die Insulin-like Growth Factor-Binding Protein Familie der Säugetiere besteht derzeit aus sechs bekannten Mitgliedern, IGFBP-1 bis -6, die IGF-I und -II mit hoher Affinität binden und deren Wirkungen in positiver oder negativer Weise modulieren können^{77,45}. Die IGFBPs befinden sich im Blutstrom, in einigen anderen biologischen Flüssigkeiten und in den meisten Geweben in einem spezifischen Muster¹⁴². Die Expression der einzelnen IGFBPs ist vom Entwicklungsstadium und Gewebetyp abhängig, je nach der metabolischen bzw. hormonellen Situation und den pathologischen Bedingungen⁴⁴. Eine wichtige Funktion der IGFBPs ist es, die Halbwertszeit der IGFs deutlich zu erhöhen. Während freies IGF im Serum eine Halbwertszeit von nur etwa 10 Minuten besitzt, beträgt diese im Komplex mit IGFBPs 20 bis 30 Minuten⁵⁴. IGFBPs besitzen auch IGF-unabhängige Effekte, indem sie in der Lage sind, mit anderen Proteinen zu interagieren, wie zum Beispiel mit ALS (= Acid Labile Subunit), Insulin, Komponenten der Zelloberfläche, ECM Proteine (ECM = extracellular matrix) und möglicherweise mit intrazellulären Komponenten⁷⁷. Spezifische Proteasen können die einzelnen IGFBPs spalten. Die dadurch entstandenen IGFBP-Fragmente besitzen keine oder eine deutlich reduzierte Affinität zu den IGFs und kontrollieren somit die Bioverfügbarkeit der IGFs²⁸. Unter den Proteasen befinden sich u.a. kallikreinähnliche Serinproteasen, Kathepsine und Matrix-Metalloproteasen^{49,139}.

2.2 Wachstumskontrolle durch das IGF-System

Anfänglich nur als Mediator der Wachstumshormonwirkung betrachtet, hat sich die IGF-Achse mit einer Vielzahl an Wirkungen als eigenes System etabliert⁴.

2.2.1 Somatomedinhypothese

Die originale Somatomedinhypothese wurde vor über 50 Jahren aufgestellt. Sowohl in vitro als auch in vivo Studien an Knorpelgewebe zeigten, dass die Aufnahme von ³⁵SO₄ in Chondroitinsulfat des Knorpels mit Serum von hypophysenektomierten Ratten nicht, aber mit dem Serum von bGH behandelten hypophysenektomierten Ratten funktionierte. Aufgrund der Annahme, dass der GH-Effekt am Knorpel indirekt über eine Transmittersubstanz erfolgt, wurde diese zirkulierende Substanz „sulfation factor“ genannt^{151,150}. Später erfolgte die Umbenennung des Faktors in „somatomedin“, da er als Mediator der Somatotropin-Effekte entdeckt wurde³². Erst zwei Jahrzehnte nachdem die Somatomedine postuliert wurden, konnten die IGFs aufgereinigt und ihre Struktur bestimmt werden. Beide Substanzen wurden „Insulinlike“ genannt, da sie die Fähigkeit besitzen, die Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen zu stimulieren¹⁴⁴. Ihre Aminosäuresequenz besitzt eine zirka 50%ige Übereinstimmung mit humanem Proinsulin^{147,148,17}. Die originale Somatomedin-Hypothese von Salmon und Daughaday schreibt dem IGF-I eine rein endokrine Wirkung zu. Die Erkenntnisse von D'Ercole und Mitarbeitern²⁹ 1980 an fetalem Mausgewebe führten zu einer Erweiterung der originalen Somatomedinhypothese dahingehend, dass IGF-I nicht nur endokrin, sondern auch lokal wirkt, d.h. einen autokrinen bzw. parakrinen Effekt hat. Weitere Untersuchungen des Expressionsmusters der IGF-I mRNA ließen erkennen, dass das IGF-I Gen (*Igf1*) in vielen Geweben während der embryonalen und postnatalen Entwicklung exprimiert wird^{58,149}. Isaksson und Mitarbeiter⁸⁰ entdeckten an Versuchen mit jungen hypophysektomierten Ratten, dass eine direkte hGH (human Growth Hormone) Injektion an der Epiphyse des Knorpels zu einem direkten Längenwachstum des Knochen führt, während dieser Effekt ohne hGH-Injektion nicht auftrat. Sie postulierten einen lokalen Effekt von GH ohne die Beteiligung von zirkulierendem IGF-I. Daher wurde 1985 von Green und Mitarbeitern⁵² eine erweiterte Somatomedinhypothese, die „Dual Effector Hypothesis“ vorgeschlagen. Diese Hypothese ergänzt die originale, indem sie direkte Effekte von GH auf peripheres Gewebe und eine GH-stimulierte, lokale IGF-I Wirkung in autokriner bzw. parakriner

Weise postuliert. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wirkungsweise der Komponenten der GH/IGF-I Achse viel komplexer ist, als bis dato angenommen. GH stimuliert nicht nur die IGF-I Synthese in der Leber, sondern stimuliert auch die Bildung des trimeren IGF-Bindungskomplexes (MG: 150 kDa) in der Zirkulation, der aus einem Molekül IGF, IGFBP-3 und einer säurelabilen Untereinheit (engl.: ALS = acid labile subunit) besteht⁹⁵. Statt IGFBP-3 kann auch IGFBP-5 in diesem trimeren Komplex vorkommen⁶. Im Serum liegen zirka 75-80% der IGFs im 150 kDa Komplex vor, zirka 20-25% sind an andere IGFBPs gebunden, wodurch Komplexe von etwa 50 kDa gebildet werden. Weniger als 1% der IGFs kommen ungebunden im Serum vor¹⁴². Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *Igf1* defiziente Mäuse ein deutlich retardiertes Wachstum zum Zeitpunkt der Geburt zeigen und beide Geschlechter infertil sind. Aufgrund dieser Tatsache folgerte man, dass IGF-I einen wichtigen, GH-unabhängigen Effekt auf das embryonale Wachstum und die Funktion der Reproduktion hat, da diese Effekte nicht bei GH bzw. GH-Rezeptor defizienten Mäusen auftraten^{102,137,193}. Viele verschiedene Knockout und transgene Mausmodelle wurden in den letzten 10 Jahren etabliert, um mehr über die komplexen Wirkungen und Interaktionen der einzelnen Komponenten des GH/IGF-Systems herauszufinden.

2.2.2 Transgene Tiermodelle und Knockout Modelle

Transgene Überexprimierung und Knockdown Strategien sind erfolgreich eingesetzt worden, um das Potential einzelner Gene, die in die Regulation von Wachstum und Differenzierung einbezogen sind, zu charakterisieren¹⁸⁷.

2.2.2.1 GH-transgene und GH-defiziente Mäuse

Eines der ersten transgenen Tiere war die Maus Metallothionein-I (mMT)-Promotor-hGH transgene Maus, die 1982 von Palmiter und Mitarbeitern generiert wurde¹³². Von diesem Zeitpunkt an entstanden viele transgene Mäuselinien, die verschiedene GH-Gene (von Mensch, Rind, Ratte oder Schaf) unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren überexprimieren²¹. Häufig verwendet wurden der Maus Metallothionein-I (mMT)-Promotor¹³³ und der Ratten Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK)-Promotor¹¹⁴. McGrane und Mitarbeiter erzeugten 1988 eine transgene Maus, in der bGH unter der Kontrolle des PEPCK-Promotors steht¹¹⁴. Unterschiedliche Fusionsgene, die für eine Überexpression von GH-Gene im Mausmodell verwendet wurden, sind bei Wanke et al. 1991 zusammenfassend dargestellt¹⁸⁰. Der

offensichtlichste phänotypische Effekt einer GH-Überexpression ist das massiv erhöhte Körpergewicht bei den GH-transgenen Mäusen. Eine Studie über PEPCK-bGH transgene Mäuse zeigte, dass der Serum-GH-Spiegel dieser Mäuse gegenüber den Kontrolltieren deutlich erhöht war und zwischen 300-3000 ng/ml lag¹⁸⁸. Die IGF-I Konzentration im Serum der bGH transgenen Mäuse war im Vergleich zur Kontrollgruppe um das zweifache erhöht¹⁵. Das Körpergewicht der transgenen Mäuse wuchs ab der dritten Lebenswoche, im Vergleich zu den nichttransgenen Kontrolltieren, bis auf das doppelte an. Die inneren Organe, vor allem Leber und Nieren, zeigten eine deutliche Vergrößerung (Viszeromegalie). Die Organe waren nicht nur vergrößert, sondern wiesen auch pathomorphologische Veränderungen auf, wie z. B. an den Nieren eine glomeruläre Hypertrophie, Glomerulosklerose und -hyalinose. An der Leber traten eine Vergrößerung der Hepatozyten sowie regressive, regenerative und fibrotische Veränderungen auf. Neben den nicht tumorösen Veränderungen wurden auch hepatozelluläre Neoplasien, wie z. B. Adenome und Karzinome gefunden^{179,180}. Ein weiterer Effekt war die um zirka die Hälfte verkürzte Lebensspanne bei den PEPCK-bGH transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren (300 zu über 600 Tagen), die in erster Linie auf das Nierenversagen zurückzuführen war^{180,188}.

GH-Defizienz, hervorgerufen durch spontane Genmutationen, findet sich in verschiedenen Mauslinien, wie zum Beispiel Snell dwarf mice, Ames dwarf mice und „little“ mice. Das Wachstum dieser Mutanten unterscheidet sich in den ersten zwei Wochen nach der Geburt gegenüber den Wildtyp-Wurfgeschwistern nicht. Bei den Snell dwarf mice (*Pit1^{dw/dw}*) und den Ames dwarf mice (*Prop1^{df/df}*) fehlen das Wachstumshormon, das Prolaktin und auch das thyroïdstimulierende Hormon. Die „little“ mice (*Ghrhr^{lit/lit}*) besitzen noch eine Restaktivität des Wachstumshormons. Aufgrund dieser Tatsache eignen sich diese spontanen Mausmutanten nur bedingt, um die Auswirkung der fehlenden Wachstumshormonwirkung zu beobachten¹⁰⁹. Daher wurden *Ghr* Knockout Mäuse hinsichtlich der fehlenden GH-Aktivität untersucht. Homozygote *Ghr/Bp* (Growth Hormone Receptor/Binding Protein) Knockout Mäuse zeigen ein postnatal deutlich reduziertes Wachstum, deutlich verminderte IGF-I aber erhöhte GH Konzentrationen im Serum. *Ghr/Bp* Knockout Mäuse werden auch Laron Mäuse genannt, da sie phänotypisch dem menschlichen LARON Syndrom ähneln, wobei sie nicht adipös oder hypoglykämisch werden¹⁹⁸. *Ghr/Igf1* Knockout Mäuse weisen weitaus ausgeprägtere Wachstumsdefizite auf als

die jeweils einfach defizienten Linien. Das Körpergewicht der Doppelmutanten betrug mit fünf Gramm nur noch 17% von dem nicht transgener Geschwister¹⁰⁹.

2.2.2.2 IGF-I/-II und IGF-IR/-IIR transgene und defiziente Mäuse

Eine Studie an IGF-I transgenen Mäusen zeigte, dass sie ab der dritten Woche im Vergleich zu ihren nicht transgenen Geschwistern deutlich an Gewicht zunehmen⁷. Untersuchungen an IGF-II transgene Mäuse ergaben, dass sie nicht grundsätzlich schwerer waren als ihre nicht transgenen Geschwister. Spezifische Effekte wurden in Abhängigkeit vom Tiermodell in bestimmten Organen gefunden⁴, unter anderem wurde ein positiver Effekt auf das Wachstum der Nieren und der Nebennieren festgestellt, der vor allem abhängig von der lokalen Überexpression von IGF-II war¹⁸⁹. Ebenfalls modellabhängig wurde in einzelnen IGF-II transgenen Tiermodellen ein erhöhtes Auftreten von Tumoren festgestellt¹⁸⁹.

Igf1 und *Igf2* Knockout Mäuse weisen schwere Wachstumsdefizite auf, die bereits vor der Geburt auftreten, woraus ein um 60% bzw. 40% vermindertes Geburtsgewicht resultiert. *Igf2* Knockout Mäuse entwickeln sich nach der Geburt normal weiter, allerdings ohne das verminderte Gewicht aufzuholen. Damit wurde IGF-II als fötaler Wachstumsfaktor identifiziert. *Igf1* Knockout Mäuse entwickeln sich nach der Geburt nur zögerlich und weisen eine hohe perinatale Sterblichkeit auf, ein Hinweis auf die Bedeutung von IGF-I als postnataler Wachstumsfaktor⁶⁴.

Eine lokale Überexpression von IGF-IR im Herzen von transgenen Mäusen resultierte in einer Vergrößerung der Herzmuskelzellen und einem erhöhtem Herzgewicht. Bei der Überexpression einer löslichen Form des IGF-IIR wurden in transgenen Mäusen verminderte Organgewichte nachgewiesen⁶⁴.

Igf1r Knockout Mäuse kommen mit einem um 45% reduzierten Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrolltieren auf die Welt und sind aufgrund der defekten Atemfunktion nicht lebensfähig. *Igf2r* Knockout Mäuse besitzen ein um zirka 135% erhöhtes Geburtsgewicht, im Vergleich zu den Kontrolltieren. Der Großteil stirbt innerhalb der späten fötalen oder perinatalen Periode^{64,108}.

2.2.2.3 IGFBP transgene Mäuse

Die Funktionen der einzelnen IGFBPs konnten über den Knockout Ansatz nicht aufgeklärt werden. Grund dafür könnte die vermehrte Expression der noch vorhandenen IGFBPs sein⁶⁴. Effekte auf das Wachstum wurden nur bei männlichen *Igfbp-2* Knockout Mäusen beschrieben, die ein vermindertes Milz- und ein erhöhtes Lebergewicht aufweisen^{191,192}. Viele transgene IGFBP-Mausmodelle wurden erstellt und es zeigte sich, bis auf wenige Ausnahmen, dass sie einen im Wachstum retardierten Phänotyp aufweisen⁶⁴. Eine Übersicht über die verschiedenen IGFBP transgenen Mausmodelle findet sich bei Wolf et al. 2005¹⁸⁷. Am intensivsten wurden die Folgen einer IGFBP-1 Überexpression in derzeit vier unterschiedlichen Mausmodellen untersucht¹⁸⁷. Eine Überexpression von Ratten IGFBP-1 unter der Kontrolle des Phosphoglyzeratkinase (PGK)-Promotors führte beispielsweise zu einer postnatalen Wachstumsretardierung, einer Beeinträchtigung der Gehirnentwicklung und zu Störungen der Glukosehomöostase¹⁴³. Funktionale Analysen von IGFBP-2 in transgenen Mäusen, die Maus (m) IGFBP-2 unter der Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV)-Promotors überexprimieren, sind Hauptbestandteil dieser Arbeit und werden unter 3.2.1 näher erläutert. IGFBP-3 transgene Mäuse zeigen in Abhängigkeit vom Tiermodell signifikante Körpergewichtsveränderungen⁶⁴. Eine systemische Überexpression von humanem IGFBP-3 unter der Kontrolle des CMV- oder des PGK-Promotors führt zu einem verminderten prä- und postnatalen Körpergewicht^{123,159}. Metallothionein (MT)-Promoter-hIGFBP-3 transgene Mäuse zeigen phänotypisch auch ein vermindertes Körpergewicht, aber ein erhöhtes Gewicht verschiedener Organe (Milz, Leber und Herz)^{124,187}. Der Grund für diesen gegensätzlichen IGFBP-3 Effekt könnte das Verhältnis von IGFBP-3 zu IGF-I sein, das je nach Überwiegen einer Komponente, bestimmt ob eine Hemmung oder Potenzierung der IGF-I Wirkung eintritt¹⁸⁷. Die Tatsache, dass ein erhöhter Serum-IGFBP-3 Spiegel mit einem 1,4-fachen Anstieg der Serum-IGF-I Konzentration einherging, führte zu dem Schluss, dass die IGFBP-3 Wachstumshemmung in den transgenen Mäusen eher auf die Hemmung des IGF-I Effekts auf Gewebeebene, als auf Interferenzen mit zirkulierendem IGF-I zurückzuführen ist¹⁸⁷. IGFBP-4 ist das einzige IGF-Bindungsprotein, das konstant die Zellproliferation in einer Vielzahl von in vitro Modellen hemmt¹⁹⁹. In Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass IGFBP-4 sowohl eine IGF-abhängige als auch unabhängige hemmende Wirkung auf spezifische Parameter des

malignen Wachstums dieser Zellen hat³⁷. IGFBP-4 Überexpression in glatten Muskelzellen transgener Mäuse bewirkt Hypoplasie und dadurch deutlich reduzierte Organgewichte verbunden mit einer hohen Anzahl an glatten Muskellzellen z. B. in der Aorta, im Magen und in der Harnblase¹⁷⁸. In transgenen Mäusen, die das murine IGFBP-4 unter der Kontrolle des H-2K^b-Promotors exprimieren, wurden erhöhte IGFBP-4 Konzentrationen in der Milz, im Thymus und in der Lunge festgestellt. Im Thymus und in der Milz wurde unter dem Einfluss von IGFBP-4 die Zellproliferation gehemmt und die Apoptose stimuliert, wobei die T- und B-Zellen sich normal entwickelten¹⁸⁷. Eine gezielte Expression von IGFBP-4 in Osteoblasten führte postnatal zu einer Verminderung der Femurlänge und des Gesamtknochenvolumens¹⁹⁷. Auch in IGFBP-5 transgenen Mäusen konnte eine hemmende Wirkung auf das Knochenwachstum in Form eines verminderten trabekulären Knochen volumens gezeigt werden³⁵. Eine zielgerichtete Expression von IGFBP-5 in der Milchdrüse transgener Mäuse führte zu einer Involution des Drüsengewebes¹⁷². In einem IGFBP-6 transgenen Mausmodell mit erhöhter Transgenexpression im ZNS konnten ein vermindertes Körpergewicht, eine verminderte Gehirnentwicklung sowie eine deutliche Reduzierung der Wurfgrößen (bis 66%) festgestellt werden¹².

Die klinischen Auswirkungen der Überexpression der IGFBPs in den unterschiedlichen Mausmodellen weisen auf ihre große Bedeutung in der Regulation physiologischer und pathologischer Wachstumsprozesse hin¹⁸⁷.

2.2.2.4 Signalübertragung durch den IGF-I Rezeptor

Bei der GH/IGF-Achse unterscheidet man zwischen dem IGF-I Rezeptor und dem GH-Rezeptor (siehe unter 2.1.1) vermittelten Signalkaskaden. Der IGF-I Rezeptor vermittelt den größten Teil der IGF-Wirkungen über die Aktivierung von drei Signalkaskaden, den MAP-Kinase Weg¹⁶⁰, den P38/JNK Weg⁶⁴ und den PI3-Kinase Weg¹²⁷. Der IGF-I Rezeptor besitzt, wie auch der Insulin Rezeptor zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Die α -Untereinheiten liegen komplett extrazellulär und bilden eine Bindungstasche, die β -Untereinheiten überbrücken die Plasmamembran, liegen vornehmlich intrazellulär und aktivieren somit die unterschiedlichen Signalproteine^{153,164}. Mindestens fünf unterschiedliche Proteinfamilien sind bei der IGF-I Signalübertragung beteiligt⁶⁴.

- Insulin-like Rezeptorsubstrat 1-4 (IRS 1-4)⁸³
- p85⁹⁵
- Shc Proteine⁹
- Grb Proteine^{95,126}
- Crk Proteine^{8,9}

Insulin-Rezeptorsubstrat 1-4 (IRS 1-4): Die Bindung von IGF-I oder IGF-II an den IGF-IR bewirkt eine Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase, die IRS1-4 phosphoryliert. Die phosphorylierten IRS1-4 führen zu einer Aktivierung von zwei Signalwegen, dem P44/42 MAP-Kinase Weg über Grb2 und dem Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Weg¹⁵⁰.

p85 ist die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase, die sowohl an den IGF-IR, als auch an IRS 1 und 2 bindet⁹².

Shc Proteine enthalten eine SH2 Domäne, sowie Bindungsstellen für andere Shc Proteine. Shc Proteine werden durch den aktivierten IGF-IR phosphoryliert und können dann an Grb2 (Growth factor receptor binding protein-2) binden und damit den MAP-Kinase Weg aktivieren⁹⁵.

Grb Proteine (Growth factor receptor binding proteins): Grb Proteine besitzen SH2 und SH3 Domänen. Grb2 bindet nicht direkt an den IGF-IR, sondern vermittelt Signale zwischen Shc, SOS (Son of Sevenless) und Ras (rat sarcoma) und ist somit an Zellproliferation und Apoptose beteiligt⁶⁴.

Crk (CT10 regulator of kinase): Crk Proteine sind SH2- und SH3-Domänen beinhaltende Adaptorproteine, die an SOS oder IRS binden^{8,9}. Crk II kann auch direkt IGF-IR binden. IGF-I stimuliert die Phosphorylierung von Crk II, das den P44/42 MAP-Kinase Weg aktiviert⁶⁴.

Der Phosphatidylinositol 3-Kinase Signalweg (PI3K-Weg) (siehe Abb. 1)

Die Aktivierung von Insulin-Rezeptorsubstrat 1 und 2 (IRS1 und IRS2) über IGF-IR führt zur Aktivierung von Phosphoinositol (PI) 3-Kinase, die Akt (= Protein Kinase B) und PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase) aktiviert. Dieser Aktivierungsschritt

spielt eine zentrale Rolle und führt zur Aktivierung der S6 Kinase und des Initiations Faktor 4E Bindungsproteins (4E-BP1) über mTOR (mammalian Target of Rapamycin), aber auch zu einer Inaktivierung von Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), dem Transkriptionsfaktor Forkhead (FKHR) und dem Apoptosefaktor Bad¹⁰⁰.

Eine Deletion von 4E-BP1 und 2 (=eukaryontische Translations-Initiations-Faktor 4E Bindungsproteine 1 und 2) in Mäusen führte zu einer Insulinresistenz, einem adipösen Phänotyp und einer erhöhten S6 Kinase Aktivität. *S6kinase* Knockout Mäuse dagegen waren schlank⁹⁴.

In einer Studie über Akt (= Proteinkinase B) defiziente Mäuse konnte eine unterschiedliche Wirkungsweise zweier Isomerasen gezeigt werden. *Akt1*^{-/-} Knockout Mäuse wiesen eine deutliche Wachstumsretardierung auf, wohingegen *Akt2*^{-/-} Knockout Mäuse nicht in der Lage waren ihre Glukosehomeostase aufrecht zu erhalten^{26,27}.

Lawlor et al. 2002 generierten *Pdk1* Knockout Mäuse. Homozygote Mäuse (*PDK*^{-/-}) starben noch während der Embryonalphase, heterozygote Mäuse (*PDK*^{+/-}) waren gesund und hatten keine genotypischen Veränderungen. PDK1 hypomorphe, transgene Mäuse mit einer um 25-50% reduzierten PDK-Expression, waren im Vergleich zu den Kontrolltieren um 40-50% wachstumsretardiert, aber gesund. Morphometrische Untersuchungen an den Nebennieren PDK1 hypomorpher Mäuse zeigten, dass der verminderte PDK1-Level zu einem verminderten Zellvolumen in der Zona fasciculata, bei unveränderter Zellzahl führt⁹³.

Dem PI3K-Weg konnte sowohl eine regulatorische Wirkung auf die Zellzahl, als auch auf die Zellgröße nachgewiesen werden.

Mitogen aktivierte Protein Kinase Wege (MAPK-Wege) (siehe Abb. 1)

Der MAP-Kinase Weg der Säugetiere wird in drei große Familien eingeteilt¹³:

- Extrazellulär-Signal regulierte Kinasen (ERK1 und 2)
- c-Jun NH2-terminale Kinasen (JNK)
- p38 MAPK (mitogen aktivierte Proteinkinase)

Die MAP-Kinase Wege können durch den IGF-IR, aber auch durch andere Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B. die Rezeptoren für NGF oder EGF induziert werden. ERKs werden über die Signalkaskade aktiviert, translozieren in den Nukleus und aktivieren dort Transkriptionsfaktoren, unter anderem Elk-1 oder c-Jun durch Phosphorylierung und nehmen Einfluss auf Zellproliferation, -differenzierung und -erhaltung¹⁵⁶. Trotz zahlreicher Untersuchungen der biologischen Funktionen von IGF-I und seines Rezeptors (IGF-IR) ist der molekulare Mechanismus der JNK Aktivierung über den IGF-IR derzeit immer noch nicht aufgeklärt¹⁰⁰. Untersuchungen an murinen Embryonen zeigten, dass sowohl JNK, als auch p38 MAPK wichtig für die normale Entwicklung der Blastozysten sind^{20,111}. In einer Studie mit murinen embryonalen RIP- (Receptor-Interacting Protein) null Zellen konnte IGF-I eine Akt- und ERK-Aktivierung auslösen, aber keine JNK-Aktivierung. RIP, ein wichtiger Bestandteil des TNF-(Tumor Necrose Factor) Signaling, wurde daher eine wichtige Rolle in der IGF-I induzierten JNK-Aktivierung und Zellproliferation zugeschrieben¹⁰⁰. Eine verminderte p38 MAP-Kinase Aktivität führte in Mäusen zu einer erhöhten Tumorzinzidenz²⁰.

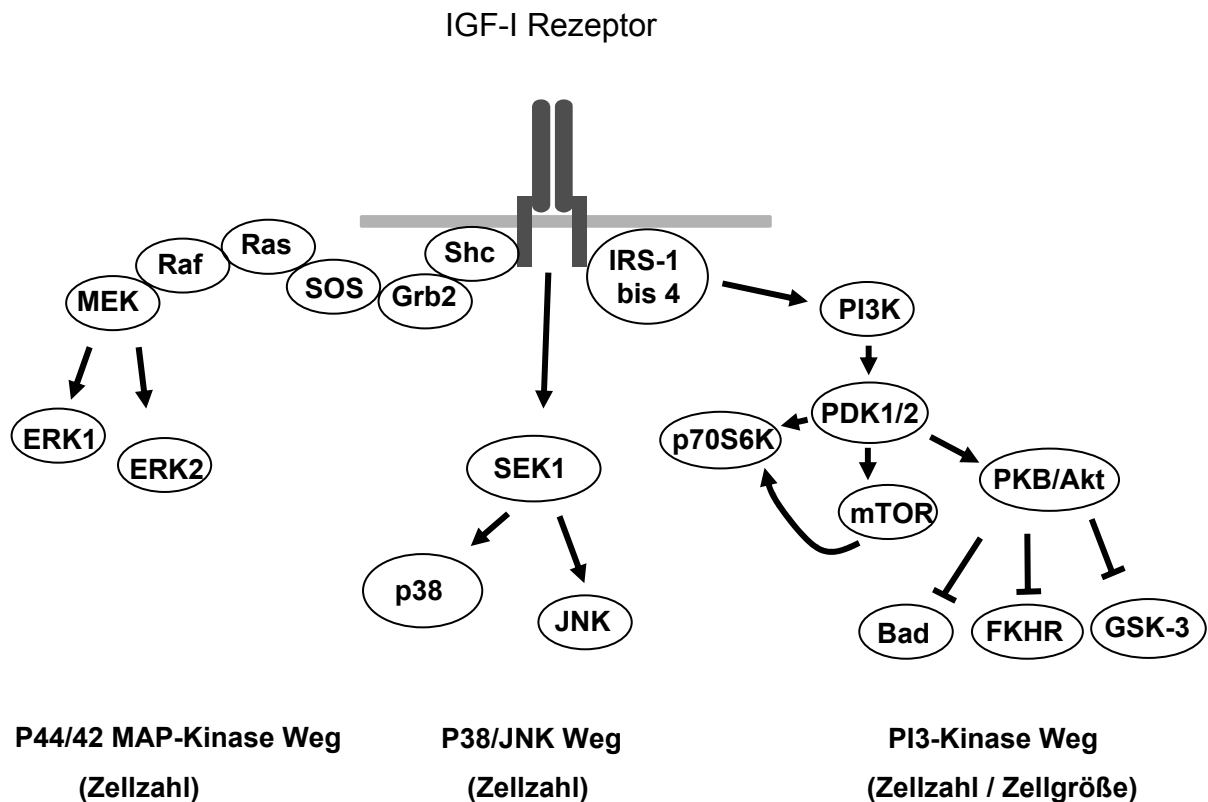


Abbildung 1: IGF-I Rezeptor vermittelte Signalkaskaden

2.3 Die Nebennieren

Bartolomeo Eustachi, ein italienischer Arzt, der im 16. Jahrhundert lebte und als Mitbegründer der Anatomie galt, beschrieb als erster die Nebennieren. In seinem Lehrbuch „Tabulae anatomicae“ waren bereits sehr exakte Zeichnungen der Nebennieren (siehe Abbildung 2) vorhanden, wobei die Funktion damals noch nicht bekannt war.

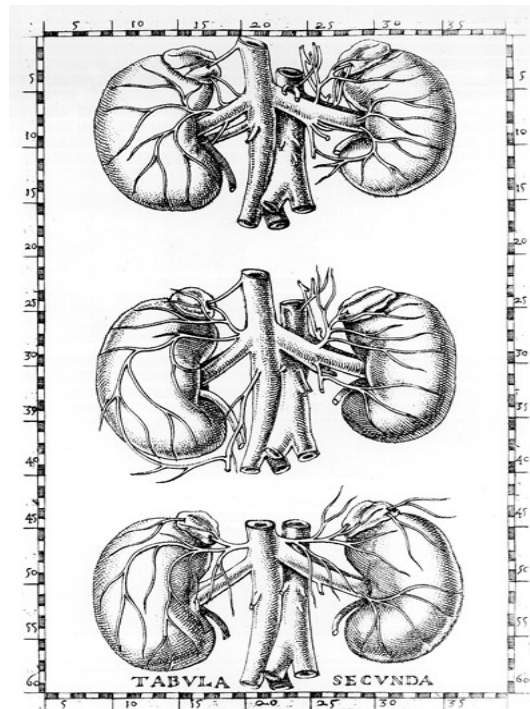


Abbildung 2: Nebennierendarstellung im 16. Jahrhundert von Eustachi

2.3.1 Anatomie und Physiologie der Nebenniere

Die Nebenniere (*Glandula suprarenalis*) der Säugetiere ist ein paariges Organ, das embryologisch und funktionell aus zwei verschiedenen Anteilen besteht: der Nebennierenrinde (*Cortex glandulae suprarenalis*) und dem Nebennierenmark (*Medulla glandulae suprarenalis*)⁹⁸. Außen ist das Organ von einer starken bindegewebigen Kapsel umgeben, von der aus Gefäße und Nerven enthaltende Septen in Rinde und Mark ziehen⁶². Die Nebennierenrinde entwickelt sich aus dem mesodermalen Zölomepithel, während sich das Mark vom Neuroektoderm (Neuralleiste) ableitet. Das Nebennierenmark ist damit ein sympathisches Paraganglion⁹⁸. Die Nebennierenrinde kann von außen nach innen in drei Zonen mit der Bildung verschiedenen Hormonen unterteilt werden. Der Zona glomerulosa mit

Mineralokortikoiden, v.a. Aldosteron, der Zona fasciculata mit Glukokortikoiden, allen voran das Kortikosteron, das dominierende Glukokortikoid bei der Maus²³ und der Zona reticularis mit androgen wirksamen Hormonen, wie das Dehydroepiandrosteron (DHEA), und sein Sulfat^{98,158}. Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks bilden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin (siehe Abbildung 3). Nagetiere besitzen zwischen Nebennierenrinde und -mark noch eine so genannte X-Zone, die bei männlichen Tieren nach der Geburt degeneriert, wohingegen sie bei weiblichen Tieren in unterschiedlicher Größe persistieren kann⁶⁵.

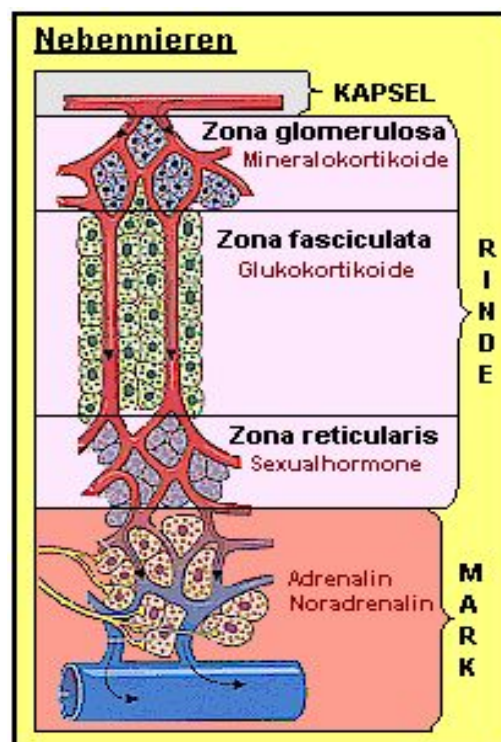


Abbildung 3: Anatomischer Aufbau und physiologische Funktion der Nebenniere

Man vermutet, dass die X-Zone der Nager-Nebenniere das Pendant zur fetalen Zone der Primaten ist¹²⁵. Die fetale Nebennierenrinde bei Primaten ist verantwortlich für die Entstehung von zwei Zonen, der fetalen Zone, die sich postpartum zurückbildet und der bestehen bleibenden Zone, aus der sich die drei klassischen Zonen der Nebennierenrinde entwickeln¹⁵⁷. Steroidhormone, die von der fetalen Zone produziert werden, sind für die intrauterine Homöostase, für die Reifung der fetalen Organe und bei manchen Spezies, wie dem Schaf, der Ziege und dem Kaninchen, für die Bestimmung des Geburtszeitpunktes verantwortlich¹¹⁶.

2.3.2 Einfluss der GH-IGF-Achse auf die Entwicklung der Nebennieren

Das adrenokortikotrope Hormon (ACTH), das von der Adenohypophyse gebildet wird, ist der Hauptregulator des Wachstums und der Funktion der Nebennierenrinde. Daneben besitzen einzelne Komponenten der GH/IGF-Achse auch einen regulatorischen Einfluss auf das Wachstum und die Funktion der Nebenniere¹¹⁶.

2.3.2.1 Effekte des Wachstumshormons (GH) auf Wachstum und Funktion der Nebenniere

Eine Überexpression von bGH oder hGH in Mäusen führt bei den transgenen Tieren zu einer deutlichen Vergrößerung der Nebennieren, wie auch zu einer Erhöhung des Plasmakortikosteronspiegel^{65,117}.

In einer zentralen Vorarbeit dieser Studie wurden PEPCK-bGH transgene Mäusen mit CMV-mIGFBP-2 transgenen Mäusen gekreuzt, um die Rolle von IGFBP-2 in der postnatalen Wachstumsregulation zu klären⁶⁷. Dadurch entstanden vier Genotypen: doppeltransgene (GB), bGH transgene (G), mIGFBP-2 transgene (B) und nichttransgene (WT = Wildtyp) Mäuse. Das Körpergewicht war bei den 15 Wochen alten männlichen Nachkommen der Gruppe GB im Vergleich zur Gruppe G um 17% und der Gruppe B im Vergleich zur Gruppe WT um 13% reduziert. So konnte in vivo zum ersten Mal gezeigt werden, dass IGFBP-2 das GH-stimulierte Wachstum hemmt⁶⁷. Aufgrund der Tatsache, dass GH eine Vergrößerung der Nebenniere bewirkt und IGFBP-2 diesen Effekt antagonisieren kann, wurden in einer weiterführenden Studie Nebennieren aller vier genetischen Gruppen (G, GB, B, WT) morphometrisch auf den GH bzw. IGFBP-2 Effekt hin untersucht⁶⁵. Die Zona fasciculata der Nebenniere der GH transgenen Mäuse (G) war sowohl durch Hypertrophie, als auch durch Hyperplasie vergrößert. Die Zellgröße in doppeltransgenen Mäusen (GB) war im Vergleich zu den G Mäusen signifikant reduziert auf das Niveau der mIGFBP-2 transgenen und Wildtyp-Mäuse. Die Zellzahl war jedoch zwischen den doppeltransgenen und G transgenen Mäusen nicht unterschiedlich. Es konnte somit gezeigt werden, dass die GH-induzierte Hypertrophie durch die IGFBP-2 Expression aufgehoben wurde, während der hyperplastische Effekt unbeeinflusst blieb. Der Plasmakortikosteronspiegel war bei bGH transgenen Mäusen (G), nicht aber bei den doppeltransgenen Mäusen (GB), im Vergleich zu den nichttransgenen Mäusen (WT) um das dreifache erhöht. Der Plasma-ACTH Spiegel lag in allen vier Gruppen in der gleichen Größenordnung. Die

Untersuchung der IGF-I mRNA-Expression in den Nebennieren ergab eine deutlich erhöhte Abundanz bei bGH transgenen und doppeltransgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Die Expression der GH-Rezeptor (GHR) und der IGF-I-Rezeptor mRNA zeigte in allen vier Genotypen keine signifikante Abundanzveränderung. Da IGFBP-2 die hypertrophischen und hyperplastischen Wirkungen von GH auf die Nebennierenrinde klar differenziert, stellt das in dieser Arbeit untersuchte Panel von Mäusen eine hervorragende Grundlage für systematische Analysen von Mechanismen der Zellgrößenkontrolle in der Nebennierenrinde dar⁶⁵.

2.3.2.2 Effekte der IGFs auf Wachstum und Funktion der fetalen und adulten Nebenniere

IGF-I und IGF-II können das Wachstum und die Funktion der unterschiedlichsten Zelltypen, so auch der Zellen der Nebenniere, in parakriner bzw. autokriner Weise beeinflussen⁵⁶. Je nach Spezies wirken IGF-I und/oder IGF-II auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen der Nebennierenrinde¹¹⁶.

Die Untersuchung der IGF-II Expression in der fetalen humanen Nebenniere zeigte, übereinstimmend mit anderen Spezies, dass IGF-II das mengenmäßig vorherrschend exprimierte Peptid während der fetalen Entwicklung war⁵⁸.

Die postnatale Überexpression von humanem IGF-II in transgenen Mäusen führte zu einer Erhöhung des Nebennierengewichts, das auf einen 50%igen Anstieg der Anzahl der Zona fasciculata Zellen zurückzuführen war. In der adulten bovinen und humanen Nebenniere verstärkte IGF-II den steroidogenen Effekt von ACTH viel effektiver als IGF-I. IGF-II ist nicht nur ein wichtiger fetaler Nebennierenrinde-wachstumsfaktor, sondern spielt auch in der Regulation des adulten adrenalen Wachstums und deren Funktion eine Rolle¹⁸².

In fetalen ovinen Zellen der Nebennierenrinde bewirkt IGF-I eine vermehrte Proliferation und verstärkt die steroidogene Antwort auf ACTH¹²⁸. Dagegen wurden diese Effekte von IGF-I bei Mensch¹¹⁶ und Rind¹³⁴ vor allem bei adulten Zellen der Nebennierenrinde beobachtet.

Sowohl für IGF-I, als auch für IGF-II konnte ein steroidogener Effekt gezeigt werden.

In einer Studie mit bovinen adrenokortikalen Zellen (BAC) konnte gezeigt werden, dass IGF-I verstärkend auf die ACTH-induzierte Steroidhormonsynthese wirkt. Die Stimulation der Steroidhormonsynthese war verbunden mit einer vermehrten mRNA Expression des ACTH-Rezeptors und der steroidogenen Schlüsselenzyme, allen voran das Steroidgenetic Acute Regulatory protein (StAR). StAR ist ein Protein, das ausschließlich in den Nebennieren und in den Gonaden exprimiert wird und für den Transport von Cholesterol von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist. Die Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon ist der erste Schritt der Steroidhormonsynthese⁹⁶.

In einer Studie mit Ratten Leydigzellen und in einer weiteren mit porzinen Granulosazellen hatte IGF-I alleine keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Expression der StAR mRNA. In beiden Studien konnte jedoch eine Potenzierung der humanen Choriogonadotropin- (hCG) bzw. der follikelstimulierenden Hormon- (FSH) Wirkung durch IGF-I nachgewiesen werden⁹⁹.

2.3.2.3 Effekte des IGF-I und -II Rezeptors auf Wachstum und Funktion der Nebenniere

Die Vermittlung der mitogenen und differenzierenden Wirkungen von IGF-I und IGF-II auf die Nebenniere wird dem IGF-I Rezeptor zugeschrieben^{116,184}. In einer bovinen Nebennierenzellstudie konnte das Vorkommen beider IGF-Rezeptoren sowohl in der Nebennierenrinde, als auch im Mark nachgewiesen werden¹⁸³. Die physiologische Rolle des IGF-II/M6P Rezeptors in der Nebenniere ist umstritten¹⁸⁴. Eine signifikante Überexpression von humanem IGF-IR ist in adrenokortikalen Karzinomen⁴⁷ und Phäochromozytomen⁴⁶ beobachtet worden. Eine mögliche Rolle des IGF-Systems in der Pathogenese von adrenalen Neoplasien wird vermutet und der IGF-IR als eventueller therapeutischer Ansatzpunkt betrachtet⁴⁶.

2.3.2.4 Effekte der IGFBPs auf Wachstum und Funktion der Nebenniere

Die Expression der mRNAs für alle sechs IGFBPs konnte sowohl in fetalem, als auch im adulten humanen Nebennierengewebe detektiert werden⁷⁸. In Nebennierenzellkulturen verschiedener anderer Spezies wurden, in Abhängigkeit vom Medium, eine unterschiedliche Zusammensetzung der IGFBP's gefunden⁶⁵. Die Überexpression von IGFBP-2 in transfizierten murinen adrenokortikalen Karzinomazellen (Y-1) führte im Vergleich zu Y-1 Zellen ohne IGFBP-2

Überexpression zu markanten morphologischen Veränderungen und verstärkter Zellproliferation⁶⁹. In humanen Neoplasien, so auch in adrenokortikalen Tumoren, sind die IGFBP-2 Konzentrationen in den malignen Tumoren im Vergleich zu benignen deutlich erhöht¹⁸.

Die Stimulation mit ACTH in adulten humanen adrenokortikalen Zellen führte zu einer deutlichen erhöhten IGFBP-1 Expression, eine Stimulation mit IGF-I und IGF-II führte zu einer deutlich erhöhten IGFBP-5 Expression. Diese Tatsache, zusammen mit früheren Studien lässt vermuten, dass die IGFBP's eine wichtige modulatorische Rolle in der Regulation der unterschiedlichen adrenokortikalen Funktionen haben⁴⁸.

Ein in vivo Effekt von IGFBP-2 auf die Nebenniere von Mäusen wurde bereits im Kapitel 2.2.2.2 genauer dargestellt.

2.4 Proteomanalyse

Im Jahr 1996 wurde der Begriff des PROTEOMS (= "the PROTEin complement expressed by a genOM") geprägt¹⁸⁶. Das Proteom stellt die Gesamtheit aller Proteine dar, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus exprimiert werden. Im Gegensatz zum statischen System des Genoms ist das Proteom in Abhängigkeit von inneren und äußeren Parametern eine dynamische, sich ständig verändernde Größe². Trotz vieler biologischer Daten zu einzelnen Genen, die man durch eine intensive Genomanalyse in den letzten Jahrzehnten gewonnen hat, können keine einfachen Rückschlüsse vom Gen zum erzeugten Protein gemacht werden. Gründe dafür sind, dass zum einen ein Gen häufig durch alternatives Spleißen der prä-mRNA für viele verschiedene Genprodukte kodiert. Zum anderen führen posttranslationale Modifikationen zu einer Vielzahl verschiedener Proteinprodukte. Solche posttranslationalen Modifikationen können Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung, Methylierung, Oxidation/Reduktion oder Proteolyse sein. Das Proteinmuster, das eine Proteomanalyse darstellt, ist daher nur eine Momentaufnahme. Ein Vergleich von Transkriptom- und Proteomdaten hat gezeigt, dass nur eine sehr geringe Korrelation zwischen der Menge an mRNA und den entsprechenden Genprodukten besteht⁵⁷. Mit Hilfe der Proteomanalyse wird versucht, so viele exprimierte Proteine wie möglich sowohl qualitativ als auch quantitativ zu identifizieren. Die Proteomanalyse kann eine neue Qualität von Antworten auf biologische Fragen geben, die zurzeit mit keiner anderen Technik erhalten werden kann. Das Zusammenspiel der Proteomanalyse mit den molekularbiologisch-gentechnischen Methoden der Genomanalyse eröffnet einen besseren Einblick in die komplexen funktionellen Regulations- und Stoffwechselnetzwerke der Natur¹⁰⁴.

2.4.1 Techniken der Proteomanalyse

In dieser Arbeit wurden zwei wichtige Techniken der Proteinanalytik, die 2D-Gelelektrophorese und die Massenspektrometrie verwendet.

Die „klassische“ 2D-Gelelektrophorese, die von O`Farell 1975 und Klose 1975 eingeführt wurde, kombiniert die isoelektrische Fokussierung mit der Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)^{88,131}. Aufgrund ihres sehr

hohen Auflösungsvermögens ist sie bis heute noch eine der wichtigsten Separationstechnik zur Trennung komplexer Proteingemische¹³⁸. Die Trennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgt durch die isoelektrische Fokussierung (IEF). Das Prinzip der IEF besteht darin, dass ein Protein im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten wandert, bis es an den pH-Wert gelangt, an dem seine Nettoladung gleich Null ist, dem so genannten isoelektrischen Punkt. Früher wurden Trägerampholyten verwendet, um einen pH-Gradienten zu erstellen. Aufgrund einiger Nachteile der Trägerampholyten-IEF, wie ihrer geringen Reproduzierbarkeit und dem Kathodendrift, wurde durch den Einsatz von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension deutlich verbessert. Ein Vorteil der IPG-IEF ist, dass die puffernden Gruppen kovalent mit der Gelmatrix verbunden sind und dadurch die pH-Gradienten während des gesamten Experiments fixiert sind. Ein weiterer Vorteil der Immobilintechnik ist die Herstellung von Gelen mit sehr engen pH-Bereichen, so dass Proteine, die sich nur minimal (0,01 pH-Einheiten) unterscheiden, noch aufgetrennt werden können^{104,105}. Die zweite Dimension ist eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli⁹¹. Aufgrund der hohen Auflösung wird heutzutage noch das 1970 von Laemmli eingeführte, SDS-haltige, diskontinuierliche Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Das Gel besteht hierbei aus zwei Teilen, dem grobmaschigen Sammelgel (4%ig; pH 6,8) und dem engmaschigen Trenngel (12%ig, pH 8,8).

Um die aufgetrennten Proteine zu detektieren, stehen eine Vielzahl von Färbemethoden zur Verfügung, unter anderem die kolloidale Coomassie-Färbung, die hochsensitive Silberfärbung¹⁶ oder Fluoreszenzfärbungen^{10,175}.

Die 2D-DIGE Methode ist ein Fortschritt der „klassischen“ 2D-Gelelektrophorese, die von Ünlü et al. 1997 entwickelt wurde¹⁷⁵. Das Prinzip ist die Markierung der Proteinproben in vitro mit Cyanin Farbstoffen (Cy dyes). Es stehen zwei verschiedenen Arten der Markierung zur Verfügung: die Minimummarkierung und die Sättigungsmarkierung. In dieser Arbeit wurde mit der Minimummarkierung (minimal labeling) gearbeitet. Die Minimummarkierung besteht aus drei Fluoreszenzfarbstoffe (Cy2, Cy3 und Cy5) mit unterschiedlichen Emissionsspektren. Dies ermöglicht die Untersuchung zweier differentieller Proteinlysate (z.B. transgen/nicht transgen) hinsichtlich ihres quantitativen Proteinexpressionsmusters, indem sie mit Cy3 und Cy5 und umgekehrt markiert werden. Mit dem dritten Farbstoff (Cy2) wird der interne

Standard (engl.: Internal Pooled Standard = IPS) markiert. Dieser besteht aus einem Aliquot jeder Probe und wird zusammen mit der Cy3 und der Cy5 markierten Proben in jedem Gel mit aufgetragen. Der Vorteil der 2D-DIGE Technik gegenüber der klassischen 2D-Gelelektrophorese ist, dass nur noch ein an Stelle von zwei Gelen benötigt werden. Des Weiteren können zwei verschiedene Proben in einem Gel gemeinsam wandern, so dass das Problem der Spotzuordnung beim Vergleich zweier einzelner Gele wegfällt und die Analyse dadurch bequemer macht. Der interne Standard wird bevorzugt einmal für alle Gele einer Serie von Replikaten markiert. Bei der Minimummarkierung wird nur eine geringe Menge an Protein an der epsilon-Aminogruppe von nur 1-2% ihrer Lysinreste markiert. Die Markierung verändert die Ladung der Proteine nicht, so dass das Laufverhalten während der ersten Dimension nicht beeinträchtigt ist. Auch die zweite Dimension bleibt unbeeinflusst, da sich die Masse eines jeden Proteins nach Farbstoffanlagerung um nur 0,5 kDa erhöht. Im Gegensatz dazu werden bei der Sättigungsmarkierung alle vorhandenen Cysteinreste markiert. Damit werden bereits geringe Mengen eines Proteins detektiert. Diese Markierungsmethode wird generell bei Vorliegen geringer Probenmengen angewandt. Die Arbeitsschritte eines 2D-DIGE Experiments in dieser Arbeit bestehen aus vier Hauptschritten: Markierung der Proteinlysate, 2D-Gelelektrophorese und anschließend Scannen der Gele, softwaregestützte Auswertung der Gele und letztendlich die Identifizierung der signifikant differenziellen Proteine über die Massenspektrometrie.

Die dominierende Methode für die Identifizierung von Proteinen war bis in die neunziger Jahre hinein der Edman-Abbau⁴⁰. Der Edman-Abbau ist ein zyklischer Prozess, bei dem in jedem Reaktionszyklus von einem Ende der Peptidkette die endständige (N-terminale) Aminosäure abgespalten und identifiziert wird¹⁰⁵. Der Durchbruch der Massenspektrometrie kam mit der Möglichkeit, intakte Peptidionen zu generieren. Die bedeutendsten Ionisierungsverfahren sind die Matrix Assisted Laser Desorption Ionisierung (=MALDI) von Karas et al. 1988⁸⁴ und Tanaka et al. 1988¹⁶⁷ entwickelt und die Electrospray Ionisierung (ESI) von Fenn et al. 1989⁴³. Bei MALDI werden die Peptide mit einer Matrix (z.B. α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure) auf einem festen Träger kristallisiert. Der Beschuss durch einen Laser bewirkt Verdampfung und Ionisation der Peptide. Dieser Prozess wird im Hochvakuum durchgeführt, da die Ionisierung im Vakuum effizienter ist als unter atmosphärischem Druck. Nach der MALDI-Ionisierung liegen die Peptidionen meist einfach protoniert

vor. In der Massenspektrometrie wird immer das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) gemessen. TOF („Time Of Flight“)-Geräte (Flugzeit-Massenspektrometer) werden häufig in Kombination mit MALDI-Ionisierungsquellen eingesetzt. Das Prinzip dabei ist, dass die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Dann wird die Flugzeit der Ionen in einem Flugrohr gemessen. Ionen mit einem hohen Masse zu Ladungs-Verhältnis (m/z) treffen später am Ionendetektor auf, als Ionen mit kleinem m/z ¹⁰⁵.

Elektrospray-Ionisierung (ESI) generiert intakte Peptidionen, indem Peptide in saurem Milieu gelöst, durch eine unter Spannung stehende, dünne Nadel geleitet und über eine Strecke mit hoher Potentialdifferenz gesprüht werden. Die elektrostatisch geladenen Tröpfchen verdampfen im Gasstrom. Die anwachsende Ladungsdichte führt zu einem stabilen Spray. Bei der ESI-Ionisierung werden neben einfach geladenen Ionen auch mehrfach geladene Peptidionen gebildet. Zur Massenanalyse der ESI-Ionen wird zum Beispiel die Ionenfalle verwendet. Hier werden die einzelnen Peptidionen isoliert und durch Kollision mit Gasmolekülen (z.B. Helium) fragmentiert. Dabei brechen die Peptide vor allem an ihren Peptidbindungen auf und es entsteht ein charakteristisches Fragmentmuster. Das Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) der Fragmente wird anschließend bestimmt. Oftmals ist ein Ionenfallen-Massenspektrometer mit einem Chromatographieverfahren, z.B. mit einer HPLC (High Performance Liquid Chromatography) gekoppelt, einer so genannten LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)¹⁰⁵.

Heutzutage ist die MS (Massenspektrometrie) basierte Identifizierung von Proteinen das dominierende Verfahren der Proteinanalytik.

2.5 Proteomstudien über die Nebennieren

Jalili et al. 2004 untersuchten das Proteom des bovinen Nebennierenmarkes mit zwei unterschiedlichen massenspektrometrischen Methoden^{81,82}. Das bovine Nebennierenmark wurde einmal mit einer Reversed Phase-HPLC (High Performance Liquid Chromatography) fraktioniert und anschließend mit MALDI-TOF MS analysiert. Es konnten 47 Proteine identifiziert werden⁸². In der zweiten Analyse wurde das bovine Nebennierenmark durch HPLC fraktioniert und mittels Tandemmassenspektrometrie analysiert. Mit dieser Methode konnten 71 Proteine identifiziert werden⁸¹. Gasnier et al. 2004 untersuchten die posttranslationalen Modifikationen

von Chromogranin B aus dem bovinen Nebennierenmark. Dazu wurde Chromogranin B aus den chromaffinen Zellen des bovinen Nebennierenmark gereinigt, enzymatisch gespalteten, über eine Flüssigkeitschromatographie fraktioniert und massenspektrometrisch analysiert. Es konnten 18 posttranslationale Modifikationen detektiert werden⁵¹. Brouwers et al. 2005 untersuchten das Serumproteom von Phäochromozytom-Patienten. Bei einem Phäochromozytom handelt es sich um einen Katecholamin-produzierenden Tumor der chromaffinen Zellen vor allem im Nebennierenmark. Ziel der Studie war es, Biomarker zu entdecken, um benigne von malignen Entwicklungen unterscheiden zu können²². Marengo et al. 2004 untersuchten auf Proteomebene Nebennieren von gesunden und an Neuroblastomen erkrankten Nacktmäusen. Der Vergleich des Proteinexpressionsmusters beider Stadien erfolgte über eine 2D-Gelelektrophorese. In der sich anschließenden MALDI-TOF Analyse konnten 14 differentiell abundante Proteinspots identifiziert werden¹¹³.

Die Humane Proteom Organisation (HUPO) wurde 2001 gegründet um die Proteomforschung im humanen Bereich verstärkt voranzutreiben. Unter ihrer Schirmherrschaft wurden das Humane Plasma-Proteomprojekt, das Humane Leber-Proteomprojekt und das Humane Gehirn-Proteomprojekt gegründet.

Über das Proteom der Nebenniere gibt es nur wenige Studien, einzig die bovine Nebenniere, genauer gesagt das Nebennierenmark wurde, wie bereits erwähnt, genauer analysiert. In dieser Arbeit wurden die Nebennieren von Mäusen, mit der GH/IGF-I Achse als genetischen Hintergrund, zum allerersten Mal auf Proteomebene untersucht.

2.6 Vorarbeit und Zielsetzung

In einer Vorarbeit dieser Studie wurden PEPCK-bGH transgenen Mäusen mit CMV-mIGFBP-2 transgenen Mäusen gekreuzt, um die Rolle von IGFBP-2 in der postnatalen Wachstumsregulation zu klären. Dadurch entanden vier Genotypen: doppeltransgene (GB), bGH transgene (G), mIGFBP-2 transgene (B) und nichttransgene (WT = Wildtyp) Mäuse. Das Körpergewicht war bei den 15 Wochen alten männlichen Nachkommen der Gruppe GB im Vergleich zur Gruppe G um 17% und der Gruppe B im Vergleich zur Gruppe WT um 13% reduziert. So konnte in vivo zum ersten Mal gezeigt werden, dass IGFBP-2 das GH-stimulierte Wachstum

hemmt⁶⁷. In einer weiterführenden Studie, der zentralen Vorarbeit für diese Studie, wurde der GH- bzw. IGFBP-2- Effekt speziell auf die Nebennieren der bereits erwähnten vier Genotypen untersucht. Das absolute Gewicht der Nebennieren war signifikant erhöht bei den fünf Wochen und den vier Monate alten der bGH transgenen (G) Mäuse im Vergleich zu den nichttransgenen WT (=Wildtyp) Mäuse und den mIGFBP-2 transgenen (B) Mäuse. Die Überexpression von IGFBP-2 in doppeltransgenen (GB) Mäusen reduzierte den GH-Effekt um 26% in den fünf Wochen alten bzw. um 37% in den vier Monate alten Tieren. Durch umfangreiche stereologische Untersuchungen an den Nebennieren von allen vier Genotypen (G, GB, B und WT Mäuse) ergab sich der hochinteressante Befund, dass die GH-induzierte Hypertrophie der Zona fasciculata-Zellen durch die gleichzeitige Überexpression von IGFBP-2 signifikant reduziert wurde, wohingegen die Hyperplasie der Zellen nicht beeinflusst wurde⁶⁵. Die inhibitorischen Wirkung von IGFBP-2 auf die GH/IGF-I induzierten Hypertrophien der Nebennierenrindenzellen bietet einen hervorragenden Ausgangspunkt für die systematische Analyse der Mechanismen der Zellgrößenkontrolle.

Eine Proteinanalyse auf Signalebene und eine holistische Proteomanalyse sind zwei Strategien, um die Zellgrößenregulation dieses Mausmodels näher zu beleuchten.

Das Ziel dieser Studie war es, eine holistische Proteomanalyse der Nebennieren von Mäusen durchzuführen und zu versuchen, Kandidatenproteine mit Relevanz für das Nebennierenwachstum zu identifizieren. Dazu wurden zwei Vergleiche vorgenommen: bGH transgene Mäuse (G) versus nichttransgene Mäuse (WT) und bGH transgene Mäuse (G) versus bGH/mIGFBP-2 transgener Mäuse (GB).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

| Substanz | Firma |
|--|-------------------------|
| Acetonitril (ACN) | Roth |
| Acrylamid-Lösung (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1) | Serva |
| Agarose | Invitrogen |
| Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄ | Merck |
| Ammoniumperoxidisulfat (APS) | Merck |
| Bromphenolblau | Merck |
| Bovine Serum Albumine (BSA) | Sigma |
| Calibration Mixture 2 (Kalibrations-Mix f. MS) | Applied Biosystems |
| 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS) | Sigma |
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | Sigma |
| α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA) | Applied Biosystems |
| Dithioerythritol (DTE) | Roth |
| dNTP Set (100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | MBI Fermentas |
| EDTA | Merck |
| Eisessig | Roth |
| Ethanol | Roth |
| Ether (Narkose) | Merck |
| Ethidiumbromid (10 mg/ml) | Roth |
| Glycerin | Roth |
| Glycin | Roth |
| Harnstoff | Roth |
| Iodacetamid | Sigma |
| Isopropanol | Roth |
| L-Lysin-monohydrochlorid | Sigma |
| β-Mercaptoethanol | Sigma |
| Methanol | Roth |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck |
| Natriumlaurylsulfat (SDS) | Serva |
| N,N-Dimethylformamid (DMF) | Roth |
| N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth |
| Pharmalyte 3-10 | GE Healthcare |
| Phosphorsäure (85%) | Merck |
| Proteinase K (20 mg/ml) | Roche |
| Roti [®] -Blue (kolloidale Coomassie-Färbung) | Roth |
| Salzsäure HCl (25%) | Merck |
| SYPRO Ruby | laboreigene Herstellung |
| Trypsin (porzines) | Promega |

Material und Methoden

| | |
|---|-------|
| Trifluoressigsäure (TFA) | Fluka |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Roth |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | Roth |

| | |
|--|---------------|
| Molekulargewichtsstandard für DNA: | |
| pUC Mix Marker 8 | MBI Fermentas |
| Molekulargewichtsmarker für Proteine: | |
| Dalton Mark VII-L | Sigma |

3.1.2 Verbrauchsmaterialien, Kits

| Produkt | Firma |
|--|----------------------|
| DryStrip Cover Fluid | GE Healthcare |
| Electrode Strips | GE Healthcare |
| Falcon Röhrchen (15 ml und 50 ml) | TPP |
| Immobiline DryStrips (pH 4–7 und 3-10; 18cm) | GE Healthcare |
| ZipTip U-C18 Pipettenspitzen | Millipore |
| PD-Desalting Columns [®] | Amersham Biosciences |
| Pipettenspitzen 0,5–10 µl | Gilson |
| Pipettenspitzen 2–200 µl | Brand |
| Pipettenspitzen 50–1000 µl | Brand |
| QIAshredder | Qiagen |
| Sample Cups (für "Cup-Loading") | GE Healthcare |
| Safe-Lock Tubes 1,5 und 2,0 ml | Eppendorf |
| Skalpelle Cutoff | Braun |
| 96-fach PCR-Reaktionsgefäße | ABgene |
| Filterpapier (ø 240 mm) | Schleicher & Schuell |

| Kit | Firma |
|--|---------------|
| Taq DNA Polymerase Kit | Qiagen |
| HotStar Taq DNA Polymerase Kit | Qiagen |
| Wizard genomic DNA purification kit [®] | Promega |
| CyDye DIGE minimal labeling kit | GE Healthcare |

3.1.3 Geräte

| Gerät | Firma |
|---|------------------|
| Analysenwaage 2357 | Sartorius |
| Brutschrank | Heraeus |
| Eagleeye II | Stratagene |
| Fluoreszenzscanner Typhoon 9400 | GE Healthcare |
| Gelkammern für Agarosegele | MWG-Biotech |
| Gewebe-Homogenisator: Art-Micro D8 | ART Labortechnik |
| LTQ Linear Ion Trap ESI mass spectrometer | Thermo-Finnigan |

| | |
|---|-----------------------|
| 4700 MALDI-TOF/TOF [®] Analyzer | Applied Biosystems |
| Magnetrührer | Omnilab |
| Mini Protean II | BioRad |
| Multiphor II (IEF-Apparatur) | GE Healthcare |
| pH-Meter 761 Calimatic | Knick |
| Powersupply POWER PAC 3000 | BioRad |
| Protean II xi Cell | BioRad |
| Rehydratisierungskassette ("Reswelling tray") | GE Healthcare |
| Ultraschallbad: Sonorex RK 100 | Bandelin |
| Spectrophotometer DU-65 | Beckman |
| SpeedVac | Bachhofer |
| Stereolupe (Stemi DV 4) | Zeiss |
| T3 Thermocycler (PCR) | Biometra |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf |
| Thermostat (für Protean II xi Cell) | Eppendorf |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Zentrifuge GS-15R | Beckmann |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf |

3.1.4 Software

| Software | Firma |
|---|--------------------|
| DeCyder, Version 6.5 | GE Healthcare |
| ImageQuant 5.2 | GE Healthcare |
| MASCOT MS/MS search engine, Version 2.1 | Matrix Science |
| ProteomWeaver, Version 2.2 | Definiens |
| GPS Explorer, Version 3.6 | Applied Biosystems |

3.1.5 Wasser

Es wurde immer Reinstwasser nach Ultrafiltration (Milli-RO Plus 60, Millipore) verwendet. Für die PCR wurde autoklaviertes Reinstwasser (s.o.) verwendet. In der LC-MS/MS Analyse kam Reinstwasser von Merck (LiChrosolv[®]) zum Einsatz.

3.2 Versuchstiere und Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Das Probenmaterial (Nebennieren) für diese Arbeit kam von IGFBP-2 sowie von bGH transgenen Mäusen. Dazu wurden weibliche hemizygot Mäuse, die das Maus (m) IGFBP-2 unter der transkriptionellen Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors überexprimieren⁶⁶, mit männlichen hemizygoten Mäusen, die das bovine Wachstumshormon (bGH) unter der Kontrolle des Ratten-Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK)-Promotors überexprimieren, verpaart⁶⁷. Dadurch wurden vier verschiedene genetische Gruppen von Nachkommen generiert (siehe Abbildung 4).

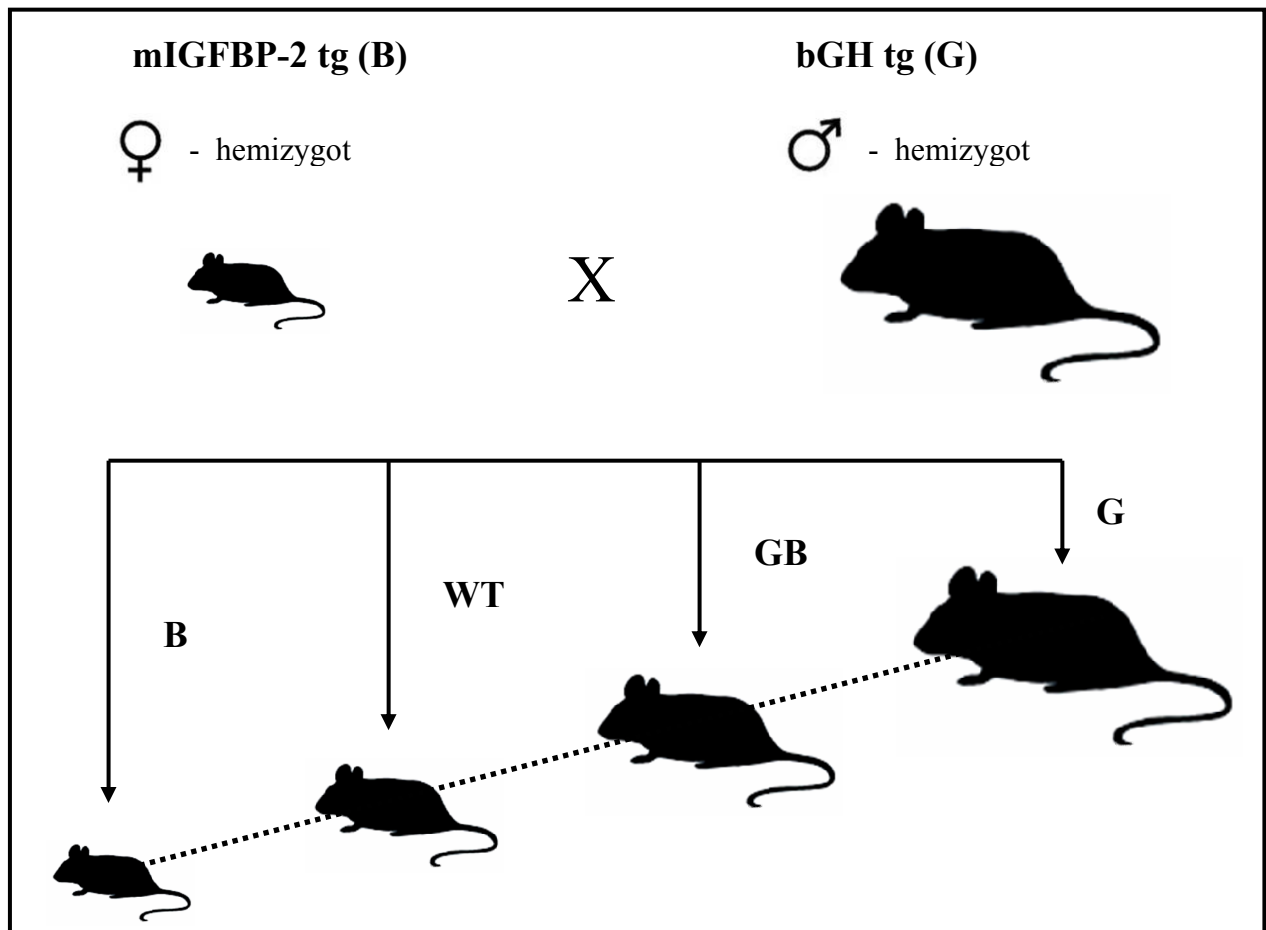


Abbildung 4: Nach dem Mendelschen Gesetz ergeben sich vier verschiedene Genotypen innerhalb der F₁-Generation: Tiere, die beide Genotypen tragen (GB), bGH transgene Tiere (G), mIGFBP-2 transgene Tiere (B) und nichttransgene Tiere (WT).

Das PEPCK-bGH transgene Mausmodell war ursprünglich auf einem C57BL/6 x SJL Hintergrund erzeugt worden und wurde von Dr. T. E. Wagner, Edison Biotechnology Center, Ohio University, zur Verfügung gestellt^{114,177}. Die hemizygoten Mäuse, die für diese Studie zum Einsatz kamen, wurden bis zur 12. Generation bei Charles River auf einen NMRI Hintergrund gezüchtet⁶⁷.

Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogen-freien (SPF) Bedingungen bei 22°C, 65% Luftfeuchtigkeit und einem 12 h Lichtprogramm (Hell-Dunkelrhythmus) gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu einem Standard-Nagerfutter (V1534, Ssniff, Soest) und Wasser. Die Tiere wurden bis zu einem Alter von drei Wochen gemeinsam mit den Muttertieren in einer Gruppe gehalten und dann nach Geschlechtern getrennt abgesetzt. Es wurden ausschließlich die Nebennieren der männlichen Tiere verwendet. Zum Zeitpunkt des Absetzens wurden den Tieren unter Äthernarkose die letzten 2-3 mm des Schwanzes mit einer sterilen Schere entfernt. Diese Schwanzbiopsien wurden für die Genotypisierung verwendet.

3.2.2 Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen

Für die Genotypisierung wurde zunächst aus den Schwanzbiopsien die DNA mittels des Wizard genomic DNA purification kit[®] (Promega) gemäß der Angaben des beiliegenden Protokolls isoliert. Die Schwanzspitzen wurden mit 637,5 µl Puffer bei 56°C in einem Thermomixer über Nacht inkubiert.

Zusammensetzung des Puffers:

| | | |
|---------------------------------|---|-------------------|
| 120 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 | } | pro Schwanzspitze |
| 500 µl Nuclei Lysis Buffer | | |
| 17,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) | | |

Am folgenden Tag wurden jeder Probe 3 µl RNase A (4 mg/ml) zugesetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach 5 min Abkühlung auf Raumtemperatur wurden je 200 µl Protein Precipitation solution zugegeben, die Proben 20 sec gevortext und 5 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Proben bei 15.000 x g, 20°C für 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung mit 600 µl Isopropanol und die Proben wurden ein weiteres Mal bei 15.000 x g, 20°C für 2 min zentrifugiert. Die entstandenen DNA-Pellets wurden einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde das DNA-Pellet in 100 µl Rehydration Solution gelöst und für eine Stunde bei 56°C inkubiert. Für den PCR-Einsatz wurde die genomische DNA im Verhältnis 1:10 mit PCR-H₂O verdünnt und 1 µl dieser Verdünnung verwendet.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung eines kurzen, genau definierten Teils eines DNA-Strangs. Als Primer werden kurze Oligonukleotide verwendet, die sich innerhalb der gewünschten Sequenz anlagern. Um einen zur DNA komplementären Strang aufzubauen, wird die Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* verwendet. Diese Polymerase ist thermostabil, wodurch sich der Strangaufbau häufig wiederholen lässt, weil nach der Denaturierung ein erneutes Anlagern der Primer möglich wird. Auf diese Weise kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Fragmentes. Alle PCR-Reaktionen für diese Arbeit wurden auf Eis angesetzt.

| Komponenten | Mengen in [µl] |
|--|------------------|
| 10-fach Puffer (Qiagen) | 2,00 µl |
| Magnesiumchlorid (25mM, Qiagen) | 1,25 µl |
| Q-Solution (5-fach, Qiagen) | 4,00 µl |
| d `NTP`s (1mM, Fermentas) | 2,00 µl |
| mIGFBP-2 sense (2 µM) | 2,00 µl |
| mIGFBP-2 antisense (2 µM) | 2,00 µl |
| PCR-H ₂ O | 5,65 µl |
| HotStar Taq Polymerase (5U/µl, Qiagen) | 0,10 µl |
| Genomische DNA (1:10 verdünnt) | 1,00 µl |
| Gesamtvolumen | 20,00 µl |

Tabelle 1: Master-Mix für die IGFBP-2 PCR

| Schritt | Temperatur in °C | Zeit in Minuten |
|------------------------|------------------|---------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C | 15 |
| Denaturierung | 94°C | 1 |
| Primer-Anlagerung | 54°C | 1 |
| Verlängerung | 72°C | 1 |
| | Wiederholungen | 34 mal ab Schritt 2 |
| Finale Verlängerung | 72°C | 10 |

Tabelle 2: Reaktionsbedingungen für die IGFBP-2 PCR

| Komponenten | Mengen in [µl] |
|---------------------------------|------------------|
| 10-fach Puffer (Qiagen) | 2,00 µl |
| Magnesiumchlorid (25mM, Qiagen) | 1,25 µl |
| Q-Solution (5-fach, Qiagen) | 4,00 µl |
| d`NTP`s (1mM, MBI Fermentas) | 4,00 µl |
| bGH sense (2 µM) | 1,00 µl |
| bGH antisense (2 µM) | 1,00 µl |
| PCR-H ₂ O | 5,65 µl |
| Taq Polymerase (5U/µl, Qiagen) | 0,10 µl |
| Genomische DNA (1:10 verdünnt) | 1,00 µl |
| Gesamtvolumen | 20,00 µl |

Tabelle 3: Master-Mix für die PEPCK-bGH PCR

| Schritt | Temperatur in °C | Zeit in Minuten |
|------------------------|------------------|---------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C | 4 |
| Denaturierung | 94°C | 1 |
| Primer-Anlagerung | 54°C | 1 |
| Verlängerung | 72°C | 2 |
| | Wiederholungen | 34 mal ab Schritt 2 |
| Finale Verlängerung | 72°C | 10 |

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für die PEPCK-bGH PCR

Der Master-Mix für die IGFBP-2 bzw. die bGH PCR ist in Tabelle 1 und 3 dargestellt. In Tabelle 2 und 4 sind die PCR-Bedingungen für den IGFBP-2 und den bGH Nachweis aufgeführt. Die PCR wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird verwendet, um Nukleinsäuren nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und anschließend sichtbar zu machen. Die PCR-Produkte werden in einem Gel, bestehend aus Agarose und Puffer, aufgetrennt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die PCR-Produkte wegen ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrer Größe erfolgt aufgrund des Molekularsieb-Effekts des Agarosegels. Die Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich bei linearisierten doppelsträngigen Molekülen im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Zur Bestimmung der Länge der aufgetrennten DNA werden je nach Größe der aufzutrennenden DNA verschiedene Molekulargewichtstandards verwendet.

3.2.4.1 TAE-Agarosegele

Für die Genotypisierung wurden 2%ige Agarosegele angefertigt. Dazu wurde eine entsprechende Menge Agarose in Millipore-H₂O aufgeköcht. Nachdem sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte, wurde das verdampfte Wasser ersetzt und die entsprechende Menge an 50-fach TAE-Puffer für eine 1-fach konzentrierte Gellösung zugesetzt. Der fertigen Gellösung und dem 1-fach Laufpuffer wurde Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente erfolgte bei 5 V/cm für ca. 45 min. Alle Gele wurden unter Verwendung des Stratagene Eagle Eye II dokumentiert. Die Visualisierung erfolgte bei einer Wellenlänge von 366 nm.

Zusammensetzung des 50-fachen TAE-Puffers (1000 ml):

242 g Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) [2 M]

57,1 ml 100%ige Essigsäure

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 [50 mM]

3.3 Nebennierenpräparation

Für den holistischen Proteomvergleich bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse und bGH transgene Mäuse versus bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse wurden Nebennieren dieser 11 Wochen alten, männlichen Genotypen verwendet. Die Nebennierenpräparation fand immer um 10 Uhr vormittags statt. Die Tiere wurden in Äther anästhesiert und mittels Genickbruch getötet. Nach der Eröffnung der Bauchhöhle und der Entfernung des Magen-Darmtrakts wurden die Nebennieren vorsichtig entnommen und auf eine frische Petrischale verbracht. Bei den bGH transgenen und den bGH/mIGFBP-2 transgenen Mäuse war die Leber sehr groß, so dass diese mit Hilfe von Stecknadeln zur Seite verbracht wurde, umso besser präparieren zu können. Nach der Entnahme jeweils beider Nebennieren einer Maus wurden diese unter der Stereolupe auf einer gekühlten Metallplatte innerhalb von 8 Minuten von dem sie umhüllenden Organfett befreit und einzeln gewogen. Im Anschluss daran kamen die Nebennieren sofort auf Trockeneis, um gleichmäßig durchzufrieren. Für die proteomanalytischen Experimente wurden immer beide Nebennieren einer Maus verwendet.

3.3.1 Zellaufschluss der Nebennieren

Für den Zellaufschluss wurden beide Nebennieren je einer Maus in ein 2 ml Eppendorfgefäß verbracht und 350 µl Lysepuffer für eine normale 2D-Gelelektrophorese bzw. 350 µl „Labeling-Buffer“ für eine 2D-DIGE Analyse hinzu pipettiert. Der Unterschied zwischen beiden Lysepuffern besteht darin, dass der „Labeling-Buffer“ kein DTE enthält, da dieses die Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen negativ beeinträchtigen würde (siehe Tabelle 5). Die beiden Nebennieren sind mittels eines Homogenisators (Art-Micro D8) zweimal für je 30 sec. zerkleinert worden. Zwischen der ersten und zweiten Zerkleinerung der Organe stand das Eppendorfgefäß auf Eis, damit die Wärme, die beim Homogenisieren entstand, abgeführt werden konnte. Zwischen jeder neuen Organprobe wurde der Homogenisatorstab mit einer 1 M NaOH-Lösung, danach mit Millipore-H₂O und zuletzt mit Lysepuffer benetzt. Die homogenisierten Nebennieren wurden zum besseren Zellaufschluss für 5 min in ein mit Eis gekühltes Ultraschalbad gegeben. Die Viskosität der erhaltenen Proteinlösung wurde mittels QIAshredder[®] durch abzentrifugieren für 2 min bei 6000 x g reduziert. Die abzentrifugierte Proteinlösung

wurde in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

| „Normaler“ Lysepuffer | DIGE-Lysepuffer |
|-----------------------|------------------------------------|
| 8 M Harnstoff | 8 M Harnstoff |
| 40 mM Tris | 40 mM Tris |
| 4% w/v CHAPS | 4% w/v CHAPS |
| 65 mM DTE | pH-Wert 8,5 mit 25% HCl einstellen |

Tabelle 5: Zusammensetzung des „Normalen“ und des DIGE-Lysepuffers

Die hohe Konzentration des Harnstoffs (8 M), einem nichtionischen Chaotrop, dient der Verbesserung der Löslichkeit der Proteine. Zusätzlich wird die Löslichkeit hydrophober Proteine durch das zwitterionische Detergenz CHAPS erhöht. Zusätzlich wurde mit DTE reduziert, damit die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen aufbrechen.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte mit dem Bradford-Test¹⁹. Dieser ist etwa um den Faktor zwei sensitiver als andere Tests (Lowry- oder BCA-Test) und ist somit der empfindlichste quantitative Färbetest¹⁰⁵. Der saure Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bindet an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine (v. a. an Arginin-Reste) und bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm (ungebunden) nach 595 nm. Mit einer 100 µg/ml BSA-Lösung (Pipettierschema siehe Tabelle 6) wurde eine Kalibriergerade erstellt (siehe Abbildung 5).

Bradford-Lösung:

0,01% Coomassie G-250

5% Ethanol (99%ig)

10% H₃PO₄ (85%ig)

| Gesamtvolumen pro Ansatz = 100 µl | | | | | | | | | |
|--|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Pro Ansatz werden 1 ml Bradford-Lösung zugegeben | | | | | | | | | |
| Proteinkonzentration µg/ml | 0 | 12,5 | 25 | 37,5 | 50 | 62,5 | 75 | 87,5 | 100 |
| Volumen Protein in µl | 0 | 12,5 | 25 | 37,5 | 50 | 62,5 | 75 | 87,5 | 100 |
| Volumen H ₂ O in µl | 100 | 87,5 | 75 | 62,5 | 50 | 37,5 | 25 | 12,5 | 0 |
| Absorption bei 595 nm | 0 | 0,052 | 0,128 | 0,190 | 0,288 | 0,358 | 0,400 | 0,465 | 0,548 |

Tabelle 6: Erstellen einer Bradford-Kalibriergerade

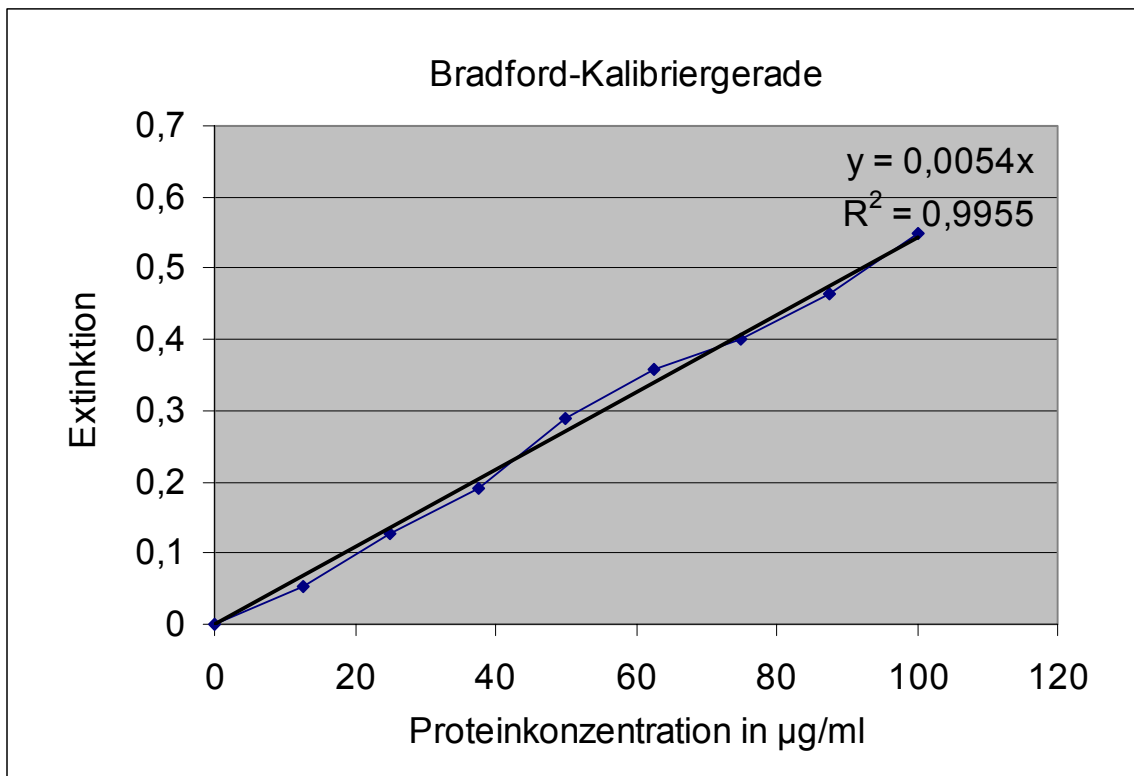


Abbildung 5: Bradford-Kalibriergerade

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration eines Lysates wurden drei Verdünnungen hergestellt: 1:100, 1:75 und 1:50. Pro Verdünnung wurde 1 ml Bradford-Lösung hinzugefügt und die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über eine Bradford-Kalibriergerade bestimmt.

3.4 Proteinauftrennung mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, muss die Eigenladung der Proteine überdeckt werden, da je nach pH-Wert des Puffers Proteine in einem Gemisch unterschiedliche Nettoladungen mit unterschiedlichen Vorzeichen hätten. SDS (Natriumdodecylsulfat; engl.: Sodiumdodecylsulfat) ist ein negativ geladenes Detergenz, das die Tertiärstruktur der Proteine denaturiert, indem es durch Anlagerung sowohl Wasserstoffbrückenbindungen, als auch hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Proteinkette zerstört und es so zu einer „Linearisierung“ des Proteins kommt. Da sich pro 3 Aminosäuren je ein SDS-Molekül anlagert, sind alle Protein-SDS-Komplexe negativ geladen und wandern während der Elektrophorese zur Anode. Aufgrund der hohen Auflösung wird heutzutage noch das von Laemmli 1970 eingeführte, SDS-haltige, diskontinuierliche Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt⁹¹. Das Gel besteht hierbei aus zwei Teilen, dem grobmaschigen Sammelgel (pH 6,8) und dem engmaschigen Trenngel (pH 8,8). Im Sammelgel dient als Leitton Cl⁻ und als Folgeion Glycin, welches bei pH 6,8 kaum geladen ist. Die Proteine werden entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilitäten konzentriert, so dass ein „Proteinstapel“ entsteht. Dieser „Stapel“ bewegt sich relativ langsam zum Trenngel. Beim Übergang in das Trenngel wird Glycin deprotoniert und läuft als geladenes kleines Molekül vor der Proteinbande. Die Proteine werden beim Übergang in das engmaschige Trenngel gebremst, was eine Bandenschärfung zur Folge hat. Da die elektrophoretische Mobilität nun nur von der Größe des Proteins abhängt, ein annähernd konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis der Protein-SDS-Komplexe vorausgesetzt, werden diese nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

3.4.1 Eindimensionale SDS-PAGE

Die Proteinlysate wurden vor der eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese mit einem 2-fach Probenpuffer nach Laemmli⁹¹ gemischt (siehe Tabelle 7) und bei 95°C für 5 min in einen Thermomixer inkubiert. Das Erhitzen auf 95°C und die Zugabe von reduzierendem β-Mercaptoethanol (Aufbrechen der Disulfidbrücken) führen zur vollständigen Denaturierung der Proteine.

| 2-fach-Probenpuffer (nach U.K. Laemmli; 1970) | | |
|--|---------|------------------|
| | Volumen | Endkonzentration |
| 0,5 M Tris-HCl-Lösung, pH 6,8 | 1,0 ml | [0,0625 M] |
| 10%ige SDS-Lösung | 1,6 ml | [2% w/v] |
| 100%iges Glycerin | 0,8 ml | [10% w/v] |
| β-Mercaptoethanol | 0,4 ml | [5% w/v] |
| 0,8%ige Bromphenolblaulösung | 0,4 ml | [0,04% w/v]* |
| auf 8 ml mit Millipore-H ₂ O auffüllen. | | |
| *Original nach Laemmli: 0,001% BPB | | |

Tabelle 7: Zusammensetzung des 2-fach Probenpuffers

Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels entsprach exakt den Gelkonzentrationen für die 2D-Gelelektrophorese (siehe unter 3.4.2.2). Die 1D-Gelelektrophorese wurde im Mini Protean II-System mit 1-fach Laufpuffer (Rezept für 5-fach Laufpuffer siehe unter 3.4.2.2.1) durchgeführt. Eine Auftrennung wurde durch das Anlegen einer Spannung von 100 Volt für zirka 60 min erreicht.

3.4.2 Hochauflösende 2D-SDS-PAGE

Die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese, die eine Kombination einer isoelektrischen Fokussierung in der ersten und einer SDS-PAGE in der zweiten Dimension darstellt, ist bis heute noch Methode der Wahl, um komplexe Proteingemische zu analysieren. Sie hat ein sehr hohes Auflösungsvermögen. Man unterscheidet die Methode nach O'Farrell¹³¹ und Klose⁸⁸, bei der der pH-Gradient während der Fokussierung mit Hilfe von Trägerampholyten ausgebildet wird und die Methode nach Bjellqvist¹⁴, bei der in der ersten Dimension immobilisierte pH-Gradienten eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich immobilisierte pH-Gradienten verwendet.

3.4.2.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Es wurden nur kommerziell erhältliche immobilisierte pH-Gradienten (IPG-Strips von GE Healthcare) im pH-Bereich 4-7 verwendet. Die Gelstreifen (IPG-Strips) für präparative Gele (500 µg Gesamtprotein) wurden im „Reswelling Tray“ von GE Healthcare rehydratisiert. Dabei wird die Rehydratisierungslösung (siehe unten) zusammen mit dem Proteinlysat in eine Vertiefung des „Reswelling Trays“ pipettiert und der Gelstreifen kommt mit der Gelseite nach unten auf diese Lösung, wird mit 2-3 ml Plus One Dry Strip Cover Fluid[®] (Mineralöl) bedeckt und über Nacht (15 h) in einem kühlen Raum rehydratisiert. Für analytische Gele (100 bzw. 150 µg Gesamtprotein bei DIGE–Gelen) wurden die Gelstreifen zwischen zwei Glasplatten gelegt und der Rehydratisierungspuffer mittels einer 25 ml Spritze über einen Silikonschlauch in den Spalt verbracht. Die Dichtung der Glasplatten bestand seitlich aus zwei Gummidichtungen, die durch Klammern fest aneinander gepresst wurden. Die Proteinlysate werden in der Regel über Probenaufgabetrichter mit einem Fassungsvermögen von je 100 µl an der Anode der Multiphor II (= IEF-Apparatur) aufgetragen (sog. „Cup-Loading“). Falls das Fassungsvermögen eines Probenaufgabetrichters zu gering war, wurde zusätzlich an der Kathode ein Probenaufgabetrichter befestigt. So konnten insgesamt 200 µl Proteinlysat aufgetragen werden. Für präparative Gele mit einem Gesamtproteingehalt von 500 µg wurde das Proteinlysat, wie bereits oben erwähnt, zusammen mit der Rehydratisierungslösung in die Gelstreifen eingequollen. Die Erfahrung hat gezeigt, dass das Auftragen der Proben mittels der Probenaufgabetrichter ein etwas schärferes Proteinmuster erzeugte.

Rehydratisierungslösung:

| | |
|----------------------------------|----------|
| Harnstoff | [8 M] |
| CHAPS | [4% w/v] |
| DTE | [13 mM] |
| Pharmalyte [®] pH 3 -10 | [1% w/v] |

+ eine Spatelspitze Bromphenolblau

Die Steuerung der IEF erfolgte über zwei Programme:

| pH 3-10: | pH 4-7: |
|---------------------------|---------------------------|
| 500 V für 2 h | 500 V für 2 h |
| Rampe auf 3500 V in 1,5 h | Rampe auf 3500 V in 1,5 h |
| 3500 V für 10 h | 3500 V für 1 h |
| 5000 V für 1 h | 5000 V für 1 h |
| Insgesamt 44 kWh 14,5 h | Insgesamt 51 kWh 16,5 h |

Die fertig fokussierten Gelstreifen wurden in einer Petrischale bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

3.4.2.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die für die zweite Dimension verwendeten SDS-Polyacrylamidgele wurden jeweils am Vortag gegossen. Die Polymerisierung erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

Herstellung eines 12%igen Trenngels:

| | | |
|-------------------------------|----------|-----------------------|
| H ₂ O | 13,40 ml | |
| 1,5 M Tris-HCl-Lösung, pH 8,8 | 10,00 ml | |
| Acrylamid (30%ig) | 16,00 ml | |
| 10%ige SDS-Lösung | 0,40 ml | → für 15 min entgasen |
| 10%ige APS-Lösung | 0,20 ml | |
| TEMED | 0,02 ml | |

Nach Zugabe der ersten drei Komponenten des Trenngels wurde diese für 15 min entgast. Die fertig hergestellte Gellösung wurde umgehend gegossen und anschließend mit H₂O zügig überschichtet. Das Sammelgel wurde am nächsten Tag gegossen.

Herstellung eines 4%igen Sammelgels:

| | |
|-------------------------------|---------|
| H ₂ O | 6100 µl |
| 0,5 M Tris-HCl-Lösung, pH 6,8 | 2500 µl |
| Acrylamid (30%ig) | 1300 µl |
| 10%ige SDS-Lösung | 100 µl |
| 10%ige APS-Lösung | 50 µl |
| TEMED | 10 µl |

3.4.2.2.1 Vorbereitung der IPG-Streifen für die 2. Dimension

Bevor die fokussierten Gelstreifen für die 2. Dimension eingesetzt wurden, mussten sie equilibriert werden. Das Equilibrieren mit DTE reduziert die Proteine, d.h. es spaltet die Disulfidbrücken auf, so dass die Proteine in „linearisierter“ Form vorliegen. Iodacetamid bewirkt eine Alkylierung von Thiolen. Pro Gelstreifen wurden in je 15 ml Equilibrierungspuffer (siehe unten) jeweils 1% DTE und 2,5% Iodacetamid eingewogen. Um eine sichtbare Lauffront in der 2. Dimension zu erkennen, wurden der 2,5%igen Iodacetamidlösung zusätzlich eine Spatelspitze Bromphenolblau hinzugefügt. Für eine optimale Equilibrierung der Gelstreifen wurden diese bei 100 U/min auf einen horizontalen Schwenker für jeweils 15 min bewegt. Die Gelstreifen wurden mit einer 0,5%igen Agaroselösung oberhalb des Sammelgels fixiert. Es wurde ein Molekulargewichtsmarker (Dalton Mark VII-L, Sigma) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in einer auf 8°C gekühlte Gelelektrophoresekammer (Protean II xi Cell, Biorad) zusammen mit zwei Litern 1-fach Laufpuffer (5-fach Laufpuffer siehe unten) durchgeführt. Eine Auftrennung wurde erreicht durch eine Stromstärke (pro Gel) von 30 mA für exakt 30 min und 40 mA für zirka 2 h und 45 min.

5-fach Laufpuffer (1000 ml):

| | | |
|------|--|------------|
| 15 g | Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) [125 mM] | |
| 72 g | Glycin | [960 mM] |
| 5 g | SDS | [0,5% w/v] |

Equilibrierungspuffer (250 ml):

| | | |
|--------|-------------------------------|-----------|
| 25 ml | 0,5 M Tris-HCl-Lösung, pH 6,8 | [50mM] |
| 90,1 g | Harnstoff | [6 M] |
| 86 ml | 87%ige Glycerinlösung | [30% v/v] |
| 5g | SDS | [2% w/v] |

Nach der Auftrennung der Proteine hinsichtlich ihres Molekulargewichts wurde das Proteinmuster durch spezifische Färbungen visualisiert. Die hier verwendeten Färbungen waren zum einen die kolloidale Coomassiefärbung (Roti[®]Blue, Roth) für präparative Gele und die Fluoreszenzfärbung mittels Sypro Ruby für analytische Gele. Auf eine weitere, hier verwendete Fluoreszenzmarkierung (2D-DIGE) zur Visualisierung für analytische Gele wird in dem Abschnitt 3.6 genauer eingegangen.

a) Kolloidale Coomassie-Färbung (Roti[®]Blue von Roth)

Prinzip der Färbung:

Roti[®]Blue ist eine kolloidale Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbung für u.a. Proteine in Polyacrylamidgelen. Aufgrund seiner kolloidalen Eigenschaften bindet der Farbstoff an die Proteine und nur minimal an die Gelmatrix. Dadurch entfallen länger andauernde Waschschrte zur Hintergrundentfärbung gegenüber nicht-kolloidalen Coomassie-Färbungen. Die Roti[®]Blue Färbung ist MS-kompatibel.

Benötigte Lösungen:

1. Fixierlösung für 1 Liter: 10 ml o-Phosphorsäure 85%ig, 200 ml Methanol
2. Roti[®]Blue-Färbelösung für 1 Liter: 200 ml Methanol, 600 ml Millipore-H₂O und 200 ml Roti[®]Blue (5-fach Konzentrat)
3. Waschlösung für 1 Liter: 250 ml Methanol (99,8%ig)
4. Stabilisierungslösung für 1 Liter: 200 g Ammoniumsulfat
5. Trocknerlösung für 1 Liter: 100 ml Glycerin (99,5%ig) und 200 ml Ethanol

| Schritte | Lösungen | Ablauf |
|------------------|-------------------------------------|--|
| 1. Fixierung | Fixierlösung | 1 h bei RT fixieren |
| 2. Färbung | Roti [®] -Blue Färbelösung | zirka 12 h bei RT schütteln |
| 3. Waschen | Waschlösung | 5 min bei RT schütteln |
| 4. Stabilisieren | Stabilisierungslösung | Aufbewahrung (bis z. B. zum Spotpicken) |

Tabelle 8: Durchführung der Roti[®]Blue Färbung

b) Sypro Ruby-Färbung

Prinzip der Färbung:

Die färbende Komponente von SYPRO Ruby ist ein organischer Rutheniumkomplex, der nicht-kovalent an Proteine bindet¹⁰. Es ist eine sehr sensitive Fluoreszenzfärbung (1-10 ng/Spot), die einen wesentlich höheren dynamischen Bereich (um 3 Größenordnungen) aufweist, als z.B. die Silberfärbung (ebenfalls 1-10 ng/Spot). Das Emmissionsmaximum von Sybro Ruby liegt bei einer Wellenlänge von 610 nm.

Benötigte Lösungen:

1. Fixierungslösung für 1 Liter: 10% Ethanol und 7% Eisessig
2. Färbelösung für 1 Liter: 20% Ethanol und 20 µl Sypro Ruby
3. Entfärbelösung für 1 Liter: 250 ml Ethanol (25%) und 70 ml Eisessig (7%)

| Schritte | Lösungen | Ablauf |
|--------------|----------------------------|-------------------------------|
| 1. Fixierung | Fixierlösung | 30 min bei RT |
| 2. Färbung | Sypro Ruby-Färbelösung | über Nacht; dunkel lagern |
| 3. Entfärben | Entfärbelösung | zirka 6 h bei RT |
| 4. Waschen | Millipore-H ₂ O | kurz vor dem Scannen der Gele |

Tabelle 9: Durchführung der Sypro Ruby-Färbung

Die fluoreszenzgefärbten Gele wurden mit einem Fluoreszenzscanner (Typhoon 9400 von Amersham) sichtbar gemacht.

3.5 Qualitative Proteomanalyse der Nebennieren mittels 2D-Nano-LC-MS/MS

Eine qualitative Proteomanalyse gibt Aufschluss darüber, welche Proteine in einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment vorhanden sind. Man erhält Protein-Identitäten und kann die Proteine klassifizieren entsprechend der Lokalisation oder bezüglich der Funktion. Somit wird eine molekulare Charakterisierung der Mäusenebennieren auf Proteinebene möglich.

Um die Proteine von Nebennieren identifizieren zu können, wurde in dieser Arbeit eine zweidimensionale LC-MS/MS, sprich eine Flüssigkeitschromatographie (engl.: Liquid Chromatography) gekoppelt mit einer Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) verwendet.

3.5.1 Prinzip der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie (2D-LC)

Die zweidimensionale Flüssigkeitschromatographie besteht, wie der Name es sagt, aus zwei unterschiedlichen Dimensionen. Die erste Dimension ist eine Kationenaustauschchromatographie (engl.: strong cation-exchange SCX), wohingegen die zweiten Dimension eine „Reversed Phase“ Chromatographie darstellt. Ein großer Vorteil dieser Kombination ist es, dass Salzionen der SCX Fraktion, die die MS-Analyse empfindlich stören, durch die „Reversed Phase“ entfernt werden⁵⁰.

In der hier verwendeten Versuchsanordnung (ESI-Online Setup) schließt sich der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie sofort die massenspektrometrische Analyse an, das bedeutet, dass das Eluat der „Reversed Phase“ Chromatographie direkt in das Massenspektrometer gesprüht wird.

3.5.2 Prinzip der ESI-Massenspektrometrie

Dieses Verfahren besteht aus einem Ionisierungsverfahren, der Elektrospray-Ionisierung (ESI) und einer MS/MS = Tandemmassenspektrometrie-Analyse. Bei der ESI-Ionisierung werden neben einfach geladenen Ionen auch mehrfach geladene Peptidionen gebildet. Im Anschluss daran werden die einzelnen Peptidionen in der Ionenfalle isoliert und fragmentiert. Die Massen der Fragmente werden bestimmt, man spricht dabei von einem MS/MS-Spektrum.

Erst durch die Kombination von MS und MS-MS Daten erfolgt die Identifizierung der Peptide bzw. Proteine.

3.5.3 Durchführung der qualitative Proteomanalyse der Nebennieren ohne Vorfraktionierung

Beide Nebennieren einer zirka sieben Monate alten, männlichen C57BL/6N Maus wurden lysiert (siehe unter 3.3.1) und der Gesamtproteingehalt bestimmt (siehe unter 4.4). Als nächsten Schritt schloss sich eine Alkylierung der Proteine im Lysat für zehn Minuten durch Zugabe von 325 mM Iodacetamid an (2,12 mg Iodacetamid für 50 µg Gesamtprotein).

Die Entsalzung des Proteinlysates erfolgte mit PD-Desalting Columns[®] von Amersham Biosciences. Die Säulenvorbereitung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Es wurden 50 µg in 35,2 µl Proteinlysate aufgetragen und mit je 1 ml NH₄HCO₃-Lösung fraktioniert eluiert. Insgesamt erhielt man 10 entsalzten Proteinfractionen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration jeder Fraktion erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (siehe Ergebnisse).

Für die weitere Analyse fanden Fraktionen 3 und 4, die lyophilisiert wurden, Verwendung. Die Fraktionen wurden mittels porcinen Trypsin (Promega; Konzentration der Gebrauchslösung: 1 µg pro 10 µl) über Nacht bei 37°C im Brutschrank hydrolytisch gespalten. Dazu beide lyophilisierten Fraktionen in 40 µl NH₄HCO₃-Lösung gelöst und 10 µl Trypsinlösung dazugegeben. Die so entstandene Peptidlösung wurde lyophilisiert und in 200 µl 1%iger Ameisensäurelösung gelöst. 40 µl der Peptidlösung wurden für die LC-MS/MS Analyse eingesetzt.

3.5.4 Durchführung der qualitativen Proteomanalyse der Nebennieren mit Vorfraktionierung

Für die qualitative Proteomanalyse mit Vorfraktionierung kam das identische Nebennierenlysate einer zirka sieben Monate alten, männlichen C57BL/6N Maus, wie bereits unter 3.5.3 verwendet, zum Einsatz. Das entsalzten und tryptisch gespaltenen Nebennierenlysate wurde zu gleichen Teilen mit 2-fach Probenpuffer nach Laemmli vermischt und für 5 min in einem Thermoblock auf 95°C erhitzt.

Die Vorfraktionierung bestand aus einer eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese mittels Mini Protean[®] von BioRad mit aufsteigenden Proteinkonzentrationen: 12,5 µg;

25 µg; 37,5 µg; 50 µg; 62,5 µg und 70 µg (siehe Abbildung 12). Es wurde mit der 25 µg Bande weitergearbeitet aufgrund der Tatsache, dass die Coomassie-Färbung bei dieser Proteinkonzentration am Ende des dynamischen Bereichs angekommen war und sich die Trennschärfe der einzelnen Banden nicht mehr steigern konnte.

Die 25 µg Bande wurde in 12 Stücke eingeteilt (siehe Abbildung 13), jeweils in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit einer Pipettenspitze zerkleinert. Die Gelstückchen wurden mit einer 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung, die 45 mM DTE beinhaltet, überschichtet und für 30 min bei 55°C inkubiert. Nach der Reduktion der Proteine wurden sie zweimal für je 15 min bei Raumtemperatur, durch eine NH_4HCO_3 -Lösung, die 100 mM Iodacetamid beinhaltet, alkyliert. Die Gelstückchen wurden anschließend zweimal 15 min mit einer 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung gewaschen und wiederum mit der identischen Lösung überschichtet. Für die hydrolytische Spaltung der Proteine wurde porcines Trypsin (Promega) im Verhältnis 1:50 zur Proteinlösung zugesetzt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde jede Lösung in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert. Die Gelstückchen wurden für 10 min mit einer 70%igen Acetonitrillösung bedeckt. Die Acetonitrillösung wurde mit der jeweils bereits abpipettierten Lösung vereinigt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert. Für die anschließende LC-MS/MS Analyse wurden die einzelnen Proben in 40 µl 1%iger Ameisensäurelösung resuspendiert. Die qualitative Proteomanalyse der Nebennieren wurde mit einem LTQ Linear Ion Trap ESI Massenspektrometer von Thermo-Finnigan durchgeführt.

3.6 Quantitative Proteomanalyse der Nebennieren mittels 2D-DIGE

Die zweidimensionale „difference gel electrophoresis“ (= 2D-DIGE) ist eine Methode, bei der die Proteine vor der zweidimensionalen Auftrennung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3, Cy5 und Cy2) markiert werden¹⁷⁵. Das so genannte „Minimal Labeling“ ist eine Möglichkeit, zwei unterschiedliche Proteinlysate, in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Genotypen, hinsichtlich ihres quantitativen Proteinexpressionsmusters zu untersuchen. Ein großer Vorteil der 2D-DIGE Technik gegenüber der herkömmlichen 2D-Gelelektrophorese ist neben der hohen Sensitivität, dass die Normalisierung über einen so genannten internen Standard (engl.: Internal Pooled Standard = IPS), der in jedem Gel mit aufgetrennt wird, läuft. Der interne Standard besteht in der Regel aus einem Gemisch zu jeweils gleichen Proteinmengen aller in einer Analyse verwendeten Proben, der mit Cy2 markiert wird.

Über die Normalisierung ist es, im Gegensatz zu anderen Visualisierungsverfahren möglich, das Abundanzverhältnis eines Proteins in unterschiedlichen Proteinlysaten deutlich reproduzierbarer zu ermitteln, da Variationen zwischen den einzelnen Gelen innerhalb eines Experiments über den internen Standard korrigiert werden. Es wurden zwei vergleichende 2D-DIGE Experimente durchgeführt

1. PEPCK-bGH transgene Mäuse versus Wildtypmäuse (G versus WT)
2. PEPCK-bGH transgene Mäuse versus PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse (G versus GB)

Als Untersuchungsorgan für den Proteomvergleich G versus WT und G versus GB wurden pro Genotyp je fünf Nebennierenpaare von je fünf Tieren verwendet (Daten der Versuchstiere siehe unter 4.4). Die 2D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde im pH-Bereich 4-7 durchgeführt. Pro Genotyp wurden 50 µg Protein eingesetzt und mit jeweils 400 pmol Fluoreszenzfarbstoff (Cy3 und Cy5) markiert (gemäß dem Protokoll von GE Healthcare). Der interne Standard 1 bestand aus je 50 µg Protein aller bGH und aller WT Nebennieren. Der interne Standard 2 wurde aus je 50 µg Protein aller bGH und aller bGH/mIGFBP-2 Nebennieren hergestellt. Der interne Standard 1 und 2 wurde in jeweils einem Arbeitsschritt mit dem Farbstoff Cy2 markiert. Nach der Markierung der Proteine folgte die Auftrennung mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese. Für die erste Dimension wurden je 50 µg einer Cy3 zusammen mit 50 µg einer Cy5 markierten Probe unterschiedlichen Genotyps und 50 µg des entsprechenden internen Standards (1 bzw. 2) vereinigt und anschließend fokussiert (Programm siehe unter 3.4.2.1). Die 2D-DIGE Gele wurden mittels des Fluoreszenzscanners Typhoon 9400 von Amersham Biosciences eingescannt. In Tabelle 10 sind die Scanparameter dargestellt.

| | |
|--------------------------|--|
| Wellenlänge Laser | Cy 2 → 488 nm Cy 3 → 532 nm Cy 5 → 633 nm |
| Photomultiplier | zwischen 500 und 600 V |
| Sensitivity | normal |
| Pixel Size | 100 µm |
| Focal Plane | + 3 mm |
| Scan Area | C2-L10 |
| Press Sample | Yes |

Tabelle 10: Scanparameter des Fluoreszenzscanners Typhoon 9400

Die Spotmuster der 2D-Gele wurden mittels der Software „DeCyder, Version 6.5“ bezüglich der Position und der Intensität verglichen und statistisch ausgewertet.

3.7 Identifikation der differenziell abundanten Proteinspots mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF)

Neben der Elektrospray Ionisierung (ESI) gibt es ein weiteres bedeutendes Ionisierungsverfahren, die Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisierung (MALDI).

3.7.1 Prinzip einer MALDI-TOF/TOF Analyse

Bei dieser Analysemethode werden Peptide mit einer Matrix auf einem festen Träger kristallisiert. Die hier verwendete Matrix ist eine α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure. Die Matrix liegt in einem hohen molaren Überschuss im Vergleich zum Analyten vor und bewirkt beim Beschuss durch einen Laser die Verdampfung und Ionisation der Peptide. Dieser Prozess wird im Hochvakuum durchgeführt. Nach der MALDI-Ionisierung liegen die Peptidionen meist einfach protoniert vor. In der Massenspektrometrie wird immer das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) gemessen. TOF („Time Of Flight“)-Geräte werden häufig in Kombination mit MALDI-Ionisierungsquellen eingesetzt. Das Prinzip dabei ist, dass die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Dann wird die Flugzeit der Ionen in einem Flugrohr gemessen. Ionen mit einem hohen Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) treffen später an dem Ionendetektor auf, als Ionen mit kleinem m/z . Die Flugzeiten liegen im μ s Bereich und die Flugstrecken bei mehreren Metern. Um die Auflösung und die Massengenauigkeit des Analysators zu erhöhen, besitzen viele Massenanalysatoren Ionenreflektoren. Diese bremsen die angekommenen Ionen ab und beschleunigen sie dann in entgegengesetzter Richtung. Hierbei dringen schwerere Ionen tiefer in den Reflektor ein als leichtere. Ionen mit gleichem m/z werden dabei fokussiert, was zu einer höheren Auflösung der Messung führt.

3.7.2 Probenvorbereitung für die MALDI-TOF/TOF Analyse

Nach der Auswertung der analytischen Gele mittels der Software DeCyder, Version 6.5[®] (GE Healthcare) wurden präparative Gele (500 μ g Gesamtprotein) hergestellt und mit der kolloidalen Coomassie-Färbung Roti[®]Blue gefärbt. Die differenziell abundanten Spots wurden mit präparierten 200 μ l Pipettenspitzen (gekürzt auf einen Durchmesser von zirka 2-3 mm) aus dem Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel ausgestochen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinspots wurden

zweimal für 15 min mit jeweils 500 µl Millipore-H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Spots zweimal für 15 min mit 50 mM NH₄HCO₃-Lösung inkubiert. Die Proteine müssen in Peptide gespalten werden, da die MALDI-TOF/TOF Analyse nur auf Peptidebene funktioniert. Hierfür wurden die Spots mit einer Pipettenspitze zerkleinert, mit 20 µl einer 50 mM NH₄HCO₃-Lösung überschichtet und pro Spot 70 ng Trypsin-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz inkubierte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Am nächsten Tag wurde jede Lösung ohne Gelstückchen in frische 1,5 ml Eppendorfgläser abpipettiert und auf Eis gestellt. Die Gelstückchen wurden erneut mit 40 µl einer 50 mM NH₄HCO₃-Lösung überschichtet, abpipettiert und mit den auf Eis stehenden Lösungen vereinigt. Die Gelstückchen wurden mit einer 70%igen Acetonitril-Lösung für 15 min gewaschen und wiederum mit den jeweiligen Lösungen auf Eis vereinigt. Die Peptidlösungen wurden in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert.

Um das Salz, das die Identifizierung der Proteine stört, zu entfernen, kamen ZipTips[®] von Millipore zum Einsatz. ZipTip-Säulen sind Pipettenspitzen mit einem Volumen von 10 µl, an deren Ende ein Reversed-Phase Chromatographiematerial eingebettet ist. Dieses besteht aus aliphatischen C₁₈-Kohlenstoffwasserketten, die kovalent an Kieselsäure gebunden sind. An dieses Material binden die Peptide in der Lösung. Damit die Bindung optimal funktioniert, sollte die Lösung einen pH-Wert von unter 4 aufweisen. Die lyophilisierten Peptidlösungen wurden aus diesem Grund in je 10 µl einer 0,5%igen TFA-Lösung rekonstituiert und für zirka 5 min in ein Ultraschallbad zur besseren Lösung gegeben. Die ZipTip-Säulen wurden zweimal mit einer 50%igen Acetonitril-Lösung + 0,1% TFA angefeuchtet und anschließend zweimal mit einer 0,1%igen TFA-Lösung equilibriert. Das Waschen der ZipTip-Säulen erfolgte jeweils zweimal mit 5%iger Methanol-Lösung + 0,1% TFA und mit 0,1%iger TFA-Lösung. Die gebundenen Peptide wurden direkt mit der Matrix-Lösung auf ein Opti-TOF[®]MALDI target eluiert. Damit eine möglichst exakte Messung durchgeführt werden konnte, musste das Massenspektrometer vor jeder Messung neu kalibriert werden. Hierfür diente ein Kalibrations-Mix (Applied Biosystems), der eine Mischung von Peptiden bekannter Masse enthält.

Matrix-Lösung:

50% Acetonitril

0,1% Trifluoressigsäure (TFA)

5 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxymizimtsäure

3.7.3 Durchführung der MALDI-TOF/TOF Analyse

Das präparierte Opti-TOF[®] MALDI Target wurde über eine Vakuumschleuse in ein 4800 MALDI TOF/TOF[®] Massenspektrometer von Applied Biosystems eingeführt. Die Position des MALDI Targets wurde justiert, damit die einzelnen Spots für den Laserbeschuss exakt festgelegt waren. Der Precursor Ionen Scan wurde in einem Massenbereich zwischen 800 Da und 4500 Da durchgeführt. Für die Erstellung der MS-Daten wurden 1600 Laserschuss eines 355 nm Nd: YAG Lasers verwendet. Humanes Keratin und porcine Trypsinfragmente wurden von der Peakliste ausgeschlossen. Zunächst wurden alle Positionen auf dem Target im MS Modus analysiert, um so die Peptidmassen für die PMF (=Peptide mass fingerprint) basierte Proteinidentifizierung zu generieren. Im anschließenden Schritt wurden von den jeweils 10 stärksten Precursor Ionen eines MALDI Spots MS/MS Spektren (mit 500 Laserschuss) erzeugt. Das Verhältnis von Signal zu Grundrauschen wurde sowohl für die MS-, als auch für die MS/MS-Analyse auf 10 eingestellt. Zur Identifizierung der Proteine aus den 2D-Gelspots wurden die MS-, sowie die MS/MS-Daten mittels der Software MASCOT über die GPS Explorer[®] Version 3.6 Software in der murinen SwissProt Datenbank (Version 49) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Genotypisierung der Versuchstiere

4.1.1 bGH- und IGFBP-2-PCR

Um die vier möglichen Genotypen der F₁-Generation (G, GB, B und WT) zu charakterisieren, wurden spezifische PCR-Reaktionen durchgeführt. Als Template für die PCR-Reaktion diente die, nach proteolytischem Verdau gewonnene genomische DNA aus den Schwanzspitzen der Tiere. Die 17 bp bzw. 20 bp großen IGFBP-2 Primer und die 20 bp bzw. 21 bp großen bGH Primer (siehe Tabelle 11) binden innerhalb des Transgens. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 2%igen TAE-Agarosegels aufgetrennt. Das zu erwartende Fragment aus der PCR für das PEPCK-bGH-Konstrukt hat eine Größe von 608 bp und im Falle einer mIGFBP-2-Transgenität ist das Fragment 342 bp groß. Um die Größen der Fragmente zu bestimmen, wurde ein Molekulargewichtsstandard (pUC Mix Marker 8, MBI Fermentas) mit aufgetrennt. Somit war es möglich, die Genotypen exakt zu bestimmen.

| | |
|-----------------------|-----------------------------------|
| mIGFBP-2 (sense) | 5' GTG TAC GGT GGG AGG TC 3' |
| mIGFBP-2 (antisense) | 5' TCG GCA GCA TGT TGG CTT GT 3' |
| PEPCK-bGH (sense) | 5' CGG ACC GTG TCT ATG AGA AGC 3' |
| PEPCK-bGH (antisense) | 5' GGA AAG GAC AGT GGG AGT GG 3' |

Tabelle 11: mIGFBP-2 und PEPCK-bGH sense und antisense Primer

In Abbildung 7 und 8 sind die PCR-Ergebnisse aller eingesetzten Versuchstiere zu sehen.

4.1.2 Optimierung der IGFBP-2 PCR

Zu Beginn der Genotypisierung der Versuchstiere traten bei der IGFBP-2 PCR, zusätzlich zu dem spezifischen 342 bp großen IGFBP-2 PCR-Produkt, zwei Banden auf (siehe Abbildung 6: 330 bp und 120 bp). Durch die Verwendung einer HotStar TaqPolymerase an Stelle der normalen TaqPolymerase (beide von Qiagen) konnten

die unspezifischen Amplifikationen zu Beginn der PCR verhindert werden (siehe Abbildung 10 und 11).

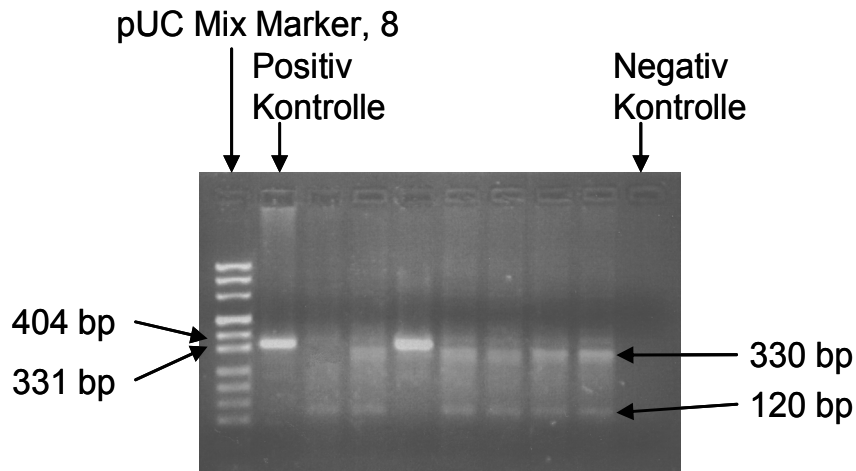


Abbildung 6: IGFBP-2 PCR: links: IGFBP-2 PCR-Produkt ist 342 bp groß; rechts: Auftreten einer unspezifischen 330 bp und 120 bp großen Bande

4.1.3 Bilder der PCR-Ergebnisse der eingesetzten Versuchstiere

In Abbildung 7 und 8 sind die Ergebnisse der bGH und IGFBP-2 PCR der eingesetzten Versuchstiere (**G**: n=5, **GB**: n=5 und **WT**: n=7) dargestellt.

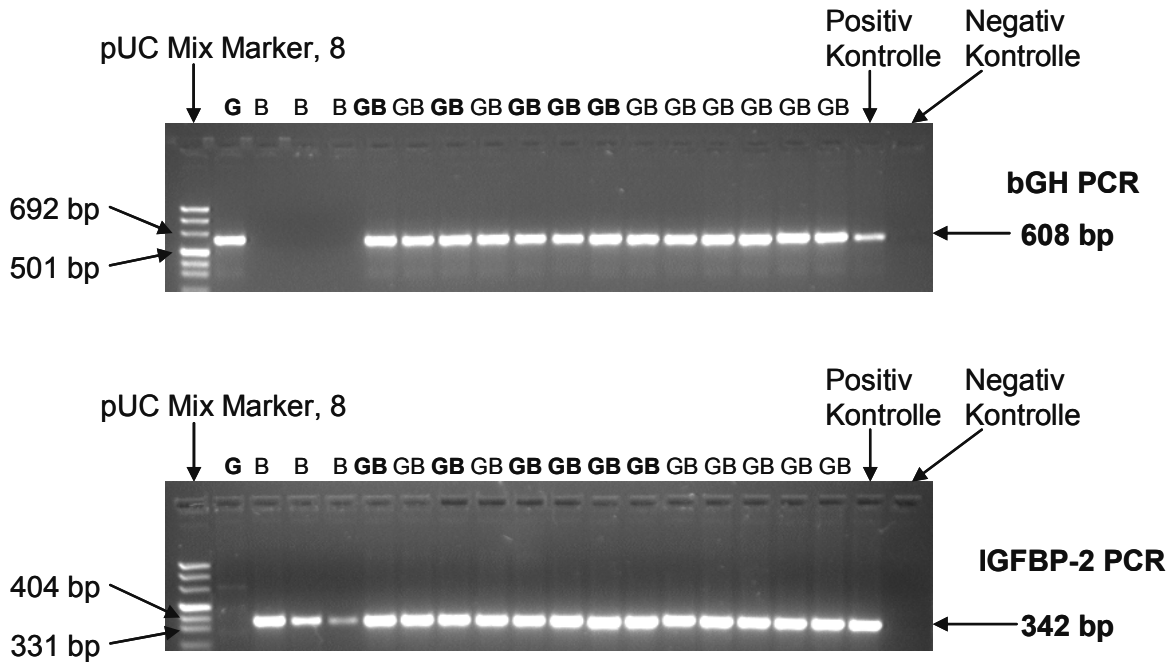


Abbildung 7: bGH PCR- und IGFBP-2 PCR-Ergebnisse (1)

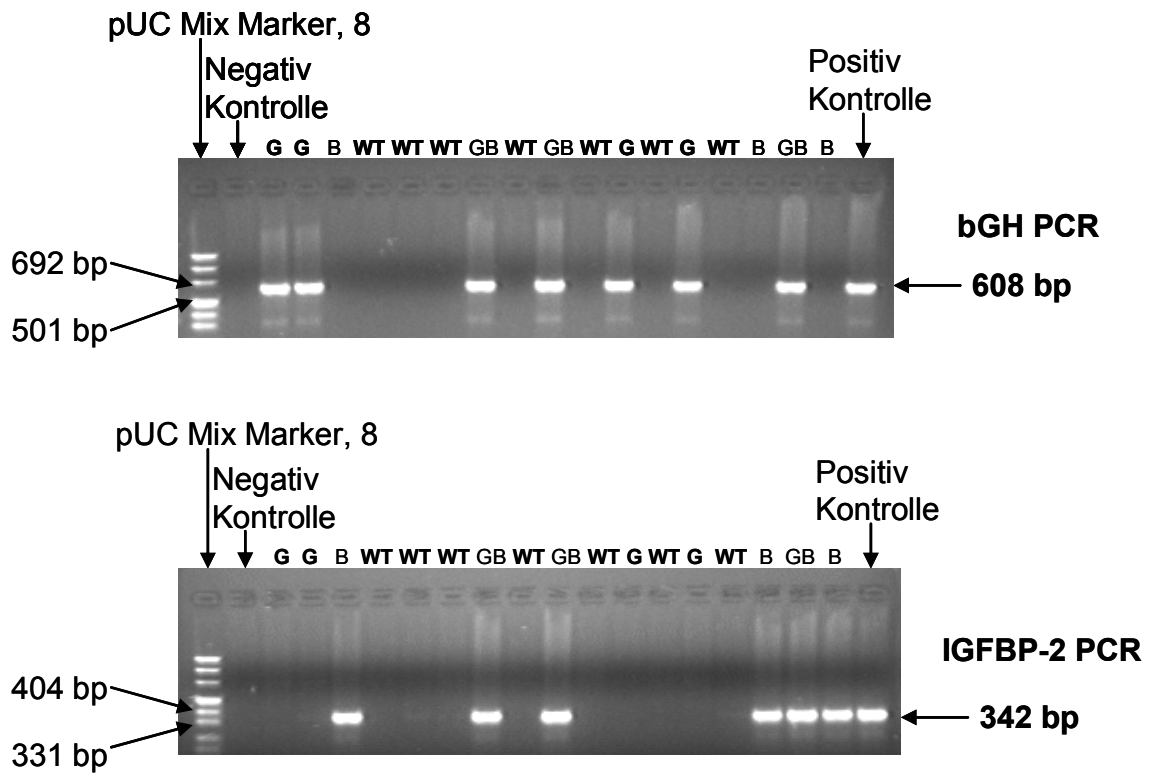


Abbildung 8: bGH PCR- und IGFBP-2 PCR-Ergebnisse (2)

4.2 Körpergewicht der Versuchstiere

Das Körpergewicht der 11 Wochen alten, männlichen bGH transgenen (G) Mäuse, doppeltransgenen (GB) Mäuse und der nichttransgenen Mäuse (WT) wurde von 36 Tieren festgestellt (WT: n=12; G:n=12; GB: n=12; siehe Abbildung 9)

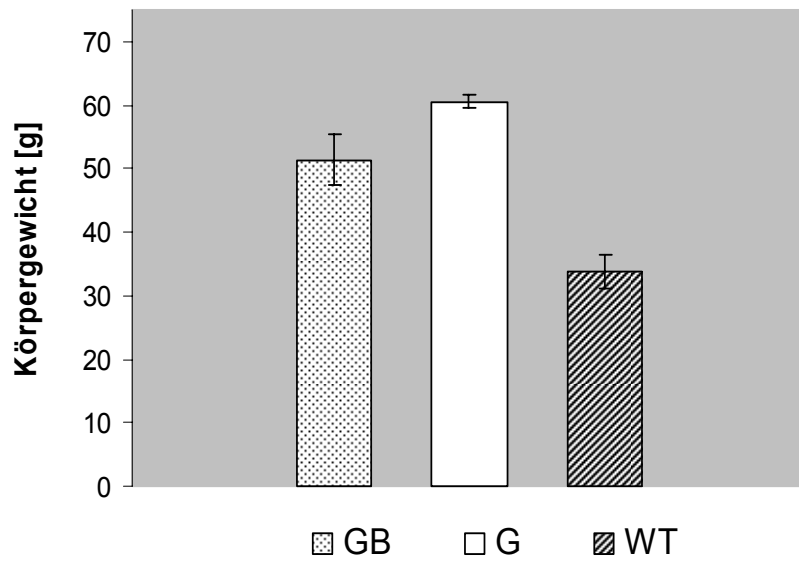


Abbildung 9: Körpergewicht in Gramm (g) der drei unterschiedlichen, genetischen Gruppen (**GB**, **G**, **WT**)

Das Körpergewicht der bGH (G) transgenen Mäuse ist um 15% (p-Wert < 0,001) gegenüber den doppeltransgenen (GB) Mäusen und um 44% (p-Wert < 0,001) im Vergleich zu den nichttransgenen (WT) Tieren erhöht. In Abbildung 10 sind die deutlichen phänotypischen Größenunterschiede sichtbar.



Abbildung 10: Phänotypische Unterschiede der vier Genotypen: **G**, **GB**, **WT** und **B**

4.3 Nebennierengewicht der Versuchstiere

Nach der Nebennierenpräparation wurde das Gewicht der linken und rechten Nebenniere eines Tieres zusammen bestimmt.

Das Nebennierengewicht beider Organe der bGH (G) transgenen Mäuse ist um 13% (p-Wert = 0,004) gegenüber den doppeltransgenen (GB) Mäusen und um 42% (p-Wert < 0,001) im Vergleich zu den nichttransgenen (WT) Tieren erhöht (siehe Abbildung 11).

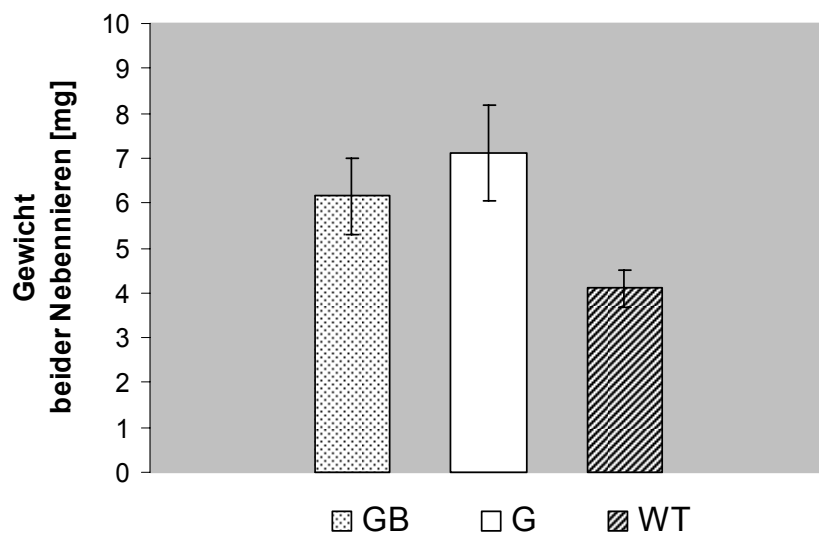


Abbildung 11: Gewicht beider Nebennieren in Milligramm (mg) der drei unterschiedlichen, genetischen Gruppen (GB, G, WT)

4.4 Proteinbestimmung der Nebennieren

Für die Proteomanalyse eines Tieres wurden immer beide Nebennieren verwendet, da eine Nebenniere eine zu geringe Gesamtproteinkonzentration liefert. Der Gesamtproteingehalt der Nebennieren wurde mittels Bradford (siehe unter 3.3.2) bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentrationen der eingesetzten Versuchstiere für das „Cross-Labeling“, die 2D-DIGE Experimente und für die qualitative Proteomanalyse sind in Tabelle 12 zu sehen.

| Genotyp | Maus-Nummer | Körpergewicht in g | NN-Gewicht in mg (je 2 NN) | Gesamtprotein-gehalt µg/350µl |
|---------------------------------|-------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|
| GB | 233 | 53,7 | 6,0 | 637 |
| GB | 304 | 54,8 | 6,2 | 721 |
| GB | 306 | 53,4 | 6,2 | 710 |
| GB | 349 | 51,5 | 5,9 | 861 |
| GB | 358 | 50,2 | 5,7 | 686 |
| | | | | |
| G | 324 | 62,5 | 7,0 | 864 |
| G | 394 | 60,9 | 7,3 | 973 |
| G | 412 | 58,1 | 7,0 | 889 |
| G | 419 | 58,4 | 7,5 | 976 |
| G | 422 | 57,8 | 6,8 | 941 |
| | | | | |
| WT | 237 | 32,8 | 4,0 | 592 |
| WT | 239 | 35,2 | 4,1 | 634 |
| WT | 254 | 34,0 | 4,4 | 626 |
| WT | 321 | 30,7 | 4,4 | 630 |
| WT | 360 | 33,9 | 4,6 | 651 |
| WT | 387 | 32,0 | 4,2 | 619 |
| WT | 420 | 32,7 | 4,4 | 626 |
| | | | | |
| Adulte, männliche C57BL/6N Maus | | 36,0 | 2,6 | 497 |

Tabelle 12: Körpergewichte, Nebennierengewichte von je zwei Nebennieren und Proteinkonzentrationen der Nebennierenlysate aller eingesetzten Mäuse

4.5 Qualitative Proteomanalyse der Nebennieren mittels Nano-LC-MS/MS

Das Ziel der qualitativen Proteomanalyse war eine möglichst hohe Anzahl an Proteinidentifizierungen. Das Nebennierenlysate der adulten, männlichen C57BL/6N Maus wurde einmal ohne und einmal mit Vorfraktionierung auf Proteinebene mit der Nano-LC-MS/MS Analyse untersucht. Das Proteinlysate ohne Vorfraktionierung wurde vor der LC-MS/MS Analyse entsalzt (siehe unter 3.5.3) und die Proteinkonzentrationen der zehn Eluate wurden photometrisch bestimmt.

Ergebnisse

Ergebnis der photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm:

| | | | |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Fraktion 1: | 0,0001 mg/ml | Fraktion 6: | 0,0053 mg/ml |
| Fraktion 2: | 0,0014 mg/ml | Fraktion 7: | 0,0336 mg/ml |
| Fraktion 3: | 0,0368 mg/ml | Fraktion 8: | 0,2844 mg/ml |
| Fraktion 4: | 0,0570 mg/ml | Fraktion 9: | 0,8818 mg/ml |
| Fraktion 5: | 0,0022 mg/ml | Fraktion 10: | 1,0132 mg/ml |

Aufgrund des Umrechnungsfaktor = 1 entspricht die Extinktion bei 280 nm der Proteinkonzentration. Fraktion 3 und 4 zusammen wurden für die qualitative Analyse ohne Vorfraktionierung eingesetzt.

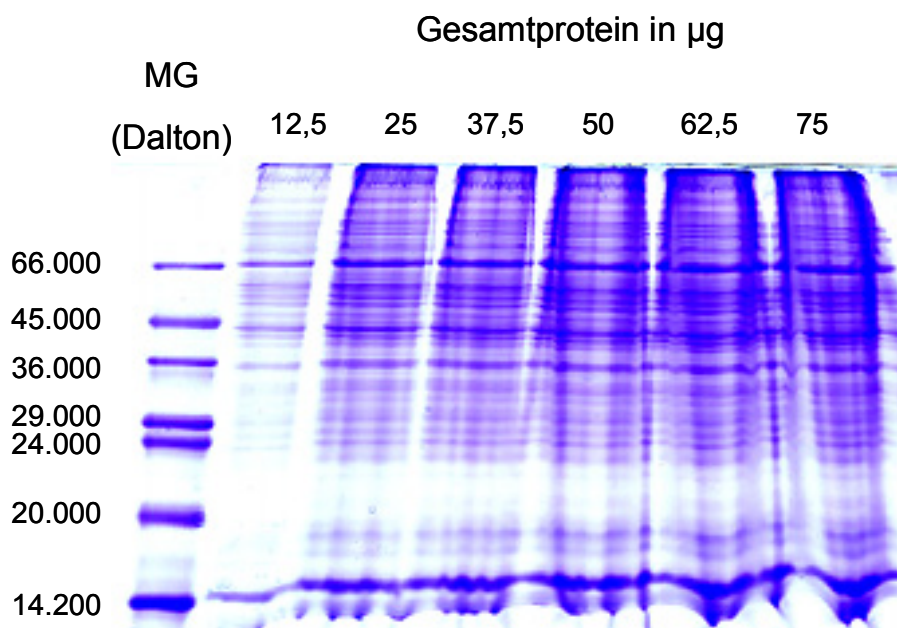


Abbildung 12: Eindimensionales SDS-Gel: Sechs Gelspuren mit aufsteigender Proteinkonzentration (12,5 μg bis 75 μg)

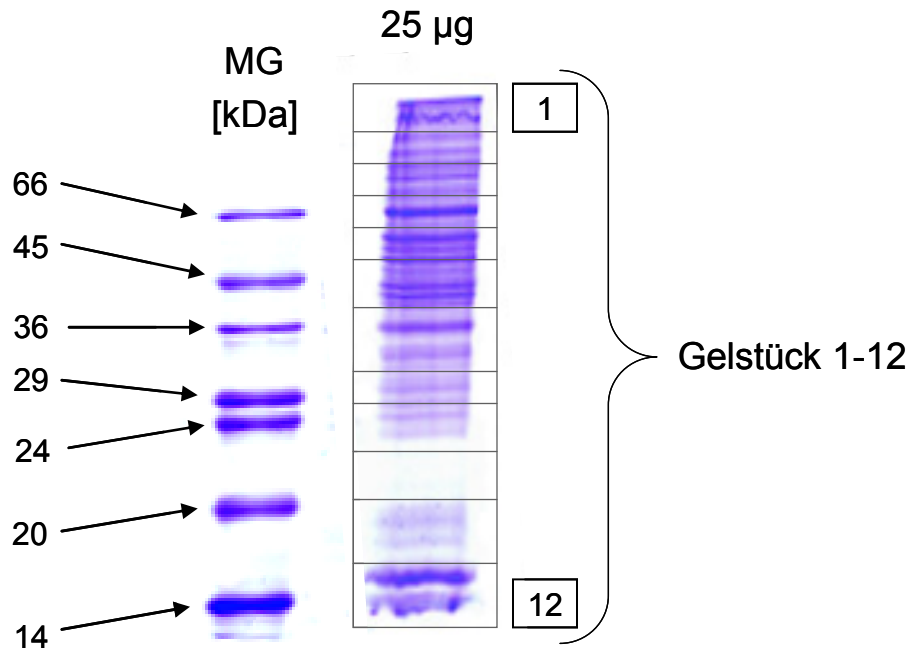


Abbildung 13: 25 µg Gelspur in zwölf Gelstücke unterteilt

Für die Vorfraktionierung wurden sechs verschiedene Proteinkonzentrationen, 12,5 µg, 25 µg, 37,5 µg, 50 µg, 62,5 µg und 75 µg auf ein 1D-SDS-Gel (siehe Abbildung 12) aufgetragen. In Abbildung 13 ist die Gelspur mit einer Proteinkonzentration von 25 µg zu sehen, die in 12 Banden eingeteilt wurde.

Das Proteinlysate ohne Vorfraktionierung und die zwölf Proteinlysate aus den zwölf Gelstücken wurden tryptisch gespalten und auf Peptidebene in zwei orthogonalen Chromatographieschritten aufgetrennt. In der ersten Dimension, einer Kationenaustauschchromatographie (engl.: strong cation-exchange SCX), wurden durch eine Stufenelution mit aufsteigender Salzlösung (10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM, und 800 mM NH₄Cl-Lösung) sechs SCX-Fractionen generiert. Die einzelnen SCX-Fractionen wurden anschließend durch einen 110 minütigen „Reversed Phase“ Gradienten (siehe Abbildung 14) aufgetrennt. Die Flussrate der ersten Dimension betrug 1 µl/min, die der zweiten Dimension 200 nl/min.

Der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie schloss sich die massenspektrometrische Analyse unmittelbar an. Das Eluat der „Reversed Phase“-Chromatographie wurde direkt in das Massenspektrometer gesprüht („Online“-LC-MS).

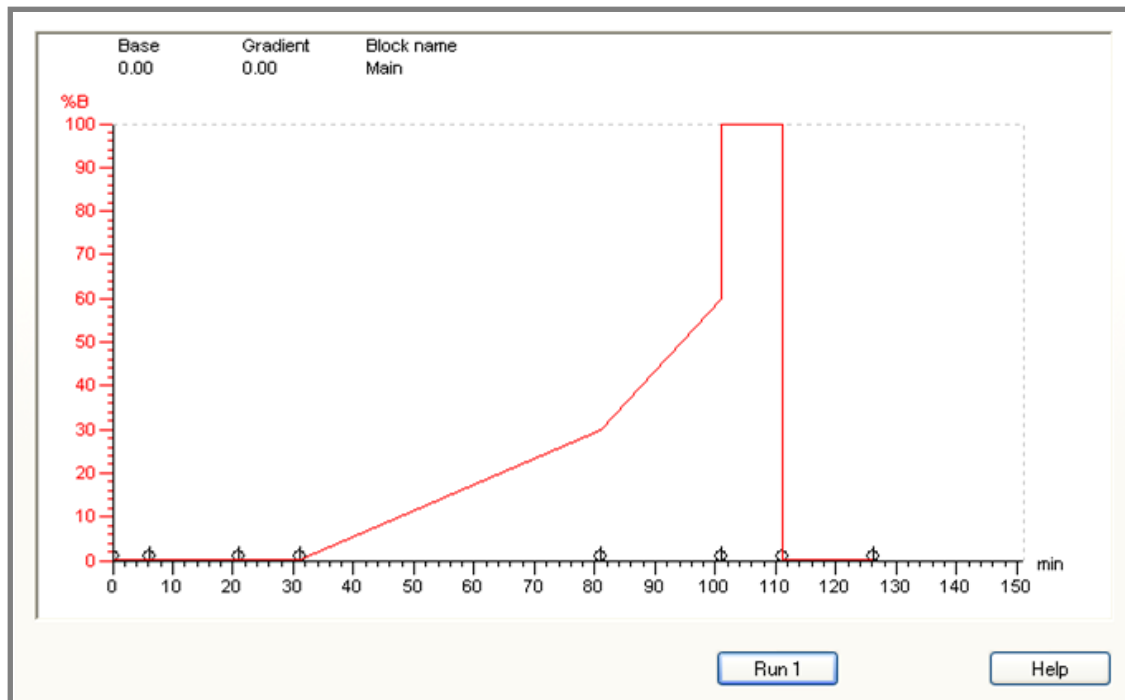


Abbildung 14: Der Acetonitril-Gradientenverlauf der „Reversed Phase“ Chromatographie

Das ESI-Tandem Massenspektrometrierverfahren besteht aus einem Ionisierungsverfahren, der Elektrospray-Ionisierung (ESI) und einer MS/MS = Tandem Massenspektrometrie. Bei der ESI-Ionisierung wurden einfach und mehrfach geladene Peptidionen gebildet, die einzeln in der Ionenfalle isoliert und anschließend fragmentiert wurden. Die Massen der Fragmente wurden bestimmt.

Mit den erhaltenen Fragmentmassen nach der zweidimensionalen LC-MS/MS Analyse wurde eine Suche in der SwissProt (Version 49) und der IPI-Datenbank (Version 3.16) mittels des Datenbank Suchprogramms „MASCOT“ (<http://www.matrixscience.com>) durchgeführt. Dabei wurden die experimentell ermittelten Fragmentmassen mit den in silico generierten, theoretischen Fragmentmassen der Proteindatenbanken verglichen.

Die genauen Parameter für die Datenbankanalyse gehen aus Abbildung 15 hervor.

MASCOT MS/MS Ions Search

| | | | |
|---|--|---|---|
| Your name | <input type="text" value="LAFUGA"/> | Email | <input type="text"/> |
| Search title | <input type="text" value="C57BL/6N"/> | | |
| Database | SwissProt | | |
| Taxonomy | Mus musculus (house mouse) | | |
| Enzyme | Trypsin | Allow up to | 2 missed cleavages |
| Fixed modifications | <input type="checkbox"/> Carbamyl (K) <input type="checkbox"/> Carbamyl (N-term) <input checked="" type="checkbox"/> Carboxymethyl (C) <input type="checkbox"/> Cation:Na (C-term) <input type="checkbox"/> Cation:Na (DE) | Variable modifications | <input type="checkbox"/> Methylthio (C) <input type="checkbox"/> NIPCAM (C) <input checked="" type="checkbox"/> Oxidation (M) <input type="checkbox"/> Oxidation (HW) <input type="checkbox"/> Phospho (ST) |
| Protein mass | <input type="text"/> kDa | ICAT | <input type="checkbox"/> |
| Peptide tol. ± | 2.0 Da | MS/MS tol. ± | 0.8 Da |
| Peptide charge | 1+, 2+ and 3+ | Monoisotopic | <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/> |
| Data file | <input type="text"/> | <input type="button" value="Durchsuchen..."/> | |
| Data format | Sequest (.DTA) | Precursor | <input type="text"/> m/z |
| Instrument | ESI-TRAP | | |
| Overview | <input type="checkbox"/> | Report top | 20 hits |
| <input type="button" value="Start Search ..."/> | | <input type="button" value="Reset Form"/> | |

Abbildung 15: Angewandte Parameter zur Spezifizierung der „MASCOT“-Suche für die LC-ESI-MS/MS Ergebnisse

Ein Protein galt als eindeutig identifiziert, wenn zwei Peptide pro Protein folgende Kriterien erfüllten: p-Wert des Student's t-Test < 0,01 und sog. „MASCOT ion score cut-off“ > 30.

4.5.1 Ergebnis ohne Vorfraktionierung des Proteinlysats:

Es konnten insgesamt 151 Proteine mit Hilfe der SwissProt (Version 49) und 166 über die IPI (Version 3.16) Datenbank eindeutig identifiziert werden.

Eine Einteilung der 151 Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation über ein im Internet verfügbares Programm „BABELOMICS“ (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) ergab, dass 66% der Proteine intrazellulären, 18% extrazellulären Ursprungs und 16% Membranproteine sind (siehe Abbildung 16).

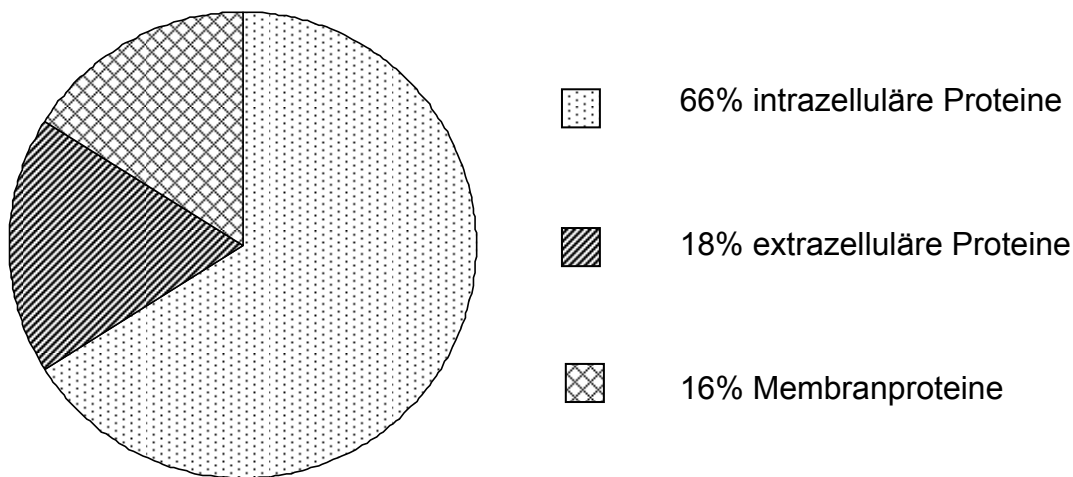


Abbildung 16: Qualitative Proteomanalyse ohne Vorfraktionierung; Kategorisierung der Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation

4.5.2 Ergebnis mit Vorfraktionierung des Proteinlysats

Die LC-MS/MS Analyse der zwölf vorfraktionierten Peptidlösungen, mit je sechs Salzschriften (wie unter 1.5.1 beschrieben) pro Analyt, ergab eine 72-malige Datenbanksuche. Die Datenbanksuche erfolgte mittels der Software „MASCOT“. Es wurde insgesamt gegen zwei Datenbanken, die IPI-Mouse (Version 3.16) und die SwissProt-Mouse Datenbank (Version 49) gesucht.

Über die IPI Datenbank, IPI (= International Protein Index) wurden 964 Proteine und mittels der SwissProt Datenbank wurden 868 Proteine aus den Nebennieren der C57BL/6N Maus identifiziert.

Um die identifizierten Proteine zu kategorisieren, wurde sie nach ihrer zellulären Lokalisation über ein im Internet verfügbares Programm, „BABELOMICS“ (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) eingeteilt.

Die Kategorisierung nach der zellulären Lokalisation ergab in der SwissProt Datenbank folgendes Ergebnis: 63% der Proteine sind intrazellulären, 14% sind extrazellulären Ursprungs und 23% konnten Membranproteinen zugeordnet werden (siehe Abbildung 17).

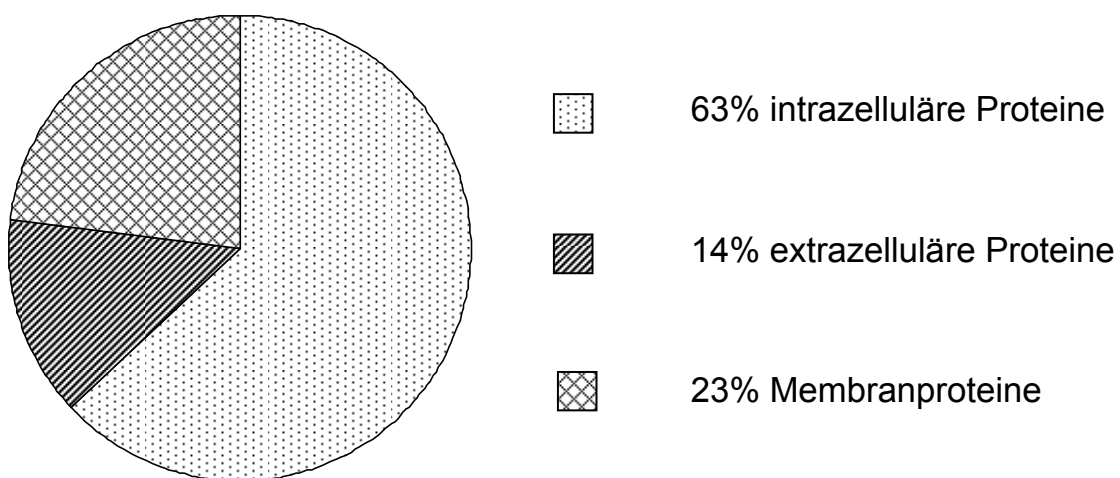


Abbildung 17: Qualitative Proteomanalyse mit Vorfraktionierung; Kategorisierung der Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation

Die 868 mittels der SwissProt Datenbank identifizierten Proteine wurden mit dem Programm „BABELOMICS“ nach ihrer Funktion unterteilt (siehe Tabelle 13). Es wurden auch seltener vertretene Proteine aus dem Bereich der Transkription, Translation und dem Signaling identifiziert.

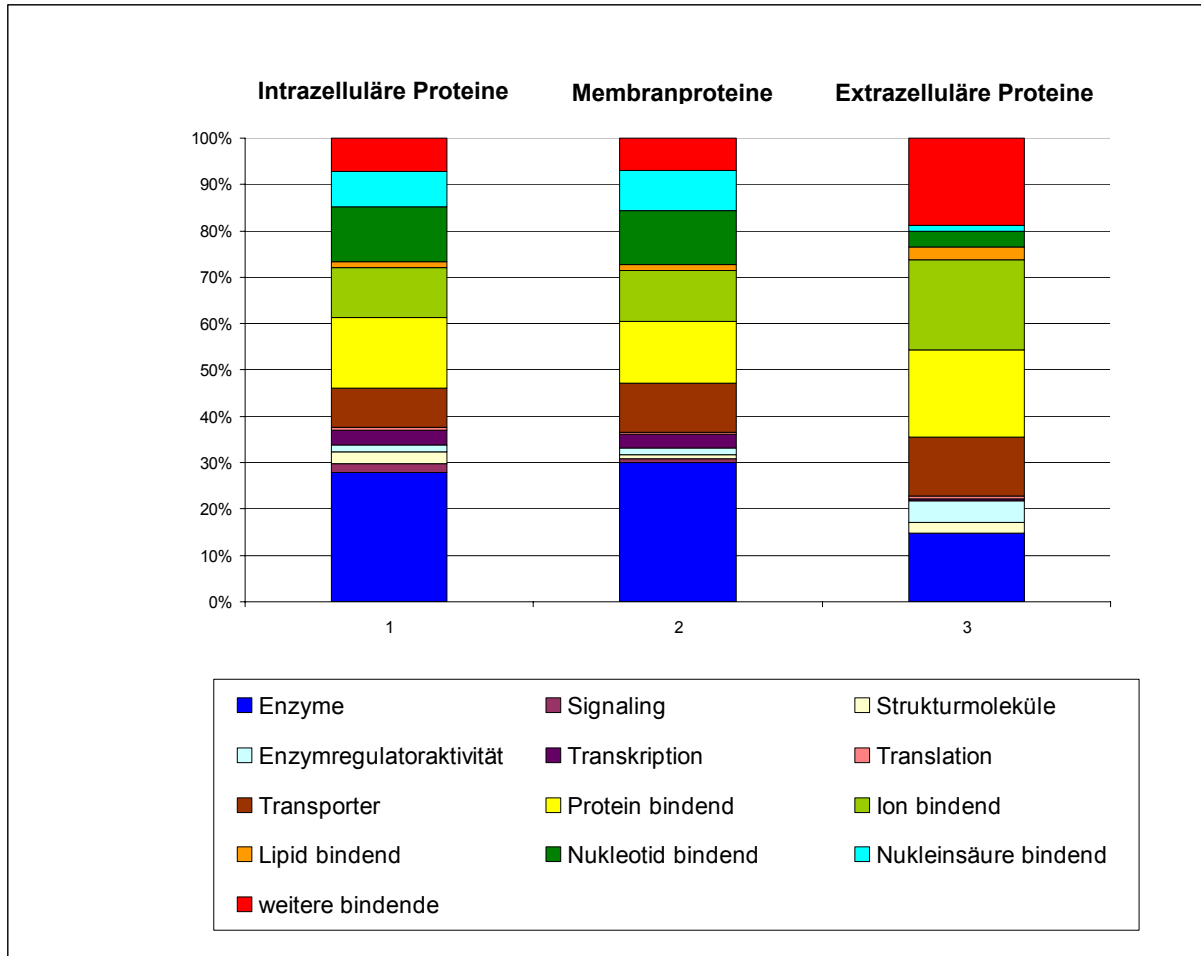


Tabelle 13: Einteilung der intrazellulären Proteine, extrazellulären Proteine und Membranproteine nach ihrer Funktion

Datenbank-„Matches“ können zufallsbedingt sein. Dies ist abhängig von der Größe der Datenbank, der Genauigkeit der m/z-Werte und der gewählten Score-Kriterien. Um den Anteil dieser falsch-positiven Identifizierungen zu ermitteln, wurden „Decoy“ (engl.: Falle, Köder) Datenbanken generiert. Jeder Sequenzeintrag der ursprünglichen Datenbank wird unter Beibehaltung der Aminosäure-Zusammensetzung nach dem Zufallsprinzip neu angeordnet. Etwaige „Matches“ mit experimentellen MS-Daten sind daher per definitionem zufällig. Das Verhältnis der Decoy-Identifizierungen zu den ursprünglichen Identifizierungen gibt die Rate der falsch positiven unter den Identifizierungen an. Sowohl der SwissProt, als auch der IPI Datensatz wurde gegen diese „Decoy“-Datenbank mit exakt den gleichen Parametern wie bei der normalen Datenbanksuche analysiert. Die „Decoy“-IPI Datenbanksuche ergab einen Anteil von 1% und die „Decoy“-SwissProt

Datenbanksuche ergab einen Anteil von 0,2% der identifizierten Proteine, die als falsch positiv erkannt wurden.

In Abbildung 18 ist die Kategorisierung der Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation einmal mit und einmal ohne Vorfraktionierung gegenübergestellt. Die Zahl der Proteinidentifikationen unterschied sich deutlich um den Faktor sechs (von 151 auf 868 bzw. von 166 auf 964 Proteine), wohingegen die Klassifizierung der Proteine nach ihrer Lokalisation eine ähnlich prozentuale Verteilung aufwies. Ohne Vorfraktionierung des Probenmaterials auf Proteinebene ergab sich folgende Verteilung: 66% intrazelluläre Proteine, 18% extrazelluläre Proteine und 16% Membranproteine (siehe Abbildung 16). Die Vorfraktionierung mittels 1D-Gelelektrophorese ergab: 63% intrazelluläre Proteine, 14% extrazelluläre Proteine und 23% Membranproteine (siehe Abbildung 17). Einzig signifikanter Unterschied lag in der Identifizierungsrate von Membranproteinen, die mit Vorfraktionierung des Proteinlysates um 7% höher lag (siehe Abbildung 18).

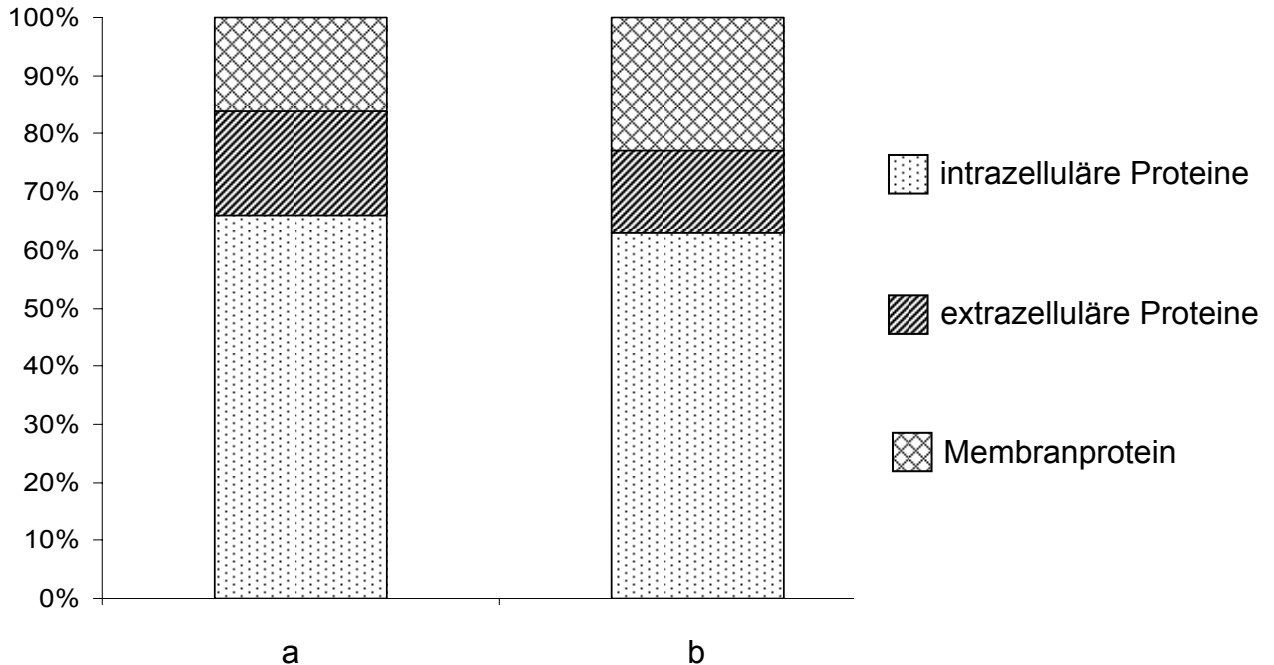


Abbildung 18: Kategorisierung der Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation: a) ohne Vorfraktionierung, b) mit Vorfraktionierung

4.6 2D-DIGE Vorversuch

Um einen Vergleich der Nebennieren der bGH transgenen Mäuse versus Wildtyp-Mäuse und der bGH transgenen versus bGH/mIGFBP-2 transgenen Mäuse auf der Basis der 2D-DIGE Technik durchführen zu können, mussten zwei Kriterien überprüft werden. Zum einen musste getestet werden, inwieweit die Nebennierenlysate reproduzierbar hergestellt werden können und zum anderen mussten die potentiellen Unterschiede der Abundanz der Spots, die durch die Farbstoffe hervorgerufen werden können, aufgedeckt werden.

Dazu wurden die Nebennieren von zwei Wildtypmäusen in einer so genannten „Cross-Labeling“ Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3 und Cy5) markiert und mit der Software „DeCyder, Version 6.5“ ausgewertet.

„Cross-Labeling“ der Wildtyp-Nebennieren:

Es wurden die Nebennieren von zwei verschiedenen, 11 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen (Nr. 237 und 239) ausgesucht (genaue Daten zu den NN siehe unter 4.4) und für die 2D-Gelelektrophorese präpariert. Der einzig wichtige Unterschied war, dass der DIGE-Lysepuffer eingesetzt wurde, da der „Normale“ Lysepuffer die Labeling-Reaktion stören kann (siehe unter 3.3.1).

Für die „Cross-Labeling“ Reaktion wurde das Nebennierenlysat der Maus Nr. 237 mit Cy3, das der Maus Nr. 239 mit Cy5 und umgekehrt markiert. Für den internen Standard wurden beide Nebennierenlysate vereinigt und mit Cy 2 markiert (siehe Abbildung 19).

| Gel | Cy2 = interner Standard | Cy3 | Cy5 | Konzentration Gesamtprotein |
|-----|---|------------------|------------------|-----------------------------|
| 1 | Pro Gel 50 µg (25 µg von Maus Nr. 237 und 25 µg von Maus Nr. 239) | 50 µg Nr. 237 | 50 µg Nr. 239 | 150 µg pro Gel |
| 2 | | 50 µg Nr. 239 | 50µg Nr. 237 | |

Abbildung 19: „Cross-Labeling“ Schema

Beide markierten Nebennierenlysat-Mischungen, je 150 µg (50 µg Cy3, 50 µg Cy5 und 50 µg Cy2 markiert) pro Gel, wurden mittels der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die 1. Dimension wurden Gelstreifen mit einem pH-Bereich von 4-7 verwendet. Das Einscannen beider Gele nach Beenden der zweiten Dimension

erfolgte mit dem Fluoreszenzscanner Typhoon 9400 (von GE Healthcare). Die Scannparameter sind unter 3.6 dargestellt. Die beide 2D-DIGE Gele wurden in die Software „DeCyder, Version 6.5“ eingeladen und mittels der zwei Module „Differential In-Gel Analysis“ (DIA) und der „Biological Variance Analysis“ (BVA) ausgewertet. Die Parameter für die Auswertung waren: Spot muss in allen Images vorkommen; Student's t-Test: $< 0,05$; Unterschiede in der Abundanz um mindestens den Faktor $\pm 2,0$.

Fluoreszenzfarbstoffe können artifiziell die Abundanz verändern, indem sie als so genannte Lichtflecken (engl.: speckles) auftreten. Derartige Lichtflecken, die sich als sehr kleine und intensiv gefärbte Punkte darstellen, traten in beiden Gelen auf. Die Filterkriterien in der Software „DeCyder, Version 6.5“ wurden so eingestellt, dass die störenden Lichtflecken vor der Auswertung entfernt werden konnten.

Der direkte Vergleich beider 2D-DIGE Gele zeigte keine differentiell abundanten Proteinspots.

4.7 2D-DIGE Hauptversuch

Um die Frage zu klären, ob sich das Proteinexpressionsmuster bei dem Vergleich PEPCK–bGH transgener versus PEPCK–bGH/mIGFBP-2 transgener Mäuse unterscheidet, wurden zwei 2D-DIGE Experimente durchgeführt:

1. PEPCK–bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse
2. PEPCK–bGH transgene Mäuse versus PEPCK–bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse

In Abbildung 20 und 21 ist das „Labeling“-Schema für den Vergleich der bGH transgenen Mäuse (**G**) mit den Wildtyp-Mäusen (**WT**) bzw. mit den doppeltransgenen Mäuse (**GB**) dargestellt.

Ergebnisse

| Gel | Cy2 = interner Standard 1 | Cy3 | Cy5 | Konzentration Gesamtprotein |
|-----|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | Pro Gel 50 µg (5,0 µg von jeweils G₁-G₅ und WT₁-WT₅) | 50 µg G₁ | 50 µg WT₁ | 150 µg pro Gel |
| 2 | | 50 µg G₂ | 50 µg WT₂ | |
| 3 | | 50 µg WT₃ | 50 µg G₃ | |
| 4 | | 50 µg WT₄ | 50 µg G₄ | |
| 5 | | 50 µg WT₅ | 50 µg G₅ | |

Abbildung 20: „Labeling“-Schema der 2D-DIGE Analyse G versus WT

| Gel | Cy2 = interner Standard 2 | Cy3 | Cy5 | Konzentration Gesamtprotein |
|-----|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | Pro Gel 50 µg (5,0 µg von jeweils G₁-G₅ und GB₁-GB₅) | 50 µg G₁ | 50 µg GB₁ | 150 µg pro Gel |
| 2 | | 50 µg G₂ | 50 µg GB₂ | |
| 3 | | 50 µg GB₃ | 50 µg G₃ | |
| 4 | | 50 µg GB₄ | 50 µg G₄ | |
| 5 | | 50 µg GB₅ | 50 µg G₅ | |

Abbildung 21: „Labeling“-Schema der 2D-DIGE Analyse G versus GB

Die Scanparameter für Fluoreszenzscanners Typhoon 9400 sind unter 3.6 beschrieben. Die Spotmuster der insgesamt zehn 2D-Gele wurden mittels der Software „DeCyder, Version 6.5“ bezüglich der Position und der Intensität verglichen und statistisch ausgewertet. Das Programm besteht aus zwei Teilen, dem Modul „Differential In-Gel Analysis“ (DIA) und dem Modul „Biological Variance Analysis“ (BVA). In DIA erfolgte für jedes einzelne Image, ein Gelbild besteht aus drei Images, die Detektion der Spots. Alle erzeugten DIA-Dateien wurden in BVA eingeladen und Spots, die innerhalb der verschiedenen Gele einander nicht korrekt zugeordnet wurden, mussten manuell nachbearbeitet werden.

4.7.1 PEPCK-bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse

Für den Vergleich bGH transgener Mäuse versus Wildtyp-Mäuse wurden fünf Gele (15 Images) in der Software „DeCyder, Version 6.5“ ausgewertet. Die Parameter für die Auswertung waren: Spot muss in allen Images vorkommen, Student’s t-Test: $< 0,05$ und Unterschiede in der Abundanz um mindestens den Faktor $\pm 2,0$. Die softwaregestützte Auswertung ergab, dass 25 Spots den oben erwähnten Parametern entsprechen und daher signifikant in ihrer Abundanz verändert sind. In Abbildung 22 sind die 25 Proteinspots rot eingekreist dargestellt. Die Spotnummern entsprechen denen in der „DeCyder“ Software. Die unterstrichenen sieben Spotnummern entsprechen den Proteinspots, die anschließend massenspektrometrisch nicht identifiziert werden konnten.

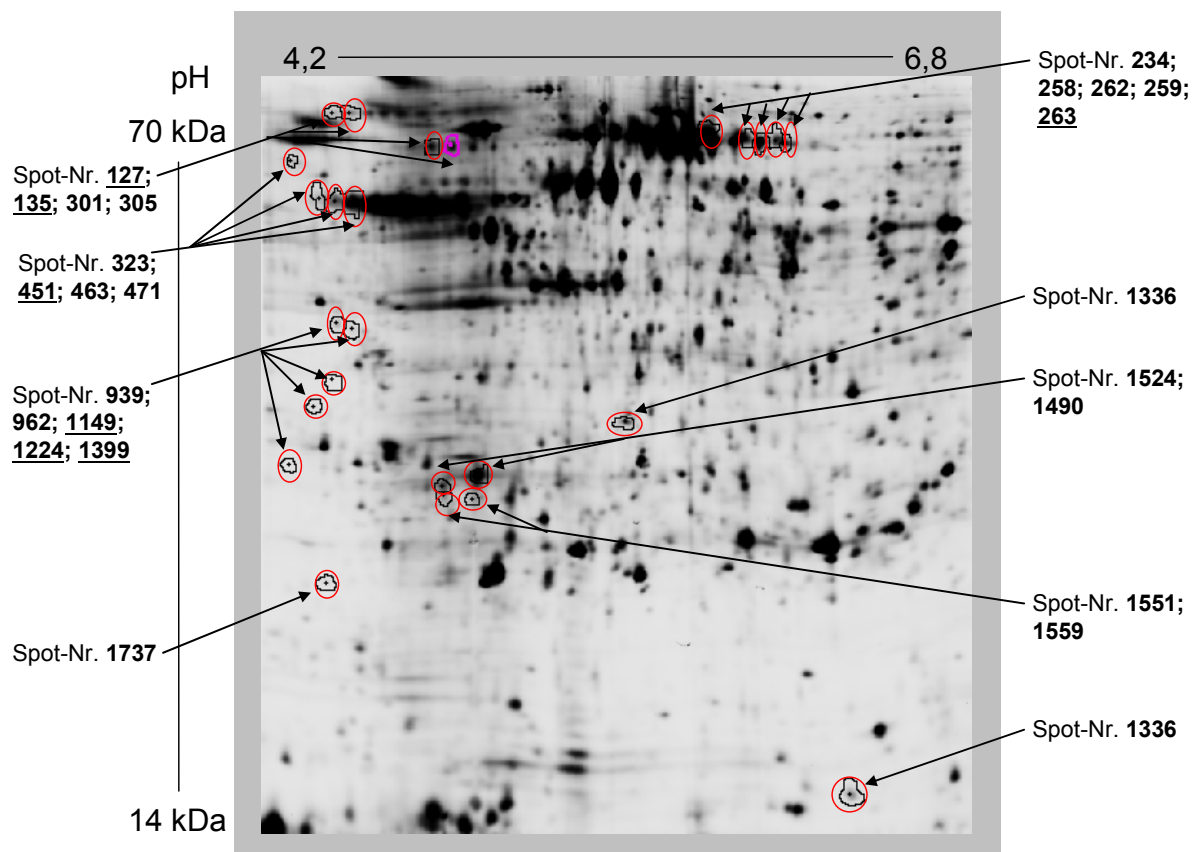


Abbildung 22: Ein Cy5-Image des Vergleichs G versus WT im pH-Bereich 4-7; es wurden 25 differenziell abundante Proteinspots (rot eingekreist) ermittelt

Ergebnisse

In Tabelle 14 sind die einzelnen p-Werte des Student's t-Test und die Abundanzfaktoren aller 25 differentiell abundanter Spots dargestellt.

| Spot-Nr. „DeCyder“ | Student's t-Test p-Wert | Abundanzfaktor im Bezug auf bGH |
|-----------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 127 | 0,00096 | - 2,3 |
| 135 | 0,00023 | - 2,6 |
| 234 | 0,00036 | + 2,0 |
| 258 | 0,00066 | + 2,5 |
| 259 | 0,03 | + 2,0 |
| 262 | 1,4e-006 | + 2,8 |
| 263 | 0,00073 | - 2,8 |
| 301 | 6,2e-005 | + 2,0 |
| 305 | 0,00017 | + 2,0 |
| 323 | 0.00034 | - 2,2 |
| 451 | 0.00018 | - 3,7 |
| 463 | 0,00068 | + 2,6 |
| 471 | 0,0015 | + 2,1 |
| 939 | 5,3e-006 | - 2,2 |
| 962 | 1,8e-006 | - 2,0 |
| 1149 | 9,5e-006 | + 2,0 |
| 1224 | 3,3e-006 | + 2,5 |
| 1336 | 6,2e-006 | + 3,4 |
| 1399 | 0,0011 | + 2,3 |
| 1490 | 0,00076 | + 2,2 |
| 1524 | 2,2e-005 | - 2,4 |
| 1551 | 0,00081 | - 2,1 |
| 1559 | 0,00038 | - 2,3 |
| 1737 | 0,00053 | - 2,1 |
| 2241 | 5,8e-005 | - 2,2 |

Tabelle 14: p-Werte und Abundanzfaktoren der 25 signifikant differentiell abundante Proteinspots im Vergleich G versus WT; 18 Spots (grau unterlegt) konnten massenspektrometrisch identifiziert werden

Das Vorzeichen der Abundanzfaktoren bezieht sich auf die bGH transgenen Mäuse. Plus bzw. Minus bedeutet, dass die Abundanz des Proteinspots bei den bGH transgenen Mäusen erhöht respektive erniedrigt ist im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. In der Software „DeCyder“ kann die Fluoreszenzintensität jedes Spots in einer dreidimensionalen Struktur anschaulich dargestellt werden. In Abbildung 23, 24 und 25 sind die differentiell abundanten Spots, die im Anschluss auch massenspektrometrisch identifiziert wurden, in ihrer dreidimensionalen Ansicht dargestellt. Der blaue Rand der 3D-Ansicht entspricht der Spotdarstellung im Cy3

Image, wohingegen der grüne Rand das Cy5 Image kennzeichnet. Aufgrund des „Labeling“-Schemas (siehe Abbildung 20 und 21) wechselt der Genotyp, z. B. bGH, nach den ersten zwei 3D-Darstellungen vom Cy3 ins Cy5 Image. Neben der 3D-Darstellung ist die Abundanz des jeweiligen Spots in einem Diagramm, der so genannten „Graph View“ logarithmisch auf der Ordinate aufgetragen. Die Steigung der blauen Gerade gibt den Wert der mittleren Abundanz des Spots an. Die fünf schwarz gestrichelten Geraden geben die logarithmische Abundanz der Spots im Cy3 und Cy5 Image der fünf analytischen Gele an.

Ergebnisse

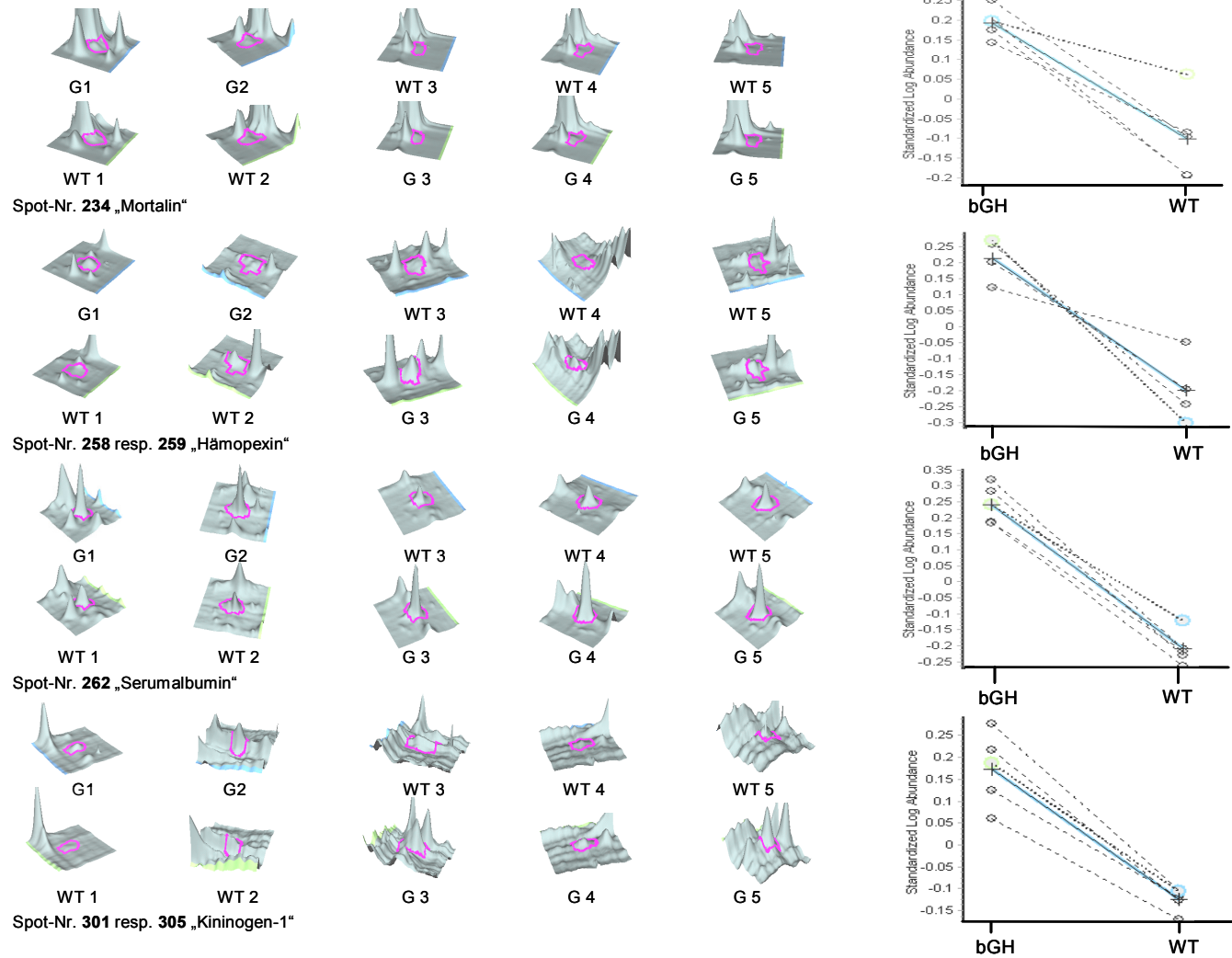


Abbildung 23: 3D-Ansicht der differentiell abundanten Proteinspots (Nr. 234, 258/259; 262; 301/305) und die korrespondierenden „Graph Views“

Ergebnisse

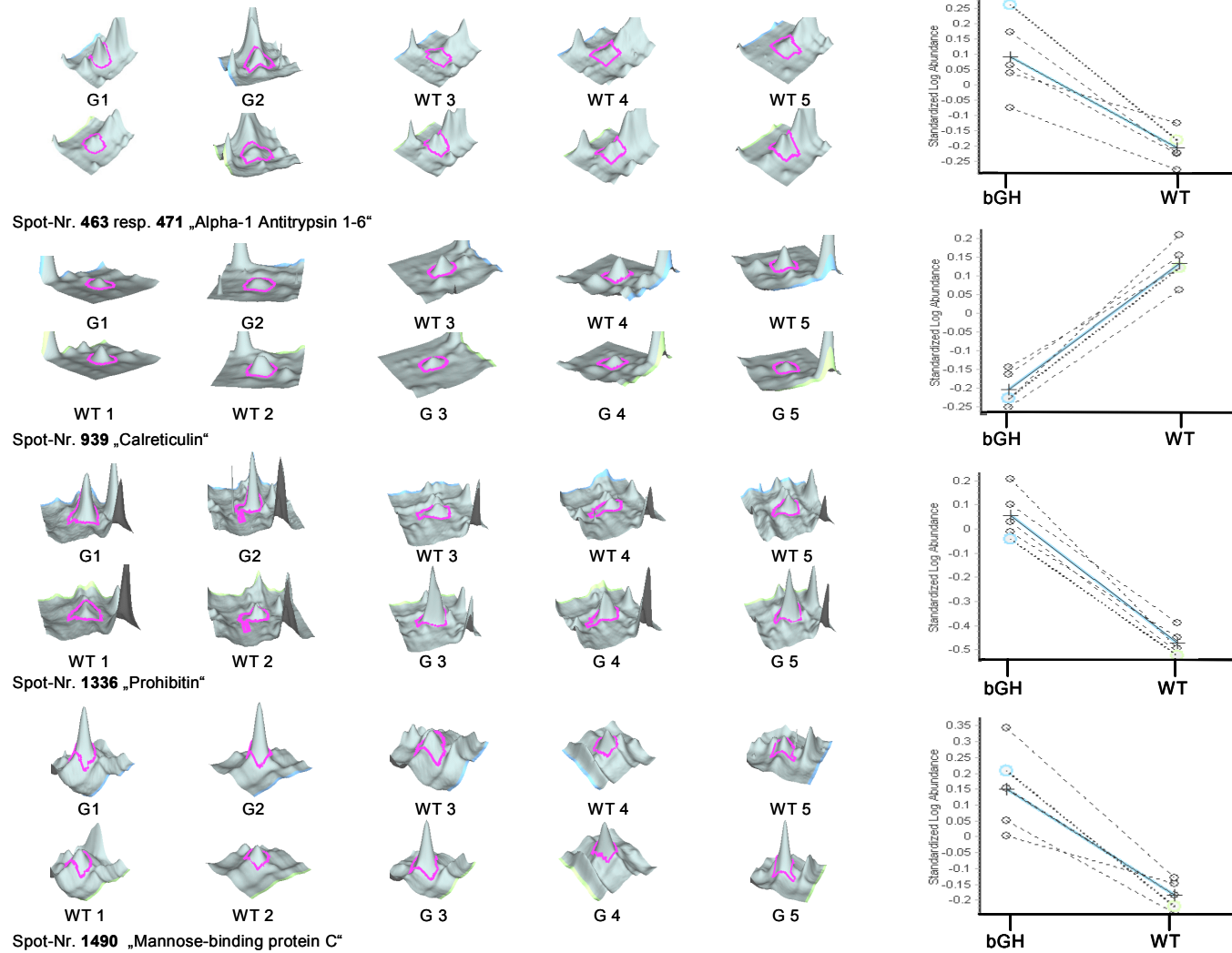


Abbildung 24: 3D-Ansicht der differentiell abundanten Proteinspots (Nr. 463/471; 939; 1336; 1490) und die korrespondierenden „Graph Views“

Ergebnisse

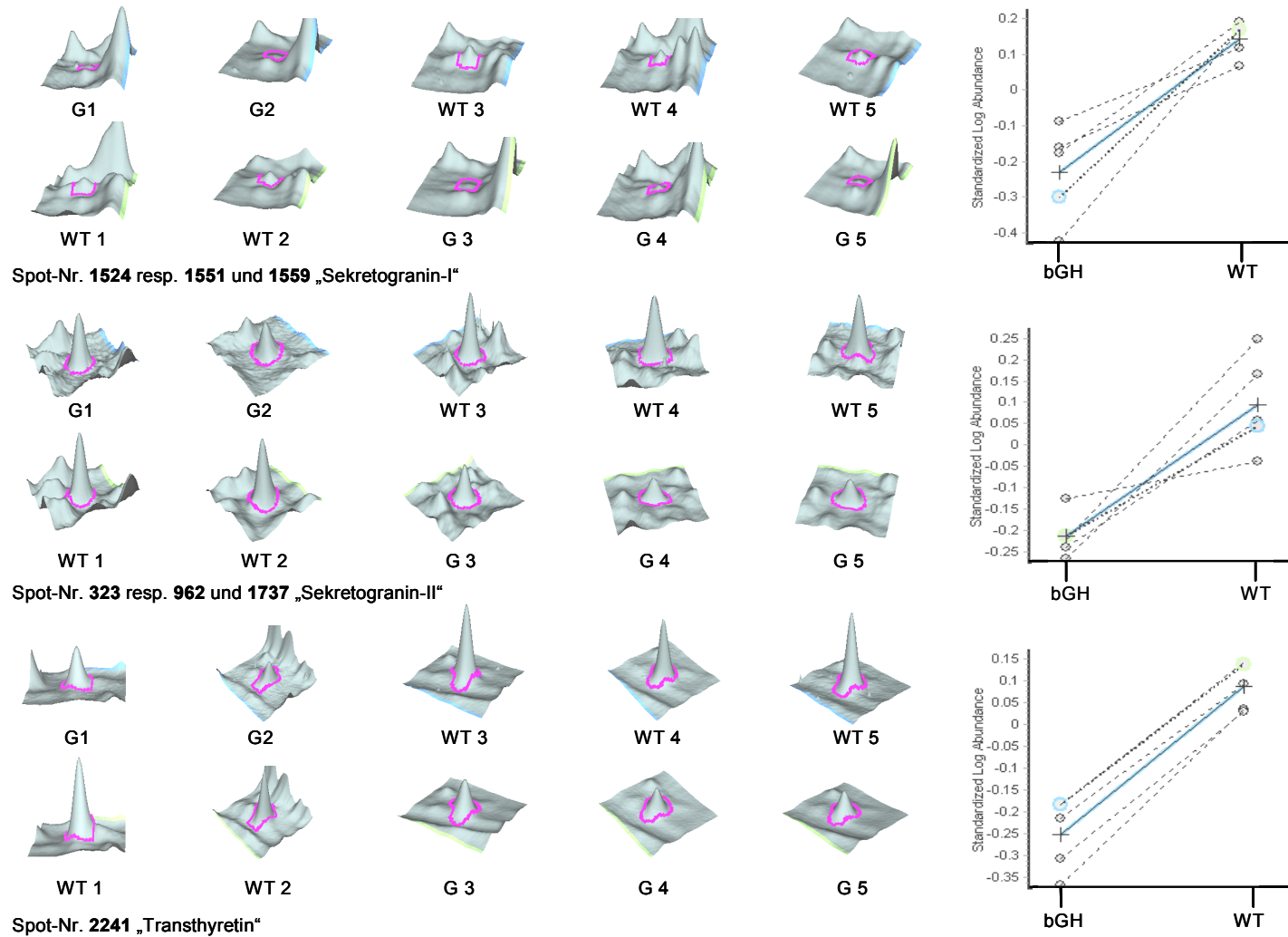


Abbildung 25: 3D-Ansicht der differentiell abundanten Proteinspots (Nr. 1524/1551/1559; 323/962/1737; 2241) und die korrespondierenden „Graph Views“

4.7.2 PEPCK-bGH transgene Mäuse versus PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgener Mäuse

Für den Vergleich bGH transgener versus doppeltransgene Mäuse wurden ebenfalls fünf Gele (15 Images) mit der Software "DeCyder, Version 6.5" ausgewertet. Die Parameter der Auswertung waren: Spot muss in allen Images vorkommen, Student's t-Test: $p < 0,05$ und Unterschiede in der Abundanz um mindestens den Faktor $\pm 2,0$ (siehe auch unter 4.7.1). Bei einem Faktor von $\pm 2,0$ war kein einziger Spot verändert, so dass der Faktor auf $\pm 1,5$ gesenkt wurde. Als Ergebnis waren 4 Spots in ihrer Abundanz verändert. In Abbildung 26 ist ein Cy5 Image von dem Vergleich G versus GB zu sehen.

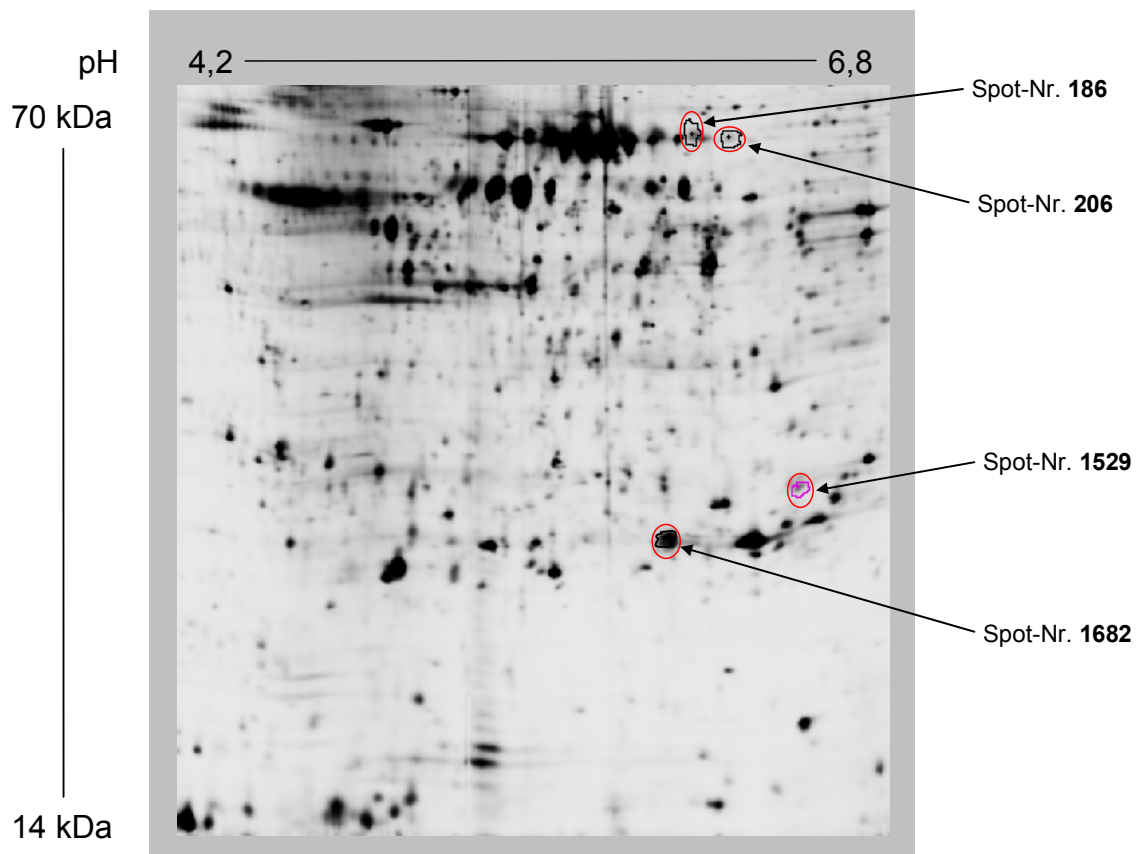


Abbildung 26: Ein Cy5-Image des Vergleichs G versus GB im pH-Bereich 4-7; es wurden 4 differentiell abundante Proteinspots (rot eingekreist) ermittelt

In Tabelle 15 sind die p-Werte und der Abundanzfaktor der vier differentiell abundanten Proteinspots dargestellt.

| Spot-Nr. „DeCyder“ | Student´s t-Test | Abundanzfaktor im Bezug auf bGH |
|-------------------------------|-------------------------|--|
| 186 | 0,03 | - 1,7 |
| 206 | 0,02 | - 1,6 |
| 1529 | 0,011 | + 1,6 |
| 1682 | 0,019 | - 1,5 |

Tabelle 15: p-Werte und Abundanzfaktoren der 4 signifikant differentiell abundanten Proteinspots im Vergleich G versus GB; alle 4 Spots konnten massenspektrometrisch identifiziert werden

In Abbildung 27 sind die vier differentiell abundanten Spots, die im Anschluss auch massenspektrometrisch identifiziert wurden, in ihrer dreidimensionalen Ansicht dargestellt. Neben der 3D-Darstellung ist die Abundanz des jeweiligen Spots in einem Diagramm, der so genannten „Graph View“ logarithmisch auf der Ordinate aufgetragen. Genauere Erklärung siehe unter 4.7.1.

Ergebnisse

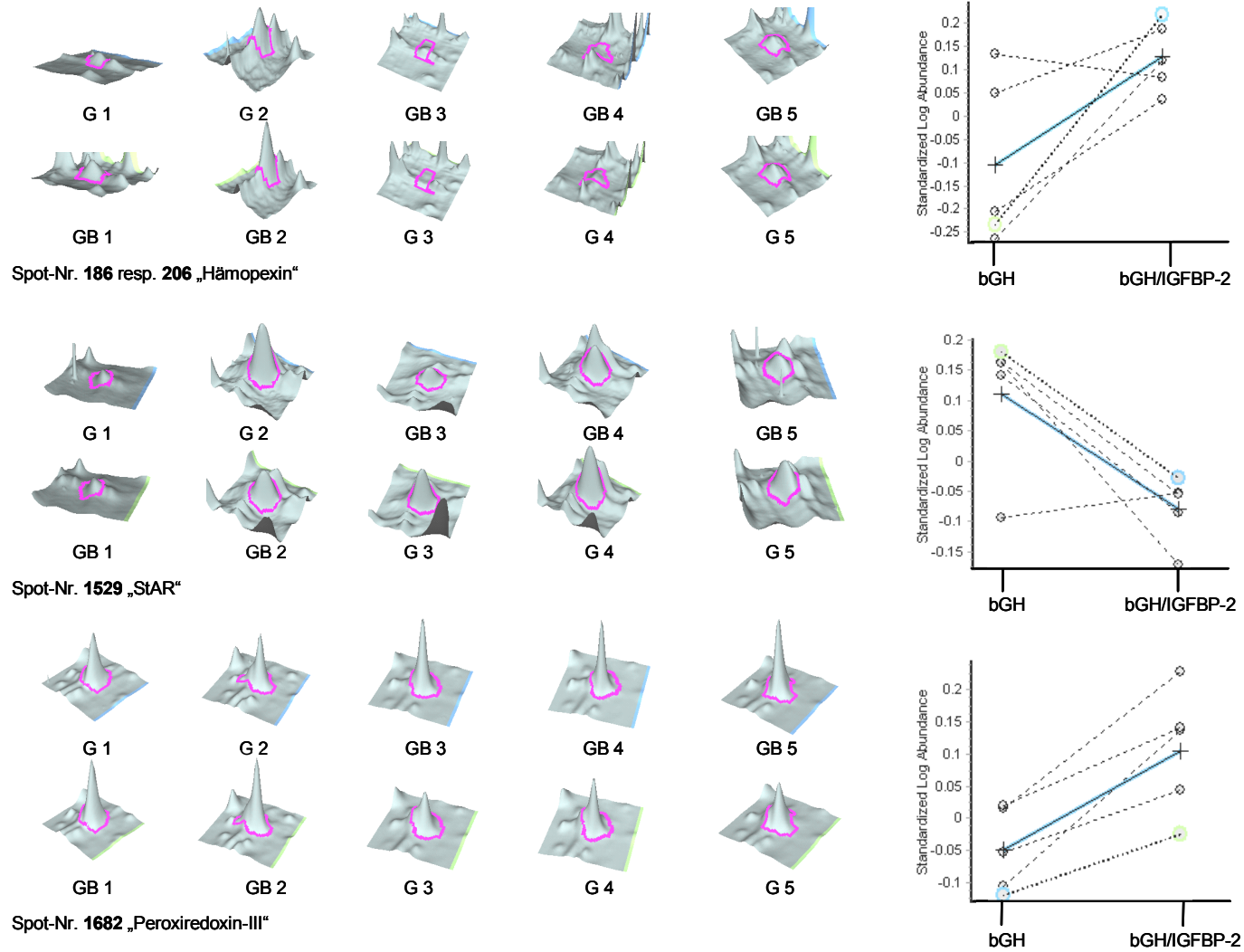


Abbildung 27: 3D-Ansicht der differentiell abundanten Proteinspots (Nr. 186/206; 1529; 1682) und die korrespondierenden Graph Views

4.8 Identifizierung der differentiell abundanten Proteine durch MALDI-TOF/TOF Analyse

Nach der 2D-DIGE Gelauswertung beider Genotypvergleiche wurden präparative Gele mit jeweils 500 µg Gesamtprotein angefertigt. Die differentiell abundanten Spots wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgestochen und mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) identifiziert.

4.8.1 Anfertigung präparativer Gele für die Analyse

Für die Herstellung der Proteinlysate der präparativen Gele wurden sämtliche Lösungen, die für den 2D-DIGE Versuch verwendet wurden, beibehalten. Die präparativen Gele wurden mit der Roti®Blue-Färbelösung (entspricht einer kolloidalen Coomassie-Färbung, siehe unter 3.4.2.2.1; Tabelle 8) angefärbt. In Abbildung 28 sind 20 differentiell abundante Proteinspots im Vergleich G versus WT und 4 differentiell abundante Proteinspots (Nummern sind unterstrichen) im Vergleich G versus GB dargestellt.

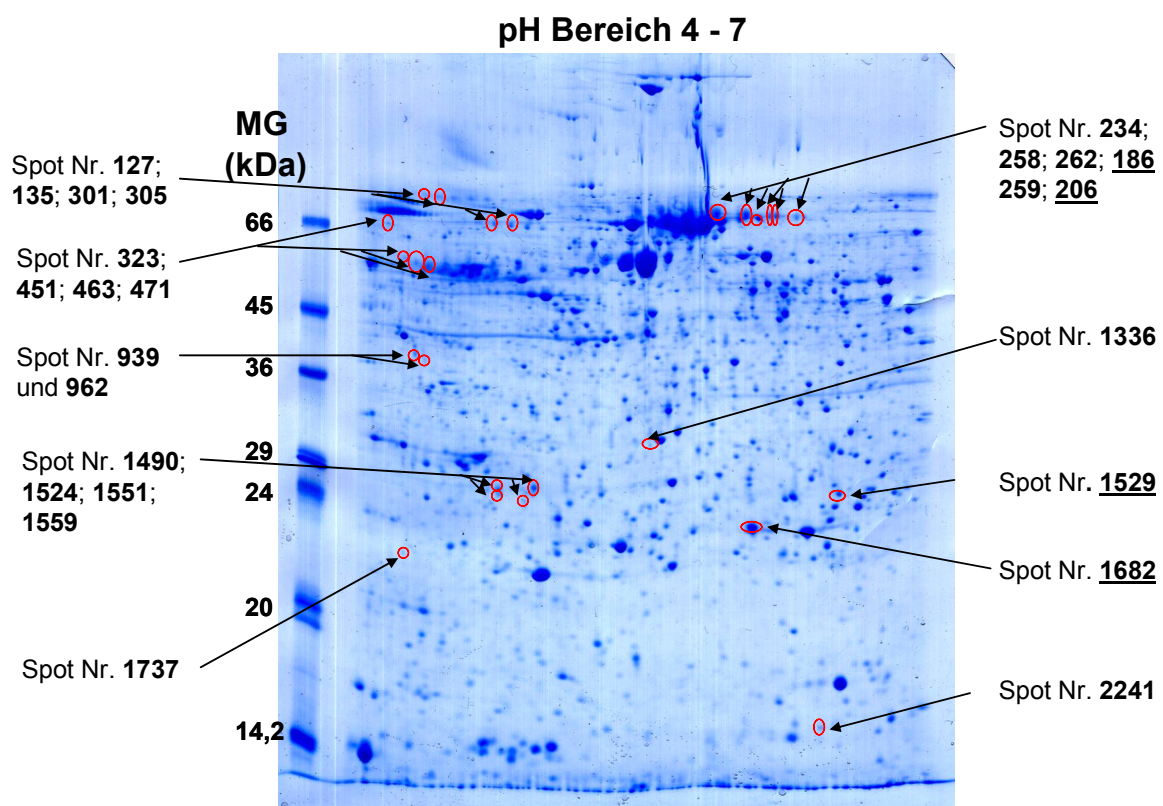


Abbildung 28: Präparatives Gel (pH 4-7) mit Roti®Blue gefärbt; es sind 20 Spots des Vergleichs G versus WT und 4 Spots (unterstrichen) des Vergleichs G versus GB dargestellt

Fünf der insgesamt 25 differentiell abundanten Spots waren zu schwach, um mit der kolloidalen Coomasie-Färbung Roti®Blue detektiert zu werden.

In Abbildung 29 sind die Spot-Nummern 323, 962, 1737 und Spot-Nummern 1524, 1551, 1559 dargestellt. Spot-Nr. 323 (MG ca. 66 kDa), Spot-Nr. 962 (MG ca. 37 kDa) und Spot-Nr. 1737 (MG ca. 22 kDa) wurden in der massenspektrometrischen Analyse als Sekretogranin-2 identifiziert. Spot-Nr. 1524, Spot-Nr. 1551 und Spot-Nr. 1559 mit einem MG von zirka 24 kDa wurden in der massenspektrometrischen Analyse als Sekretogranin-1 identifiziert.

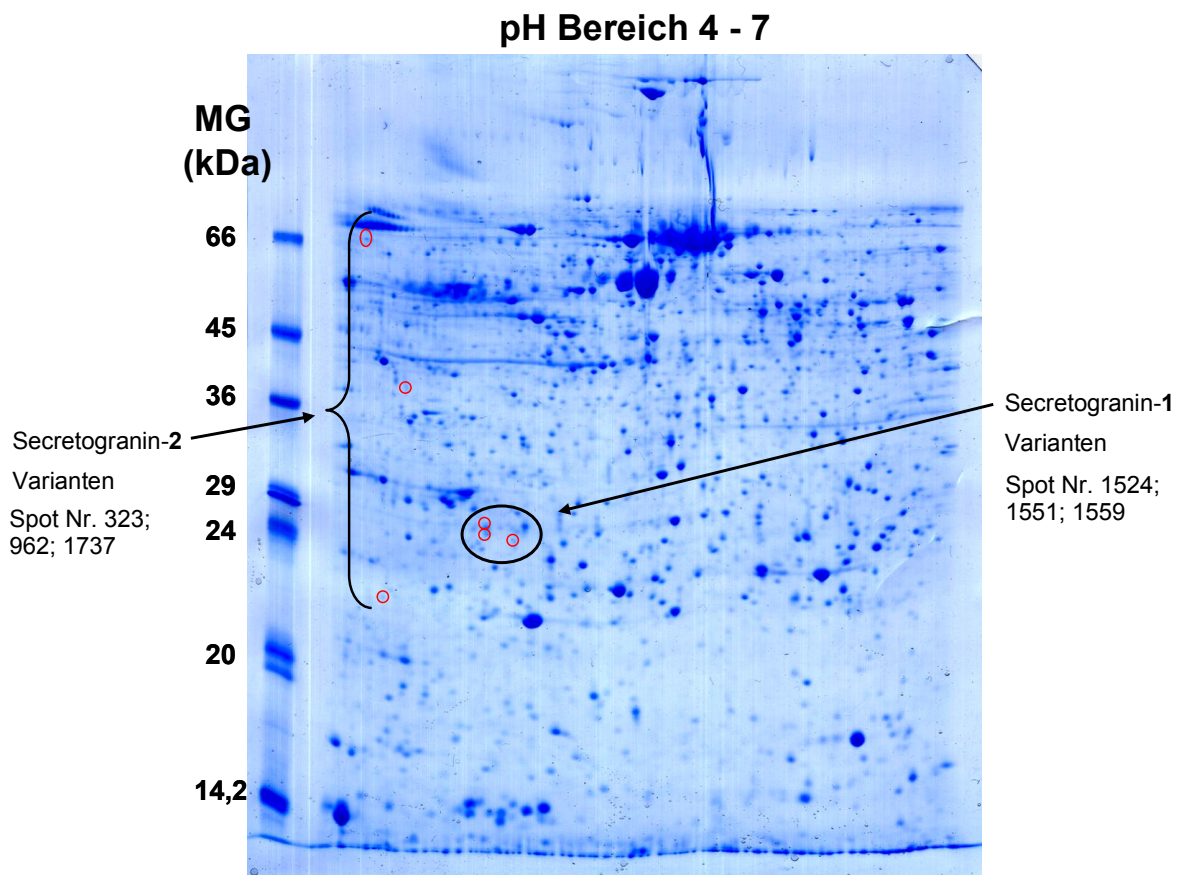


Abbildung 29: Präparatives Gel (pH 4-7) mit Roti®Blue gefärbt; Spot-Nr. 323, 962, 1737 (Sekretogranin-2) und Spot-Nr. 1524, 1551, 1559 (Sekretogranin-1)

4.8.2 Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF Analyse

Die MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie wurde, wie bereits unter 3.7 erklärt, durchgeführt. Die MASCOT-Suche der Ergebnisse wurde über die GPS Explorer[®] Version 3.6 Software in der murinen SwissProt Datenbank (Version 49) durchgeführt. Für die kombinierte MS und MS/MS Suche in der Datenbank wurden folgende Parameter verwendet (siehe Abbildung 30).

| Enzym | Trypsin |
|--------------------------|---------------------|
| Fixed modification | Carbamidomethyl (C) |
| Variable modification | Oxidation (M) |
| Maximum missed cleavages | 2 |
| Precursor tolerance | 200 ppm |
| MS/MS fragment tolerance | 0,5 Da |

Abbildung 30: Angewandte Parameter zur Spezifizierung der „MASCOT“-Suche für die MALDI-TOF/TOF MS Ergebnisse

Von den 25 differentiell abundanten Proteinspots des Vergleichs G versus WT konnten 20 Spots in einem präparativen, Roti[®]Blue gefärbten Gel detektiert werden (siehe Abbildung 28). Spot-Nr. 263, 451, 1149, 1224 und 1399 hatten eine zu geringe Intensität, um sie mit der kolloidalen Coomassie-Färbung sichtbar zu machen. 18 der 20 Spots konnten über die MALDI-TOF/TOF Analyse eindeutig identifiziert werden. Zwei Spots (Nr. 127 und 135) konnten aufgrund einer zu geringen Intensität massenspektrometrisch nicht erfasst werden. In dem Proteomvergleich G versus GB konnten alle 4 differentiell abundanten Proteinspots massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden. In Abbildung 31, 32 und 33 sind die MS-Spektren der erfolgreich analysierten Proteinspots des quantitativen Nebennierenproteomvergleichs G versus WT und G versus GB abgebildet. Das m/z Verhältnis (Masse zu Ladung) ist für die Precursor (Vorläufer) Ionen dargestellt, die während des MS-Schrittes entstehen. Insgesamt hatten die MS-Spektren eine angemessene Intensität. Für jeden einzelnen Spot wurden maximal 10 Precursor Ionen mittels CID (collision-induced dissociation) verarbeitet. Als Ergebnis entstanden pro MS-Spektrum 10 MS/MS-Spektren.

Ergebnisse

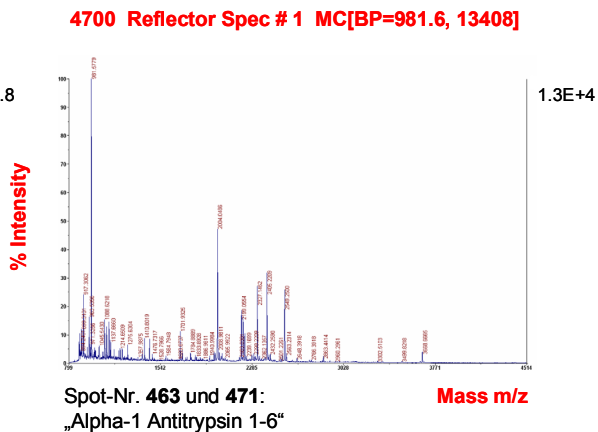
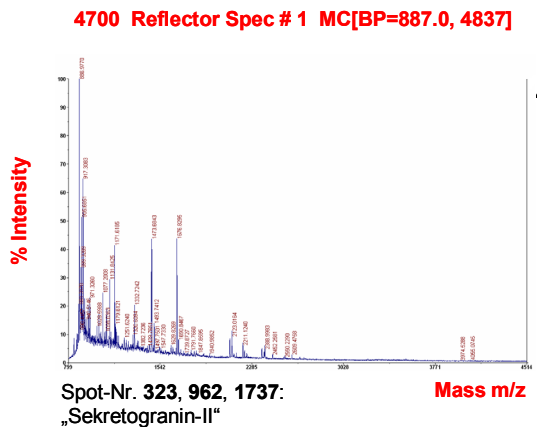
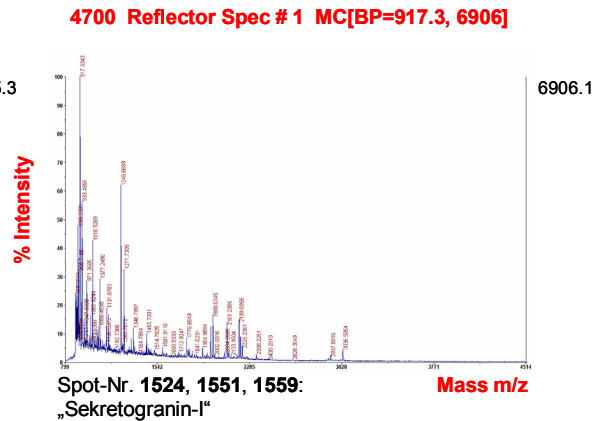
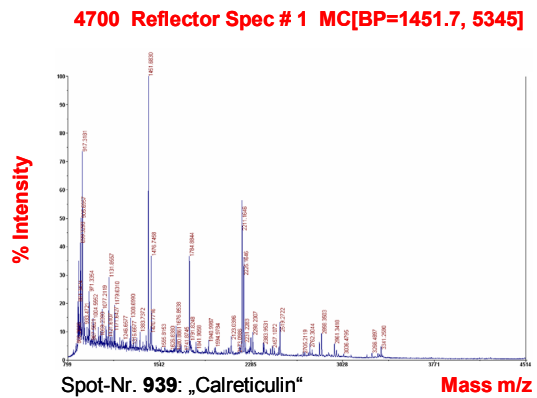
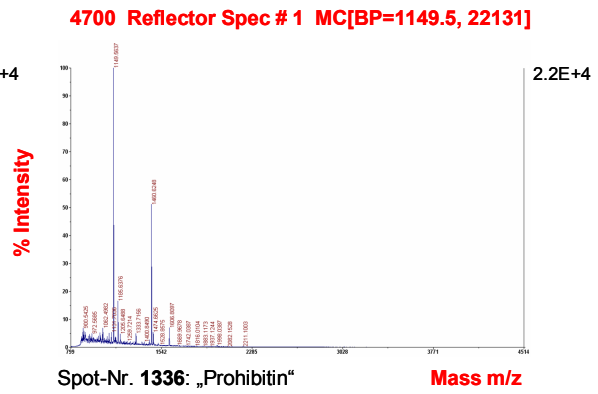
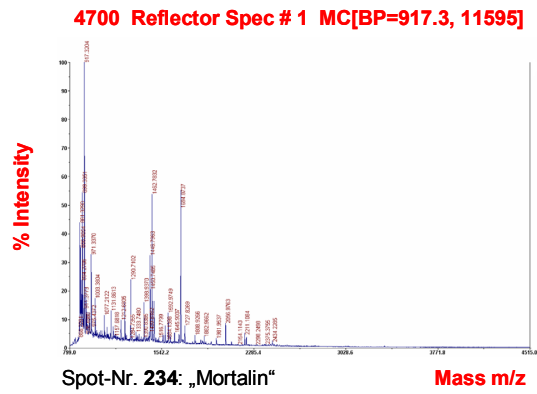


Abbildung 31: MS-Spektren der differentiell abundanten Spots (Nr. 234, 1336, 939, 1524, 1551, 1559, 323, 962, 463 und 471); die Spotnummern beziehen sich auf die Auswertung des Vergleichs G versus WT in der „DeCyder“ Software

Ergebnisse

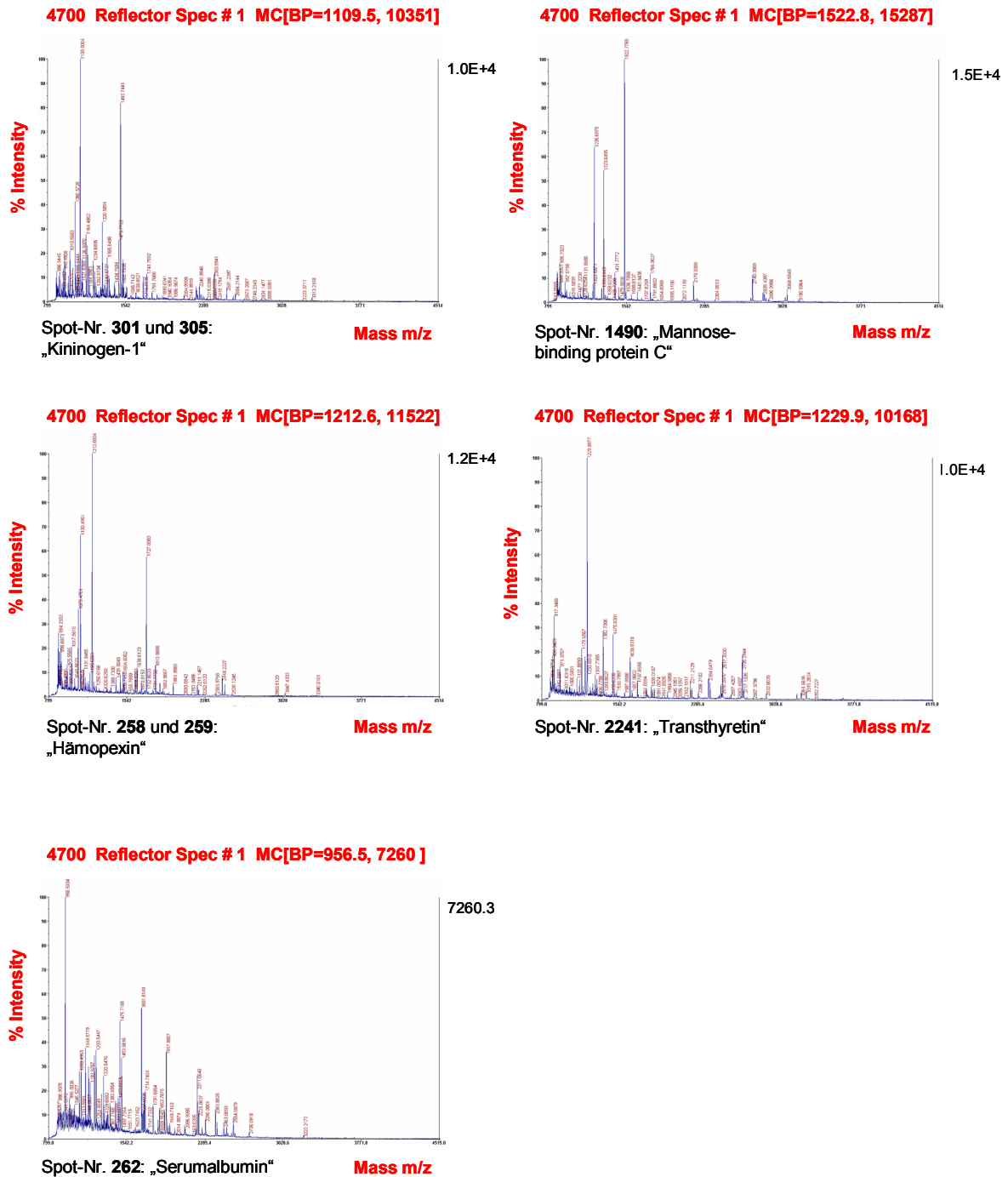


Abbildung 32: MS-Spektren der differentiell abundanten Spots (Nr. 301, 305, 1490, 258, 259, 2241, 262); die Spotnummern beziehen sich auf die Auswertung des Vergleichs G versus WT in der „DeCyder“ Software

Ergebnisse

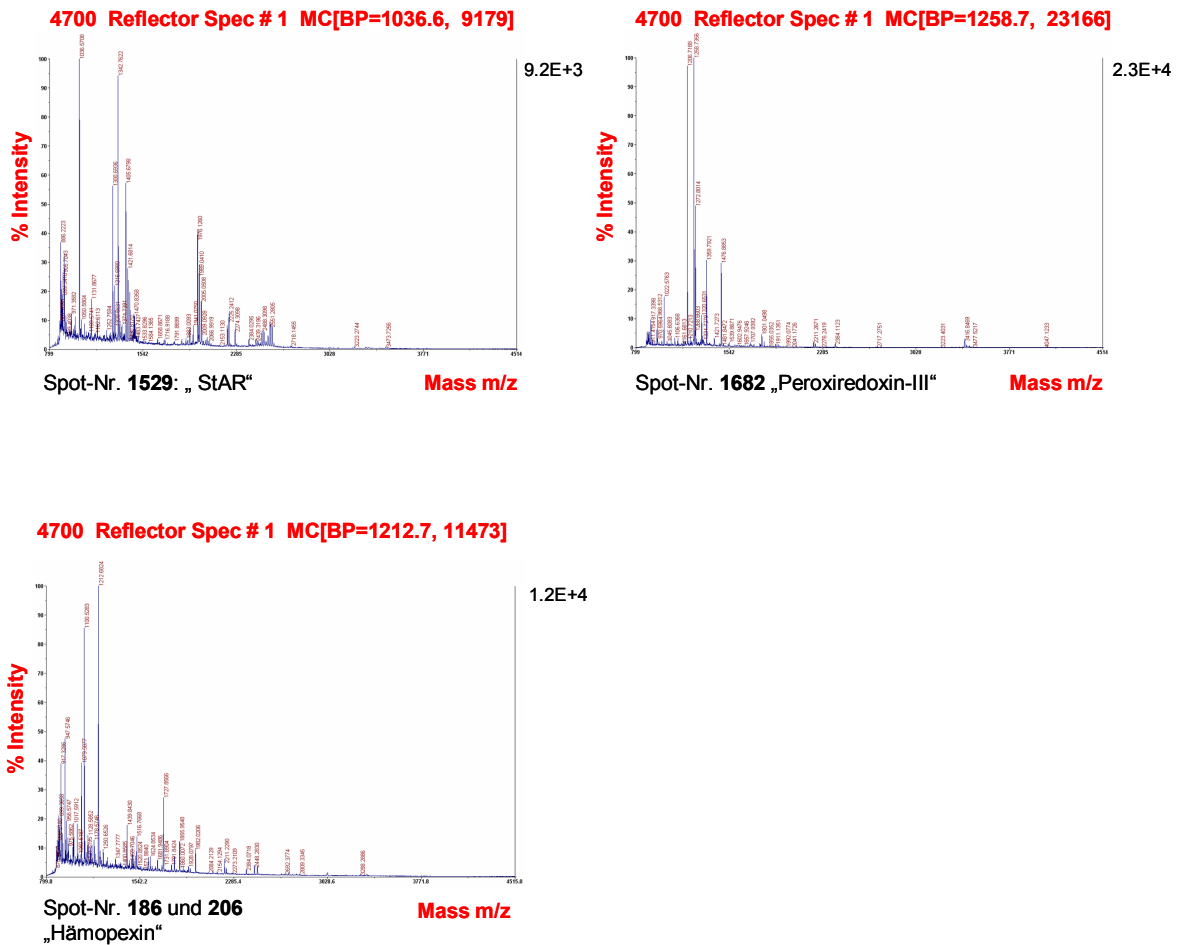


Abbildung 33: MS-Spektren der differentiell abundanten Spots (Nr. 1529, 1682, 186, 206); die Spotnummern beziehen sich auf die Auswertung des Vergleichs G versus GB in der „DeCyder“ Software

Ein Parameter, der die Qualität der Datenbank-Identifikationen beschreibt, ist der so genannte Mascot Protein Score, auch MOWSE Score (molecular weight search) genannt. Dieser Score ist ein Maß für die Signifikanz eines Ergebnisses, indem man diesen mit dem Minimum Score vergleicht. Der Minimum Score sagt aus, welchen Wert die Identifizierungen mindestens besitzen müssen, um als valide eingestuft zu werden. Der Mascot Algorithmus stellt diesen Score als eine Nummer und in einem Diagramm dar. In Abbildung 34 sind zwei Beispiele aufgelistet, wie dieses Diagramm aussehen kann. Für ein valides Ergebnis der MALDI-TOF/TOF Analyse musste der Mascot Protein Score über 56 sein. Das bedeutet, dass in der rechten Abbildung die roten Balken in der grün schraffierten Fläche nicht signifikante Treffer darstellen, wohingegen in der linken Abbildung einen validen Treffer und somit eine valide Proteinidentifizierung aufzeigt.

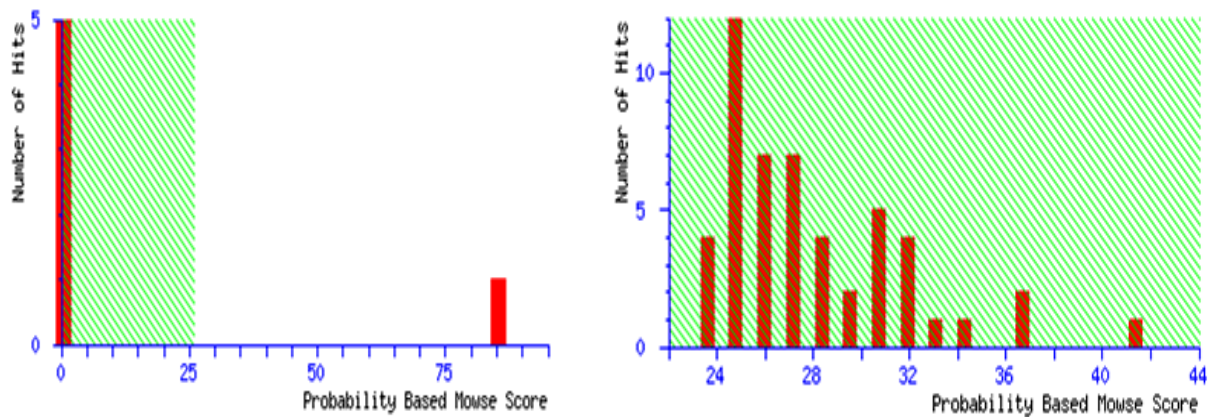


Abbildung 34: Beispiel für den Protein Score (MOWSE Score), die im MASCOT-Ergebnis dargestellt sind. Links: valide Identifikation eines Proteins; rechts: keine Identifikation

In Tabelle 16 und 17 sind die Ergebnisse der Datenbanksuche (murine SwissProt Datenbank, Version 49) dargestellt. Für jedes identifizierte Protein im Nebennierenproteomvergleich G versus WT (insges. 18) und G versus GB (insges. 4) sind die Accession number, das theoretische Molekulargewicht (MG) bzw. der theoretische isoelektrische Punkt (IEP) der Datenbank und der Mascot Protein Score aufgelistet. Den theoretischen Daten ist das im Experiment tatsächlich ermittelte Molekulargewicht bzw. der tatsächlich ermittelte Isoelektrische Punkt gegenübergestellt. Die Fragmente von Sekretogranin-1 bzw. -2 sind im präparativen Coomassie-Gel (Abbildung 29) zu sehen.

Ergebnisse

Ergebnis der Datenbanksuche: bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse

| Spot-Nr. „DeCyder“ | AF | Accession Number „SwissProt“ | Name | Protein Score | Theoret. MG [kDa] | MG Gel [kDa] | Theoret. IEP | IEP Gel |
|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|--|------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| 234 | + 2,0 | GRP75_Mouse P38647 | Mortalin (Stress-70- protein) [Precursor] | 118 | ca. 74 | 68 | 5,5 | 5,8 |
| 1336 | + 3,4 | PHB_Mouse P67778 | Prohibitin | 97 | ca. 30 | 30 | 5,6 | 5,5 |
| 939 | - 2,2 | CALR_Mouse P14211 | Calreticulin [Precursor] | 122 | ca. 48 | 39 | 4,3 | 4,4 |
| 1524 | - 2,4 | SCG1_Mouse P16014 | Secretogranin-1 [Precursor] | 75 | ca. 78 | 24 | 5,0 | 4,8 |
| 1551 | - 2,1 | s.o. | Secretogranin-1 [Precursor] | 58 | s.o. | 24 | s.o. | 4,9 |
| 1559 | - 2,3 | s.o. | Secretogranin-1 [Precursor] | 101 | s.o. | 24 | s.o. | 4,9 |
| 323 | - 2,2 | SCG2_Mouse Q03517 | Secretogranin-2 [Precursor] | 80 | ca. 70 | 66 | 4,7 | 4,2 |
| 1737 | - 2,1 | s.o. | Secretogranin-2 [Precursor] | 94 | s.o. | 22 | s.o. | 4,3 |
| 962 | - 2,0 | s.o. | Secretogranin-2 [Precursor] | 72 | s.o. | 37 | s.o. | 4,4 |
| 463 + 471 | + 2,6 und + 2,1 | A1AT6_Mouse P81105 | Alpha-1 antitrypsin 1-6 [Precursor] | 683 und 401 | ca. 46 | 46 | 5,3 | 4,5 |
| 301 +305 | je + 2,1 | KNG1_Mouse O08677 | Kininogen-1- [Precursor] | 93 und 92 | ca. 73 | 66 | 6,0 | 5,0 |
| 1490 | + 2,2 | MBL2_Mouse P41317 | Mannose- binding protein C [Precursor] | 210 | ca. 26 | 26 | 5,0 | 4,8 |
| 258 + 259 | + 2,5 und + 2,0 | HEMO_Mouse Q91X72 | Hemopexin [Precursor] | 304 und 266 | ca. 51 | 68 | 7,6 | 6,2 |
| 2241 | - 2,2 | TTHY_Mouse P07309 | Transthyretin [Precursor] | 70 | ca. 16 | 16 | 5,8 | 6,4 |
| 262 | + 2,8 | ALBU_Mouse P07724 | Serumalbumin [Precursor] | 478 | ca. 69 | 69 | 5,5 | 6,2 |

Tabelle 16: Alle 18 identifizierten Proteine des Nebennierenproteomvergleichs PEPCK-bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse im Überblick; der Abundanzfaktor (AF) bezieht sich auf PEPCK-bGH transgene Mäuse: + bedeutet differentiell erhöht und – bedeutet differentiell erniedrigt im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.

Ergebnisse

Ergebnis der Datenbanksuche: bGH transgene versus bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse

| Spot-Nr. „DeCyder“ | AF | Accession Number „SwissProt“ | Name | Protein Score | Theoret. MG [kDa] | MG Gel [kDa] | Theoret. IEP | IEP Gel |
|--------------------|-----------------|------------------------------|--|---------------|-------------------|--------------|--------------|---------|
| 1529 | + 1,6 | STAR_Mouse P51557 | Steroidgenetic acute regulatory protein | 97 | ca. 32 | 28 | 6,3 | 6,5 |
| 1682 | - 1,5 | PRDX3_Mouse P20108 | Thioredoxin-dependent peroxide reductase | 200 | ca. 28 | 23 | 5,7 | 6,1 |
| 186 + 206 | - 1,7 und - 1,6 | HEMO_Mouse Q91X72 | Hemopexin [Precursor] | 174 und 396 | ca. 51 | 66 | 7,6 | 6,3 |

Tabelle 17: Alle 4 identifizierten Proteine des Nebennierenproteomvergleichs PEPCK-bGH transgene Mäuse versus PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse im Überblick; der Abundanzfaktor (AF) bezieht sich auf PEPCK-bGH transgene Mäuse: + bedeutet differentiell erhöht und – bedeutet differentiell erniedrigt im Vergleich zu den PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgenen Mäusen.

5 Diskussion

In der zentralen Vorarbeit dieser Studie konnte eine inhibitorische Wirkung von IGFBP-2 auf die GH/IGF-I induzierte Hypertrophie der Nebennierenrindenzellen nachgewiesen werden⁶⁵. Das Ziel dieser Studie war es, eine holistische Proteomanalyse der Nebennieren von Mäusen durchzuführen und zu versuchen, Kandidatenproteine mit Relevanz für das Nebennierenwachstum zu identifizieren. Für die Erstellung des Panels der zu untersuchenden Mäuse wurden weibliche hemizygote CMV-mIGFBP2 transgene Mäuse mit männlichen hemizygoten PEPCK-bGH transgenen Mäusen verpaart, woraus vier genetische Gruppen an Nachkommen resultierten:

Doppeltransgene (**GB**), bGH transgene (**G**), mIGFBP-2 transgene (**B**) sowie nichttransgene (**WT**) Mäuse.

Für die Proteomstudien wurden nur Nebennieren von männlichen Nachkommen verwendet, um eine starke Streuung der Daten aufgrund der variablen Größe der so genannten X-Zone der Nebennieren bei weiblichen Tieren zu vermeiden. Um die Effekte von GH/IGF-I und IGFBP-2 hinsichtlich des Nebennierenwachstums auf Proteomebene zu charakterisieren, wurden folgende Vergleiche vorgenommen:

bGH transgene Mäuse (**G**) versus nichttransgene Mäuse (**WT**)

bGH transgene Mäuse (**G**) versus bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse (**GB**)

Für die Durchführung dieser quantitativen Proteomanalyse standen moderne, hochsensitive Techniken, wie die 2-D DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) und die MALDI-TOF/TOF Analyse (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) zur Verfügung.

Zusätzlich wurde das Nebennierenproteom qualitativ durch Einsatz einer LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) Analyse untersucht.

5.1 Qualitative Proteomanalyse der Nebennieren

Das Nebennierenproteom einer adulten, männlichen C57BL/6N Maus wurde in zwei Ansätzen, mit und ohne Vorfraktionierung des Nebennierenlysats auf Proteinebene, mittels einer 2D-Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Analyse (LC-MS/MS) untersucht. Grund der Untersuchung war das Interesse, durch Einsatz dieser hochauflösenden Technik möglichst viele Proteine des interessanten und funktionell komplexen Organs Nebenniere zu identifizieren.

5.1.1 Diskussion der Methode

Bis heute ist die 2D-SDS-PAGE (zweidimensionale Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese) besonders gut geeignet, um komplexe Proteingemische eines Organs, Gewebes oder biologischer Flüssigkeiten in einzelne Spots zu trennen.

Die LC-MS/MS-Methode stellt eine schnellere und höher automatisierbare Alternative zur 2D-PAGE dar, komplexe Proteingemische aufzutrennen und qualitativ zu analysieren.

Die in dieser Studie verwendete LC-MS/MS Anordnung bestand aus einer zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie und einem ESI (Elektrosprayionisierung)-Massenspektrometer. Die Vorschaltung einer zweidimensionalen (2D) an Stelle einer eindimensionalen (1D) Flüssigkeitschromatographie dient der besseren Trennung des komplexen Peptidgemisches und führt so zu einer höheren Identifizierungsrate. Während bei einer 1D-Chromatographie die „Reversed Phase“ Chromatographie direkt mit der ESI-Ionenfalle gekoppelt ist, wird in der 2D-Anordnung eine Kationenaustauschchromatographie vorgeschaltet. Der Vorteil ist, dass die Elution in Form eines Stufengradienten erfolgt und somit die Komplexität des eingesetzten Probenmaterials pro Zeiteinheit verringert wird. Die Elution wurde aus experimenteller Erfahrung mit sechs Salzlösungen (siehe unter 4.5) in aufsteigender Konzentration durchgeführt und ergab sechs SCX-Fractionen (SCX=strong cation-exchange). Zur Entfernung störender Salzionen wurde jede Fraktion (SCX-Fraktion) in eine „Trap Column“ gepumpt und erst dann schloß sich die zweite Dimension, eine „Reversed Phase“ Chromatographie an. Die „Reversed Phase“ Chromatographie

wurde im Nano-Bereich (Flussrate: 200 nl/min) durchgeführt. Dies führte zur Aufkonzentrierung und Verbesserung des „Signal-to-Noise“-Verhältnisses. Die massenspektrometrische Sensitivität konnte erhöht werden und lag im femtomol [10^{-15}] Bereich.

Derzeitig ist eine LC-MS/MS Analyse in der Lage, mehrere hundert bis ein paar tausend Proteine zu identifizieren⁵⁰. Dies ist jedoch nur ein kleiner Ausschnitt aus dem eukaryontischen Proteom, das aus zirka 5×10^4 unterschiedlichen Proteinen besteht¹³⁸. Um an die obere Grenze der maximal möglichen Identifizierungen zu gelangen ist eine Vorfraktionierung des Untersuchungsmaterials unumgänglich.

Für eine Vorfraktionierung komplexer Proteingemische stehen verschiedene leistungsstarke Methoden zur Verfügung, wie zum Beispiel fraktionierte Zentrifugation, trägerfreie Elektrophorese oder Gelelektrophorese. Die eindimensionale (1D) Gelelektrophorese wurde für diesen Versuch ausgewählt, da sie ohne großen Geräteinsatz und innerhalb kurzer Zeit eine gute Trennung des Nebennierenproteoms bot. Auf ein 1D-Gel wurden sechs unterschiedliche Proteinkonzentrationen (12 µg, 25 µg, 37,5 µg, 50 µg, 62,5 µg und 75 µg) des Nebennierenlysats aufgetragen. Die mit 25 µg beladene Gelspur zeigte nach der Coomassie-Färbung eine klare Auftrennung des Proteingemisches in einzelnen Banden, wohingegen der Einsatz höherer oder niedrigerer Proteinkonzentrationen keine Verbesserung darstellte. Für die Reduktion der Komplexität wurde die 25 µg Gelspur in zwölf ungefähr gleichgroße Stücke eingeteilt. Die in den Gelstücken enthaltenen Proteine mussten vor der LC-MS/MS Analyse noch mit einer Endopeptidase, in diesem Fall mit Trypsin, gespalten werden, da die massenspektrometrische Analyse ausschließlich auf Peptidebene funktioniert.

Die qualitative Proteomanalyse der „nativen“ (ohne Vorfraktionierung) Peptidlösung sowie die Peptidlösung eines jeden Gelstückes lieferten jeweils sechs SCX-Fractionen als Ergebnis der ersten Dimension der Flüssigkeitschromatographie. Jede Fraktion durchläuft einzeln die zweite Dimension und die massenspektrometrische Analyse. Die entstandenen Spektren jeder Fraktion mussten einzeln, insgesamt sechsmal mit den SwissProt- und den IPI-Datenbankeinträgen verglichen werden.

Eine Vorfraktionierung der Proteine mit der 1D-Gelelektrophorese ergab zwölf einzelne Banden. Zwölf LC-MS/MS Analysen mit je sechs SCX-Fractionen, die einzeln weiterverarbeitet wurden, bedeutete einen zwölfmal höheren Arbeitsaufwand, der sich angesichts der Ergebnisse rechtfertigte.

5.1.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Vorschaltung einer 1D-Gelelektrophorese führte zu einer erheblichen Steigerung der Anzahl identifizierter Proteine und zwar von 151 auf 868 (SwissProt Datenbank) bzw. von 166 auf 964 (IPI Datenbank) Proteine. Somit unterschied sich die Zahl der Proteinidentifikationen deutlich um den Faktor sechs.

Die Klassifizierung der Proteine nach ihrer Lokalisation wies eine ähnlich prozentuale Verteilung auf. Ohne Vorfraktionierung des Probenmaterials auf Proteinebene ergab sich folgende Verteilung: 66% intrazelluläre Proteine, 18% extrazelluläre Proteine und 16% Membranproteine. Die Vorfraktionierung mittels 1D-Gelelektrophorese ergab: 63% intrazelluläre Proteine, 14% extrazelluläre Proteine und 23% Membranproteine.

Der einzige Unterschied lag in der höheren Identifizierungsrate (um 7%) von Membranproteinen mit Vorfraktionierung. Eine Identifizierung von über 20% Membranproteinen ist bemerkenswert, da viele davon schwer löslich sind und damit seltener identifiziert werden.

Die Analyse des Nebennierenproteoms der adulten, männlichen C57BL/6N Maus mit der LC-MS/MS-Methode ergab ohne vorherige Fraktionierung des Probenlysats auf Proteinebene insgesamt 151 bzw. 166 unterschiedliche und eindeutig identifizierte Proteine. Die Identifizierung der Proteine erfolgte über die Eingabe der massenspektrometrischen Daten in „MASCOT“ und der Suche aller erhaltener MS- und MS/MS-Spektren gegen die murine SwissProt (Version 49) bzw. die murine IPI Datenbank (Version 3.16). Ein Protein wurde mit mindestens zwei unterschiedlichen Peptiden und einem Mascot ion score cut-off über 30 als identifiziert gewertet. Um die identifizierten Proteine zu kategorisieren, wurde sie nach ihrer zellulären Lokalisation über ein im Internet verfügbares Programm, „BABELOMICS“ (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) eingeteilt.

Die Kategorisierung der 151 identifizierten Proteine nach Lokalisation ergab, dass 66% (absolute Anzahl: 100) der Proteine intrazellulären, 18% (absolute Anzahl: 27) extrazellulären Ursprungs und 16% (absolute Anzahl: 24) Membranproteine (u.a. Synaptobrevin-2, Synaptic vesicle membrane protein) sind. Unter den identifizierten Proteine waren auch nebennierenspezifische, zum einen Proteine der Granin-Familie (Chromogranin A+B, Sekretogranin-2) und zum anderen Proteine, die an der Steroidhormongenese beteiligt (insgesamt 7, u.a. Perilipin und Apolipoprotein A-I) sind. Des Weiteren wurden Hämoglobin (α -und β -Kette), Heat Shock Proteine (insgesamt 8, u.a. Stress-70 protein, Heat shock protein HSP 90-beta) und Signalproteine (insgesamt 9, u.a. Protein kinase C inhibitor protein 1, 14-3-3 protein) identifiziert.

Bisher ist in der Literatur keine LC-MS/MS Analyse des murinen Nebennierenproteoms beschrieben. Eine LC-MS/MS Analyse des bovinen Nebennierenmarks wurde 2004 von Jalili und Dass durchgeführt ⁸¹.

Jalili und Dass konnten über die „SEQUEST“ Software in der NCBI Nr Datenbank 191 Proteine identifizieren, wobei nach Anwendung strenger Auswahlkriterien nur 71 gute Score-Werte hatten. Die Auswahlkriterien waren wie folgt: delta correlation value > 0,1; preliminary score > 200; cross-correlation value über 2,5. Aufgrund dieser Auswahlkriterien wurden nur Proteine mit mindestens 2 oder mehr Peptiden identifiziert. Die Proteine mit der höchsten Anzahl an identifizierten Peptiden waren Chromogranin A und B, Proenkephalin A, Myosin X, Hämoglobin (α -und β -Kette), Heat shock Protein 10 kDa und Replikase ⁸¹.

Übereinstimmend wurden in beiden Studien nebennierenspezifische Proteine der Granin-Familie gefunden. Chromogranine bzw. Sekretogranine gelten als Indikatoren für die sympathoadrenale Aktivität. Weitere Übereinstimmungen treffen auf die Identifizierung von Heat shock Proteinen und auf Hämoglobin zu. Ein Unterschied lag in der Identifizierung von Proteinen, die mit der Steroidhormonsynthese in Verbindung stehen. Diese wurden nur in der kompletten Nebennierenproteomanalyse identifiziert. Die Tatsache, dass die Steroidhormonsynthese in der Nebennierenrinde und nicht im Nebennierenmark stattfindet, könnte der Grund dafür sein.

Die Analyse des Nebennierenproteoms der C57BL/6N Maus mit vorheriger Fraktionierung des Probenlysats auf Proteinebene (1D-Gelelektrophorese) ergab nach der Suche aller erhaltener MS- und MS/MS-Spektren gegen die murine SwissProt Datenbank 868 Proteine und gegen die murine IPI Datenbank 964 Proteine. Die hohe Anzahl an Identifizierungen ist bemerkenswert, da kaum Studien über Gewebe bzw. Organe vorliegen, in denen ähnliche Zahlen an unterschiedlichen Proteinen festgestellt wurden. Die Identifizierung von 96 Proteinen mehr in der IPI-Datenbank (301.482 Einträge, Stand April 2007) kann an der höheren Zahl der Einträge, im Vergleich zur SwissProt Datenbank (261.513 Einträge, Stand April 2007) liegen. Die Zahlen der Einträge innerhalb der Datenbanken unterscheiden sich deutlich, da in der IPI Datenbank potentielle und vorhersagbare Proteine und Proteinvarianten beinhaltet sind, wohingegen die SwissProt Datenbank spezialisiert ist, nur die funktional bereits charakterisierten Proteine in Verbindung mit der entsprechenden Literatur bereitzustellen und alle Proteine auszuschließen, die einzig durch Genbestimmungsalgorithmen vorhersagbar sind⁵⁰. Um das Ergebnis einer Datenbanksuche auf falsch-positive Identifizierungen zu untersuchen, wurden „Decoy“ Datenbanken (engl.: decoy = Falle bzw. Köder) generiert. Jeder Sequenzeintrag der ursprünglichen Datenbank wird in einer „Decoy“ Datenbanken unter Beibehaltung der Aminosäure-Zusammensetzung neu angeordnet. Matches sind per definitionem zufällig. Das Verhältnis der Decoy-Identifizierungen zu den ursprünglichen Identifizierungen gibt die Rate der falsch-positiven unter den Identifizierungen an. Sowohl der SwissProt Datensatz, als auch der IPI Datensatz wurde gegen die „Decoy“ Datenbank analysiert. Das Ergebnis der „Decoy“ Datenbanksuche war eine falsch-positiv Rate von 1% in der Decoy-IPI und von 0,2% in der Decoy-SwissProt Datenbank. Eine falsch-positiv Rate von 1% ist verhältnismäßig gering.

Die hohe Anzahl an Identifizierungen (über 900 Proteine) in Verbindung mit einer geringen falsch-positiv Rate zeigen, wie leistungsfähig die moderne Massenspektrometrie ist.

Die stetige Weiterentwicklung der Massenspektrometrie reflektiert sich in einer aktuellen Studie von Adachi et al. 2006. In dieser Studie konnten exakt 1543 Proteine im Proteom des humanen Urins mittels einer LC-MS/MS Analyse mit

einer noch leistungsfähigeren massenspektrometrischen Methode identifiziert werden. Der Urin wurde mit Hilfe von Ultrazentrifugation konzentriert und über eine eindimensionale Gelelektrophorese und eine Flüssigkeitschromatographie vorfraktioniert. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit einem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer durchgeführt. Das LTQ-Orbitrap ist ein Hybrid Massenspektrometer, das auf einem neuartigen Analysatorkonzept, einer elektrostatischen Ionenfalle (Orbitrap) beruht. Damit sind noch genauere Massenmessungen an Molekülonen und deren Fragmenten bei gleichzeitig extrem hoher Massenauflösung möglich, als bei herkömmlichen Geräten mit linearer Ionenfalle. Die Suche gegen die „Decoy-Datenbank“ ergab daher keinen einzigen falsch-positiven Treffer¹.

Die stetige Weiterentwicklung in der Massenspektrometrie ermöglicht sowohl eine immer größere Anzahl an Proteinidentifizierungen aus Organen, Geweben oder biologischen Flüssigkeiten, als auch einen Einblick in posttranslationale Modifikationen der Proteine und ihre daraus resultierenden Funktionsänderungen.

5.2 Quantitative Proteomanalyse der Nebennieren

Das Ziel dieser Studie war es, eine holistische (vom Griechischen holos = das Ganze) Proteomanalyse der Nebennieren von Mäusen durchzuführen und zu versuchen, Kandidatenproteine mit Relevanz für das Nebennierenwachstum zu identifizieren. Es wurden Nebennieren von 11 Wochen alten, männlichen Mäusen eingesetzt und in zwei Ansätzen miteinander verglichen: bGH transgene Mäuse (G) versus nichttransgene Mäuse (WT) und bGH transgene Mäuse (G) versus bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse (GB).

Es wurde eine quantitative Proteomanalyse der Nebennieren in den zwei Versuchsanordnungen (siehe oben) mit der 2D-DIGE Analyse durchgeführt.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Die unspezifischen Amplifikationen (330 bp und 120 bp große Banden), die während der IGFBP-2 PCR auftraten, konnten durch die Verwendung einer HotStar Taq Polymerase an Stelle einer normalen Taq Polymerase beseitigt werden. PCRs mit nicht eindeutigen Ergebnissen wurden wiederholt.

Da die Nebenniere unter dem Einfluss der GH/IGF-I Achse steht und ihre Hormonproduktion tageszeitliche Schwankungen aufweist, erfolgte die Nebennierenpräparation aller Versuchstiere immer zur gleichen Tageszeit (10 Uhr). Das Abpräparieren des umliegenden Fettgewebes von den Nebennieren erfolgte gründlich unter dem Mikroskop. Die Zeit von acht Minuten zwischen der Nebennierenpräparation und dem anschließenden Gefrieren beider Organe auf Trockeneis wurde bei jeder Präparation exakt eingehalten. Somit konnte hinsichtlich der Präparation ein ausgesprochen gut definiertes und homogenes Ausgangsmaterial geschaffen werden.

Bevor die 2-D DIGE Analyse durchgeführt wurde, mussten die Präparation und Lyse der Nebennieren auf ihre Eignung für die 2D-SDS-PAGE (zweidimensionale Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektro-phorese) und auf ihre Reproduzierbarkeit hin überprüft werden. Hierfür wurden aus einem Nebennierenlysat einer Wildtyp-Maus fünf 2D-SDS-Gele (pH 4-7) angefertigt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby angefärbt. Alle fünf Sypro Ruby gefärbten 2D-Gele wurden mit der Software „Proteomweaver, Version 2.2“ (von Definiens) ausgewertet. Der Vergleich der fünf Gele erfolgte hinsichtlich der jeweiligen

Gesamtanzahl der Spots und der Position im jeweiligen Gel. 532 Proteinspots konnten in jedem Gel bestimmt werden. Die positionelle Überprüfung (pH-Bereich und Molekulargewicht) der 532 Spots, die in allen fünf Gelen vorkamen, ergab keine Abweichungen.

Im nächsten Schritt wurde eine so genannte „Cross-Labeling“ Reaktion durchgeführt. Hierfür wurden die Nebennierenlysate der Wildtyp-Mäuse Nummer 237 und 239 mit den DIGE Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 und umgekehrt markiert. Der interne Standard, bestehend aus einer Mischung beider Lysate, wurde mit Cy 2 markiert (siehe unter 4.6). Die Auftrennung beider Ansätze erfolgte über die 2D-SDS-PAGE und die Auswertung wurde mit der Software „DeCyder, Version 6.5“ (GE Healthcare) durchgeführt. Mit dieser Technik konnte zum einen überprüft werden, inwieweit die Nebennierenlysate reproduzierbar hergestellt werden können. Zum anderen, ob potentielle Unterschiede der Abundanz der Spots durch die Farbstoffe hervorgerufen werden können. Fluoreszenzfarbstoffe können artifiziell die Abundanz verändern, indem sie als so genannte Lichtflecken (engl.: speckles) auftreten. Derartige Lichtflecken, die sich als sehr kleine und intensiv gefärbte Punkte darstellen, traten in beiden Gelen auf. Die Filterkriterien in der Software „DeCyder“ wurden so eingestellt, dass die störenden Lichtflecken vor der Auswertung entfernt werden konnten. Der Vergleich der beiden 2D-DIGE-Gele untereinander zeigte keine differentiell abundanten Proteinspots. Da der Zellaufschluss der Nebennieren und die technische Durchführung der 2D-Gelelektrophorese keiner Optimierung hinsichtlich der Reproduzierbarkeit bedurften, konnte mit der 2D-DIGE Analyse begonnen werden.

5.2.1 Diskussion der Methode

Bis heute ist die 2D-SDS-PAGE (zweidimensionale Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese) besonders gut geeignet, um komplexe Proteingemische in einzelne Spots zu trennen. Die 2D-DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) Technik kombiniert die 2D-SDS-PAGE mit der sogenannten „Minimal Labeling“ Technik (siehe unter 3.6) und ermöglicht dadurch das Markieren von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen vor der zweidimensionalen Auftrennung. Diese Kombination eignet sich hervorragend, das Proteinexpressionmuster zweier unterschiedlicher Zellzustände, gesund zu pathologisch oder zweier unterschiedlicher Genotypen, wie in dieser Studie, quantitativ zu untersuchen.

Das Auftragen der Proteinprobe auf den Gelstreifen in der 1. Dimension der 2D-SDS PAGE kann auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt werden. Zum einen wird das Proteinlysate kurz vor dem Start der IEF mit Hilfe eines Probenaufgabetrichters, dem so genannten „Cup-Loading“, aufgetragen. Dies ist aber nur bis zu einem Probenvolumen von insgesamt 200 µl (Anoden- und Kathodenbeladung) möglich. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Proteinlysate nur kurz ungekühlt ist und somit eine geringe Chance für Proteinmodifikationen besteht, bevor es fokussiert wird. Der 2D-DIGE Versuch konnte mit „Cup-Loading“ durchgeführt werden.

Für die Erstellung der präparativen Gele (500 µg Gesamtproteinkonzentration) kam die zweite Methode des Probenauftrags aufgrund des zu großen Probenvolumens (über 200 µl) zum Einsatz. Hierbei wird die Proteinprobe (max. 350 µl) für zirka 12 Stunden in den Gelstreifen eingequollen. Nachteil dieser Methode war, dass sich das Proteinlysate für zirka 12 Stunden außerhalb des Tiefkühlschranks befand und Proteinmodifikationen möglich waren. Aufgrund nicht definierbarer Vorgänge in der 1. Dimension, zeigten sich vereinzelt in der 2. Dimension horizontale Streifen. Dadurch waren einzelne Proteinspots zu einer Bande verschmolzen und konnten somit auch nicht für die weitere Identifizierung verwendet werden.

Für die 2-D DIGE Analyse und für die sich anschließenden präparativen Gele wurde der pH-Bereich 4-7 ausgewählt, da sich in den Vorversuchen, siehe unter 4.6 zeigte, dass sich die einzelnen Proteinspots optisch sehr gut aufgelöst und deutlich voneinander abgegrenzt darstellten.

Pro Genotypenvergleich (**G** versus **WT** und **G** versus **GB**) wurden fünf, insgesamt zehn DIGE-Gele in der „DeCyder“ Software hinsichtlich differentiell abundanter Proteinspots ausgewertet. Alle zehn DIGE-Gele wurden hinsichtlich des Software Alignments der einzelnen Proteinspots einer ausführlichen visuellen Prüfung unterzogen. Bei fehlerhafter Zuordnung der positionell identischen Proteinspots innerhalb der drei Images eines Gels wurde manuell korrigiert.

Idealerweise sollten sich die differentiell abundanten Proteinspots von den 2D-DIGE Gelen auf der identischen Position in den präparativen Coomassie-Gelen wieder finden, aufgrund der Tatsache, dass die DIGE Farbstoffe (Cy2, 3, 5) das Laufverhalten der Proteine nicht verändern. Des Weiteren wurden sämtliche Lösungen zur Herstellung der Proteinlysate sowohl für den 2D-DIGE Versuch, als auch für die präparative Gele verwendet. Auch der pH-Bereich von 4-7 und das Protokoll für die erste und zweite Dimension der SDS-PAGE wurden exakt beibehalten. Um die Zuordnung des jeweiligen Spots zwischen den analytischen (DIGE) und den präparativen Gelen zu erleichtern, wurde jeweils der identische Molekulargewichtsmarker verwendet. Die Exzision der differentiell abundanten Proteinspots aus einem präparativen Coomassie-Gel erfolgte manuell mittels abgeschnittener 200 µl Pipettenspitzen, so dass diese Durchmesser von 2-3 mm aufwiesen. Dieser Vorgang wäre auch komplett automatisch möglich gewesen. Hierbei wird aber eine Spotexzisionsnadel mit Standarddurchmesser verwendet, wohingegen der Pipettenspitzendurchmesser je nach Größe des Spots variiert werden konnte.

Der Einsatz der ZipTips[®] von Millipore war das Mittel der Wahl, um Salze, die die massenspektrometrische Analyse empfindlich stören würden, zu entfernen.

Für die exakte Identifizierung der differentiell abundanten Proteine der Nebennieren in den zwei Versuchsansätzen bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse und bGH transgene versus bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse wurde das 4700 MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer von Applied Biosystems verwendet. Die MALDI-TOF/TOF Analyse ist die eleganteste Methode, um Proteinspots zu analysieren, da jeder Spot auf einer bestimmten Position des Targets fixiert ist und für jeden einzelnen Spot die massenspektrometrischen Parameter verändert werden können. Im Vergleich zu einem LC-ESI Setup ist die MALDI-TOF/TOF Analyse schneller, da

die „Reversed Phase“ Gradienten der Flüssigkeitschromatographie und der entsprechende Leerlauf zwischen den einzelnen Spots wegfällt.

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse in der Nebennierenproteomstudie bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse

Es wurden pro Genotyp fünf biologische Proben (Nebennieren) für die Analyse verwendet. Somit konnten fünf 2D-DIGE Gele (insgesamt 15 Images) mittels der Software „DeCyder, Version 6.5“ ausgewertet werden. Für die Auswertung der Gele wurden folgende, stringente Parameter angewandt:

Der p-Wert des Student's t-Tests lag bei 0,05; die Abundanz der Spots musste sich um mindestens den Faktor + 2 oder – 2 unterscheiden und die Spots mussten in allen Images vorkommen.

Das Ergebnis der Auswertung waren 25 Proteinspots, die in ihrer Abundanz verändert waren. Der p-Wert lag zwischen $1,4 \times 10^{-6}$ und 0,03; der Abundanzfaktor lag zwischen +/- 2,0 und 3,4.

Von den 25 in der Abundanz um mindestens den Faktor +/- 2,0 veränderten Proteinspots konnten 18 eindeutig identifiziert werden (siehe Tabelle 18). Von den restlichen 7 Proteinspots konnten 5 Spots in den präparativen Gelen nicht mehr detektiert werden und 2 Spots waren nur sehr schwach auf dem präparativen Gel zu erkennen und konnten mittels der MALDI-TOF/TOF Analyse nicht identifiziert werden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe (Cy2, 3 und 5) des 2D-DIGE Systems sind sehr sensitiv. Dass bedeutet, sie können bis zu 125 pg eines einzelnen Proteins detektieren (gemäß Herstellerangaben). Wenn ein Protein gerade noch mit den hochsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen detektiert wurde, kann dieses Protein trotz Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration von 150 µg auf 500 µg mit der weniger sensitiven Roti® Blue-Färbung meist nicht mehr detektiert werden.

| Spot-Nummer „DeCyder“ | Abundanzfaktor | Accession Number „SwissProt“ | Proteinname |
|--------------------------|-----------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 234 | + 2,0 | GRP75_Mouse P38647 | Mortalin (Stress-70-protein) |
| 1336 | + 3,4 | PHB_Mouse P67778 | Prohibitin |
| 939 | - 2,2 | CALR_Mouse P14211 | Calreticulin |
| 1524 | - 2,4 | SCG1_Mouse P16014 | Secretogranin-1 |
| 1551 | - 2,1 | s.o. | s.o. |
| 1559 | - 2,3 | s.o. | s.o. |
| 323 | - 2,2 | SCG2_Mouse Q03517 | Secretogranin-2 |
| 1737 | - 2,1 | s.o. | s.o. |
| 962 | - 2,0 | s.o. | s.o. |
| 463 + 471 | + 2,6 und + 2,1 | A1AT6_Mouse P81105 | Alpha-1 antitrypsin 1-6 |
| 301 +305 | je + 2,1 | KNG1_Mouse O08677 | Kininogen-1 |
| 1490 | + 2,2 | MBL2_Mouse P41317 | Mannose-binding protein C |
| 258 + 259 | + 2,5 und + 2,0 | HEMO_Mouse Q91X72 | Hemopexin |
| 2241 | - 2,2 | TTHY_Mouse P07309 | Transthyretin |
| 262 | + 2,8 | ALBU_Mouse P07724 | Serumalbumin |

Tabelle 18: Im Überblick alle 18 identifizierten Proteine des Nebennierenproteomvergleichs PEPCK-bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse

Im Folgenden werden die 18 identifizierten Proteinen (siehe Tabelle 18) einzeln ihrer Funktion entsprechend dargestellt und ihre Veränderung der Abundanz mit den jeweiligen Genotypen diskutiert.

Mortalin (Synonyme: Stress-70-protein; 75 kDa glucose-regulated protein=GRP 75; Peptide-binding protein=PBP 74)

In der Maus existieren sieben Mitglieder der Hsp 70 Familie, unter anderem das 75 kDa glucose-regulated protein GRP 75⁷⁴. Mortalin ist nicht durch definierten akuten Stress induzierbar (keine Erhöhung der Abundanz des Proteins)³⁴. In der Maus existieren zwei Isoformen von Mortalin (Mot-1 und Mot-2³⁴), die sich in zwei Aminosäuren nahe dem C-Terminus unterscheiden¹⁶¹, genauer gesagt hat Mot-1 Valin (V) an der Stelle 618 und Arginin (R) an Position 624. Mot-2 hat Methionin (M) an Stelle 618 und Glycin (G) an Position 624⁸⁵.

Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz von MOT-1 (SwissProt):

```
        610           620           630           640           650           660
DQLPADECNK LKEEISKVRA LLARKDSETG ENIRQAASSL QQASLKL FEM AYKKMASERE
        670           679
GSGSSGTGEQ KEDQKEEKQ
```

Beide Isoformen sind in der Maus unterschiedlich im Zytoplasma verteilt⁸⁵. Mot-1 kommt panzytosolisch vor, wohingegen Mot-2 perinuklear vorkommt. Mot-1 und MOT-2 haben völlig konträre biologische Eigenschaften. In vitro Versuche haben gezeigt, dass bei einer Überexpression von Mot-1 NIH3T3-Zellen vermehrt absterben, wohingegen eine Überexpression von Mot-2 zur Inaktivierung von p53 und damit zur Begünstigung der malignen Eigenschaften der Zellen führt. Sekundär wirkt Mortalin als Chaperon, wobei Mot-1 eine schwächere Wirkung im Vergleich zu Mot-2 besitzt³⁴.

In verschiedenen Veröffentlichungen wird hingegen nicht zwischen Mot-1 und Mot-2 unterschieden, sondern es wird nur von „Mortalin“ gesprochen. Beispielsweise beschreiben Mizokushi et al. 1999 „Mortalin“ als ein FGF-1 bindendes Protein und postulierten, dass die Interaktion von „Mortalin“ mit FGF-1 eine Rolle bei der

Regulation der Zellantwort auf Proliferationssignale spielen könnte¹²². Unklar ist allerdings, auf welche Isoform sich diese Ergebnisse beziehen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht entschieden werden, um welche Isoform von Mortalin es sich bei dem als differentiell abundant identifizierten Spot handelt. Für die massenspektrometrische Analyse des Proteins wurde Trypsin als Protease eingesetzt. Dieses Enzym hydrolysiert C-terminale Peptidbindungen von Lysin (K) und Arginin (R). Im Falle des Verdauens von Mot-1 und Mot-2 entstünden zwar unterschiedliche tryptische Fragmente, die die unterschiedlichen Sequenzen von Mot-1 und Mot-2 widerspiegeln (V⁶¹⁸R⁶¹⁹ versus M⁶¹⁸R⁶¹⁹ bzw. A⁶²⁰LLAR⁶²⁴ versus A⁶²⁰LLAGK⁶²⁵). Diese Peptide konnten nicht in dem Massenspektrum der tryptischen Spaltung gefunden werden. Dies kann durch die geringe Masse dieser Peptide bzw. durch ihre geringe Hydrophobizität erklärt werden. Daher entziehen sie sich der massenspektrometrischen Analyse bzw. gehen bei der Entsalzung der tryptischen Hydrolysate mittels ZipTips[®] verloren. Eine Unterscheidung zwischen Mot-1 und Mot-2 ist daher mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich. Auf diese Problematik wiesen bereits Skynner et al. 2002 hin¹⁶¹.

Mortalin war bei der PEPCK-bGH transgenen Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Mäusen in der Abundanz um den Faktor + 2,0 erhöht. Da PEPCK-bGH transgene Mäuse eine Neigung zur Ausbildung von Tumoren besitzen, wäre die weiterführende Differenzierung der Isoformen Mot-1 und Mot-2 durchaus relevant. Mortalin-2 könnte die Entartung von Zellen in den PEPCK-bGH transgenen Tieren durch seine erhöhte Abundanz forcieren.

Prohibitin: (Synonyme: B-cell receptor associated protein 32; BAP 32, PHB 1)

Prohibitin 1 und 2 (PHB 1: MG zirka 30 kDa und PHB 2: MG zirka 37 kDa) sind hochkonservierte Proteine in eukaryontischen Zellen, die in vielen zellulären Kompartimenten, vornehmlich in Mitochondrien, als Chaperone, aber auch im Zellkern als Modulatoren der Transkription und in der Blutzirkulation vorkommen. Ursprünglich wurden für das Prohibitin inhibitorische Wirkungen auf die Zellproliferation beschrieben¹²⁰. Neuere in vitro Studien zeigen, dass der MAP-Kinase- Signalweg direkt durch Prohibitin beeinflusst wird und zwar über die c-Raf Proteinkinase. Dabei bildet c-Raf einen Komplex mit Prohibitin aus, was zu einer verstärkten Aktivierung der Raf-MEK-ERK Kaskade und einer ERK vermittelten Internalisierung von Cadherin und β -Catenin, einhergehend mit einer Schwächung des Zell-Zell-Kontaktes, führt. Diese Koppelung ist auch bedeutsam für die EGF-induzierte Auslösung der Zellwanderung¹⁴¹. Eine Überexpression von Prohibitin in Rattenzellen zeigte, dass es die renale interstitielle Fibroblastenproliferation unterdrückt und eventuell als Ansatzpunkt für die Therapie der tubulointerstitiellen Fibrose dienen könnte⁵⁵. Eine in vitro Studie an humanen Kolonkarzinomzellen (Caco2-BBE-Zellen), die Prohibitin überexprimieren, hat gezeigt, dass die Zellen vor einer H₂O₂-induzierten Verminderung des Antioxidans Glutathion geschützt sind¹⁷⁰. Prohibitin 1 interagiert mit verschiedenen nukleären Proteinen, darunter auch zwei Tumorsuppressorproteinen, (Östrogenrezeptor, HDAC-1, p53, Retinoblastomprotein, E2F, BRG1/BRM, Androgenrezeptor, N-CoR), die an der Gentranskription beteiligt sind¹²⁰. Prohibitin 1 ist mit einer hohen Abundanz im Gefäßsystem des weißen Fettgewebes der Maus und des Menschen vorhanden¹²⁰. Prohibitin wirkt demnach als vaskulärer Marker von Fettgewebe¹⁴⁰. Beide Prohibitine kommen fraktioniert auf der Plasmamembran von humanen intestinalen Epithelzellen als Bindungsort für das Vi kapsuläre Polysaccharid von Salmonella typhimurium. In vitro bindet Prohibitin in humanem Serum an C3 und verstärkt die Komplementaktivierung¹²¹. Prohibitin 1 ist in vielen Tumorzellen überexprimiert¹⁴¹ und erhöhte Konzentrationen von Prohibitin 1 zeigten sich in der Zirkulation von Tumorpatienten⁸⁹.

In vivo Versuche mit tierischen Modellen und Untersuchungen an Menschen haben gezeigt, dass die Expression von Prohibitin nach unten reguliert ist bei der „Inflammatory Bowel Disease“ (= IBD bzw. chronisch entzündliche Darmerkrankung

= CED). Interleukin 6 (IL-6) verändert die Prohibitin-Expression in intestinalen Epithelzellen in Kultur und in vivo. IL-6 Knockout Mäuse zeigen eine reduzierte Prohibitin-Expression im Kolon verglichen mit den Wildtypmäusen¹⁶⁹.

Zirkulierende Prohibitine haben möglicherweise eine regulatorische Funktion, die es zu bestimmen gilt. Der derzeitige Wissensstand über die einzelnen Funktionen von Prohibitin 1 und 2 ist noch sehr unbefriedigend und nur durch Knockout Modelle können Aussagen über die physiologische Bedeutung der verschiedenen Interaktionen, die bereits in vitro gezeigt wurden, getroffen werden¹²⁰. Prohibitin 2 Knockout Mäuse weisen eine embryonale Letalität auf. Heterozygote PHB 2 Mäuse zeigen eine erhöhte Östrogen-Empfindlichkeit¹²⁰.

Der Vergleich der Massenspektren in der SwissProt Datenbank identifizierte das Protein Prohibitin 1 der Hausmaus (*Mus musculus*). Der Proteinspot, der für die MALDI-TOF/TOF Analyse aus dem Gel geschnitten wurde, hat ein Molekulargewicht von zirka 30 kDa. Die Auswertung in der „DeCyder Software, Version 6.5“ ergab eine Erhöhung der Abundanz um den Faktor + 3,4 bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtypmaus. Die Überexpression von bGH unter der Kontrolle des PEPCK-Promotors führt bei Mäusen zu Viszeromegalie und unter anderem auch zu pathologischen Veränderungen an den Nieren. Ebenso ist ein mögliches Auftreten von hepatozellulären Neoplasien bei bGH transgenen Mäusen bekannt. Aufgrund der in vitro Versuche von Guo et al. 2007 könnte eine vermehrte Expression von Prohibitin in PEPCK-bGH transgenen Mäusen den Nierenveränderungen entgegen wirken⁵⁵. Des Weiteren wäre auch, aufgrund des vermehrten Vorkommens von Prohibitin bei PEPCK-bGH transgenen Mäusen denkbar, dass das Wachstumshormon seine Wirkung über Prohibitin vermittelt und der MAP-Kinase Signalweg in der Nebenniere verstärkt aktiviert ist. Die Verminderung des oxidativen Stresses und auch die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 durch Prohibitin könnten Regulationsmechanismen gegen die erhöhte Tumorneigung bei PEPCK-bGH transgenen Mäusen darstellen. Auf einen möglichen Einfluss von Prohibitin auf die Tumorentwicklung haben Rajalingam et al. 2005 hingewiesen¹⁴¹.

Calreticulin: (Synonyme: CRP 55, Calregulin)

Calreticulin ist ein Calcium-bindendes Chaperon des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die N-terminale Domäne und die zentrale P-Domäne sind verantwortlich für die Chaperon-Aktivität, wohingegen der C-terminalen Domäne eine Schlüsselrolle bei der Ca^{2+} -Speicherung zukommt. Studien an Zellen von Calreticulin-defizienten Mäusen zeigten, dass Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in Abwesenheit von Calreticulin gehemmt war und auch Ca^{2+} -abhängige Signalwege beeinträchtigt waren. Zusammen mit Calcineurin, einer Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Phosphatase, kann Calreticulin die Apoptoserate beeinflussen, indem es indirekt über Calcineurin Apoptosefaktoren (Bax, Bid, Caspase 9) dephosphoryliert oder Transkriptionsfaktoren (NF-AT, MEF2, CREB, Elk-1) aktiviert⁵³. In vivo Studien haben gezeigt, dass ein Calreticulin-Mangel während der Embryonalentwicklung der Maus auf Grund von daraus resultierenden Läsionen in der Ventrikelwand tödlich ist¹¹⁵. Calreticulin beeinflusst die Zelladhäsion, indem es die Expression von mehreren Genen, die für Adhäsionsproteine (z. B. Vinculin und N-Cadherin) kodieren, reguliert¹⁰⁶. Übermäßige Adipositas ist mit chronischer Entzündung assoziiert, sowohl in humanen, als auch in murinen Adipositasmodellen. Adiponektin, das von Adipozyten gebildet wird, ist ein Hormon, welches antidiabetische und antiinflammatorische Wirkungen aufweist. Adiponektin-defiziente (APN-KO) Mäuse konnten apoptotische Zellen, welche ihnen intraperitoneal injiziert wurden, schlechter entfernen und umgekehrt förderte die Verabreichung von Adiponektin die Clearance apoptotischer Zellen durch Makrophagen. Es konnte gezeigt werden, dass Adiponektin apoptotische Zellen opsonisiert und sie dann über ihre Bindung an Calreticulin an der Oberfläche von Makrophagen der Phagozytose zuführt¹⁶⁶. Über Vasostatin, der N-terminalen Domäne von Calreticulin, wurde in verschiedenen Veröffentlichungen deren antiproliferative und anti-Tumor Effekte in endothelialen Zellen und Maustumormodellen berichtet⁷⁵. Eine in vivo Studie mit Nacktmäusen, denen Vasostatin-exprimierende BON-Zellen (humane Pankreastumorzellen) implantiert wurden, zeigte, konträr zu früheren Untersuchungen, ein früheres und schnelleres Tumorwachstum verglichen mit den Wildtyp-Mäusen. Des Weiteren war die Expression von Tumorsuppressorgenen, u.a. von p53, nm23, Rb und Vinculin und des zellregulatorischen Proteins p27kip1 und der Zelldifferenzierungsabhängigen Proteinkinase PRK herunterreguliert¹⁰¹. In einer Untersuchung der Expression von intrazellulären Proteinen im Vergleich zwischen einer regressiven und einer

progressiven murinen Fibrosarkomzelllinie konnten insgesamt neun Proteinspots identifiziert werden, die in der Abundanz zwischen den zwei Zelllinien signifikant verändert waren. Einer der signifikant veränderten Proteinspots konnte als Calreticulin identifiziert werden. Calreticulin war in der progressiven Zelllinie deutlich überexprimiert⁶¹.

Calreticulin war bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus in der Abundanz um den Faktor - 2,2 erniedrigt. Eine Reduktion von Calreticulin in PEPCK-bGH transgenen Mäusen könnte dafür sprechen, dass die Clearance apoptotischer Zellen nicht im vollen Umfang funktioniert und eventuell in einer systemischen Entzündung endet.

Chromogranine/Sekretogranine:

Chromogranine und Sekretogranine gehören zu einer einheitlichen Gruppe aus sauren und löslichen sekretorischen Proteinen, die in Neuronen und neuroendokrinen Zellen gemeinsam mit biogenen Aminen und Neurotransmittern in Vesikeln gespeichert werden. Die Vesikel sind im Transmissionselektronenmikroskop als elektronendichte Strukturen sichtbar. Die drei klassischen „Granine“ sind Chromogranin A, Chromogranin B und Sekretogranin-II; weitere Mitglieder der Granin-Familie sind Sekretogranin-III (1B1075), Sekretogranin-IV (HISL-19), Sekretogranin-V (7B2) und Sekretogranin-VI (NESP55)¹⁶⁸. Das relative Verhältnis der „Granine“ variiert zwischen den einzelnen Spezies, den Geweben und Zellen, was darauf hinweist, dass sie unterschiedliche Funktionen besitzen⁵¹. Unter anderem besitzen sie Erkennungsstellen für Endopeptidasen, die die Prohormone durch proteolytische Spaltung in die bioaktive Form überführen. Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in neuroendokrinem Gewebe und im Nervensystem, können sie als Indikatoren für die sympathoadrenale Aktivität dienen. Des Weiteren können sie in klinischer Hinsicht sehr nützliche Marker darstellen für ihre Sekretion in gesunden im Vergleich zu pathologisch veränderten, neuroendokrinen Zellen¹⁶⁸.

Chromogranin B (Synonym: Sekretogranin-I; 657 AS [Mus musculus])

Es wurden drei Fragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa als Sekretogranin-1 identifiziert. Das theoretische Molekulargewicht von Sekretogranin-1

[Precursor] liegt bei ca. 78 kDa. Die drei Fragmente können das Ergebnis einer proteolytischen Spaltung sein. Ein Vorkommen bzw. die Bedeutung eines 24 kDa großen Fragmentes von Chromogranin B der Maus wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Gasnier et al. 2004 spaltete enzymatisch das gereinigte bovine Chromogranin B mit der Endoproteinase Lys-C und erhielt nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE 10 Fragmente mit einem Molekulargewicht zwischen 100 kDa und 18 kDa, unter anderem war auch ein Fragment mit 24 kDa dabei⁵¹. Als Pro-Protein, kann Chromogranin B gespalten werden in das antibakterielle Peptid Sekretolytin (bovin: CHGB 614-626) und in andere Peptide mit nicht definierten biologischen Funktionen, einschließlich SR-17 (porcin: CHGB 586-602), CCB (human: CHGB 597-653), GAWK (human: CHGB 420-493) und PE-11 (Ratte: CHGB 552-562)¹¹². Chromogranin B ist nicht nur in den sekretorischen Granula, sondern auch im Nukleus vorhanden. Huh et al. 2006 zeigten, dass Chromogranin B bei der IP₃-induzierten Ca²⁺-Mobilisierung im Nukleus beteiligt ist⁷⁶. Yoo et al. 2002 stellten fest, dass Chromogranin B die Transkription verschiedener Gene induzieren (MEF2C, hCRP2, abLIM) oder unterdrücken (hcKrox, T3-Rezeptor, Troponin C, Intergrin) kann¹⁹⁵.

In einer in vitro Studie führte man eine Proteomanalyse (2D-SDS PAGE, Silberfärbung und anschließender Identifizierung mittels N-terminaler AS-Mikrosequenzierung) vor und nach Behandlung von PC12 Zellen (=Nebennierenpheochromozytomzellen der Ratte) mit NGF (Nerve Growth Factor) durch. Das Ergebnis war, dass ein 43 kDa Chromogranin B Fragment und beta-Tubulin nach der Behandlung mit NGF signifikant in ihrer Abundanz erhöht waren. Dieser Effekt konnte spezifisch mit einem MEK-1 Inhibitor (PD98059) geblockt werden. Die Schlussfolgerung war, dass das vermehrte Vorkommen des Chromogranin B Fragmentes auf die Aktivierung des MAP-Kinase Weges zurück zu führen ist und dass dieses Fragment eventuell als neuer Marker für neuronale Differenzierung in Proteomstudien angesehen werden kann⁷².

Secretogranin-II (Synonym: Chromogranin C; 617 AS [Mus musculus])

Auch hier wurden drei Fragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 66, 37 und 22 kDa als Secretogranin-2 identifiziert. Das theoretische Molekulargewicht von

Secretogranin-2 [Precursor] liegt bei ca. 70 kDa. Das 66 kDa Fragment kann das ausgeschleuste Secretogranin-2, das heißt nach Abspaltung der Signalsequenz (30 AS), darstellen. Das ca. 37 kDa große Fragment und das 22 kDa große Fragment könnten nach proteolytischer Spaltung entstanden sein. Das Auftreten eines 37 bzw. 24 kDa großen Fragmentes von Secretogranin-2 der Maus nach einer 2D-SDS PAGE wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben. Sekretoneurin, ein Neuropeptid, das von Sekretogranin-II abstammt, besitzt verschiedene Aufgaben. Es verhindert die endotheliale Zellapoptose, stimuliert die endotheliale Zellproliferation und aktiviert das MAP-Kinase System und den Akt-Signalweg⁸⁷.

Sowohl Chromogranin B, als auch Secretogranin-II waren bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtypmaus in der Abundanz um den Faktor -2,0 bis -2,4 erniedrigt. Das verminderte Vorkommen von Chromograninen in der Nebenniere von PEPCK-bGH transgenen Mäusen könnte ein Hinweis auf eine verminderte sympathoadrenale Aktivität sein.

Alpha-1 Antitrypsin 1-6: (Synonym: Serinprotease Inhibitor 1-6, 412 AS [Mus musculus])

Das Alpha-1 Antitrypsin gehört zu den Akute-Phase Proteinen, die bei einer Gewebeschädigung aktiviert werden und als Serinproteaseinhibitor (Serpine) die Gewebsschädigung reduzieren¹³⁵. Lu et al. 2006 zeigten in einer Studie mit NOD (Non Obese Diabetic) Mäusen, dass eine Gentherapie mit humanem Alpha-1 Antitrypsin die zellvermittelte Autoimmunität erhält, das T-Zell-Rezeptor Repertoire ändert und somit die Mäuse effektiv vor der Ausbildung eines Typ 1 Diabetes schützt¹⁰⁷. Eine in vitro und eine in vivo Studie über die Lungenemphysempathogenese ergaben, dass humanes Alpha-1 Antitrypsin direkt die Caspase-3 hemmt und somit antiapoptotisch wirkt. Dieser Anti-Apoptose Mechanismus könnte relevant sein für Krankheiten, die durch exzessive, strukturelle Zellapoptose, oxidativen Stress und Entzündung, wie beim Lungenemphysem der Fall, gekennzeichnet sind¹³⁶. In einer in vivo Studie wurden Mäusen subkutan UV-induzierte Hautfibrosarkomzellen injiziert, um dann in vivo sezernierte Peptide bzw. Proteine aus der Tumormasse einmal im progressiven und einmal im regressiven Tumorstadium mittels Massenspektrometrie zu bestimmen. Unter anderem wurde Alpha-1 Antitrypsin 1-6 aus der Tumormasse nur des regressiven Stadiums

identifiziert. Dies könnte ein Ansatz sein für die Entdeckung von in vivo Biomarkern in menschlichen Krankheiten⁷³.

Beide differentiell abundanten Proteinspots, die als Alpha-1 Antitrypsin 1-6 identifiziert wurden, waren bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtypmaus in der Abundanz um den Faktor +2,1 beziehungsweise um +2,6 erhöht. Da PEPCK-bGH transgene Mäuse pathologische Veränderungen an inneren Organen (v.a. an Niere und Leber) und auch eine erhöhte Tumorneigung aufweisen, könnte Alpha-1 Antitrypsin eventuell als Schutz vor oxidativem Stress in Erscheinung treten. Die Tatsache, dass Alpha-1 Antitrypsin in einer Lungenemphysemstudie einen anti-apoptotischen Effekt aufwies (Petrache et al. 2006¹³⁶) und die MS-Identifizierung von Alpha-1 Antitrypsin nur aus der regressiven, nicht der progressiven Tumormasse (Huang et al. 2006⁷³) möglich war, unterstützt die These.

Kininogen-1:

Kininogen-1 ist ein Plasmaprotein und besteht aus einer schweren und einer leichten Kette und dem 9 AS großen, vasoaktiven Peptid Bradykinin. HMW (High Molecular Weight) Kininogen schützt Präkallikrein vor der Inaktivierung, so dass die Blutgerinnungskaskade in Gang gesetzt werden kann¹⁵⁴. Das HMW (High Molecular Weight) Kininogen wirkt aufgrund der Freisetzung von Bradykinin positiv auf die Angiogenese. Song et al 2004 konnten mittels eines monoklonalen Antikörpers (C11C1) die Bindung von HMW (High Molecular Weight) Kininogen an endotheliale Zellen verhindern und somit die Tumorangio-genese (humanes Kolonkarzinom in Nacktmäuse verpflanzt) hemmen¹⁶².

Kininogen-1 war bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus in der Abundanz um den Faktor + 2,1 erhöht. Diese Erhöhung würde für ein Tumorgeschehen und der damit verbundenen Tumorangio-genese sprechen, wobei in den Nebennieren der PEPCK-bGH transgenen Mäusen keine tumorösen Veränderungen beobachtet wurden.

Mannose-binding Protein C: (Synonym: Mannan-binding Protein, Mannan-binding Lectin)

Das Mannose-binding Protein C (MBP) ist ein Ca^{2+} -abhängiges Serumlektin, das hauptsächlich von Hepatozyten gebildet wird. Es bindet mit hoher Affinität an Glucoproteinen mit terminalen Mannose-, Fucose- und N-acetylglucosamin- Reste, die auf der Oberfläche von Mikroorganismen zu finden sind. MBP aktiviert durch die Bindung an Kohlenhydrate das Komplementsystem (Lektin-Weg) und ist somit ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität. Endogene MBP-Liganden sind Meprine (α und β), sogenannte Metalloprotease, die im Bürstensaumepithel der proximalen Nierentubuli und in den Epithelzellen des Darms von Mensch und Maus vorkommen. Meprine sind unter anderem an Tumorwachstum und Metastasierung beteiligt. MBP ist ein natürlicher Metalloprotease-Inhibitor und kann als therapeutischer Ansatz in der Tumorprogression gesehen werden⁶³. Eine in vivo Studie mit humanen Kolonkarzinomzellen, die in Nacktmäusen implantiert wurden hat gezeigt, dass das Mannose-binding protein C eine deutliche Verminderung des Tumorwachstums und dadurch eine Lebensverlängerung dieser Mäuse bewirkte¹¹⁰. Eine in vitro Studie mit einer humanen Hepatozytenzelllinie untersuchte, inwieweit Hormone, wie GH, Hydrokortison, IGF-I, Insulin, Interleukin-6 oder Thyroidhormone (T_3 und T_4) die Synthese des Mannose-binding Protein C beeinflussen. Anhand der Messung der MBP-mRNA zeigte sich, dass GH, T_3 und T_4 einen deutlichen Anstieg der MBP-Synthese verursachen¹⁶³.

Mannose-binding protein C war bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtypmaus in der Abundanz um den Faktor +2,2 erhöht. Die erhöhte bGH-Expression in Mäusen vermindert durch Organveränderungen, v.a der Niere, die Lebenserwartung dieser Mäuse deutlich (siehe unter 2.2.2.1). Das vermehrte Vorkommen von Mannose-binding protein C bei den PEPCK-bGH transgenen Mäusen könnte aufgrund der GH-Wirkung (siehe Sørensen et al. 2006¹⁶³) erklärbar sein und sich zudem auch positiv auf die Lebenserwartung (Ma et al. 1999¹¹⁰) der PEPCK-bGH transgenen Mäusen auswirken.

Hämopexin:

Hämopexin ist ein Serumglykoprotein (Akute-Phase-Protein), das freies Häm aus dem Blutstrom mit hoher Affinität absondert und es dann zur Leber für die Eisenaufbereitung transportiert. Es wird vor allem in der Leber, aber auch im peripheren Nervensystem exprimiert¹⁷¹. Hämopexin hemmt deutlich die Häm-katalysierte Sauerstoffradikalbildung und ist daher ein wichtiger Schutz der Lipide und Proteine vor oxidativem Stress¹⁶⁵. In Hämopexin-Knockout Mäusen zeigte sich nach einer akuten Hämolyse in der Niere mit verstärkter Hämoglobinurie, renaler Eisenansammlung und Lipidperoxidation als Folge ein schwerer, renaler Schaden im Gegensatz zu Wildtypmäusen¹⁷¹. Eine weitere Aufgabe von Hämopexin als hepatische Hyaluronidase die Mithilfe bei der Clearance von Hyaluron-Fragmenten aus dem Blutstrom. Stred et al. 2003 stellten fest, dass Hämopexin ein GH-induzierbares Gen in der Rattenleber in vivo und in kultivierten Ratten-Hepatoma-Zellen ist¹⁶⁵. In Maus-Hepatomazellen (Hepa) zeigte sich, dass der Häm-Hämopexin Komplex JNK/SAPK aktivieren und die Expression von p53 und p21^{WAF1/CIP1/SDI1} erhöhen kann⁴². Infektion geht oft mit Hämolyse einher und führt damit zu einem erhöhten Vorkommen von freiem Häm. Zu große Mengen an freiem Häm sind toxisch, da sie die Haupteisenquelle für das Wachstum der eingedrungenen Bakterien darstellen. Bei einem in vivo Versuch wurden Mäuse mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert und die Verteilung der Plasmaproteine nach Entfernung von Albumin mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF Analyse ermittelt. Wie erwartet, waren viele murine Akute-Phase Proteine hochreguliert. Der erhöhte Level an Hämopexin im entzündeten Mausplasma wurde mit einer Western Blot Analyse bestätigt³⁸. Cheung et al. 2000 zeigten, dass Ratten, denen humanes Hämopexin in die suprarenale Arterie infundiert wurde, einen deutliche Proteinurie und auch MCD (Minimal Change Disease)-ähnliche Veränderungen an den Nieren entwickelten²⁵.

Beide differentiell abundanten Proteinspots, die als Hämopexin identifiziert wurden, waren bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtypmaus in der Abundanz um den Faktor + 2,0 beziehungsweise um + 2,5 erhöht. Der Einfluss von GH könnte für die verstärkte Exprimierung von Hämopexin, wie Stred et al. 2003 feststellten, verantwortlich sein. Der erhöhte Hämopexin-Spiegel könnte, durch Hemmung der Sauerstoffradikalbildung, oxidativen Prozessen in PEPCK-bGH transgenen Mäusen entgegenwirken.

Transthyretin: (Synonym: Präalbumin)

Transthyretin ist ein so genanntes Negativ-Akute-Phase Protein, dessen Plasmakonzentration bei einer Entzündung sinkt³⁶ wird hauptsächlich in der Leber, aber auch im Plexus choroideus gebildet und kommt somit im Plasma und in der Zerebrospinalflüssigkeit vor. Es besitzt hochaffine Bindungsstellen für die Thyroidhormone (T₃ und T₄) und bildet mit Retinol Binding Protein (RBP) einen stabilen Komplex⁴¹. Transthyretin kann sich durch eine Punktmutation als Amyloidfibrillenprotein (Ersatz von Valin durch Methionin an Position 30) in Organen ablagern und eine Amyloidose verursachen¹⁵². In adulten Patienten mit Morbus Crohn (=chronisch-entzündliche Darmerkrankung) ist unter anderem IGF-I und Transthyretin vermindert vorhanden und negativ korreliert mit dem Krankheitsverlauf¹⁴⁶. Eine Studie über renales Zellkarzinom war der Serumspiegel von Transthyretin und Leptin der Patienten umgekehrt korreliert mit dem Tumorstadium und der Tumordifferenzierung¹⁴⁵. Eine Studie an männlichen Ratten, denen die Hypophyse entfernt wurde, ergab, dass die Expression von Transthyretin deutlich reduziert war im Serum und in der Leber dieser Tiere. Ein Ersatz durch GH senkte die mRNA Expression noch weiter herab. Bei den Kontrolltieren mit normaler Schilddrüsenfunktion bewirkte eine GH-Behandlung eine Hemmung der Transthyretin-Expression¹⁷⁶.

Transthyretin war bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtypmaus in der Abundanz um den Faktor 2,2 erniedrigt. Ein Grund könnte die hemmende GH-Wirkung auf die Transthyretin-Expression, die von Vranckx et al. 1994 beobachtet wurde¹⁷⁶, sein.

Serumalbumin:

Die Entfernung der Hypophyse bei Ratten zeigte als Folge eine verminderte Albuminsyntheserate. Die Substitution von GH bewirkte eine verstärkte Albuminsyntheserate⁸⁶.

Hana et al. 2002 untersuchten die Wirkung von GH-Ersatz auf die reduzierte mikrovaskulärer Perfusion GH-defizienter Menschen. Nach einer GH-Therapie konnte die verminderte Stickoxid (NO)-Bildung normalisiert werden. Aus früheren Studien zeigte sich, dass eine Vasodilatation stimuliert durch IGF-I komplett durch

einen NO-Synthase Inhibitor verhindert werden kann. Es wurde der IGF-I–NO-Synthase–NO–Achse eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Mikrozirkulation zugesprochen. Der GH-Ersatz stimulierte die Umwandlung von Thyroxin (T_4) in das aktive Hormon Triiodthyronin (T_3). Dieser erhöhte Triiodthyronin-Level könnte ebenfalls zu einer erhöhten Mikrozirkulation beitragen⁵⁹.

Serumalbumin war bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur Wildtypmaus in der Abundanz um den Faktor + 2,8 erhöht. Der Grund für das erhöhte Vorkommen von Albumin ist die direkte positive Wirkung von GH auf die Albuminsyntheserate (Kernoff et al. 1971)⁸⁶ oder indirekt über Triiodthyronin durch die verbesserte Blutzirkulation (Hana et al. 2002)⁵⁹.

5.2.3 Diskussion der Ergebnisse der Nebennierenproteomstudie bGH transgener versus bGH/mIGFBP-2 transgener Mäuse

Auch bei dem zweiten Nebennierenproteomvergleich wurden pro Genotyp fünf biologische Proben (Nebennieren) für die Analyse verwendet. Somit konnten fünf 2D-DIGE Gele (insgesamt 15 Images) mittels der „DeCyder Software, Version 6.5“ ausgewertet werden. Zwei Parameter für die Auswertung konnten, wie im DIGE-Experiment G versus WT angewandt, beibehalten werden (p-Wert < 0,05 und Spot muss in allen Images vorkommen). Dagegen konnte mit der Wahl des Abundanzfaktors von +2 oder -2 kein einziger, differentiell abundanter Proteinspot detektiert werden. Erst nach Korrektur des Faktors um 0,5, das bedeutet einen Wert von + 1,5 oder – 1,5, konnten 4 Proteinspots in ihrer Abundanz als differentiell ausgemacht werden. Der p-Wert lag zwischen 0,01 und 0,03 und der Abundanzfaktor lag zwischen +/- 1,5 bis +/-1,7. Von den vier in der Abundanz um den Faktor +/- 1,5 veränderten Proteinspots konnten alle vier mittels der MALDI-TOF/TOF Analyse eindeutig identifiziert werden (siehe Tabelle 19).

| Spotnummer „DeCyder“ | Abundanzfaktor | Accession Number „SwissProt“ | Proteinname |
|----------------------|-----------------|------------------------------|--|
| 1529 | + 1,6 | STAR_Mouse P51557 | Steroidgenetic acute regulatory protein |
| 1682 | - 1,5 | PRDX3_Mouse P20108 | Thioredoxin-dependent peroxide reductase |
| 186 + 206 | - 1,7 und - 1,6 | HEMO_Mouse Q91X72 | Hemopexin |

Tabelle 19: Im Überblick alle 4 identifizierten Proteine des Nebennierenproteomvergleichs PEPCK-bGH transgene versus PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse

Im Folgenden werden die 4 identifizierten Proteinen (siehe Tabelle 19) einzeln ihrer Funktion entsprechend dargestellt und ihre Veränderung der Abundanz mit den jeweiligen Genotypen diskutiert.

Steroidgenetic acute regulatory protein (StAR): (Synonym: Luteinizing hormone-induced protein)

StAR, eine essentielle Komponente der Steroidhormonsynthese, ist für den Transport von Cholesterin vom Zytoplasma zur inneren Mitochondrienmembran zuständig. Untersuchungen an Menschen, die an kogenitaler lipoiden adrenalen Hyperplasie (engl.: lipoid CAH), einer autosomal rezessiven Erbkrankheit leiden, haben ergeben, dass bei ihnen eine Mutation am *Star* Gen auftritt, die für die Entstehung eines funktionell unwirksamen StAR-Proteins verantwortlich ist²³. Eine Studie an *Star* Knockout Mäusen zeigte, dass die meisten Tiere innerhalb von ein bis zwei Tagen nach der Geburt aufgrund von Lungenversagen, die verbleibenden Tiere nach zirka zwei Wochen mit klinischen Anzeichen von Hypovolämie starben. Makroskopisch waren die Nebennieren der Knockout Mäuse kleiner, als die der nicht transgenen Wurfgeschwister und die männlichen Mäuse wiesen weibliche äußere Geschlechtsmerkmale auf. Deutliche histologische Veränderungen traten an der Nebennierenrinde beider Geschlechter und an den Hoden in Form von Lipidablagerungen auf⁶⁰ (genauere Beschreibungen der histologischen Veränderungen siehe Hasegawa et al. 2000). Hormonelle Veränderungen waren deutlich erniedrigte Kortikosteron- und Aldosteron-Spiegel, wohingegen eine Erhöhung des ACTH- und des CRH- Spiegels aufgrund des fehlenden negativen Feedbacks Mechanismus eintrat. Eine Behandlung mit Kortikosteroiden post partum erhielt einzelne Mäuse bis zu 14 Wochen am Leben^{60,23}. Die Erkenntnis dieser Studie ist, dass StAR post partum lebensnotwendig für die Synthese von Steroidhormonen ist, die unter anderem essentiell für die Lungenreifung (Glukokortikoide) und die Regulation des Blutdrucks (Aldosteron) sind. Angiotensin II-, Kalium- und ACTH-Stimuli induzieren die Expression des StAR Proteins³. Ca^{2+} -Signal stimuliert die Expression von StAR und somit der Steroidhormonsynthese in bovinen fasciculata/reticularis Zellen¹⁹⁴. In einer Studie mit H295R Zellen (humane adrenokortikalen Zellen) konnte gezeigt werden, dass JAK2 durch Angiotensin II aktiviert wurde und dass die Hemmung von JAK2 mit AG490 die Angiotensin II-

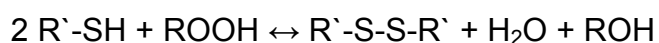
abhängige Aktivierung der StAR-Transkription blockiert und die Progesteronsynthese hemmt⁹⁷.

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) war bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgenen Maus in der Abundanz um den Faktor + 1,6 erhöht. StAR, eine essentielle Komponente der Steroidhormonsynthese in der Nebennierenrinde, könnte unter dem Einfluss des Wachstumshormons stehen. Hoeflich et al. konnten 2002 zeigen, dass IGFBP-2 das durch GH-stimulierte Wachstum (nur Hypertrophie) der Zona fasciculata-Zellen der Nebennierenrinde hemmt⁶⁵. Außerdem wurde gezeigt, dass IGFBP-2 auch einen negativen Einfluss auf die Steroidsynthese ausüben kann, indem es den GH-abhängigen Anstieg der Serum-Kortikosteronkonzentration vollständig blockierte. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte IGFBP-2 seinen negativen Einfluss auf die Serum-Kortikosteronkonzentration durch eine Hemmung der Steroidhormonbiosynthese ausüben.

Thioredoxin-dependent peroxide reductase (PRDX 3): (Synonym: Peroxiredoxin-III)

Peroxiredoxine sind eine Familie von multifunktionalen, Thioredoxin-abhängigen Peroxidasen. Es gibt sechs bekannte Peroxiredoxine (PRDX I-VI) unter den Säugetieren¹³⁰. Zu ihren Hauptaufgaben zählen der zelluläre Schutz vor oxidativem Stress, Modulation intrazellulärer Signalkaskaden, die Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als sekundären Botenstoff benötigen und Regulation der Zellproliferation⁷⁹. PRDX-III ist ein mitochondriales Mitglied der Peroxiredoxin-Familie. Ein niedriger H₂O₂-Spiegel, der von den Mitochondrien produziert wird, reguliert physiologische Prozesse, inklusive Zellproliferation. Dagegen ist ein hoher H₂O₂-Spiegel zelltoxisch und induziert Apoptose. Die Expression von Peroxiredoxinen ist in verschiedenen humanen Tumoren erhöht. Eine Überexprimierung von PRDX-III in murinen Thymuszellen (WEHI7.2) bewirkt eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials, die Verminderung des H₂O₂-Spiegels und eine Wachstumsverzögerung ohne Veränderung der basalen Apoptoserate¹³⁰.

Die Thioredoxin-abhängigen Peroxidasen katalysieren die Reaktion:



Die Thioredoxin-abhängige Peroxidase III (PRDX-III) war bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgenen Maus in der Abundanz um den Faktor -1,5 erniedrigt. In Tumorzellen der Nebennierenrinde (Y-1 Zellen) konnte gezeigt werden, dass IGFBP-2 in die Kontrolle von oxidativem Stress involviert ist⁷⁰. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass auch in unterschiedlichen Geweben von IGFBP-2 transgenen Mäusen die spezifische Enzymaktivität von unterschiedlichen Redox-relevanten Enzymen (Katalase, Superoxiddismutase) verändert ist (Hoeflich et al. 2006, Patentschrift). Mit PRDX-III ist ein weiteres, bislang nicht berücksichtigtes Redox-relevantes Enzym identifiziert worden, wodurch eine Beteiligung von IGFBP-2 bei der Kontrolle des oxidativen Stresses unterstützt wird.

Hämopexin:

Hämopexin ist ein Serumglykoprotein, das freies Häm aus dem Blutstrom mit hoher Affinität absondert und es dann zur Leber für die Eisenaufbereitung transportiert (genauerer siehe unter 5.2.2).

Beide differentiell abundanten Proteinspots, die als Hämopexin identifiziert wurden, waren bei der PEPCK-bGH transgenen Maus im Vergleich zur PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgenen Maus in der Abundanz um den Faktor -1,6 bzw. -1,7 erniedrigt. Das vermehrte Vorkommen bei PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgenen Mäusen könnte im Zusammenhang mit der Beteiligung von IGFBP-2 bei der Kontrolle von oxidativem Stress stehen.

Im Rahmen dieser holistischen Proteomanalyse konnten Kandidatenproteine mit Relevanz für das Nebennierenwachstum identifiziert werden. Somit steht eine solide Basis für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Ein interessanter Ansatz wäre, die Funktion von Prohibitin und Sekretogranin-I und -II in den MAP-Kinase Signalwegen zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Das GH/IGF-System ist maßgeblich an der Regulation von Wachstumsprozessen beteiligt. Die Funktion der IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) wurde sowohl *in vitro*, als auch in transgenen Tiermodellen untersucht. In den IGFBP transgenen Mausmodellen zeigte sich häufig ein im Wachstum retardierter Phänotyp. Speziell für IGFBP-2 konnte gezeigt werden, dass es bei einer gleichzeitige Überexpression von GH zu einer signifikanten Abnahme der GH-induzierten Hypertrophie der Zona fasciculata-Zellen der Nebennierenrinde kommt⁶⁵. Ziel dieser Studie war es, Kandidatenproteine mit Relevanz für das Nebennierenwachstum zu identifizieren. Für die holistische Proteomanalyse der Nebennieren wurden folgende Vergleiche vorgenommen: bGH transgene Mäuse (G) versus nichttransgene Mäuse (WT) und bGH transgene Mäuse (G) versus bGH/IGFBP-2 transgener Mäuse (GB). Die differentielle Proteomanalyse der Nebennieren (pro Genotyp: n=5) wurde mittels der 2D-DIGE Technik durchgeführt. Die Ergebnisse wurden einer softwarebasierten Bildanalyse zur Quantifizierung untergezogen. Die differentiel abundanten Proteinspots wurden über die MALDI-TOF/TOF Analyse identifiziert. Sowohl für die Bildanalyse, als auch für die Massenspektrometrie wurden stringente statistische Kriterien angewandt. Das Ergebnis des quantitativen Vergleichs des Proteinexpressionsmusters von G versus WT waren 25 differentiel abundante Spots mit einem Abundanzfaktor von 2,0. Davon konnten 18 Spots eindeutig identifiziert werden. Drei der identifizierten Proteine werden in der Literatur als mögliche Regulatoren von Wachstumsprozessen beschrieben: Mortalin, Prohibitin, Chromogranin B bzw. Sekretogranin-II. Mit einem Abundanzfaktor von 1,5 konnten im Vergleich G versus GB vier differentiel abundante Spots detektiert werden. Als potentielle wachstumsregulatorischer Faktoren wurde StAR (= Steroidgenetic acute regulatory protein) und Peroxiredoxin-III identifiziert. Die Ergebnisse der quantitativen Nebennierenproteomanalyse konnten sowohl bereits bestehende Erkenntnisse der GH bzw. IGFBP-2 Wirkung bestätigen, als auch neue Kandidatenproteine für die Regulation des Nebennierenwachstums liefern. Neben der quantitativen wurde auch eine qualitative Proteomanalyse des Nebennierenproteom von Mäusen mittels LC-MS/MS durchgeführt, wobei 964 Proteine identifiziert werden konnten.

7 Summary

Holistic proteome analysis of adrenal glands from bGH and IGFBP-2 transgenic mice

The GH/IGF-System is involved in the regulation of growth processes. The function of the IGF-binding proteins (IGFBP's) was investigated in vitro as well as in transgenic animal models. In the IGFBP transgenic mouse models, a primarily growth retarded phenotype was exhibit. Especially IGFBP-2, in the context of simultaneous overexpression of GH, lead to a significant decrease of GH induced hypertrophy of zona fasciculata cells of the adrenal gland. The aim of this study was the identification of candidate proteins with relevance for the growth of the adrenal gland. For the holistic proteom analysis the following comparisons were done: bGH transgenic (G) versus non transgenic mice and bGH transgenic versus bGH/IGFBP-2 transgenic mice. The differential proteome analysis of the adrenal gland (n=5 per genotype) was performed with 2D-DIGE followed by extensiv software-assisted image analysis for quantitation. Subsequent identification of the differentially abundant proteins was carried out by MALDI TOF/TOF MS. For both, image analysis and mass spectrometry, stringent statistical criteria were applied. As a result of the comparison G versus WT, 25 differentially abundant proteins were detected with a ratio of at least 2.0, 18 of which could be identified. Three of the identified proteins are described in literature as potential regulators of growth: mortalin, prohibitin and chromogranin b (secretogranin 2). With a ratio of 1.5, four differentially abundant proteins were detected in the comparison G versus GB. StAR (=steroid genetic regulatory protein) and thioredoxin-dependent peroxide reductase were identified as potential regulatory factors of growth. The results of the quatitative proteome analysis could affirm already known findings about GH respectively IGFBP-2 action as well as new candidate proteins for growth regulation of the adrenal gland. In addition to the quantitative proteome analysis of adrenal gland, also a qualitative analysis was performed using a LC-MS/MS approach. As a result, 964 adrenal proteins could be identified.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| µl | Mikroliter |
| µg | Mikrogramm |
| 2D-DIGE | two-dimensional difference gel electrophoresis |
| 1D | eindimensional |
| 2D | zweidimensional |
| ACN | Acetonitril |
| ACTH | adrenokortikotropes Hormon |
| AF | Abundanzfaktor |
| ALS | Acid-labile subunit |
| B | mIGFBP-2 transgene Mäuse |
| bGH | bovines Wachstumshormon |
| BP | Bindungsprotein |
| bp | base pair |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BVA | Biological Variance Analysis |
| Ca | Kalzium |
| CID | Collision-Induced Dissociation |
| CMV | Cytomegalievirus |
| Da | Dalton |
| DIA | Differential In-Gel Analysis |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| ERK | Extrazellulär-Signal regulierte Kinase |
| ESI | Elektrospray-Ionisierung |
| FSH | follikelstimulierendes Hormon |
| G | PEPCK-bGH transgene Mäuse |
| g | Gramm |
| GB | PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse |
| GH | Wachstumshormon |
| GHBP | Growth Hormon Binding Protein |
| GHR | Growth Hormone Receptor |
| GRF | Growth hormone-Releasing Factor, Somatoliberin |
| h | Stunde |
| hCG | humanes Choriongonadotropin |
| hGH | humanes Wachstumshormon |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| IEP | Isoelektrischer Punkt |
| IGFBP-2 | Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 |
| IGF-I | Insulin-like Growth Factor I |
| IGF-II | Insulin-like Growth Factor II |
| IGF-IR | IGF-I Rezeptor |
| IGF-IIR | IGF-II Rezeptor |
| IPG | immobilisierter pH-Gradient |
| IPS | Internal Pooled Standard |
| IRS | Insulin Receptor Substrat |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| JAK2 | Januskinase 2 |
| JNK | c-Jun NH2-terminale Kinase |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LC | Liquid Chromatography |
| m/z | Masse/Ladungsverhältnis |
| mA | Milliampere |
| MALDI-TOF/TOF | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight |
| MAPK | mitogen aktivierte Proteinkinase |
| mg | Milligramm |
| MG | Molekulargewicht |
| mGH | murines Wachstumshormon |
| mIGFBP-2 | Maus-Insulin-like Bindungsprotein-2 |
| min | Minute |
| mM | millimolar |
| mMT | Maus Metallothionein-I |
| mRNA | messenger RNA |
| MS | Massenspektrometrie |
| MS/MS | Tandem Massenspektrometrie |
| NN | Nebenniere |
| NF-1 | Nuclear Factor 1 |
| NGF | Nerve Growth Factor |
| nm | Nanometer |
| oGH | ovines Wachstumshormon |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PEPCK | Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase |
| PGK | Phosphoglyzeratkinase |
| PI3K | Phosphoinositol-3- Kinase |
| PMF | Peptide Mass Fingerprint |
| ppm | parts per million |
| PRDX | Peroxiredoxin |
| rGH | Ratten-Wachstumshormon |
| SCX | Strong Cation-Exchange |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| sec | Sekunde |
| SOCS | Supressor Of Cytokine Signaling |
| SPF | spezifisch pathogen frei |
| SST | Somatostatin |
| StAR | Steroidgenetic Acute Regulatory protein |
| STAT | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| STH | Somatotropin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| tg | transgen |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp-Mäuse = nichttransgene Kontrolltiere |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

9 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: IGF-I Rezeptor vermittelte Signalkaskaden (Quelle: siehe Literaturverzeichnis Nr. 64) | 14 |
| Abbildung 2: Nebennierendarstellung im 16. Jahrhundert von Eustachi (Quelle: http://webpages.ull.es/users/isccb12/Chromaffin Cell/History.html) | 15 |
| Abbildung 3: Anatomischer Aufbau und physiologische Funktion der Nebenniere (Quelle: http://www.medizininfo.de/endokrinologie/anatomie/nebennieren.htm) | 16 |
| Abbildung 4: Nach dem Mendelschen Gesetz ergeben sich vier verschiedene Genotypen innerhalb der F ₁ -Generation: Tiere, die beide Genotypen tragen (GB), bGH transgene Tiere (G), mIGFBP-2 transgene Tiere (B) und nichttransgene Tiere (WT)..... | 30 |
| Abbildung 5: Bradford-Kalibriergerade | 37 |
| Abbildung 6: IGFBP-2 PCR: links: IGFBP-2 PCR-Produkt ist 342 bp groß; rechts: Auftreten einer unspezifischen 330 bp und 120 bp großen Bande | 54 |
| Abbildung 7: bGH PCR- und IGFBP-2 PCR-Ergebnisse (1)..... | 54 |
| Abbildung 8: bGH PCR- und IGFBP-2 PCR-Ergebnisse (2)..... | 55 |
| Abbildung 9: Körpergewicht in Gramm (g) der drei unterschiedlichen, genetischen Gruppen (GB, G, WT)..... | 56 |
| Abbildung 10: Phänotypische Unterschiede der vier Genotypen: G, GB, WT und B | 56 |
| Abbildung 11: Gewicht beider Nebennieren in Milligramm (mg) der drei unterschiedlichen, genetischen Gruppen (GB, G, WT)..... | 57 |
| Abbildung 12: Eindimensionales SDS-Gel: Sechs Gelspuren mit aufsteigender Proteinkonzentration (12,5 µg bis 75 µg)..... | 59 |
| Abbildung 13: 25 µg Gelspur in zwölf Gelstücke unterteilt..... | 60 |
| Abbildung 14: Der Acetonitril-Gradientenverlauf der „Reversed Phase“ Chromatographie..... | 61 |
| Abbildung 15: Angewandte Parameter zur Spezifizierung der „MASCOT“-Suche für die LC-ESI-MS/MS Ergebnisse (Quelle: www.matrixscience.com) | 62 |
| Abbildung 16: Qualitative Proteomanalyse ohne Vorfraktionierung; Kategorisierung der Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation..... | 63 |
| Abbildung 17: Qualitative Proteomanalyse mit Vorfraktionierung; Kategorisierung der Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 18: Kategorisierung der Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation: a) ohne Vorfraktionierung, b) mit Vorfraktionierung | 66 |
| Abbildung 19: „Cross-Labeling“ Schema | 67 |
| Abbildung 20: „Labeling“-Schema der 2D-DIGE Analyse G versus WT | 69 |
| Abbildung 21: „Labeling“-Schema der 2D-DIGE Analyse G versus GB..... | 69 |
| Abbildung 22: Ein Cy5-Image des Vergleichs G versus WT im pH-Bereich 4-7; es wurden 25 differentiell abundante Proteinspots (rot eingekreist) ermittelt | 70 |
| Abbildung 23: 3D-Ansicht der differentiell abundanten Proteinspots (Nr. 234, 258/259; 262; 301/305) und die korrespondierenden „Graph Views“ | 73 |
| Abbildung 24: 3D-Ansicht der differentiell abundanten Proteinspots (Nr. 463/471; 939; 1336; 1490) und die korrespondierenden „Graph Views“ | 74 |
| Abbildung 25: 3D-Ansicht der differentiell abundanten Proteinspots (Nr. 1524/1551/1559; 323/962/1737; 2241) und die korrespondierenden „Graph Views“ | 75 |
| Abbildung 26: Ein Cy5-Image des Vergleichs G versus GB im pH-Bereich 4-7; es wurden 4 differentiell abundante Proteinspots (rot eingekreist) ermittelt | 76 |
| Abbildung 27: 3D-Ansicht der differentiell abundanten Proteinspots (Nr. 186/206; 1529; 1682) und die korrespondierenden Graph Views | 78 |
| Abbildung 28: Präparatives Gel (pH 4-7) mit Roti [®] Blue gefärbt; es sind 20 Spots des Vergleichs G versus WT und 4 Spots (unterstrichen) des Vergleichs G versus GB dargestellt | 79 |
| Abbildung 29: Präparatives Gel (pH 4-7) mit Roti [®] Blue gefärbt; Spot-Nr. 323, 962, 1737 (Sekretogranin-2) und Spot-Nr. 1524, 1551, 1559 (Sekretogranin-1)80 | |
| Abbildung 30: Angewandte Parameter zur Spezifizierung der „MASCOT“-Suche für die MALDI-TOF/TOF MS Ergebnisse..... | 81 |
| Abbildung 31: MS-Spektren der differentiell abundanten Spots (Nr. 234, 1336, 939, 1524, 1551, 1559, 323, 962, 463 und 471); die Spotnummern beziehen sich auf die Auswertung des Vergleichs G versus WT in der „DeCyder“ Software | 82 |
| Abbildung 32: MS-Spektren der differentiell abundanten Spots (Nr. 301, 305, 1490, 258, 259, 2241, 262); die Spotnummern beziehen sich auf die Auswertung des Vergleichs G versus WT in der „DeCyder“ Software..... | 83 |
| Abbildung 33: MS-Spektren der differentiell abundanten Spots (Nr. 1529, 1682, 186, 206); die Spotnummern beziehen sich auf die Auswertung des Vergleichs G versus GB in der „DeCyder“ Software..... | 84 |

Abbildung 34: Beispiel für den Protein Score (MOWSE Score), die im MASCOT-Ergebnis dargestellt sind. Links: valide Identifikation eines Proteins; rechts: keine Identifikation (Quelle: www.matrixscience.com) 85

10 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Master-Mix für die IGFBP-2 PCR..... | 32 |
| Tabelle 2: Reaktionsbedingungen für die IGFBP-2 PCR..... | 33 |
| Tabelle 3: Master-Mix für die PEPCK-bGH PCR..... | 33 |
| Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für die PEPCK-bGH PCR..... | 33 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung des „Normalen“ und des DIGE-Lysepuffers..... | 36 |
| Tabelle 6: Erstellen einer Bradford-Kalibriergerade..... | 37 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung des 2-fach Probenpuffers..... | 39 |
| Tabelle 8: Durchführung der Roti® Blue Färbung..... | 44 |
| Tabelle 9: Durchführung der Sypro Ruby-Färbung..... | 45 |
| Tabelle 10: Scanparameter des Fluoreszenzscanners Typhoon 9400..... | 49 |
| Tabelle 11: mIGFBP-2 und PEPCK-bGH sense und antisense Primer..... | 53 |
| Tabelle 12: Körpergewichte, Nebennierengewichte von je zwei Nebennieren und Proteinkonzentrationen der Nebennierenlysate aller eingesetzten Mäuse..... | 58 |
| Tabelle 13: Einteilung der intrazellulären Proteine, extrazellulären Proteine und Membranproteine nach ihrer Funktion..... | 65 |
| Tabelle 14: p-Werte und Abundanzfaktoren der 25 signifikant differentiell abundante Proteinspots im Vergleich G versus WT; 18 Spots (grau unterlegt) konnten massenspektrometrisch identifiziert werden..... | 71 |
| Tabelle 15: p-Werte und Abundanzfaktoren der 4 signifikant differentiell abundanten Proteinspots im Vergleich G versus GB; alle 4 Spots konnten massenspektrometrisch identifiziert werden..... | 77 |
| Tabelle 16: Alle 18 identifizierten Proteine des Nebennierenproteomvergleichs PEPCK-bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse im Überblick; der Abundanzfaktor (AF) bezieht sich auf PEPCK-bGH transgene Mäuse: + bedeutet differentiell erhöht und – bedeutet differentiell erniedrigt im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen..... | 86 |
| Tabelle 17: Alle 4 identifizierten Proteine des Nebennierenproteomvergleichs PEPCK-bGH transgene Mäuse versus PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse im Überblick; der Abundanzfaktor (AF) bezieht sich auf PEPCK-bGH transgene Mäuse: + bedeutet differentiell erhöht und – bedeutet differentiell erniedrigt im Vergleich zu den PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgenen Mäusen... | 87 |

Tabelle 18: Im Überblick alle 18 identifizierten Proteine des Nebennierenproteomvergleichs PEPCK-bGH transgene Mäuse versus Wildtyp-Mäuse.....100

Tabelle 19: Im Überblick alle 4 identifizierten Proteine des Nebennierenproteomvergleichs PEPCK-bGH transgene versus PEPCK-bGH/mIGFBP-2 transgene Mäuse114

11 Literaturverzeichnis

- 1 Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen J V, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.*, 7, R:80, 2006
- 2 Anderson N G, Anderson N L. Twenty years of two - dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*, 17, 443-53, 1996
- 3 Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein S R, Willenberg H S. Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265–266, 150–156, 2007
- 4 Bajpai A and Menon P S. Insulin like growth factors axis and growth disorders. *Indian J Pediatr.*, 73, 67-71, 2006
- 5 Baumann G, Amburn K, Shaw M A. The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. *Endocrinology*, 122, 976-84, 1988
- 6 Baxter R C, Meka S, Firth S M. Molecular Distribution of IGF Binding Protein-5 in Human Serum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, 271–276, 2002
- 7 Behringer R R, Lewin T M, Quiafe C J, Palmiter R D, Brinster R L, D'Ecole A J. Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal and somatic growth in growth hormone-deficient mice. *Endocrinology*, 127, 1033-1040, 1990
- 8 Beitner-Johnson D, Blakesley V A, Shen-Orr Z, Jimenez M, Stannard B, Wang L-M, Pierce J, LeRoith D. The Proto-oncogene product c-Crk Associates with Insulin Receptor Substrate-1 and 4PS. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 9287-9290, 1996
- 9 Beitner-Johnson and LeRoith D. Insulin-like Growth Factor-I Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Endogenous c-Crk. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 5187-5190, 1995
- 10 Berggren K, Chernokalskaya E, Steinberg T H, Kemper C, Lopez M F, Diwu Z, Haugland R P, Patton W F. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis*, 21, 2509-21, 2000

- 11 Bermann M, Jaffe C A, Tsai W, DeMott-Friberg R, Barkan A.L. Negative feedback regulation of pulsatile growth hormone secretion by insulinlike growth factor I. Involvement of hypothalamic somatostatin. *J Clin Invest.*, 94, 138-45, 1994
- 12 Bienvenu G, Seurin D, Grellier P, Froment P, Baudrimont M, Monget P, Le Bouc Y, Babajko S. Insulin-like growth factor binding protein-6 transgenic mice: postnatal growth, brain development, and reproduction abnormalities. *Endocrinology*, 145, 2412–2420, 2004
- 13 Biondi R M and Nebreda A R. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem.J.*, 372, 1-13, 2003
- 14 Bjellqvist B, Ek K, Rhigetti P G, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, 6, 317-339, 1982
- 15 Blackburn A, Dressendörfer R A, Blum W F, Erhard M, Brem G, Strasburger C J, Wolf E. Interactions of insulin-like growth factor (IGF)-II and growth hormone in vivo: circulating levels of IGF-I and IGF-binding proteins in transgenic mice. *European Journal of Endocrinology*, 137, 701-708, 1997
- 16 Blum H, Beier H, Gross H J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93 - 99, 1987
- 17 Blundell T L, Bedarkar S, Rinderknecht E, Humbel R E. Insulin-like growth factor: a model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:180–184, 1978
- 18 Boulle N, Logie A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 1713–1720, 1998
- 19 Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, 1976
- 20 Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura J. J, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell R A, Davis R J. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.*, 17, 1969-1978, 2003
- 21 Brem G, Wanke R, Wolf E, Buchmüller T, Müller M, Brenig B, Hermanns W. Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. *Mol Biol Med.*, 6, 531-47, 1989

- 22 Brouwers F M, Petricoin E F, Ksinantova L, Breza J, Rajapakse V, Ross S, Johann D, Mannelli M, Shulkin B L, Kvetnansky R, Eisenhofer G, Walther M M, Hitt B A, Conrads T P, Veenstra T D, Mannion D P, Wall M R, Wolfe G M, Fusaro V A, Liotta L A, Pacak K. Low molecular weight proteomic information distinguishes metastatic from benign pheochromocytoma. *Endocrine-Related Cancer*, 12, 263–272, 2005
- 23 Caron K M, Soo S C, Wetsel W C, Stocco D M, Clark B J, Parker K L. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11540–11545, 1997
- 24 Chene N, Martal J, de la Llosa P, Charrier J. Growth hormones. II. Structure-function relationships. *Reprod Nutr Dev*, 29, 1-25, 1989
- 25 Cheung P K, Klok P A, Baller J F W, Bakker W W. Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney International*, 57, 1512–1520, 2000
- 26 Cho H, Mu J, Kim J K, Thorvaldsen J L, Chu Q, Crenshaw E B, Kaestner K H, Bartolomei M S, Shulman G I, Birnbaum M J. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 292, 1728–1731, 2001a
- 27 Cho H, Thorvaldsen J L, Chu Q, Feng F, Birnbaum M J. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.*, 276, 38349–38352, 2001b
- 28 Clemmons D R. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol*, 140, 19-24, 1998
- 29 D'Ercole A J, Applewhite G T, Underwood L E. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol*, 75, 315–328, 1980
- 30 Dastot F, Sobrier M L, Duquesnoy P, Duriez B, Goossens M, Amselem S. Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Biochemistry*, 93, 10723-10728, 1996
- 31 Dastot F, Duquesnoy P, Sobrier M L, Goossens M, Amselem S. Evolutionary divergence of the truncated growth hormone receptor isoform in its ability to generate a soluble growth hormone binding protein. *Mol Cell Endocrinol*, 137, 79-84, 1998
- 32 Daughaday W H, Hall K, Raben MS, Salmon Jr W D, van den Brande J L, van Wyk J J. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*, 235:107, 1972
- 33 Daughaday W. Growth hormone axis overview - somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol*, 14, 537-540, 2000

- 34 Deocaris C C, Yamasaki K, Kaul S C, Wadhwa R. Structural and Functional Differences between Mouse Mot-1 and Mot-2 Proteins That Differ in Two Amino Acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1067, 220–223, 2006
- 35 Devlin R D, Du Z, Buccilli V, Jorgetti V, Canalis E. Transgenic mice over-expressing insulin-like growth factor binding protein-5 display transiently decreased osteoblastic function and osteopenia. *Endocrinology*, 143, 3955–3962, 2002
- 36 Dickson P W, Howlett G J, Schreiber G. Rat Transthyretin (Prealbumin) Molecular cloning, nucleotide sequence, and gene expression in liver and brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 8214-8219, 1985
- 37 Diehl D, Hoeflich A, Wolf E, Lahm H. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 inhibits colony formation of colorectal cancer cells by IGF-independent mechanisms. *Cancer Res.*, 64,1600–1603, 2004
- 38 Duan X, Yarmush D, Berthiaume F, Jayaraman A, Yarmush M L. Immunodepletion of albumin for two-dimensional gel detection of new mouse acute-phase protein and other plasma proteins. *Proteomics*, 5, 3991–4000, 2005
- 39 Dupont J and Holzenberger M. Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res Part C Embryo Today*, 69, 257-7, 2003
- 40 Edman P, Begg G A. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, 1, 80-91, 1967
- 41 Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris G A, Gottesman M E, Robertson E J. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone (homologous recombination/retinol-binding protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2375-2379, 1993
- 42 Eskew J D, Vanacore R M, Sung L, Morales P J, Smith A. Cellular Protection Mechanisms against Extracellular Heme. Heme-Hemopexin, but not free heme, activates the N-terminal c-Jun Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 638–648, 1999.
- 43 Fenn J B, Mann M, Meng C K, Wong S F, Whitehouse C M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246, 64-71, 1989
- 44 Ferry R J, Cerri R W, Cohen, P. Insulin-like growth factor binding proteins: new proteins, new functions. *Horm Res*, 51, 53-67, 1999
- 45 Firth S M and Baxter R C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr.Rev.*, 23, 824-854, 2002

- 46 Fottner C, Minnemann T, Kalmbach S, Weber M M. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human pheochromocytomas. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36, 279-287, 2006
- 47 Fottner C, Hoeflich A, Wolf E, Weber M M. Role of insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenese. *Horm Metab Res.*, 36, 397-405, 2004
- 48 Fottner C, Engelhardt D, Elmlinger M W, Weber M M. Identification and characterization of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein expression and secretion by adult human adrenocortical cells: differential regulation by IGFs and adrenocorticotropin. *Journal of Endocrinology*, 168, 465–474, 2001
- 49 Fowlkes J L, Engihild J J, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem*, 269, 25742-46, 1994
- 50 Fröhlich T and Arnold G J. Proteom research based on modern liquid chromatography-tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification. *J Neural Transm.*, 113, 973-994, 2006
- 51 Gasnier C, Lugardon K, Ruh O, Strub J-M, Aunis D, Metz-Boutigue M-H. Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics*, 4, 1789–1801, 2004
- 52 Green H, Morikawa M, Nixon T. A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*, 29, 195–198, 1985
- 53 Groenendyk M, Lynch J, Michalak M. Calreticulin, Ca²⁺, and Calcineurin – Signaling from the Endoplasmic Retikulum. *Mol. Cells*, 17, 383-389, 2004
- 54 Guler H P, Zapf J, Schmid C, Froesch E R. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 121, 753-8, 1989
- 55 Guo W, Xu H, Chen J, Yang Y, Jin J W, Fu R, Liu H M, Zha X L, Zhang Z G, Huang W Y. Prohibitin suppresses renal interstitial fibroblasts proliferation and phenotypic change induced by transforming growth factor-b1. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 295, 167–177, 2007
- 56 Guyda H J. Concepts of IGF physiology. In: Spencer E (ed) Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors. *Elsevier, New York*, 99–110, 1991
- 57 Gygi S P, Rochon Y, Franza B R, Aebersold R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1720-1730, 1999

- 58 Han V K, Lund P K, Lee D C, D'Ercole A J. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: Identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab.*, 66, 422–429, 1988
- 59 Hana V, Prazny M, Marek J, Skrha J, Justova V. Reduced microvascular perfusion and reactivity in adult GH deficient patients is restored by GH replacement. *European Journal of Endocrinology*, 147, 333–337, 2002
- 60 Hasegawa T, Caron L Z K M, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, Sasano H, Parker K L. Developmental Roles of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) as Revealed by StAR Knockout Mice. *Molecular Endocrinology*, 14, 1462–1471, 2000
- 61 Hayashi E, Kuramitsu Y, Okada F, Fujimoto M, Zhang X, Kobayashi M, Iizuka N, Ueyama Y, Nakamura K. Proteomic profiling for cancer progression: Differential display analysis for the expression of intracellular proteins between regressive and progressive cancer cell lines. *Proteomics*, 5, 1024–1032, 2005
- 62 Hees H, Sinowatz F. "Histologie": Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie, 2. Auflage, Deutscher Ärzte-Verlag, 1992
- 63 Hirano M, Ma B Y, Kawasaki N, Okimura K, Baba M, Nakagawa T, Miwa K, Kawasaki N, Oka S, Kawasaki T. Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases mepirin α and β . *The Journal of Immunology*, 175, 3177–3185, 2005
- 64 Hoeflich A, Lahm H, Wolf E. Molekulare Mechanismen der Wachstumshormonwirkung des IGF-Systems. "Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen" von D.Ganten, K. Ruckpaul, J. Köhrle, Springer Verlag, 2006
- 65 Hoeflich A, Weber M M, Fisch T, Medbal S, Fottner C, Elmlinger M W, Wanke R, Wolf E. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/IGF-I excess on adrenocortical cells in vivo. *The FASEB Journal*, 16, 1721-1731, 2002
- 66 Hoeflich A, Wu M, Mohan S, Föll J, Wanke R, Froehlich T, Arnold G J, Lahm H, Kolb H J, Wolf E. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology*, 140, 5488-96, 1999
- 67 Hoeflich A, Nedbal S, Blum W F, Erhard M, Lahm H, Brem G, Kolb H J, Wanke R, Wolf E. Growth inhibition in giant hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology*, 142, 1889-98, 2001
- 68 Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum W F, Kolb H J, Weber M M, Wolf E. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res.*, 61, 8601-10, 2001

- 69 Hoeflich A, Fettscher O, Lahm H, Blum W F, Kolb H J, Engelhardt D, Wolf E, Weber M M. Overexpression of insulin-like growth factor binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res.*, 60, 834-838, 2000
- 70 Hoeflich A, Fettscher O, Preta G, Lahm H, Kolb H J, Wolf E, Weber M M. Increased activity of catalase in tumor cells overexpressing IGFBP-2. *Horm Metab Res.*, 35, 816-21, 2003
- 71 Hokken-Koelega A C, Hackeng W H, Stijnen T, Wit J M, de Muinck Keizer-Schrama S M, Drop S L. Twenty-four-hour plasma growth hormone (GH) profiles, urinary GH excretion, and plasma insulin-like growth factor-I and -II levels in prepubertal children with chronic renal insufficiency and severe growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab*, 71, 688-95, 1990
- 72 Huang L, Mivechi N F, Moskopidid D. Insights into Regulation and Function of the Major Stress-Induced hsp70 Molecular Chaperone In Vivo: Analysis of Mice with Targeted Gene Disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 8575–8591, 2001
- 73 Huang C M, Ananthaswamy H N, Barnes S, Ma Y, Kawai M, Elmets C A. Mass spectrometric proteomics profiles of in vivo tumor secretomes: Capillary ultrafiltration sampling of regressive tumor masses. *Proteomics*, 6, 6107–6116, 2006
- 74 Huang C M, Shui H A, Wu Y T, Chu P W, Lin K G, Kao L S, Chen S T. Proteomic analysis of proteins in PC12 cells before and after treatment with nerve growth factor: increased levels of a 43-kDa chromogranin B-derived fragment during neuronal differentiation. *Molecular Brain Research*, 92, 181–192, 2001
- 75 Huegel R, Velasco P, De La Luz Sierra M, Christophers E, Schröder J M, Schwarz T, Tosato G, Lange-Asschenfeldt B. Novel Anti-Inflammatory Properties of the Angiogenesis Inhibitor Vasostatin. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 65–74, 2007
- 76 Huh Y H, Chu S Y, Park S Y, Huh S K, Yoo S H. Role of Nuclear Chromogranin B in Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Mediated Nuclear Ca²⁺ Mobilization. *Biochemistry*, 45, 1212-1226, 2006
- 77 Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R G. The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily. *Endocr Rev*, 20, 761-87, 1999
- 78 Ilvesmaki V, Blum W F, Voutilainen R. Insulin-like growth factor binding proteins in the human adrenal gland. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 97, 71-79, 1993
- 79 Immenschuh S and Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, Oxidative Stress, and Cell Proliferation. *Antioxidans & Redox Signaling*, 7, 768-777, 2005

- 80 Isaksson O G, Jansson J O, Gause I A. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science*, 216, 1237–1239, 1982
- 81 Jalili P R and Dass C. Proteom analysis in the bovine adrenal medulla using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid commun.Mass Spectrom.*, 18, 1877-1884, 2004
- 82 Jalili P R, Gheyi T and Dass C. Proteome analysis in bovine adrenal medulla using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 914–916, 2004
- 83 Jones J I and Clemmons D R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.*, 16, 3-34, 1995
- 84 Karas M and Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.*, 60, 2299-301, 1988
- 85 Kaul S C, Duncan E, Sugihara T, Reddel R R, Mitsui Y, Wadhwa R. Structurally and Functionally Distinct Mouse Hsp70 Family Members Mot-1 and Mot-2 Proteins are Encoded by Two Alleles. *DNA Research*, 7, 229–231, 2000
- 86 Kernoff L M, Pimstone B L, Solomon J, Brock J F. The Effect of Hypophysectomy and Growth Hormone Replacement on Albumin Synthesis and Catabolism in the Rat. *Biochem. J.*, 124, 529-535, 1971
- 87 Kirchmair R, Egger M, Walter D H, Eisterer W, Niederwanger A, Woell E, Nagl M, Pedrini M, Murayama T, Frauscher S, Hanley A, Silver M, Brodmann M, Sturm W, Fischer-Colbrie R, Losordo D W, Patsch J R, Schratzberger P. Secretoneurin, an Angiogenic Neuropeptide, Induces Postnatal Vasculogenesis. *Circulation*, 110, 1121-1127, 2004
- 88 Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangegetik*, 26, 231-43, 1975
- 89 Kolonin M G, Saha P K, Chan L, Pasqualini R, Arap W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nature Medicine*, 10, 625-632, 2004
- 90 Kopchick J J and Andry J M. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab*, 71, 293-314, 2000
- 91 Laemmli U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970
- 92 Lamothe B, Bucchini D, Jami J, Joshi R L. Interaction of p85 subunit of PI3-kinase with insulin and IGF-I receptors analysed by using two-hybrid system. *FEBS Lett.*, 373, 51-55, 1995

- 93 Lawlor M A., Mora A, Ashby P R, Williams M R, Murray-Tait V, Malone L, Prescott A R, Lucocq J M, Alessi D R. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *The EMBO Journal*, 21, 3728-38, 2002
- 94 Le Bacquer O, Petroulakis E, Paglialunga S, Poulin F, Richard D, Cianflone K, Sonenberg N. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J. Clin. Invest.*, 117, 387–396, 2007
- 95 Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu J L, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev*, 22, 53-74, 2001
- 96 Le Roy C, Li JY, Stocco DM, Langlois D, Saez JM. Regulation by adrenocorticotropin (ACTH), angiotensin II, transforming growth factor-beta, and insulin-like growth factor I of bovine adrenal cell steroidogenic capacity and expression of ACTH receptor, steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome P450c17, and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 141, 1599-607, 2000
- 97 Li J, Feltzer R E, Dawson K L, Hudson E A, Clark B J. Janus Kinase 2 and Calcium Are Required for Angiotensin II-dependent Activation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Transcription in H295R Human Adrenocortical Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 52355–52362, 2003
- 98 Liebich H G, "Funktionelle Histologie der Haussäugetiere", 3. Auflage, Schattauer Verlag, 1998
- 99 Lin T, Wang D, Hu J, Stocco D M. Upregulation of human chorionic gonadotrophin-induced steroidogenic acute regulatory protein by insulin-like growth factor-I in rat Leydig cells. *Endocrine*, 8, 73–78, 1998
- 100 Lin Y, Yang Q, Wang X and Liu Z. The Essential Role of the Death Domain Kinase Receptor-interacting Protein in Insulin Growth Factor-I-induced c-Jun N-terminal Kinase Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 23525–23532, 2006
- 101 Liu M, Imam H, Öberg K, Zhou Y. Gene Transfer of Vasostatin, a Calreticulin Fragment, into Neuroendocrine Tumor Cells Results in Enhanced Malignant Behavior. *Neuroendocrinology*, 82, 1–10, 2005
- 102 Liu J P, Baker J, Perkins A S, Robertson E J, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75, 59–72, 1993
- 103 Lopaczynski W, Harris S, Nissley P. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) dependent phosphorylation of the IGF-I receptor in MG-63 cells. *Regul Pept.*, 48, 207-16, 1993
- 104 Lottspeich F. Proteomanalyse-ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen. *Angew. Chem.*, 111, 2630-2647, 1999

- 105 Lottspeich F, Engels J W. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage 2006.
- 106 Lozyk M D, Papp S, Zhang X, Nakamura K, Michalak M, Opas M. Ultrastructural analysis of development of myocardium in calreticulin-deficient mice. *BMC Developmental Biology*, 6, 1-16, 2006
- 107 Lu Y, Tang M, Wasserfall C, Kou Z, Campbell-Thompson M, Gardemann T, Crawford J, Atkinson M, Songs S. α 1-Antitrypsin Gene Therapy Modulates Cellular Immunity and Efficiently Prevents Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Human Gene Therapy*, 17, 625–634, 2006
- 108 Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ecole A J, Davenport M L, Efstradiadis A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Dev. Biol.*, 177, 517-535, 1996
- 109 Lupu F, Terwilliger J D, Lee K, Segre G V, Efstradiadis A. Roles of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-1 in Mouse Postnatal Growth. *Developmental Biology*, 229, 141-162, 2001
- 110 Ma Y, Uemura K, Oka S, Kozutsumi Y, Kawasaki N, Kawasaki T. Antitumor activity of mannan-binding protein in vivo as revealed by a virus expression system: Mannan-binding protein-independent cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 371-375, 1999
- 111 Maekawa M, Yamamoto T, Tanoue T, Yuasa Y, Chisaka O, Nishida E. Requirement of the MAP kinase signaling pathways for mouse preimplantation development. *Development*, 132, 1773-1783, 2005
- 112 Mahapatra N R, Mahata M, Ghosh S, Gayen J R, O'Connor D T, Mahata S K. Molecular basis of neuroendocrine cell type-specific expression of the chromogranin B gene: crucial role of the transcription factors CREB, AP-2, Egr-1 and Sp1. *Journal of Neurochemistry*, 99, 119–133, 2006
- 113 Marengo E, Robotti E, Righetti P G, Campostrini N, Pascali J, Ponzoni M, Hamdan M, Astner H. Study of proteomic changes associated with healthy and tumoral murine samples in neuroblastoma by principal component analysis and classification methods. *Clinica Chimica Acta*, 345, 55–67, 2004
- 114 McGrane M M, de Vente J, Yun J, Bloom J, Park E, Wynshaw-Boris A, Wagner T, Rottman F M, Hanson W R. Tissue-specific Expression and Dietary Regulation of a Chimeric Phosphoenolpyruvate Carboxykinase/Bovine Growth Hormone Gene in Transgenic Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 11443-51, 1988
- 115 Mesaeli N and Phillipson C. Impaired p53 Expression, Function, and Nuclear Localization in Calreticulin-deficient Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 1862–1870, 2004

- 116 Mesiano S and Jaffe R B. Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex. *Endocrine Reviews*, 18, 378-403, 1997
- 117 Michl P, Engelhardt D, Oberneder R, Weber MM. Growth hormone has no direct effect on human adrenal steroid and insulin-like growth factor-binding protein secretion. *Endocr Res.*, 25, 281-293, 1999
- 118 Miller W L and Eberhardt N L. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev.*, 4, 97-130, 1983
- 119 Miquet J G, Sotelo A I, Bartke A, Turyn D. Suppression of Growth Hormone (GH) Janus Tyrosine Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 5 Signaling Pathway in Transgenic Mice Overexpressing Bovine GH. *Endocrinology*, 145, 2824-2832, 2004
- 120 Mishra S, Murphy L C, Murphy L J. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell. Mol. Med*, 10, 353-363, 2006
- 121 Mishra S, Moulik S, Murphy L J. Prohibitin binds to C3 and enhances complement activation. *Molecular Immunology*, 44, 1897-1902, 2007
- 122 Mizukoshi E, Suzuki M, Loupatov A, Uruno T, Hayashi H, Misono T, Kaul S C, Wadhwa R, Imamura T. Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin. *Biochem. J.*, 343, 461-466, 1999
- 123 Modric T, Silha J V, Shi Z, Gui Y, Suwanichkul A, Durham S K, Powell D R, Murphy L J. Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor-binding protein-3 over- expression in transgenic mice. *Endocrinology*, 142, 1958-1967, 2001
- 124 Murphy L J, Molnar P, Lu X, Huang H. Expression of human insulin-like growth factor-binding protein-3 in transgenic mice. *J Mol Endocrinol.*, 15, 293-303, 1995
- 125 Muscatelli F, Strom T M, Walker A P, Zanaria E, Récan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, Schwarz H P, Kaplan J-C, Camerino G, Meitinger T, Monaco A P. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature*, 372, 672-676, 2002
- 126 Myers Jr M G, Wang L M, Sun X J, Zhang Y, Yenush J, Schlessinger J, Pierce J H, White M F. Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol.*, 14, 3577-3587, 1994
- 127 Myers Jr M G, Backer J M, Sun X J, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White M F. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1035-10354, 1992

- 128 Naaman E, Chatelain P, Saez J M, Durand P. In vitro effect of insulin and insulin-like growth factor-I on cell multiplication and adrenocorticotropin responsiveness in fetal adrenal cells. *Biol Reprod*, 40, 570–577, 1989
- 129 Niall H D, Hogan M L, Sauer R, Rosenblum I Y, Greenwood F C. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68, 866–870, 1971
- 130 Nonn L, Berggren M, Powis G. Increased Expression of Mitochondrial Peroxiredoxin-3 (Thioredoxin Peroxidase-2) Protects Cancer Cells Against Hypoxia and Drug-Induced Hydrogen Peroxide-Dependent Apoptosis. *Molecular Cancer Research*, 1, 682–689, 2003
- 131 O'Farrel P H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 4007-4021, 1975
- 132 Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, Trumbauer M E, Rosenfeld M G, Birnberg N C, Evans R M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300, 611-5, 1982
- 133 Palmiter R D, Norstedt G, Gelinas R E, Hammer R E, Brinster R L. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222, 809-14, 1983
- 134 Penhoat A, Jaillard C, Saez J M. Synergistic effects of corticotropin and insulin-like growth factor I on corticotropin receptors and corticotropin responsiveness in cultured bovine adrenal cortical cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 165, 355–359, 1989
- 135 Perlmutter D H. Pathogenesis of Chronic Liver Injury and Hepatocellular Carcinoma in Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *Pediatric Research*, 60, 233-238, 2006
- 136 Petrache I, Fijalkowska I, Medler T R, Skirball J, Cruz P, Zhen L, Petrache H I, Flotte T R, Tuder R M. α 1-Antitrypsin Inhibits Caspase-3 Activity, Preventing Lung Endothelial Cell Apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 169, 1155-1166, 2006
- 137 Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart T A. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.*, 7, 2609–2617, 1993
- 138 Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2, 3-10, 2002
- 139 Rajah R, Katz L, Nunn S, Solberg P, Beers T, Cohen P. Insulin-like growth factor binding protein proteases: Functional regulators of cell growth. *Prog Growth Factor Res*, 6, 273-284, 1996

- 140 Rajalingam K and Rudel T. Ras-Raf Signaling Needs Prohibitin. *Cell Cycle*, 4, 1503-1505, 2005
- 141 Rajalingam K, Wunder C, Brinkmann V, Churin Y, Hekman M, Sievers C, Rapp U R, Rudel T. Prohibitin is required for Ras-induced Raf–MEK–ERK activation and epithelial cell migration. *Nature Cell Biolog.*, 7, 837-843, 2005
- 142 Rajaram S, Baylink D J, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev*, 18, 801-31, 1997
- 143 Rajkumar K, Barron D, Lewitt M S, Murphy L J. Growth retardation and hyperglycemia in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *Endocrinology*, 136, 4029–4034, 1995
- 144 Randle PJ. Plasma-insulin activity in hypopituitarism. *Lancet*, 1, 809–810, 1954
- 145 Rasmuson T, Grankvist K, Jacobsen J, Olsson T, Ljungberg B. Serum Insulin-like Growth Factor-1 is an Independent Predictor of Prognosis in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Acta Oncologica*, 43, 744-748, 2004
- 146 Reimund J M, Arondel Y, Escalin G, Finck G, Baumann R, Duclos B. Immune activation and nutritional status in adult Crohn's disease patients. *Digestive and Liver Disease*, 37, 424–431, 2005
- 147 Rinderknecht E and Humbel R E. The Amino Acid Sequence of Human Insulin-like Growth Factor I and Its Structural Homology with Proinsulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 253, 2769-76, 1978
- 148 Rinderknecht E and Humbel R E. Primary Structure of Human Insulin-Like Growth Factor II. *FEBS Letters*, 89, 283-286, 1978
- 149 Roberts Jr C T, Lasky S R, Lowe Jr W L, Seaman W T, LeRoith D. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol Endocrinol*, 1, 243–248, 1987
- 150 Russo V C, Gluckman P D, Fedman E L, Werther G A. The Insulin-Like Growth Factor System and Its Pleiotropic Functions in Brain. *The Endocrine Society*, 26, 916-943, 2005
- 151 Salmon W D and Daughaday W. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med*, 49, 825-836, 1957
- 152 Saraiva M J M, Birken S, Costa P P, Goodman D S. Amyloid Fibril Protein in Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Portuguese Type Definition of Molecular Abnormality in Transthyretin (Prealbumin). *J. Clin. Invest.*, 74, 104-119, 1984

- 153 Sasaki N, Rees-Jones R W, Zick Y, Nissley S P, Rechler M M. Characterization of insulin-like growth factor I-stimulated tyrosine kinase activity associated with the b-subunit of type I insulin-like growth factor receptors of rat liver cells. *J Biol Chem*, 260, 9793–9804, 1985
- 154 Schapira M, Scott C F, Colman R W. Protection of Human Plasma Kallikrein from Inactivation by C 1 Inhibitor and Other Protease Inhibitors. The Role Kininogen? *Biochemistry*, 20, 2738-2743, 1981
- 155 Schulte D M, Shapiro I, Reincke M, Beuschlein F. Expression and spatio-temporal distribution of differentiation and proliferation markers during mouse adrenal development. *Gene Expr Patterns*, 7, 72-81, 2007
- 156 Seger R and Krebs E C. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 9, 726-735, 1995
- 157 Seron-Ferre M, Jaffe R B. The fetal adrenal gland. *Ann. Rev. Physiol.*, 43, 141-62, 1981
- 158 Sicard F, Ehrhart-Bornstein M, Corbeil D, Sperber S, Krug A W, Ziegler C G, Rettori V, McCann S M, Bornstein S R. Age-dependet regulation of chromaffin ceell proliferation by growth factors, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate. *PNAS*, 104, 2007-2012, 2007
- 159 Silha J V, Gui Y, Murphy L J. Impaired glucose homeostasis in insulin-like growth factor-binding protein-3-transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E937–E945, 2002
- 160 Skolnik E Y, Batzer A, Li N, Lee C-H, Lowenstein E, Mohammadi M, Schlessinger J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signaling pathways. *Science*, 260, 1953-1955, 1993
- 161 Skynner H ., Rosahl T W, Knowles M R, Salim K, Reid L, Cothliff R, McAllister G, Guest P C. Alterations of stress related proteins in genetically altered mice revealed by two-dimensional differential in-gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 2, 1018–1025, 2002
- 162 Song J S, Sainz I M, Cosenza S C, Isordia-Salas I, Bior A, Bradford H N, Guo Y-L, Pixley R A, Premkumar Reddy E, Colman R W. Inhibition of tumor angiogenesis in vivo by a monoclonal antibody targeted to domain 5 of high molecular weight kininogen. *Blood*, 104, 2065-72, 2004
- 163 Sørensen C M, Hansen T K, Steffensen R, Jensenius J C, Thiel S. Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 145, 173–182, 2006
- 164 Steele-Perkins G, Turner J, Edman J C, Hari J, Pierce S B, Stover C, Rutter W J, Roth R A. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem*, 263, 11486–11492, 1988

- 165 Stred S E and Messina J L. Identification of hemopexin as a GH-regulated gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 204, 101-110, 2003
- 166 Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, Aprahamian T, Kirber M T, Summer R S, Shinji K, Walsh K. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor–dependent clearance of early apoptotic bodies. *J. Clin. Invest.*, 117, 375–386, 2007
- 167 Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. Protein and polymer analysis up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2, 151-153, 1988
- 168 Taupenot L, Harper K L, O'Connor D T. The Chromogranin–Secretogranin Family. *N Engl J Med*, 348, 1134-49, 2003
- 169 Theiss A L, Obertone T S, Merlin D, Sitaraman S V. Interleukin-6 Transcriptionally Regulates Prohibitin Expression in Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 12804–12812, 2007
- 170 Theiss A L, Idell R D, Srinivasan S, Klapproth J M, Jones D P, Merlin D, Sitaraman S V. Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells. *FASEB Journal*, 21, 197–206, 2007
- 171 Tolosano E, Hirsch E, Patrucco E, Camaschella C, Navone R, Silengo L, Altruda F. Defective Recovery and Severe Renal Damage After Acute Hemolysis in Hemopexin-Deficient Mice. *Blood*, 94, 3906-3914, 1999
- 172 Tonner E, Allan G, Shkreta L, Webster J, Whitelaw C B, Flint D J. Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) potentially regulates programmed cell death and plasminogen activation in the mammary gland. *Adv Exp Med Biol*, 480, 45–53, 2000
- 173 Tuggle C K and Trenkle A. Control of growth hormone synthesis. *Domestic Animal Endocrinology*, 13, 1-33, 1996
- 174 Tzanela M, Christoforaki M, Papastathopoulou L, Vassiliadi D, Botoula E, Trivizas P, Thalassinou N C. Growth hormone binding protein and acid labile subunit levels in the assessment of acromegaly treatment. *Hormones*, 4, 148-154, 2005
- 175 Unlu M, Morgan M E, Minden J S. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18, 2071-2077, 1997
- 176 Vranckx R, Rouaze-Romet M, Savu L, Mechighel P, Maya M, Nunez E A. Regulation of rat thyroxine-binding globulin and transthyretin: studies in thyroidectomized and hypophysectomized rats given tri-iodothyronine or/and growth hormone. *J Endocrinol.*, 142, 77-84, 1994

- 177 Wagner T E, Hoppe P C, Jollick J D, Scholl D R, Hodinka R L, Gault J B. Microinjection of a rabbit β -globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6376-80, 1981
- 178 Wang J, Niu W, Witte D P, Chernausk S D, Nikiforov Y E, Clemens T L, Sharifi B, Strauch A R, Fagin J A. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle alpha-actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia. *Endocrinology*, 139, 2605–2614, 1998
- 179 Wanke R, Wolf E, Brem G, Hermanns W. Physiology and pathology of growth-studies in GH transgenic mice. *J Anim Breed Genet*, 113, 445-456, 1996
- 180 Wanke R, Hermanns W, Folger S, Wolf E, Brem G. Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview. *Pediatr Nephrol*, 5, 513-2, 1991
- 181 Wanke R, Folger S, Hermanns W, Wolf E, Schams D, Brem G. Induktion neoplastischer und nicht-neoplastischer Leberveränderungen durch Wachstumshormon-Überproduktion bei bGH-transgenen Mäusen. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 75, 312, 1991
- 182 Weber M M, Fottner C, Wolf E. The role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical tumourigenesis. *European Journal of Clinical Investigation*, 30, 69–75, 2000
- 183 Weber M M, Kiess W, Beikler T, Simmler P, Reichel M, Adelman B, Kessler U, Engelhardt D. Identification and characterization of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II/mannose-6-phosphate (IGF-II/M6P) receptors in bovine adrenal cells. *European Journal of Endocrinology*, 130, 265-270, 1994
- 184 Weber M M, Simmler P, Fottner C, Engelhardt D. Insulin-Like Growth Factor II (IGF-II) Is More Potent Than IGF-I in Stimulating Cortisol Secretion from Cultured Bovine Adrenocortical Cells: Interaction with the IGF-I Receptor and IGF-Binding Proteins. *Endocrinology*, 136, 3714-20, 1995
- 185 Weimann E und Kiess W. Grundlagen und klinische Bedeutung der Insulin-like Growth Factors/Somatomedine. *Klin Wochenschr.*, 68, 985-1002, 1990
- 186 Wilkins M R, Pasquali C, Appel R D, Ou K, Golaz O, Sanchez J C, Yan J X, Gooley A A, Hughes G, Williams K L and Hochstrasser D F. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nature Bio/Technology*, 14, 61-65, 1996
- 187 Wolf E, Schneider M R, Zhou R, Fisch T, Herbach N, Dahlhoff M, Wanke R, Hoeflich A. Functional consequences of IGFBP excess lessons from transgenic mice. *Pediatr Nephrol*, 20, 269 - 278, 2005

- 188 Wolf E, Kahnt E, Ehrlein J, Hermanns W, Brem G, Wanke R. Effects of Long-Term Elevated Serum Levels of Growth Hormone on Life Expectancy of Mice: Lessons from Transgenic Animal Models. *Mechanisms of Ageing and Development*, 68, 71-87, 1993
- 189 Wolf E, Hoeflich A, Lahm H. What is the function of IGF-II in postnatal life? Answers from transgenic mouse models. *Growth Hormone and IGF Research*, 8, 185-193, 1998
- 190 Wolf E, Lahm H, Wu M, Wanke R, Hoeflich A. Effects of IGFBP-2 overexpression in vitro and in vivo. *Pediatr Nephrol*, 14, 572-578, 2000
- 191 Wood T L, Rogler L, Streck R D, Cerro J, Green B, Grewal A, Pintar J E. Targeted disruption of IGFBP-2 gene. *Growth Regul.*, 3, 5-8, 1993
- 192 Wood T L, Rogler L, Czick M E, Schuller A G, Pintar J E. Selectiv alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like factor binding protein-2 gene. *Mol.Endocrinol.*, 14, 1472-82, 2000
- 193 Woods K A, Camacho-Hubner C, Savage M O, Clark A J. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*, 335:1363–1367, 1996
- 194 Yamazaki T, Kawasaki H, Takamasa A, Yoshitomi T, Kominami S. Ca²⁺ signal stimulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis in bovine adrenal fasciculata–reticularis cells. *Life Sciences*, 78, 2923–2930, 2006
- 195 Yoo S H, You S H, Kang M K, Huh Y H, Lee C S, Shim C S. Localization of the Secretory Granule Marker Protein Chromogranin B in the Nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 16011–16021, 2002
- 196 Zhang Q, Jiang J, Kopchick J J, Frank S J. Disulfide Linkage of Growth Hormone (GH) Receptors (GHR) Reflects GH-induced GHR Dimerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 33072-84, 1999
- 197 Zhang M, Faugere M C, Malluche H, Rosen C J, Chernausek S D, Clemens T L. Paracrine overexpression of IGFBP-4 in osteoblasts of transgenic mice decreases bone turnover and causes global growth retardation. *J Bone Miner Res*, 18, 836–843, 2003
- 198 Zhou Y, Xu B C, Maheshwari H G, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner T E, Baumann G, Kopchick J J. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor binding protein gene (the Laron mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13215–13220, 1997
- 199 Zhou R, Diehl D, Hoeflich A, Lahm H, Wolf E. IGF binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J Endocrinol*, 178, 177–193, 2003

12 Danksagung

Herrn Professor Dr. Eckhard Wolf danke ich ganz herzlich für die jederzeit sehr freundliche Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Andreas Höflich danke ich für die Überlassung des Themas und für das allzeit offene Ohr.

Der LAFUGA-Gruppe (Proteomics), Herrn Dr. Georg J. Arnold und Herrn Dr. Thomas Fröhlich möchte ich für die freundliche Aufnahme in ihre Laborräume und die Benutzung der massenspektrometrischen Geräte danken. Mein besonderer Dank geht an Roman und Patrick für die Unterstützung bei massenspektrometrischen Fragen.

Für die unermüdliche Aufheiterung und der stets guten Laune, die Ihr verbreitet habt, möchte ich Euch, liebe „Wasserflohforscher“, danken. Ohne Euch wäre die Welt nur halb so schön.

Mein Dank geht natürlich auch an die Mitarbeiter des Tierstalls, sowohl im Genzentrum, als auch am Moorversuchsgut für die optimale Pflege der Mäuse und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an die „Werkstatt“ mit ihren stets hilfsbereiten Mitarbeitern.

Simone, Daniela und Maik möchte ich für ihre schnelle und kompetente Hilfe danken.

Ein Dankeschön geht an Frau Kammerer, der guten Seele des Graduiertenkollegs.

Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung all die Jahre danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dich, lieber Stefan, für Deine aufmunternden Worte und für den Zusammenhalt während der vergangenen Jahre.

13 Lebenslauf

Persönliches

Geburtstag 05. April 1976

Geburtsort Fürstenfeldbruck

Schulbildung

1982-1986 Grundschule, 82216 Maisach

1986-1995 Gymnasium, 82140 Olching; Abschluss: Abitur

Berufliche Ausbildung

Sept. 1995-Juli 1998 3-jährige Berufsfachschule für VMTA (veterinärmedizinisch-technische Assistentinnen/Assistenten) am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 85762 Oberschleißheim

Berufliche Tätigkeit

Okt.1998-Okt.1999 als VMTA angestellt im Max-Planck-Institut für Neurobiologie; Abteilung Neurobiochemie, 82152 Planegg-Martinsried

Hochschulbildung

ab November 1999 Tiermedizinstudium an der LMU München

Januar 2005 Approbation

Dissertation

ab Februar 2005 Dissertation