

Aus der
Klinik für Anästhesiologie
der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Desfluran induzierte Präkonditionierung:
Beteiligung und Regulation zytosolischer Proteine**
- ein proteomanalytischer Ansatz -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hendrik Vogt

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Schlack

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Haendeler

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

In Vivo Desflurane Preconditioning Evokes Dynamic Alterations of Metabolic Proteins in the Heart - Proteomic Insights Strengthen the Link between Bioenergetics and Cardioprotection

Dyballa-Rukes N.^a · Schuh C.^a · **Vogt H.**^a · Toma O.^b · Schlack W.S.^b · Weber N.C.^c · Metzger S.a,^d

^aBiological Medical Research Centre, Heinrich-Heine-University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany;

^bDepartment of Anaesthesiology, ^cLaboratory of Experimental Intensive Care and Anaesthesiology, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; ^dCurrent address: University of Cologne, Biocenter, Cologne

Cell Physiol Biochem 2014;33:967-981

(DOI:10.1159/000358668)

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>Einleitung</i>	- 1 -
1.1	Stellung myokardialer Erkrankungen in der heutigen Medizin	- 1 -
1.2	Pathophysiologie der Ischämie-/Reperfusionsschäden	- 2 -
1.2.1	Einfluss der Ischämie-Reperfusion auf die Energiegewinnung	- 2 -
1.2.2	Einfluss der Ischämie-Reperfusion auf die Radikalbildung	- 4 -
1.2.3	Einfluss der Ischämie-Reperfusion auf die Ionen-Gradienten	- 4 -
1.3	Präkonditionierung	- 5 -
1.3.1	Definition	- 5 -
1.3.2	Mechanismen und Signalwege der Präkonditionierung	- 6 -
1.3.3	Desfluran als präkonditionierendes Anästhetikum	- 10 -
1.3.4	Klinische Anwendung pharmakologischer Präkonditionierung	- 12 -
1.4	Fragestellungen dieser Dissertation	- 13 -
2	<i>Material und Methoden</i>	- 15 -
2.1	Präkonditionierung	- 15 -
2.2	Vorbereitung der Proben	- 16 -
2.2.1	Proteinfraktionierung	- 16 -
2.2.2	Proteinbestimmung nach Lowry	- 17 -
2.2.3	Proteinfällung	- 17 -
2.3	2D-Gelelektrophorese	- 18 -
2.3.1	Die erste Dimension: isoelektrische Fokussierung	- 18 -
2.3.2	Die zweite Dimension: SDS-PAGE	- 20 -
2.4	Coomassie-Färbung	- 22 -
2.5	Auswertung der 2D-Gele	- 23 -
2.6	Tryptischer Verdau	- 23 -
2.7	Entsalzung der Proben	- 25 -
2.8	Protein-Identifikation	- 25 -
2.8.1	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	- 26 -
2.8.2	Tandem-Hybrid-Massenspektrometer	- 27 -
2.8.3	Identifizierung der Proteine	- 28 -

3	<i>Ergebnisse</i>	- 32 -
3.1	Studiendesign	- 32 -
3.2	Optimierung der Konditionen für die 2D-Gelelektrophorese	- 33 -
3.2.1	Einfluss des Rehydratationspuffer	- 33 -
3.2.2	SDS-Gel-Konditionen	- 36 -
3.2.3	Applizierte Proteinmengen	- 36 -
3.2.4	Zoom-Gele	- 38 -
3.2.5	Auswertung der 2D-PAGE	- 39 -
3.2.6	Definition signifikanter Spotvolumenveränderungen	- 40 -
3.2.7	Signifikant veränderte Spots	- 42 -
3.3	Massenspektrometrische Identifikation der Proteine	- 45 -
3.4	Identifizierte Proteine	- 47 -
4	<i>Diskussion</i>	- 49 -
4.1	Einordnung der Proteine in den Kontext der Präkonditionierung	- 49 -
4.2	Unterschiedliche Regulierungsmuster der identifizierten Proteine	- 55 -
4.3	Limitationen und Kritik an der Methode	- 57 -
4.3.1	Limitationen der 2D-PAGE	- 57 -
4.3.2	Limitationen des Versuchaufbaus	- 59 -
4.4	Ausblick	- 59 -
5	<i>Zusammenfassung</i>	- 61 -
6	<i>Literatur</i>	- 62 -
7	<i>Anhang</i>	- 71 -
7.1	Identifizierte Proteine	- 71 -
8	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	- 76 -
9	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	- 77 -
10	<i>Lebenslauf</i>	- 78 -
11	<i>Danksagung</i>	- 79 -

1 EINLEITUNG

1.1 Stellung myokardialer Erkrankungen in der heutigen Medizin

Unter den zehn häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland findet man gleich vier, nach ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) definierte, Krankheiten, die direkt das Herz betreffen. Der akute Myokardinfarkt belegt, mit einem Anteil von 6,0% an der Gesamt-Sterberate, den zweiten Platz in der Statistik ¹. Vor allem in Zeiten hoher Prävalenz des metabolischen Syndroms, welches als infarktbegünstigender Faktor angesehen werden muss, besteht ein dringender klinischer Handlungsbedarf.

Zwar hat sich in der Behandlung eines ischämischen Infarkts, also dem Verschluss eines arteriellen Blutgefäßes mittels eines Blutgerinnsels, innerhalb der letzten Jahre die möglichst rasche Wiederherstellung des Blutflusses (Reperfusion) als Standard-Therapie etabliert, allerdings darf hierbei die Gefahr des Reperfusionsschadens (s. nächster Abschnitt) nicht unterschätzen werden. Es muss also nach alternativen, möglichst präventiven statt kurativen, Behandlungsmöglichkeiten gesucht werden. Einen vielversprechenden Ansatz stellt dabei die pharmakologische Präkonditionierung dar. Unter Präkonditionierung versteht man die Applikation eines Triggers (im Falle der pharmakologischen Präkonditionierung z.B. ein volatiles Anästhetikum), in dessen Folge intrazelluläre Kaskaden ablaufen, die schließlich zu einer Protektion der Zelle und damit des Organs führen. Die Präkonditionierung wirkt dabei einerseits direkt infarktlimitierend, schützt aber ebenso vor einer der gefürchtetsten Komplikationen des Herzinfarkts, der Arrhythmie.

Klinisch hochrelevante Einsatzgebiete für eine solche präventive Maßnahme sind beispielsweise größere Operationen. Die 30-Tage-Mortalität aufgrund kardialer Ursachen liegt bei diesen Operationen zwischen 2% (Normalbevölkerung) und 5% (kardiale Risikopatienten) ². Da eine Anästhesie ohnehin notwendig ist, ist die Integration der pharmakologischen Präkonditionierung gut möglich.

Landesberg *et al.* konnten außerdem zeigen, dass viele der postoperativen kardialen Komplikationen auf eine intraoperative myokardiale Ischämie zurückzuführen sind ³.

Im Rahmen dieser Einleitung wird auf die Mechanismen, Effekte, sowie klinische Anwendungen der Präkonditionierung eingegangen, doch zunächst soll im nächsten Abschnitt die Pathophysiologie der Ischämie-Reperfusion besprochen werden.

1.2 Pathophysiologie der Ischämie-/Reperfusionsschäden

Während einer Ischämie und paradoxerweise vor allem während der Reperfusion, kommt es zu enormen Schäden auf zellulärer und subzellulärer Ebene. Die entscheidende Rolle dieses Pathomechanismus kommt, nach heutigem Kenntnisstand, den Mitochondrien zu.

1.2.1 Einfluss der Ischämie-Reperfusion auf die Energiegewinnung

Als Kraftwerke der Zelle sind die Mitochondrien für die Bereitstellung von ATP, dem wichtigsten zellulären Energieäquivalent, verantwortlich. Außerdem spielen sie eine entscheidende Rolle in der Apoptose-Kaskade.

Um aus denen der Zelle zugeführten Energie-Ressourcen (v.a. Fettsäuren und Glukose) ATP zu synthetisieren, wird viel Sauerstoff benötigt. Im Herzen ist der Anteil der oxidativen Energiegewinnung an der gesamten Energiegewinnung mit über 90% sehr hoch ⁴. Ein Überblick über die verschiedenen Prozesse gibt Abbildung 1.

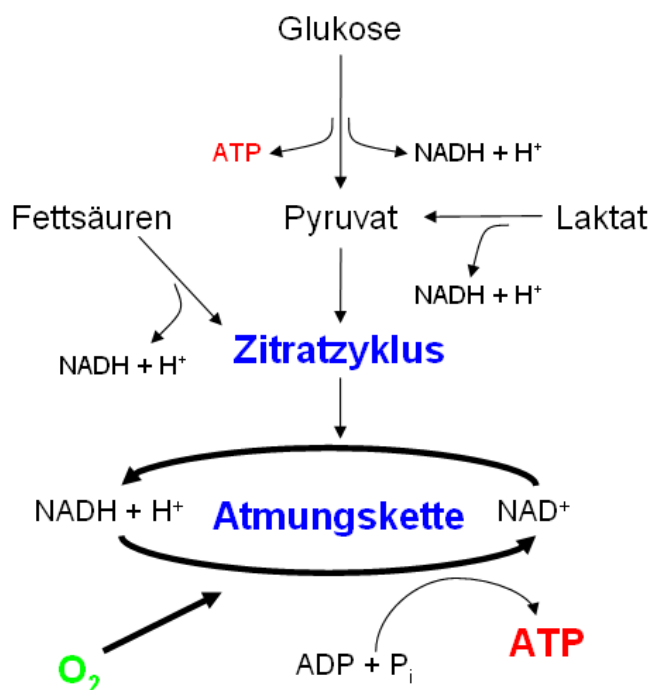


Abbildung 1: Dargestellt ist die Energiegewinnung in der Zelle unter normoxischen Bedingungen. Im Zitratzyklus laufen die verschiedenen Reaktionswege zusammen, ehe die Reduktionsequivalente der Atmungskette zugeführt werden. Abbildung modifiziert nach Solaini et al. 5.

Wichtig für das Verständnis des Pathomechanismus der Ischämie ist, dass während der oxidativen Phosphorylierung durch die verschiedenen Komplexe der Atmungskette ein Proton-elektrochemischer Gradient aufgebaut wird. Dieses Potential nutzt anschließend die F₁F₀-ATP-Synthase, indem sie Protonen kontrolliert zurückfließen lässt, um mit der

dabei frei werdenden Energie aus ADP und anorganischem Phosphat ATP zu synthetisieren.

Wenn nun zu wenig Sauerstoff zur Verfügung steht, wie z.B. während einer Ischämie, kommt es zu enormen Veränderungen in der Zelle. Die gegebenenfalls nachfolgende Reperfusion aggraviert die Gesamtsituation zusätzlich. Dieser Vorgang ist bekannt als Reperfusionsschaden. Die verschiedenen Aspekte und Pathomechanismen werden im Folgenden näher erläutert.

Zunächst einmal kann ohne Sauerstoff keine oxidative Phosphorylierung mehr stattfinden, da den dafür zuständigen Atmungskettenenzymen der Sauerstoff als Elektronenakzeptor nicht mehr zur Verfügung steht. Daher findet nur noch die anaerobe Glykolyse statt, deren Endpunkt das Laktat darstellt. Die Akkumulation von Laktat wiederum führt zu einem Absinken des zytoplasmatischen pH, wodurch schließlich auch die Enzyme der Glykolyse gehemmt werden, sodass keine Energiegewinnung mehr stattfinden kann. Wenn die Ischämie dreißig Minuten andauert, fällt der ATP-Gehalt der Zelle auf 40-50% des normalen Levels⁶. Bis zu diesem Zeitpunkt sind andere schnell verfügbare Energiequellen, wie z.B. das Kreatinphosphat, ebenfalls lange aufgebraucht.

Dadurch dass die Komplexe der Atmungskette nicht mehr arbeiten können, bricht das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran (IM) zusammen. Das führt dazu, dass die F_1F_0 -ATP-Synthase nun als ATPase arbeitet, das heißt unter ATP-Verbrauch H^+ -Ionen in den Intermembranraum pumpt, um den Ionengradienten aufrecht zu erhalten. Manche Forscher sehen darin einen zellprotektiven Mechanismus⁵.

Die Auswirkungen des O_2 -Mangels betreffen vor allem die Atmungskettenenzyme, sodass es sich lohnt die Veränderungen dieser Enzyme ebenfalls zu betrachten:

Die NADH-Dehydrogenase ist das am besten untersuchte und wahrscheinlich auch das am meisten durch die Ischämie beeinträchtigte Atmungskettenenzym⁷⁻¹⁰. Untersuchungen an Rattenherzen haben ergeben, dass es nach 20 Minuten Ischämie zu einer signifikanten Reduktion der Enzymaktivität kommt¹⁰, welche durch die einsetzende Reperfusion noch verstärkt wird⁹. Der Grund dafür konnte allerdings noch nicht eindeutig bestimmt werden. Verschiedene Theorien führen oxidativen Stress^{11,12} oder vermehrte NO-Bildung^{13,14} als mögliche Erklärung an.

Die Komplexe II und III der Atmungskette scheinen beide recht resistent gegenüber Ischämie und Reperfusion zu sein. Doch auch hier gehen die Meinungen bzw. Forschungsergebnisse auseinander, ebenso bei den Untersuchungen zu Cytochrom C. Einen Überblick geben Solaini *et al.* ^{5,15}.

1.2.2 Einfluss der Ischämie-Reperfusion auf die Radikalbildung

Wie in jeder anderen Zelle auch, findet in den Kardiomyozyten Radikalbildung statt. Erneut kommt den Mitochondrien hierbei die zentrale Rolle zu, da sie einen Großteil des aufgenommenen O₂ für die Funktion ihrer Atmungskettenenzyme benötigen. Ein Teil des O₂ wird allerdings von den gleichen Enzymen zu Radikalen umgesetzt ¹⁶. Obwohl während einer Ischämie die Sauerstoffzufuhr zur Zelle abnimmt, werden mehr freie Radikale (reactive oxygen species = ROS) gebildet, welche durch eine nachfolgende Reperfusion nochmals vermehrt werden, einen aktuellen Überblick geben Chen *et al.* ¹².

Die erhöhten ROS-Mengen übersteigen die Kompensationsmöglichkeiten der Zelle und es kommt zu ausgeprägten Schäden: Membranschäden durch Lipid-Peroxidation, sowie irreversiblen Protein- sowie DNA-Modifikationen. Dies führt zu gravierenden Folgen innerhalb der Zelle. Je nach Höhe der ROS-Konzentration reichen diese von reversiblen Einschränkungen der Mitochondrienfunktion bis hin zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose ^{17,18}.

Eine besondere Rolle unter den Radikalen spielt das Stickstoffmonoxid ($\triangleq$ NO). Es ist stark konzentrationsabhängig, ob NO positive oder negative Effekte für die Zelle hat. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass der NO-Gehalt der Zelle während der Ischämie-Reperfusion steigt ¹³, aber ob diese Konzentrationen protektive oder schädigende Effekte haben, wird kontrovers diskutiert ¹⁹⁻²³, ein ausführlicher Review-Artikel wurde von Ziolo *et al.* veröffentlicht ²⁴. Es sei an dieser Stelle aber bereits darauf hingewiesen, dass das NO eine essentielle Rolle als Mediator der Präkonditionierung spielt (vgl. Abschnitt 1.3.2.1, Abbildung 2). Eine gute Übersicht darüber geben Jones *et al.* ²⁵, sowie Folino *et al.* ²⁶.

1.2.3 Einfluss der Ischämie-Reperfusion auf die Ionen-Gradienten

Ein weiterer wichtiger pathophysiologischer Gesichtspunkt ist die Verschiebung der unterschiedlichen Ionen-Gradienten. Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 erwähnt, bricht der

Protonen-Gradient während einer Ischämie über der IM zusammen. Unter diesen Umständen arbeitet die F_1F_0 -ATP-Synthase als ATPase, das heißt sie transportiert unter ATP-Verbrauch Protonen in den Intermembranraum, um dem Zusammenbruch entgegenzuwirken. Damit wird der vorhandene Mangel an ATP noch verstärkt.

Die Veränderung des Ca^{2+} -Gradienten hat nachfolgend beschriebene, zellschädigende Wirkung: Durch den ATP-Mangel kann das Calcium nicht mehr aus dem Mitochondrien-Zytosol heraus transportiert werden und als Folge dessen kann es während der Reperfusion u.a. zu einer, durch Hyperkontraktur ausgelösten, Nekrose kommen²⁷. Eine entscheidende Rolle spielt der Calcium-Überschuss auch als Trigger für den Mechanismus der 'Mitochondrial Permeability Transition' (MPT). Dieser erstmals in den 70er Jahren von Hunter und Haworth beschriebene Mechanismus führt dazu, dass die IM für Moleküle mit bis zu 1500 Dalton Größe permeabel wird²⁸. Es folgen ein Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten, sowie ein onkotisch verursachter Wasser-Influx mit Schwellung des Intermembranraumes. Dieser angeschwollene Intermembranraum wiederum führt zu Funktionseinbußen der Atmungskettenenzyme. Die Ausmaße der MPT spielen eine enorme Rolle für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zelle. Entsprechend gibt es viele Regulations- und Triggermechanismen, eine ausführliche Übersicht geben Honda *et al.*²⁹, sowie Brenner *et al.*³⁰. Zwei besonders erwähnenswerte Trigger sind die ATP-abhängigen K^+ -Kanäle und die Proteinkinase C- ϵ . Beide führen nach ihrer Öffnung / Aktivierung dazu, dass keine MPT stattfindet und schützen somit die Zelle. Beide Proteine spielen auch eine wichtige Rolle bei den Mechanismen der Präkonditionierung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Schäden, die durch die Ischämie und vor allem durch die Reperfusion entstehen, sehr vielfältig sind und je nach Ausmaß zu verheerenden Folgen für die Zelle führen können. Im Folgenden Abschnitt wird dargestellt wie und an welchen Stellen die Präkonditionierung zu einer Protektion der Zelle führen kann.

1.3 Präkonditionierung

1.3.1 Definition

Die Präkonditionierung ist ein Phänomen, dass erstmals 1986 von Murry *et al.* beschrieben wurde³¹. Er konnte beobachten, dass seine Versuchstiere (Hunde) nach einer Okklusion der Herzkranzgefäße eine deutlich geringere Infarktgröße aufwiesen,

wenn dem Verschluss eine sublethale ischämische Periode voranging³¹. In den folgenden Jahren konnte diese Beobachtung auf viele weitere Spezies, unter anderem den Menschen, übertragen werden, vgl. Przyklenk *et al.*³². Es etablierte sich der Begriff der ischämischen Präkonditionierung.

Unabhängig von diesen Erkenntnissen wurde 1983 und 1989 von Davis *et al.* beobachtet, dass die beiden Anästhetika Halothan und Isofluran infarktlimitierende Eigenschaften haben^{33,34}. Cason *et al.*, sowie Kersten *et al.* gelangen 1997 die Verknüpfung der beiden Beobachtungen, indem sie nachweisen konnten, dass die präkonditionierenden Eigenschaften der Anästhetika auf eine Nachahmung der Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung zurückzuführen sind^{35,36}. Es prägte sich der Begriff der anästhetischen Präkonditionierung. Später konnte außerdem gezeigt werden, dass auch andere Pharmaka, wie z.B. Opioide, eine entsprechende Protektion auslösen können³⁷, sodass der Überbegriff der pharmakologischen Präkonditionierung entstand.

Neben der ischämischen und der pharmakologischen Präkonditionierung, die nachfolgend detailliert besprochen werden, gibt es weitere Formen der Kardioprotektion, wie die Fern-Präkonditionierung³⁸ oder die Postkonditionierung³⁹.

In den letzten Jahren haben sich viele Forschergruppen der Aufgabe gewidmet die Mechanismen aufzuklären die auf molekularer Ebene diese Präkonditionierung begründen. Der heutige Stand der Dinge wird in den nachfolgenden Abschnitten erläutert.

Neben dem infarktlimitierenden Effekt führt die Präkonditionierung auch zu einer verbesserten post-ischämischen Erholung der Herzmuskelzellen und verringert die Gefahr der Entwicklung einer Arrhythmie. Man fand außerdem heraus, dass nicht nur das Herz, sondern auch viele andere Organe präkonditioniert werden können, einen Überblick darüber geben Candilio *et al.*⁴⁰.

1.3.2 Mechanismen und Signalwege der Präkonditionierung

1.3.2.1 Allgemeine Mechanismen

Es gibt allgemeine Mechanismen und Signalwege, die bei allen Formen der Präkonditionierung gleich bzw. ähnlich sind. Aufgrund der Geschichte der Präkonditionierung wurden diese meist im Zusammenhang mit Forschungsarbeiten an der ischämischen Präkonditionierung entdeckt und werden nun bei den anderen Formen der Präkonditionierung nachvollzogen. Daher wird im Folgenden zunächst die

ischämische Präkonditionierung erläutert, um danach die Parallelen zur pharmakologischen Präkonditionierung zu ziehen.

Jede Präkonditionierung braucht einen entsprechenden Trigger. Im Falle der ischämischen Präkonditionierung ist dies eine kurze, sublethale Okklusion eines der Herzkranzgefäße. Die daraufhin folgende Schutzwirkung teilt sich in zwei Phasen: Die frühe und die späte Phase der Protektion. Die frühe Phase beginnt wenige Minuten nach dem entsprechenden Trigger, verschwindet aber nach zwei bis drei Stunden wieder. Nach zwölf bis 24 Stunden tritt die zweite Phase der Protektion auf, die circa 72 Stunden anhält. Zwischen diesen beiden Phasen ist das Herz ebenso anfällig für die Folgen einer Ischämie wie ohne eine Präkonditionierung⁴¹. Mit Ausnahme des Triggers und der Effektoren (s.u.) sind die Mechanismen, die beiden Phasen der Protektion zu Grunde liegen, völlig verschieden. Da in der vorliegenden Arbeit die frühe Phase der Präkonditionierung untersucht wurde, wird hauptsächlich auf diese eingegangen.

Der präkonditionierende Trigger führt zu einer Ausschüttung einer Vielzahl von Mediatoren, u.a. Adenosin, Angiotensin, Purine, Endotheline, Opioide, Bradykinin, Katecholamine oder Acetylcholin. Diese leiten das Signal dann über verschiedenste, sarkolemmal lokalisierte Rezeptoren an die Zelle weiter. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um inhibitorische G-Protein gekoppelte Rezeptoren⁴². Diese Vielfalt und Variabilität der Mediatoren und Rezeptoren zeigt, dass dieser endogene Schutzmechanismus eine biologisch so eminente Bedeutung hat, dass es viele Möglichkeiten gibt ihn auszulösen und ebenso viele Alternativen falls ein Signalweg ausfällt. Dabei bleibt natürlich zu beachten, dass je nach Spezies und Präkonditionierungsart spezielle Mediatoren und Rezeptoren die Hauptrolle spielen⁴³.

Intrazellulär schlägt das Signal vielfältige Wege ein. Der Wichtigste ist die Aktivierung der Phospholipasen C und D, die ihrerseits über die Bildung von Inositoltrisphosphat und Diacylglycerat weitere Schlüsselenzyme aktivieren. Das Bedeutendste davon ist die Proteinkinase C. Je nach Spezies und Trigger werden unterschiedliche Isoformen dieses Enzyms aktiviert, bzw. vom Zytosol in die Membran transloziert, um dann weitere Enzyme zu phosphorylieren. Unter diesen Enzymen sind die wichtigen ATP-abhängigen Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle), die sich sowohl sarkolemmal als auch in der mitochondrialen Membran befinden. Bevor auf die Funktion der K_{ATP} -Kanäle eingegangen wird sei erwähnt, dass es neben dem oben beschriebenen Weg noch viele weitere gibt, um die PKC oder auch die K_{ATP} -Kanäle zu aktivieren. Aus Gründen der

Übersicht kann in diesem Rahmen nicht darauf eingegangen werden, einen Überblick gibt Abbildung 2.

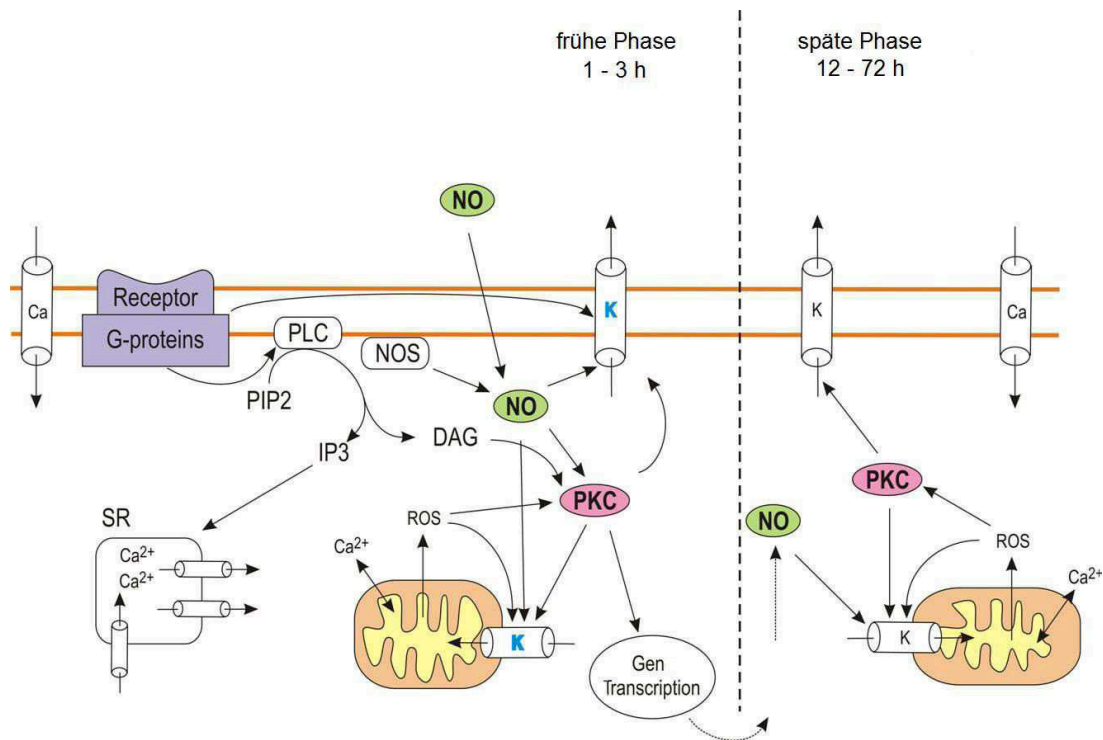


Abbildung 2: Gezeigt werden Mediatoren und mögliche Effektoren der ischämischen Präkonditionierung. Man kann erkennen, dass es viele parallele Reaktionswege gibt, um die K_{ATP} -Kanäle zu aktivieren. PLC = Phospholipase C ; PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ; NOS = NO-Synthase ; DAG = Diacylglycerin ; IP3 = Inositoltrisphosphat ; PKC = Proteinkinase C ; SR = Sarkoplasmatisches Retikulum ; Ca = Calcium-Kanal ; K = Kalium-Kanal
Abbildung modifiziert nach Zaugg et al. ⁴⁴.

Wie wichtig die K_{ATP} -Kanäle für die Präkonditionierung sind lässt sich dadurch zeigen, dass pharmakologische K_{ATP} -Kanal-Öffner eine Präkonditionierung hervorrufen, sowie K_{ATP} -Kanal-Blocker diese verhindern können ⁴⁵. Dabei scheinen die mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle gegenüber den sarkolemmlen die größere Rolle für die ischämische Präkonditionierung zu spielen ⁴⁶.

Unter physiologischen Konditionen sind diese Kanäle im Herzen nicht geöffnet, da sie durch ATP allosterisch inhibiert werden. Kommt es allerdings zur Ischämie nimmt der ATP-Gehalt ab und im Gegenzug die ADP-Konzentration zu. Daraus resultiert eine Öffnung der Kanäle. Bei der Frage nach den Protektionsmechanismen muss zunächst zwischen den Wirkungen der sarkolemmlen und den mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen unterschieden werden.

Die Öffnung der sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Dies wiederum hat eine verkürzte Aktionspotentialdauer und damit verminderten Ca^{2+} -Influx zur Folge. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, ist die erhöhte Calcium-Konzentration während der Ischämie ein Hauptgrund für die enormen Zellschäden, welche durch die Öffnung der sarkolemmalen Kanäle verringert wird.

Über die Effekte der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle gibt es verschiedene Theorien, von denen sich bisher keine hat durchsetzen können. Allerdings schließen sie sich gegenseitig auch nicht aus, sodass eine kombinierte Theorie aus allen drei Ansätzen der Realität wahrscheinlich am Nächsten kommt^{44,47}.

1. Marbán *et al.* haben gezeigt, dass eine Öffnung der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle zu einer geringen Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran führt. Aufgrund der nicht-linearen Abhängigkeit des Calcium-Einstroms von diesem Membranpotential hat die Änderung aber einen stark mindernden Einfluss auf die Ca^{2+} -Akkumulation während der Ischämie⁴⁸.
2. Garlid *et al.* haben die Theorie aufgestellt, dass die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle die ischämieinduzierte Schwellung des Intermembranraumes (s. Kapitel 1.2) verringert und so die Zelle schützt^{49,50}.
3. Die dritte Erklärung stützt sich auf die Beobachtung, dass das Öffnen der K_{ATP} -Kanäle eine vermehrte ROS-Produktion zur Folge hat. Diese Radikale induzieren nun die Freisetzung weitere Mediatoren (NF- κ B, Hypoxia-inducible factor, Proteinkinasen und -phosphatasen u.v.m.), die zur Protektion führen, vgl. Pain *et al.*⁵¹. In diesem Modell stellen die Kaliumkanäle keine Effektoren, sondern nur einen weiteren Trigger dar. Marinovic *et al.* vermuten, dass durch die ROS-Freisetzung zytosolische Mediatoren, wie z.B. die Protein Kinase C, aktiviert werden, die wiederum in das Sarkolemm translozieren und dort über eine Phosphorylierung der sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle diese sensibilisieren bzw. aktivieren⁵².

Da die K_{ATP} -Kanäle eine so zentrale Rolle im Signalweg der Präkonditionierung spielen, beschäftigen sich viele verschiedene Arbeitsgruppen mit diesem Thema. Dabei finden sich zum Teil kontroverse Ergebnisse und Interpretationen. Einen guten Überblick findet man im Review-Paper von Weber *et al.*⁵³.

Durch eine Reihe von Beobachtungen, die vor allem im Bereich der pharmakologischen Präkonditionierung gemacht wurden, gibt es neben der hier vorgestellten Theorie eine alternative Theorie, die ohne Miteinbeziehung der Kalium-Kanäle argumentiert. Dabei fungiert eine partielle Inhibition der Atmungskette bzw. des Zitratzyklus als Endeffektor der Präkonditionierung. Da ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse diese Theorie unterstützt, wird diese ausführlicher im Diskussionsteil vorgestellt (vergleiche Kapitel 4.1, Seite 54).

1.3.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung

Für viele der heute gängigen volatilen Anästhetika, sowie für einige Opioide wurde mittlerweile eine präkonditionierende Wirkung nachgewiesen. Darunter fallen u.a. Isofluran, Enfluran, Halothan, Sevofluran und Desfluran⁵⁴⁻⁵⁹. Sie ersetzen dabei die sublethalen, ischämischen Perioden als Trigger und initiieren über verschiedene Rezeptoren und Mechanismen intrazelluläre Signalkaskaden.

Dabei finden sich, im Großen und Ganzen, die Abläufe der ischämischen Präkonditionierung wieder. Allerdings scheinen bei der pharmakologischen Präkonditionierung die sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle eine bedeutendere, den mitochondrialen gleichzustellende Bedeutung zu haben^{59,60}. Doch auch hierbei kommt es, mehr denn je, auf Spezies, verwendetes Anästhetikum und den Versuchsaufbau an.

Da eine ausführliche Besprechung aller Rezeptoren und Trigger den Rahmen dieser Einleitung übersteigen würde, sei auf den Review-Artikel von Siracusano *et al.* verwiesen⁶¹. Die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtigen Mechanismen der Desfluran-getriggerten Präkonditionierung folgen im nächsten Abschnitt.

1.3.3 Desfluran als präkonditionierendes Anästhetikum

Bei Desfluran handelt es sich um einen fluorierten Methylethyläther. Klinisch zeichnet es sich durch einen niedrigen Blut-Gas-, sowie einen niedrigen Öl-Blut-Verteilungskoeffizienten aus, das heißt es findet eine schnelle Narkoseeinleitung, sowie ein rasches Erwachen nach Beendigung der Narkose statt. Es ist ein weit verbreitetes Standardanästhetikum.

2000 konnten Toller *et al.* an Hunden nachweisen, dass Desfluran einen kardioprotektiven Effekt im Sinne einer Präkonditionierung besitzt⁵⁸. 2004 wurde dieses Erkenntnis durch Toma *et al.* auch bei Ratten nachgewiesen (s. Abbildung 3)⁶².

In einer vergleichenden Studie zwischen Halothan, Sevofluran, Isofluran und Desfluran war letzteres das potenteste in Bezug auf die Infarktlimitierung⁶³.

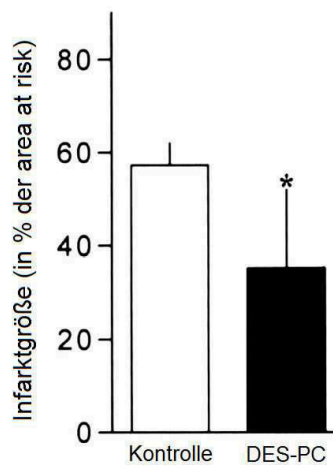


Abbildung 3: Infarktgrößen mit (DES-PC) bzw. ohne (Kontrolle) Desfluran-Präkonditionierung. Toma *et al.* konnten eine signifikante Infarktminderung nach der Desfluran-Behandlung nachweisen (Abbildung modifiziert nach Toma *et al.*⁶²).

Wartier *et al.* und Meissner *et al.* konnten zeigen, dass Desfluran außerdem das so genannte ‘myokardiale Stunning’ vermindert^{57,64}.

Welcher Signalweg der Kardioprotektion durch Desfluran zu Grunde liegt konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Zwar wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen einzelne Proteine auf ihre Beteiligung an der Desfluran-Präkonditionierung getestet (s. Tabelle 1) aber ein Gesamtüberblick fehlt noch. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere, bisher in der Präkonditionierung unbekannte Proteine eine Rolle spielen.

Tabelle 1: Aufgeführt sind verschiedene, bereits untersuchte Aspekte der Desfluran-Präkonditionierung

Desfluran-Präkonditionierung	Referenz
Aktivierung mitochondrialer K ⁺ -ATP-Kanäle, Adenosin-A1-Rezeptoren, sowie α - und β -Rezeptoren	Hanouz <i>et al.</i> , 2000 ⁶⁵
Verringerung der Calcium-induzierten Auslösung der MPT	Pirou <i>et al.</i> , 2004 ⁶⁶
Aktivierung der PKC- ϵ und ERK1&2	Toma <i>et al.</i> , 2004 ⁶²
Beteiligung von NO in der Signalvermittlung	Tsai <i>et al.</i> , 2004 ⁶⁷
Inhibierung der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin	Biao <i>et al.</i> , 2005 ⁶⁸

Beteiligung des β 1- und β 2-adrenergen Signalweges in der Signalvermittlung	Lange <i>et al.</i> , 2006/2009 ^{69,70}
Beteiligung ROS-basierter Mechanismen in der Signalvermittlung beim Menschen	Hanouz <i>et al.</i> , 2007 ⁷¹
Aktivierung mitochondrialer 'large-conductance K(Ca)-channels' via Proteinkinase A	Redel <i>et al.</i> , 2008 ⁷²
Signalvermittlung u.a. durch Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II	Lange <i>et al.</i> , 2008 ⁷³
Aktivierung des peroxisome-proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in der Signalvermittlung	Lotz <i>et al.</i> , 2011 ⁷⁴
Regulation der Aromatase-Expression und –Aktivität	Jazbutyte <i>et al.</i> , 2012 ⁷⁵
endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) vermittelt die frühe Phase der Desfluran-Präkonditionierung	Redel <i>et al.</i> , ⁷⁶
Aktivierung von NF- κ B in der Signalvermittlung	Yi <i>et al.</i> , ⁷⁷

1.3.4 Klinische Anwendung pharmakologischer Präkonditionierung

Die Umsetzung der experimentell gewonnen Daten auf die Klinik gestaltete sich lange Zeit schwierig. Die im Tierversuch klar kardioprotektiven Wirkungen der Präkonditionierung zeigten im klinischen Setting eine große Divergenz bezüglich des Outcomes. Erklärungsansätze für die schwierige Übertragbarkeit der Ergebnisse vom experimentellen in den klinischen Sektor gibt es einige. Einer der Hauptaspekte ist die Verwendung verschiedener Präkonditionierungs- bzw. Anästhesieprotokolle vor und während Operationen. Die Arbeitsgruppe um Bolli *et al.* diskutiert speziell diese Problematik der Übertragung in einem eigenen Artikel⁷⁸.

Schließlich gelang es de Hert *et al.* 2002 in einer Studie an zwanzig Patienten zu zeigen, dass mit Sevofluran anästhesierte Patienten bessere Outcome-Variablen, bezogen auf die Herzleistung, zeigten also solche, die mit dem intravenös zu verabreichenden Propofol behandelt wurden⁷⁹. Eine Vielzahl weiterer Studien, darunter große randomisierte Multicenter-Studien, konnten die protektive Wirkung der volatilen Anästhetika bestätigen⁸⁰⁻⁸⁴. In weitergehenden Studien wurde anschließend nachgewiesen, dass mit den besseren Herzleistungen auch eine Verbesserung klinischer Parameter, wie zum Beispiel die Verweildauer des Patienten auf der Intensivstation oder der Verbrauch inotropiesteigernder Medikamente, einhergeht⁸⁵⁻⁸⁷.

In einer Metaanalyse, die sich mit dem Vergleich von Sevofluran und Desfluran zu intravenösen Anästhetika beschäftigt, konnten die oben aufgeführten herzprotektiven Eigenschaften der volatilen Anästhetika ein weiteres Mal bestätigt werden ⁸⁸.

Der Nachweis der Beeinflussung weiterer klinischer Parameter, wie beispielsweise der Gesamtmortalität oder der Inzidenz des Myokardinfarkts, ist bisher nicht gelungen. Aufgrund dessen hat sich gerade in den letzten Jahren eine intensive, kontrovers geführte Debatte über die Sinnhaftigkeit des klinischen Einsatzes der pharmakologischen Präkonditionierung entwickelt ⁸⁹⁻⁹¹. Einig sind sich die Autoren darüber, dass groß angelegte, prospektive Multicenterstudien nötig sind, um klare wissenschaftliche Evidenz zu schaffen.

In den aktuellen Richtlinien der *American Heart Association* und dem *American College of Cardiology* („ACC/AHA 2007 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Care for Noncardiac Surgery“) wird die Verwendung volatiler Anästhetika für kardiale Risikopatienten ausdrücklich empfohlen ⁹².

1.4 Fragestellungen dieser Dissertation

Da es noch viele offene Fragen bezogen auf den Signalweg der Desfluran-Präkonditionierung gibt, waren die Ziele meiner vorliegenden Arbeit:

1. Bisherige Studien zur Aufklärung des Signaltransduktionswegs der Desfluran-induzierten Präkonditionierung untersuchten jeweils gezielt einzelne Proteine bzw. Proteingruppen auf deren Beteiligung. Die untersuchten Proteine waren häufig bereits im Vorfeld als Mediatoren bzw. Effektoren anderer pharmakologisch oder ischämisch induzierten Präkonditionierungs-Vorgänge bekannt. Daraus abgeleitet ergab sich die Frage der vorliegenden Arbeit: Welche weiteren, möglicherweise bisher nicht mit der Präkonditionierung in Verbindung gebrachten Proteine, sind in den Signaltransduktionsweg der Desfluran-induzierten Präkonditionierung involviert?

Diese Fragestellung sollte mit Hilfe eines offenen, explorativen in-vivo Versuchsansatzes beantwortet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine der zytosolischen Fraktion mit einem isoelektrischen Punkt im pH-Bereich 4-7 analysiert.

2. Aus den Studiendesigns vorangegangener Studien lässt sich die Hypothese ableiten, dass es sowohl zeit- als auch dosisabhängige Effekte im Rahmen der pharmakologischen Präkonditionierung gibt. Bisher wurde dies nicht explizit untersucht. Es ist zum Beispiel nicht klar, wie viele Zyklen der Desfluran-Administration zu einer optimalen Präkonditionierung führen. Es ist nicht klar, ob sich direkt mit Anfluten des Anästhetikums Effekte auf Proteinebene zeigen, oder ob diese erst nach dem Auswaschen des Pharmakons entstehen. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Studiendesign und dem Vergleich der verschiedenen Behandlungszeitpunkte sollte die Frage beantwortet werden: Gibt es zeit- und/oder dosisabhängige Effekte der Desfluran-induzierten Präkonditionierung auf Ebene des Proteoms?
3. Bei der für diesen Versuchsansatz derzeit einzig verfügbaren Methode, der 2D-PAGE, zeigen sich methodologische Probleme, vor allem bezüglich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden: Inwieweit lassen sich, durch Individualisierung und Anpassung der Prozessschritte auf die zu untersuchende Proteinfraction, diese methodologischen Schwierigkeiten minimieren?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Präkonditionierung

Die in Kapitel 2.1 und 2.2 beschriebenen Tierversuche, sowie die Probengewinnung wurden von Toma *et al.* durchgeführt. Weitere Details dazu können im Paper von Toma *et al.*⁶² nachgelesen werden.

Die Tierversuche, durchgeführt nach dem deutschen Tierschutzgesetz, wurden durch die Bezirksregierung Düsseldorf, unter der Projektnummer G18/04 und dem Aktenzeichen 50.05-230-18/04, genehmigt.

Es wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 300 g verwendet. Sie wurden zunächst durch intraperitoneal verabreichtes S(+)-Ketamin (150 mg/kg) anästhesiert und für 30 Minuten nicht weiter behandelt, ehe das Präkonditionierungsprotokoll gestartet wurde. Während der Präkonditionierung wurde die Anästhesie durch α -Chloralose-Infusion aufrechterhalten.

Die Präkonditionierung wurde durch Gabe von 2 x 5 Minuten Desfluran der Firma Baxter Deutschland GmbH (Unterschleissheim, Deutschland), mit einer Konzentration von 1 MAC (= minimale alveoläre Konzentration) durchgeführt (s. Abbildung 4). Die Präkonditionierungs-Phasen wurden von jeweils einer zehnminütigen Auswaschphase unterbrochen. Am Ende der jeweiligen Phasen wurden, zu den Zeitpunkten Des 1, Des 2 sowie Wasch 1 und Wasch 2, die Herzen entnommen. Die beiden Kontrollgruppen (Kontrolle 0 und Kontrolle 40) wurden anästhesiert, erhielten aber keine Desfluran-Behandlung.

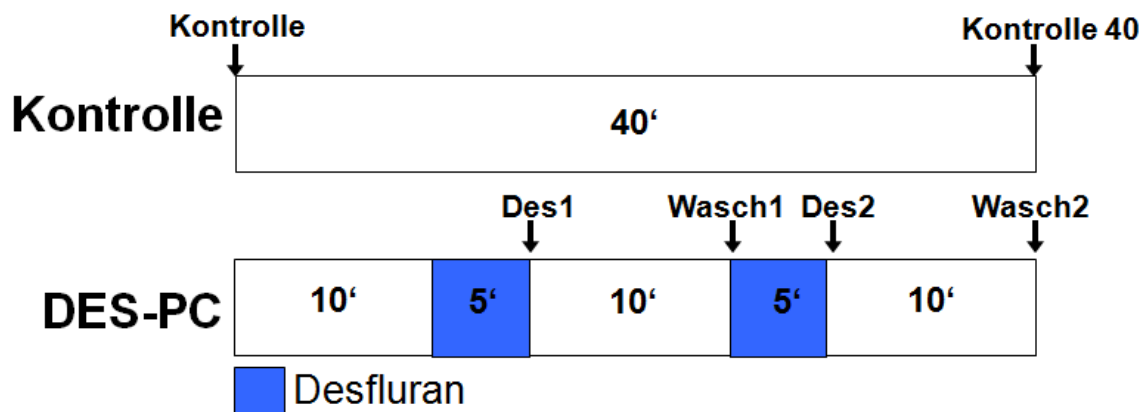


Abbildung 4: Desfluran-Präkonditionierungsprotokoll. Mit Pfeilen markiert sind die Zeitpunkte der Herzentnahmen. Präkonditioniert wurde durch eine zweimalige, jeweils fünfminütige Desflurangabe, unterbrochen von einer jeweils zehnminütigen Auswaschphase.

Die verwendeten Ratten wurden randomisiert in insgesamt sechs Gruppen zu je drei (Gruppen Kontrolle 40 und Wasch 2) bzw. vier (Gruppen Kontrolle, Des 1, Des 2 und Wasch 1) Versuchstieren eingeteilt.

2.2 Vorbereitung der Proben

2.2.1 Proteinfractionierung

Zur Homogenisierung des Gewebes wurden die tiefgefrorenen Herzen in einem Stickstoff-gekühlten Metall-Potter mit einem Hammer pulverisiert. Die Proben wurden in eiskaltem Lysepuffer (Rezept s. Tabelle 2) aufgenommen und auf Eis zweimal für jeweils zehn Sekunden homogenisiert. Danach wurde die Probe bei 4°C und 1.000 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um für 15 Minuten bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert zu werden. Der so gewonnene Überstand stellte die zytosolische Fraktion dar.

Das aus dem ersten Zentrifugationsschritt gewonnene Pellet wurde mit 500 µl Tritonpuffer (Triton-X-100 gemischt mit Lysepuffer im Verhältnis 1:99) vermischt und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (4°C, 16.000 g, 15 Minuten), der entstandene Überstand stellte die detergentlösliche Fraktion dar.

Das restliche Proteinpellet enthielt die unlösliche Kernfraktion. Alle Proben wurden bei -80°C gelagert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Lysepuffers

Reagenz	Menge
Tris Base (Sigma 7-9)	5 mM
Natriumfluorid	50 mM
Na ₃ VO ₄	2 mM
Ethylendiamintetraessigsäure	2 mM
Aprotinin	2 µg/ml
Leupeptin	2 µg/ml
Pepstatin	2 µg/ml
DTT	0,77 mg/ml
Okadainsäure	10 mM

2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit der Methode nach Lowry⁹³ ermittelt. Dies erfolgt über drei nacheinander folgende chemische Reaktionen:

1. Anlagerung von Cu^{2+} -Ionen an Peptidbindungen in alkalischem Milieu
2. Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^{1+}
3. Reduktion des zugegebenen Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdänblau (durch die Cu^{1+} -Ionen), welches photometrisch bei 750, 650 oder 540 nm zu messen ist.

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden zunächst 1:100 verdünnt. 500 µl der verdünnten Probe wurden 500 µl Lowry-Reagenz (s. Tabelle 3) zugegeben, dieser Ansatz anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das, 1:1 mit Aqua dest. verdünnte, Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz zugegeben und erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe photometrisch bei 740 nm gemessen und mit einem BSA-Standard verglichen. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen.

Tabelle 3: Rezepte zur Herstellung des Lowry-Reagenz

Reagenz A		Reagenz B		Reagenz C	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
Na_2CO_3	10 g	KNa-Tartat	2 g	CuSO_4	1 g
0,1 M NaOH	500 ml	Aqua dest.	ad 100 ml	Aqua dest.	ad 100 ml

Lowry-Reagenz	
Reagenz	Menge
Reagenz A	20 ml
Reagenz B	200 µl
Reagenz C	200 µl

2.2.3 Proteinfällung

Ziel der Präzipitation war es, die Proteine, frei von störenden Substanzen wie Lipiden oder Salzen, aus den lysierten Proben zu gewinnen. Die fraktionierten Proteine wurden dabei in Pellets zu je 500 µg gefällt. Abhängig von der Proteinkonzentration im Lysat musste eine entsprechende Menge genommen und mit Lysepuffer (s. Tabelle 2) auf 200 µl aufgefüllt werden. Anschließend wurden 1,6 ml eiskaltes Aceton (80%) und 200 µl TCA zugegeben und dieser Ansatz über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz bei 16.000g und 4°C für 45 Minuten zentrifugiert, der Überstand

abgenommen, das resultierende Pellet mit 2 ml Aceton gewaschen und für 45 Minuten bei -20°C inkubiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Zum Schluss wurde das Pellet für 20 Minuten an der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet und gegebenenfalls bei -80°C gelagert.

2.3 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine hochauflösende Trenntechnik zur Analyse von Proteinen. Dies geschieht nach zwei Kriterien: In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt, in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (M_w).

2.3.1 Die erste Dimension: isoelektrische Fokussierung

2.3.1.1 Theoretische Grundlagen der isoelektrischen Fokussierung

Jedes Protein besitzt einen spezifischen pI. Stimmt dieser mit dem pH des Mediums überein in welchem sich das Protein befindet, so besitzt das Protein keine Nettoladung und ist nach außen hin neutral. Andernfalls hat das Protein eine nach außen positive oder negative Ladung, je nachdem ob der pH ins Anionische oder Kationische vom pI abweicht. Diese Tatsache wird bei der isoelektrischen Fokussierung ausgenutzt.

Zunächst werden die Proteine in eine Gelmatrix aufgenommen, die einen immobilisierten pH-Gradienten aufweist. An die Gelmatrix wird dann eine Spannung angelegt, die auf die geladenen Proteine als elektromotorische Kraft wirkt. Die Proteine wandern nun, entsprechend ihrer aktuellen Ladung, so lange Richtung Anode bzw. Kathode, bis sie an dem Punkt angelangen, an dem der pH ihrem pI gleicht. Dort verweilen sie, weil ohne Nettoladung keine elektromotorische Kraft mehr auf sie einwirkt.

Einen weitergehenden Überblick über die Technik der isoelektrischen Fokussierung geben Görg *et al.* in ihrem Review-Artikel ⁹⁴.

2.3.1.2 Probenvorbereitung für die isoelektrische Fokussierung

Die tiefgefrorenen Protein-Pellets zu je 500 µg wurden auf Eis aufgetaut und in 250 µl Rehydratationspuffer aufgenommen. Um die Ergebnisse zu optimieren wurden verschiedene Rehydratationspuffer ausgetestet (s. Tabelle 4). Diesem Ansatz wurde 2% v/v IPG-Puffer der Firma GE Healthcare für den pH-Bereich 4-7 hinzugefügt. Es folgte eine 45 minütige Inkubationsphase auf dem Schüttler. Anschließend wurden die

Proben in zwei Ansätze à 125 µl aufgeteilt, d.h. jeder Ansatz enthielt 250 µg Protein. Über Nacht wurde dann auf diese Probenlösung die Gelmatrix des IPG-Strips (s.u.) gebettet, damit die Proteine osmotisch in die Gelmatrix aufgenommen wurden (in-Gel-Rehydratation; verwendet wurde das Immobiline TrayStrip Reswelling Tray von GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden). Zur Vermeidung einer Austrocknung wurde der Ansatz mit 2,5 ml Mineralöl gegenüber der Umgebung abgedichtet.

Tabelle 4: Zusammensetzungen der verschiedenen Puffervarianten. Angaben zu den Inhalten der hier erwähnten Stocklösungen finden sich in Tabelle 5

Variante	Pufferzusammensetzung
1	TU-ASB-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT
2	TU-ASB-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
3	TU-ASB-Stocklsg. + 1,5% w/v HED
4	TU-ASB-Stocklsg. + 1,5% w/v HED + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
5	TU-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT
6	TU-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
7	TU-Stocklsg. + 1,5% w/v HED
8	TU-Stocklsg. + 1,5% w/v HED + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
9	U-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT
10	U-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
11	U-Stocklsg. + 1,5% w/v HED
12	U-Stocklsg. + 1,5% w/v HED + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol

Tabelle 5: Zusammensetzungen der verwendeten wässrigen Stocklösungen

	TU-ASB-Stocklösung	TU-Stocklösung	U-Stocklösung
Urea	7 M	7 M	8 M
Thiourea	2 M	2 M	---
CHAPS	2% w/v	4% w/v	2% w/v
ASB-14	2% w/v	---	---
Bromphenolblau	1 Spatelspitze	1 Spatelspitze	1 Spatelspitze

2.3.1.3 Isoelektrische Fokussierung der Präkonditionierungsproben

In dieser Arbeit wurden 7 cm bzw. 13 cm lange Immobiline DryStrips der Firma GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Schweden) mit einem pH-Bereich von 4-7, sowie 7 cm lange ReadyStrip IPG Strips der Firma Biorad mit einem pH von 4,7-5,9 bzw. pH 5,5-6,7 verwendet. Um die Spannung (Protokoll s. Tabelle 6) an die Gelmatrix

anzulegen wurde eine Ettan IPGphor 3 der Firma GE Healthcare benutzt. Im Idealfall wurde eine Gesamt-Voltstundenanzahl von 6800 Vh erreicht. Da die IPGphor aber, um die Proben vor Überhitzung zu schützen, keine Stromstärke von über 50 mA / Strip zulässt, kann die reell erreichte Voltstundenzahl geringgradig von diesem Wert abweichen, ohne dass dies Auswirkungen auf die Qualität der Fokussierung hat.

Tabelle 6: Verwendete Protokolle zur isoelektrischen Fokussierung (in Anlehnung an das User manual). Die vierte Spalte gibt an, wie die Spannung von einem zum nächsten Fokussierungsschritt gesteigert wurde. Step = direkt auf die angegebene Spannung ; Grad = Steigerung der Spannung gleichmäßig über die Dauer des jeweiligen Schritts

Protokoll für pH 4-7				Protokoll für pH 4,7-5,9			
Schritt	angelegte Spannung in Volt	Dauer in min		Schritt	angelegte Spannung in Volt	Dauer in min	
1.	300	60	Step	1.	300	75	Step
2.	300-1000	30	Grad	2.	300-4000	60	Grad
3.	1000-2400	90	Grad	3.	4000	180	Step
4.	2400	60	Step				
Protokoll für pH 5,5-6,7							
1.	250	60	Step				
2.	250-4000	60	Grad				
3.	4000	450	Step				

2.3.2 Die zweite Dimension: SDS-PAGE

2.3.2.1 Theoretische Grundlagen der SDS-PAGE

SDS-PAGE steht für sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis und dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Dabei dient das Sodium Dodecylsulfat dazu, die Proteine zu denaturieren, indem es nicht-kovalente Bindungen auflöst. Außerdem bindet es sich an die Proteine und überlagert dadurch deren Eigenladung, d.h. alle Proteine haben eine nach außen gleiche Ladung. Die Proteine werden auf ein SDS-Gel aufgetragen, das man sich wie ein dreidimensionales Maschennetzwerk vorstellen kann. Die Proteine werden dann, mit Hilfe einer angelegten Spannung die als elektromotorische Kraft wirkt, gezwungen, sich durch dieses Maschennetzwerk hindurch zu bewegen. Dies können die Proteine umso schlechter, und damit langsamer, je größer sie sind. Wenn die SDS-PAGE nach einer entsprechenden Zeit gestoppt wird, haben kleinere Proteine eine weitere Strecke

zurückgelegt als größere. Somit hat man eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht geschaffen.

2.3.2.2 *Probenvorbereitung für die SDS-PAGE*

Vor dem Lauf in der zweiten Dimension der 2D-Gelelektrophorese mussten die Proben zunächst mit SDS equilibriert werden. Dabei wurden sie zusätzlich mit DTT und Iodacetamid (IAA) behandelt. DTT dient dazu, Disulfidbrücken zu reduzieren und somit die Tertiärstruktur der Proteine zu destabilisieren. IAA wird zur Alkylierung der freien SH-Gruppen verwendet und verhindert so die erneute Disulfidbrückenbildung.

Die IPG-Strips wurden zunächst für 15 Minuten mit Equilibrierungspuffer (s. Tabelle 7) + 1% w/v DTT und anschließend für ebenfalls 15 Minuten mit Equilibrierungspuffer + 2,5% w/v IAA auf einer Schüttelplatte inkubiert. Unmittelbar vor der SDS-PAGE wurden die Strips in SDS-Laufpuffer (s. Tabelle 10) getaucht.

Tabelle 7: Rezept für den verwendeten Equilibrierungspuffer

Reagenz	Menge
Tris/HCl Puffer 8,8 (s. Tabelle 8)	75 mM
SDS	2% w/v
Harnstoff	6 M
Glycerol	30% v/v
Bromphenolblau	Eine Spatelspitze
Milli Q Wasser	Ad 200 ml

Tabelle 8: Rezept für den verwendeten Tris/HCl Puffer mit pH 8,8

Reagenz	Menge
1,5 M Tris 7-9	181,5 g
HCl	bis pH auf 8,8 eingestellt
Milli Q Wasser	ad 1000 ml

2.3.2.3 *SDS-PAGE der Präkonditionierungsproben*

In dieser Arbeit wurden 11%ige SDS-Gele (Angaben zur Herstellung s. Tabelle 9), eine Gelapparatur der Firma peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), 10x10 cm große Glasplatten und 0,8 mm dicke Spacer verwendet. Die angelegte Spannung betrug für die ersten 10 Minuten 100 Volt, gefolgt von 120 Volt bis zur Beendigung der SDS-PAGE. Die Spannung wurde mit einem Electrophoresis Power Supply EPS 301 der Firma Amersham Pharmacia Biotech erzeugt. Der mitlaufende Molekulargewichts-Standard

war der Dual Color Precision Plus Protein Standards der Firma Biorad. Die gesamte SDS-PAGE fand in SDS-Laufpuffer statt, Rezept s. Tabelle 10.

Tabelle 9: Angaben zur Herstellung eines 11%igen SDS-Gels

Lösungen	Volumen in µl
Polyacrylamid (30%)	2700
MilliQ-Wasser	2830
Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8)	1875
SDS (10%)	75
Temed	7,5
APS (10%)	37,5

Tabelle 10: Rezept für den SDS-Laufpuffer

Reagenz	Menge
1,5 M Tris Base (Sigma 7-9)	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
MilliQ-Wasser	Ad 1000 ml

2.4 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der Proteine in den SDS-Gelen, die das Weiterverarbeiten und Analysieren der Proben erlaubt, wurde eine, nach Kang *et al.*⁹⁵ modifizierte, kolloidale Coomassie-Färbung verwendet. Durch die Modifikation wird etwa die Sensitivität einer Silber-Färbung, mit einer Nachweisgrenze von ca. 10 ng Protein, erreicht.

Vor der Färbung wurden die SDS-Gele zunächst dreimal 5 Minuten mit MilliQ-Wasser gewaschen, ehe sie über Nacht in der Coomassie-Färbelösung (s. Tabelle 11) inkubiert wurden. Dann wurden sie erneut mit MilliQ-Wasser gewaschen und für 4 Stunden in Coomassie-Entfärbelösung (s. Tabelle 11) geschüttelt, um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Anschließend folgte über Nacht ein weiterer Waschschrift in MilliQ-Wasser.

Tabelle 11: Reagenzien für die Coomassie-Lösungen

	Färbelösung	Entfärbelösung
Reagenz		
Coomassie-Brilliant-Blau-G250	0,02% w/v	---
Aluminiumsulfat-18-Hydrat	5% w/v	---
Ethanol (96%)	10% v/v	10% v/v
Ortho-Phosphorsäure (85%)	2% v/v	2% v/v
MilliQ-Wasser	ad 2000 ml	ad 2000 ml

2.5 Auswertung der 2D-Gele

Die Gele wurden mit einem Umax Powerlook III Scanner der Firma GE Healthcare digitalisiert und mit Hilfe einer speziellen Software als Graustufen-Bild abgespeichert. Die Auswertung der Proteinspots erfolgte mit der ImageMaster Software Melanie 6.0 der Firma GE Healthcare.

Zur Erkennung und Abgrenzung der einzelnen Spots wurde zunächst der Spotdetektions-Algorithmus der Auswertesoftware verwendet. Dieser Algorithmus identifiziert die einzelnen Spots und verknüpft die jeweils gleichen Spots in den unterschiedlichen Gelen (Matching). Das Ergebnis wurde dann von Hand kontrolliert und ggf. korrigiert, da, vor allem bei sich überlagernden Spots, Fehler auftreten konnten.

Das nächste Ziel war nun, die einzelnen Behandlungszeitpunkte auf Unterschiede in ihrem Spotmuster zu untersuchen. Da es dazu keine festgelegten Regeln gibt, ab wann ein Protein als differentiell exprimiert gilt, mussten in dieser Arbeit entsprechende Kriterien entwickelt werden. Die entsprechenden Resultate sind im Ergebnis-Teil, Kapitel 3.2.6 zu finden.

2.6 Tryptischer Verdau

Für die Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie mussten die Proteine zuvor enzymatisch verdaut werden. In dieser Arbeit wurde der tryptische Verdau gewählt, da er eine Reihe von Vorteilen bietet:

- Trypsin schneidet C-terminal hinter Arginin oder Lysin (es sei denn es folgt ein Prolin). Arginin und Lysin sind häufig vorkommende (durchschnittlich elf Schnittstellen / 100 Aminosäuren) und gleichmäßig über das Protein verteilte Aminosäuren. Das heißt es entstehen ausreichend viele, aber nicht zu kleine

Peptidbruchstücke aus einem Protein, die sich gut mit Hilfe der Massenspektrometrie identifizieren lassen.

- Das Schneiden hinter den basischen Aminosäuren bedingt, dass jedes der entstehenden Peptide eine Nettoladung aufweist, was eine wichtige Voraussetzung für die Massenspektrometrie ist (vgl. Kapitel 2.8)
- Trypsin ist ein Enzym, welches über einen weiten pH-Bereich arbeitet.

Es wurde das modifizierte Proteomics Grade Trypsin der Firma Sigma verwendet, welches einen verminderten Eigenverdau aufweist.

Zunächst wurden die Gelspots aus dem Gel ausgestanzt und in ein Eppendorf-Gefäß ("Lobind") überführt. Zur Entfärbung wurde das Gelstück einmal 10 Minuten und dreimal 30 Minuten unter Zusatz von 100 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer / 50% Acetonitril geschüttelt. Der Puffer wurde vorsichtig abpipettiert und die Gelstücke ein weiteres Mal für 30 Minuten in 100% Acetonitril geschüttelt und an einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Durch das Acetonitril wurde die Probe vollständig dehydriert und geschrumpft. Das im Anschluss bei 4°C zugefügte Trypsin (0,1 µg / µl 25 mM NH₄HCO₃ (Puffer)) konnte deshalb von dem Gelstück aufgesaugt werden. Nach 30 Minuten wurde das überschüssige Trypsin entfernt und die Probe mit 25 mM NH₄HCO₃-Puffer überschichtet. Die Probe wurde dann bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Peptide über mehrere Waschschriffe aus dem Gel eluiert:

- Als erstes wurde die Probe mit Wasser bedeckt, 5 Minuten geschüttelt, 5 Minuten im Ultraschallbad inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem silikonisierten Eppendorfgefäß gesammelt.
- Anschließend wurde die Elutionslösung, (50% Acetonitril, 5% Ameisensäure und 45% Wasser) hinzugegeben und die Probe 30 Minuten geschüttelt. Der Überstand wurde gesammelt und der gesamte Vorgang zweimal wiederholt.
- Abschließend wurde 100% Acetonitril zugegeben, 30 Minuten geschüttelt, abzentrifugiert und der Überstand mit dem restlichen Eluat vereint.
- Zur Lagerung wurde die Probe an der Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20°C eingefroren.

Das beispielhafte Übersichtsspektrum des Proteins des Spots 319 in Abbildung 6 (Seite 29) zeigt, dass der Verdau gut funktioniert hat. Man sieht auf der einen Seite typische, durch tryptischen Eigenverdau verursachte Peaks (z.B. bei 523,28 m/z), auf

der anderen Seite deutliche Peaks vom verdauten Probenprotein (z.B. 771,35 m/z und 954,80 m/z).

Bei Spots mit einer geringeren Proteinmenge war weniger Trypsin für den gesamten Verdau notwendig. Da bei überschüssigem Trypsin der Eigenverdau zunimmt und die großen Trypsin-Signale während der Massenspektrometrie die Detektion der Peptid-Signale erschweren, wurde die Trypsinkonzentration bei solchen Proben noch einmal 1:10 mit 25mM NH_4HCO_3 -Puffer auf $0,01\mu\text{g} / \mu\text{l}$ verdünnt.

2.7 Entsalzung der Proben

Bevor die Peptide massenspektrometrisch untersucht werden konnten, mussten sie zunächst entsalzt werden, da Salze die Analyse stören würden.

Die dazu verwendete Technik gleicht einer Reversed-Phase-Chromatographie im Miniaturmaßstab und wurde in einer Pipettenspitze, gefüllt mit C_{18} -Material („Ziptip“, Fa. Millipore Cooperation, Bedford, USA), durchgeführt. Die Peptide wurden in einer 4% Methanollösung (MeOH) gelöst, der 1% Ameisensäure (HCOOH) zugesetzt wurde. Im nächsten Schritt musste die C_{18} -Säule aktiviert werden. Dazu erfolgte ein Waschschriff mit einer 100%igen MeOH-Lösung, gefolgt von einem Waschschriff mit einer 60%igen MeOH + 1% HCOOH -Lösung. Zur Equilibrierung wurde mit einer 4%igen MeOH + 1% HCOOH -Lösung gewaschen.

Nachfolgend wurden die Peptide durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren an die Säule gebunden. Die Säule wurde dann mehrfach mit der 4%igen MeOH-Lösung + 1% HCOOH -Lösung gewaschen, ehe die Peptide mit der 60%igen MeOH-Lösung + 1% HCOOH -Lösung eluiert wurden.

2.8 Protein-Identifikation

Das Massenspektrometer (MS) dient der Auftrennung von Ionen nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z). Bei bekannter Ladung kann man so die Masse der Ionen bestimmen.

Grundsätzlich besteht ein MS aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Aus der Ionenquelle treten die ionisierten Proben aus und werden im Massenanalysator nach ihrem m/z-Verhältnis aufgetrennt. Der Detektor wandelt die ankommenden Ionen in elektronische Signale, das Massenspektrum, um.

2.8.1 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

2.8.1.1 Die Ionisationsquelle

Bei der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie wird die Probe zunächst in einem sauren oder basischen Puffer gelöst, damit die Analytmoleküle eine Ladung erhalten und somit ionisiert sind. Anschließend wird mit Hilfe eines elektrischen Feldes die Lösung, in der die Proteine vorliegen, in sehr viele kleine Tröpfchen zerstäubt. Wie diese Zerstäubung im Einzelnen geschieht ist bis heute nicht eindeutig verstanden, es gibt dazu hauptsächlich zwei Theorien (das Charge-Residue-Model von Dole und das Ion Evaporation Model von Iribarne und Thomson), von denen sich bisher keine durchsetzen konnte. Beiden Modellen gemeinsam ist aber, dass am Ende winzige Tropfen entstehen, in denen jeweils nur ein geladener Einzelbestandteil (in dieser Arbeit ein Peptid-Ion) vorliegt.

Die Ionisation findet unter Atmosphärendruck statt, der nächste Schritt, die Massenanalyse, im Hochvakuum (10^{-7} mbar). In dieses Hochvakuum gelangt der Analyt über eine Interface-Platte. Eine stark vereinfachte Schemazeichnung über die Vorgänge der Elektrospray Ionisation zeigt Abbildung 5.

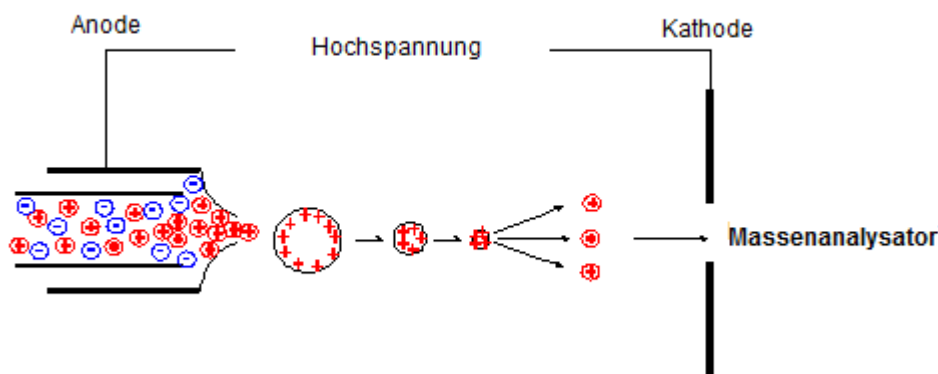


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation. Im Bereich der Anode wird die Probe appliziert. Im Bereich des Hochspannungsfeldes findet die Ionisation des Analyten statt, ehe er über die Interface-Platte in den Massenanalysator geleitet wird.

2.8.1.2 Massenanalysatoren

Es gibt viele verschiedene Arten von Massenanalysatoren, darunter den Quadrupol und den Time-of-flight (TOF)-Analysator.

Ein Quadrupol besteht aus vier parallel angeordneten Metallelektroden, wobei die jeweils diagonal gegenüberliegenden die gleiche Polung haben. Zwischen diesen Metallelektroden wird ein kombiniertes Gleich- und Wechselfeld induziert, was dazu führt, dass Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis auf einer spiralförmigen Flugbahn stabilisiert werden. Alle anderen kollidieren mit einer der Metallelektroden. Somit kann man Ionen mit einem ganz speziellen m/z -Verhältnis, bzw. eine Reihe von Ionen innerhalb eines bestimmten m/z -Intervalls auswählen.

Der TOF-Analysator ist ein circa ein Meter langes Flugrohr, an dessen Anfang die Ionen durch ein elektrisches Feld beschleunigt werden. Danach folgt eine beschleunigungsfreie Flugstrecke. Da alle Ionen idealerweise die gleiche kinetische Energie erhalten, hängt die Geschwindigkeit mit der sie das Flugrohr durchqueren allein von ihrem m/z -Verhältnis ab.

Das m/z -Verhältnis hängt mit der Flugzeit nach folgender Formel zusammen:

$$m/z = (2 * e * U / l^2) * t^2$$

e = Elementarladung, l = Länge des Flugrohres, t = Flugzeit,
 U = angelegte Spannung

2.8.2 Tandem-Hybrid-Massenspektrometer

Das in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer ist ein QStarXL Elektrospray-Quadrupol-Time-of-flight-Gerät (ESI-Qq-TOF) der Firma Applied Biosystems, welches als Massenanalyseur drei nacheinander geschaltete Quadrupole (Q0, Q1, Q2), gefolgt von einem TOF-Analysator besitzt.

Die einzelnen Quadrupole haben dabei folgende Aufgabe:

Q0: dient als Hilfsquadrupol, der den Ionenstrahl zunächst bündelt

Q1: selektiert die einzelnen Peptid-Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis

Q2: dient als Kollisionszelle.

Die genauen Vorgänge, und wie diese zur Identifikation der Aminosäuresequenz führen, sind in Abschnitt 2.8.3 beschrieben.

Hinter den drei Quadrupolen wurden die Peptid-Ionen, bzw. deren Bruchstücke, in den orthogonal dazu angeordneten TOF-Analysator geleitet. Dort erfolgte eine erneute Auftrennung nach ihrem m/z -Verhältnis.

Die Bedienung des Massenspektrometers erfolgte über das Programm Analyst der Firma Applied Biosystems.

In dieser Arbeit wurde ein saurer Puffer verwendet, um die Peptide zu ionisieren. Im MS wurde somit im 'positive Mode' gemessen. Saure Puffer stellen H^+ -Ionen zur Verfügung, die sich an basische Aminosäureseitenketten (zu finden an Arginin, Lysin, Histidin, sowie N-terminal) anlagern können. Jedes durch tryptischen Verdau entstandene Peptid hat mindestens eine solche Aminosäure.

Um die Proben dem elektrischen Feld zuzuführen, welches für deren Zerstäubung nötig ist, müssen diese in eine metallbedampfte Glaskapillare aufgenommen werden, an welche eine Spannung angelegt wird. Diese Glaskapillaren wurden von der Firma Proxeon (Odense, Dänemark) bezogen.

2.8.3 Identifizierung der Proteine

Mit der so genannten MS/MS-Technik kann man zuvor unbekannte Proteine identifizieren. Der erste Schritt besteht in dem Verdau des Proteins (s. Abschnitt 2.6), da ganze Proteine zu groß sind, um sie massenspektrometrisch untersuchen zu können.

Der erste Schritt in der massenspektrometrischen Analyse besteht darin, ein Übersichtspektrum zu erstellen, welches einen Überblick über alle in der Probe vorhandenen Peptiden gibt. Dabei werden die Quadrupole Q1 und Q2 so eingestellt, dass alle Peptid-Ionen in einem Intervall von $m/z = 350-1200$ u zum Detektor gelangen.

Da bei dem Ionisationsprozess nicht beeinflusst werden kann wie viele H^+ -Ionen ein Peptid aufnimmt, entstehen Analyt-Ionen mit unterschiedlichen Ladungen. Dabei können auch Signale mit unterschiedlichen m/z -Werten von dem gleichen Ausgangspeptid entstehen. Um die jeweilige Ladung eines zu untersuchenden Ions herauszufinden, nutzt man die Kenntnisse über die natürlich vorkommenden Isotopenverteilungen von Elementen wie Kohlenstoff. Kommt z.B. in einem Peptid an einer Stelle statt des ^{12}C -Atoms das schwerere ^{13}C -Atom vor, so ist das gesamte Peptid um eine Massenzahl schwerer. Sind nun beide Peptide jeweils zweifach geladen, so resultiert ein um 0,5 units unterschiedlicher m/z -Wert. Bei dreifach geladenen Peptiden unterscheidet sich der Wert um 0,3 units usw. Mit Hilfe dieses Isotopenmusters kann

man also errechnen, welche Ladung ein bestimmtes Peptid hat, was wichtig für den späteren Identifikationsprozess ist.

So kann man im Übersichtsspektrum die Signale der einzelnen Peptid-Ionen erkennen, vgl. Abbildung 6

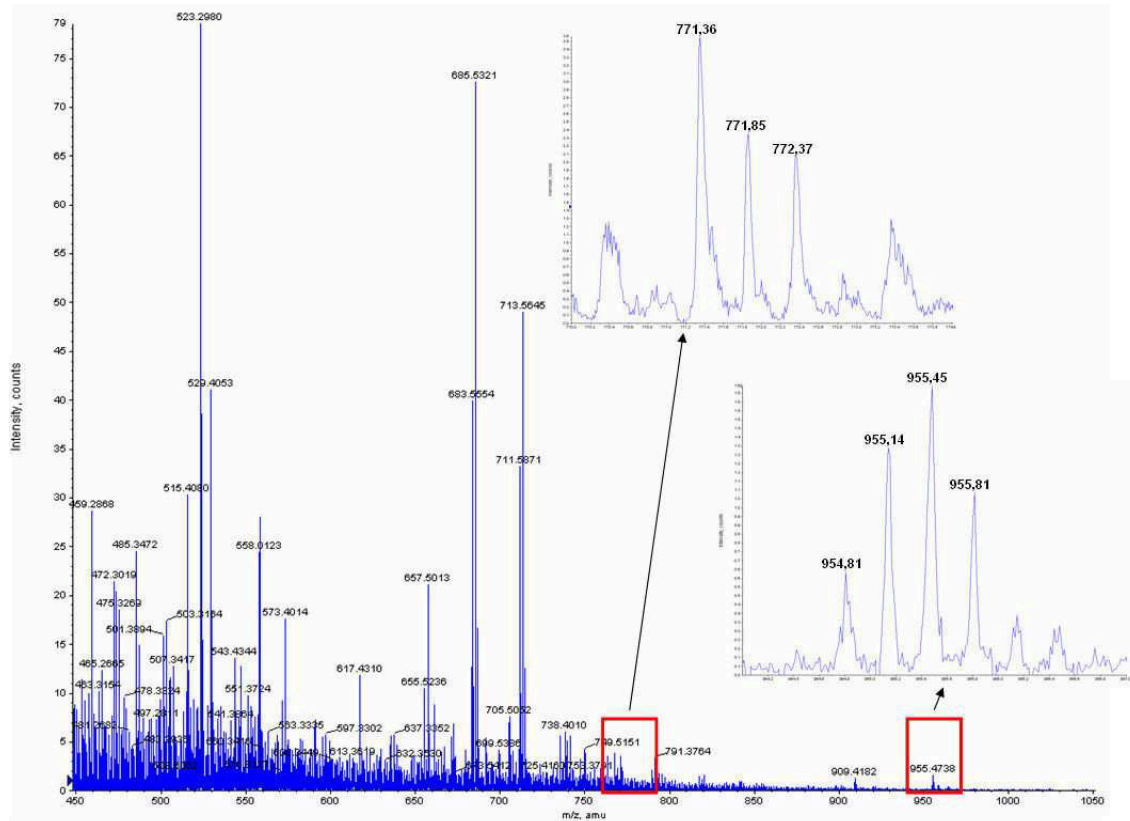


Abbildung 6: Übersichtsspektrum des Spots 319. Exemplarisch herausvergrößert sind die Peaks $[M+2H]^{2+} = 771,35$ und $[M+3H]^{3+} = 954,80$.

Zur Bestimmung der Aminosäuresequenz werden die Peptid-Ionen zunächst mit Hilfe des Quadrupols Q1 selektiert, dass nur die Peptid-Ionen mit einem ganz bestimmten m/z-Verhältnis weitergeleitet werden. Danach werden die Peptid-Ionen in der Kollisionszelle Q2 fragmentiert. In der Kollisionszelle lässt man den Analyt mit einem inerten Gas, hier Stickstoff, kollidieren, worauf die Ionen in mehrere kleinere Fragmente zerbrechen. Diese Fragmente werden dann analysiert und lassen nachträglich Rückschlüsse auf das Ursprungs-Ion (Product Ion) zu.

Bei dem Zusammenstoß mit den Stickstoffmolekülen wird Energie übertragen, die zu Brüchen in der Aminosäurekette führt. Diese Brüche finden vor allem an den Peptidbindungen statt. Verweilt nach der Spaltung des Peptids die Ladung am N-

Terminus spricht man von Ionen der a-, b- oder c-Serie. Ist die Ladung am C-terminalen Ende lokalisiert so gehören die Ionen zur x-, y- oder z-Serie (Abbildung 7).

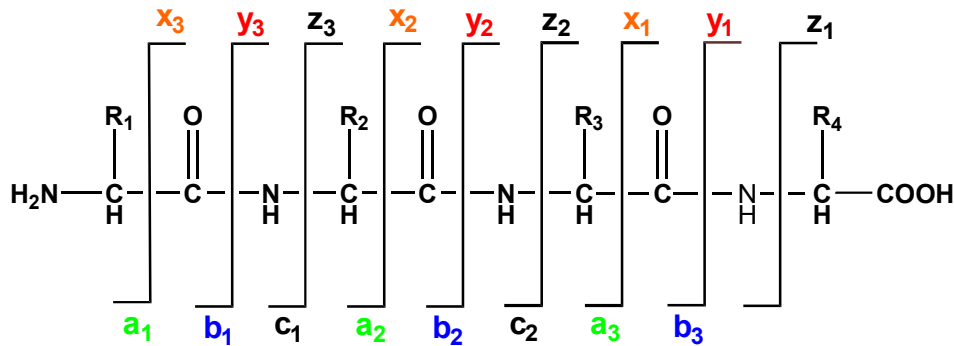


Abbildung 7: Nomenklatur der Fragmente, die durch das Zusammenstoßen mit inerten Stickstoffmolekülen aus den Aminosäureketten entstehen. Nomenklatur nach Biemann (1988) und Roepstorff (1984).

Wenn nun von dem gleichen Ausgangspeptid ein Peptid-Ion z.B. an der Stelle b₁ bricht und ein anderes an der Stelle b₂, so resultiert daraus ein Massenunterschied, und damit ein anderer m/z-Wert. Da man die Ladung der Peptid-Ionen kennt, kann man aufgrund des entstehenden Laufzeitunterschiedes die Massendifferenz der beiden Peptidbruchstücke berechnen. Dieser Massenunterschied kann nur durch die fehlende Aminosäure bedingt sein, womit man das Gewicht selbiger kennt und sie damit identifizieren kann. Ausnahmen stellen dabei die Differenzierung zwischen Leucin und Isoleucin (gleiche Masse), bzw. zwischen Glutamin und Lysin (Massenunterschied zu gering, um sie mit dem zur Verfügung stehenden Massenspektrometer auflösen zu können) dar.

Mit Hilfe des Massenunterschiedes von Peptid-Ionen der gleichen Bruchserie kann man die einzelnen Aminosäuren bestimmen und erhält so im Idealfall die gesamte Aminosäuresequenz des Peptids.

Über die Identifikation der einzelnen Peptide kann man dann das ursprüngliche Protein ermitteln. Je länger und damit spezifischer für ein bestimmtes Protein die einzelnen Peptide sind, umso weniger Peptid-Identifikationen sind nötig, um eine sichere Prognose über das Ursprungs-Protein zu stellen.

In dieser Arbeit erfolgte die Auswertung der MS/MS-Spektren mit Hilfe des Programms Mascot (Matrixscience.com) und der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

In schwierigen Fällen war es nicht möglich, die Proteine über den Mascot-Logarithmus zu bestimmen. Dann wurden die Spektren von Hand (*De Novo*-Sequenzierung) ausgewertet und die ermittelte Aminosäuresequenz wiederum gegen die NCBI-Datenbank abgeglichen.

Eine weitere Möglichkeit einen Hinweis auf das Ausgangsprotein zu erhalten ist der Peptide Mass Fingerprint (PMF). Dabei werden die Massen der Peptid-Ionen, die man im Übersichtsspektrum erhält, mit denen verglichen, die bei einem theoretischen Verdau des Proteins entstehen. Diese Methode kann aber nicht als Ersatz, sondern nur als Ergänzung zur MS/MS-Analyse gesehen werden.

3 ERGEBNISSE

Die zwei Hauptziele dieser Arbeit waren:

1. Unterschiede in den Proteinmustern zwischen den verschiedenen Behandlungszeitpunkten der Desfluran-Präkonditionierung und den Kontrollgruppen zu finden.
2. Die, den Unterschieden zu Grunde liegenden, Proteine zu identifizieren.

Bevor die eigentliche Proteinanalytik begonnen werden konnte, mussten zunächst die Versuchsbedingungen optimiert werden, um möglichst valide Ergebnisse zu erhalten.

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Technik der 2D-PAGE verwendet. Im Jahre 1975 von Klose et al. das erste Mal angewendet⁹⁶, zeigen sich seitdem Probleme im Bereich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Daher wurde in dieser Arbeit sehr darauf geachtet, ein angepasstes Studiendesign und optimierte Pufferbedingungen zu verwenden, um eben diese potentiellen Fehlerquellen zu minimieren.

Dadurch dass mit lebenden Organismen gearbeitet wurde, galt es interindividuelle Unterschiede zu beachten, d.h. Unterschiede im Proteinmuster zwischen den einzelnen Ratten, die aber nichts mit der Desfluran-Präkonditionierung zu tun hatten. Ein Beispiel wären Proteine die stressabhängig reguliert werden, wie z.B. bestimmte Hitzeschock-Proteine. Durch entsprechendes Studiendesign und angepasste Auswertungsmethoden wurde dieser Einfluss minimal gehalten (vgl. Abschnitte 3.1 und 3.2.5).

3.1 Studiendesign

Durch die Verbindung dieser Arbeit mit der Studie von Toma *et al.*⁶² (vgl. Kapitel 2.1) stand die Anzahl der Versuchstiere vor Beginn der Experimente fest. Für jeden Behandlungszeitpunkt wurden drei (Kontrolle 40, Wasch 2) bzw. vier (Kontrolle 0, Des 1, Des 2, Wasch 1) Ratten als biologische Replikate eingesetzt. Mit Hilfe der statistischen Auswertung (vgl. Kapitel 3.2.5) war es später möglich, Unterschiede im Proteinmuster, die nichts mit der Anästhetika-Behandlung zu tun hatten, herauszumitteln.

Des Weiteren wurden von jedem Rattenherz drei technische Replikate angefertigt, das heißt aus jeder Organprobe wurden drei 2D-Gele angefertigt und ausgewertet. Aus diesen technischen Replikaten wurde dann ein synthetisches, repräsentatives Gel für das

jeweilige Organ erstellt (vgl. Kapitel 3.2.5). Damit war es möglich, methodisch bedingte Ungenauigkeiten zu minimieren.

3.2 Optimierung der Konditionen für die 2D-Gelelektrophorese

3.2.1 Einfluss des Rehydratationspuffer

Die Rehydratation ist der erste Schritt der 2D-PAGE, in der die IPG-Strips durch Zugabe eines denaturierenden Puffers aufquellen. In dieser Arbeit wurden die Proben während der Rehydratation gleichzeitig auf die IPG-Strips aufgetragen, indem die TCA-präzipitierten Proteinpellets in dem Rehydratationspuffer aufgenommen wurden (in-Gel Rehydratation). Die Wahl der Pufferzusammensetzung ist ein sehr wichtiger Aspekt, da der Puffer die Solubilisierung der Proteine und somit die Qualität der Trennauflösung im SDS-Gel stark beeinflusst.

Die einzelnen Bestandteile des Rehydratationspuffers (vgl. Abschnitt 2.3.1.2) dienen der Denaturierung (Urea, Thiourea), der Reduzierung (DTT, HED), bzw. der Solubilisierung (CHAPS, ASB-14, Glycerol, Isopropanol) der Proteine. Da für jede zu untersuchende Proteinfraction andere Kombinationen am besten geeignet sind, müssen die optimalen Konditionen empirisch herausgefunden werden.

Für die Analyse zytosolischer Proteine im pH-Bereich 4-7 wurden zunächst zwölf verschiedene Puffervarianten getestet (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammensetzung der verschiedenen Puffervarianten

Variante	Pufferzusammensetzung
1	TU-ASB-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT
2	TU-ASB-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
3	TU-ASB-Stocklsg. + 1,5% w/v HED
4	TU-ASB-Stocklsg. + 1,5% w/v HED + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
5	TU-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT
6	TU-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
7	TU-Stocklsg. + 1,5% w/v HED
8	TU-Stocklsg. + 1,5% w/v HED + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
9	U-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT
10	U-Stocklsg. + 2,5% w/v DTT + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol
11	U-Stocklsg. + 1,5% w/v HED
12	U-Stocklsg. + 1,5% w/v HED + 5% v/v Glycerol + 10% v/v Isopropanol

Die verwendeten Stripes waren 13 cm lang und trennten den pI-Bereich von pH 4-7 auf. Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden diese Streifen über Nacht mit Coomassie-Färbung gefärbt (s. Abbildung 8).

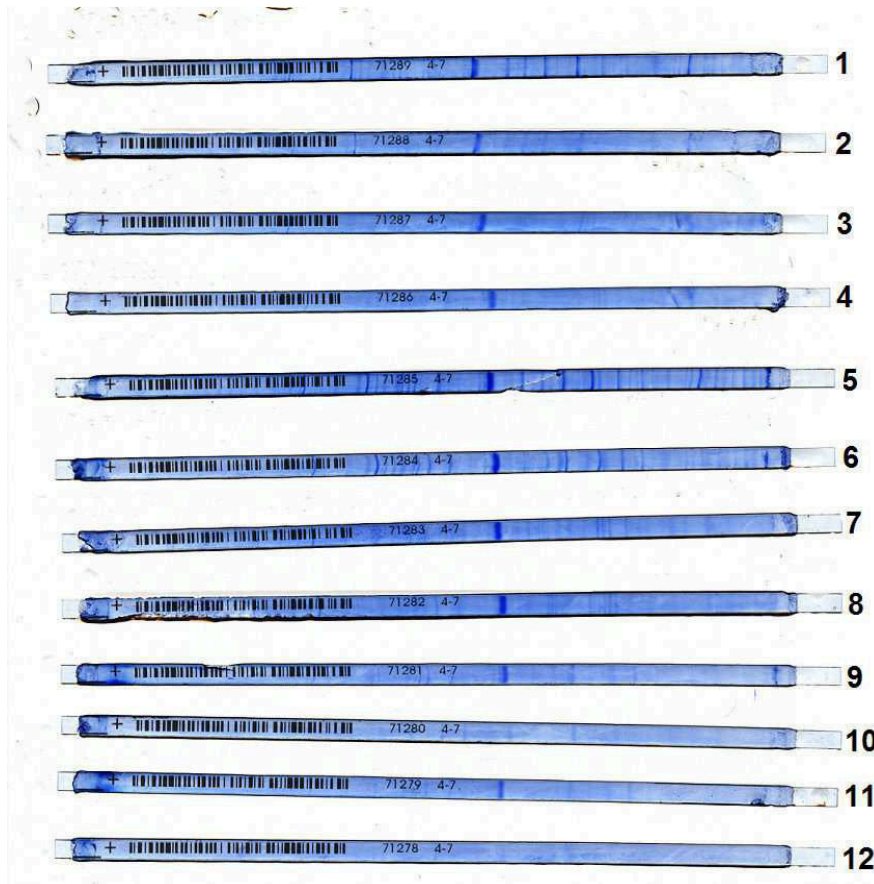


Abbildung 8:
Coomassie gefärbte
IPG-Strips mit
jeweils einer der
zwölf
Puffervarianten (von
oben nach unten
Varianten 1-12 s.
Tabelle 12). Man
erkennt deutlich die
unterschiedliche
Qualität der
Fokussierung der
einzelnen Banden
zwischen den
verschiedenen
Puffervarianten.

Anhand der in Abbildung 8 gezeigten IPG-Strips wurden die Pufferkonditionen quantitativ (wie viele Proteine wurden fokussiert) und qualitativ (wie scharf sind die Banden der fokussierten Proteine) gegeneinander verglichen. Mit den vier besten Puffern (Varianten 1, 5, 6 und 7 in Tabelle 12) wurden dann neue Proben solubilisiert und aus diesen vollständige 2D-Gele hergestellt (s. Abbildung 9).

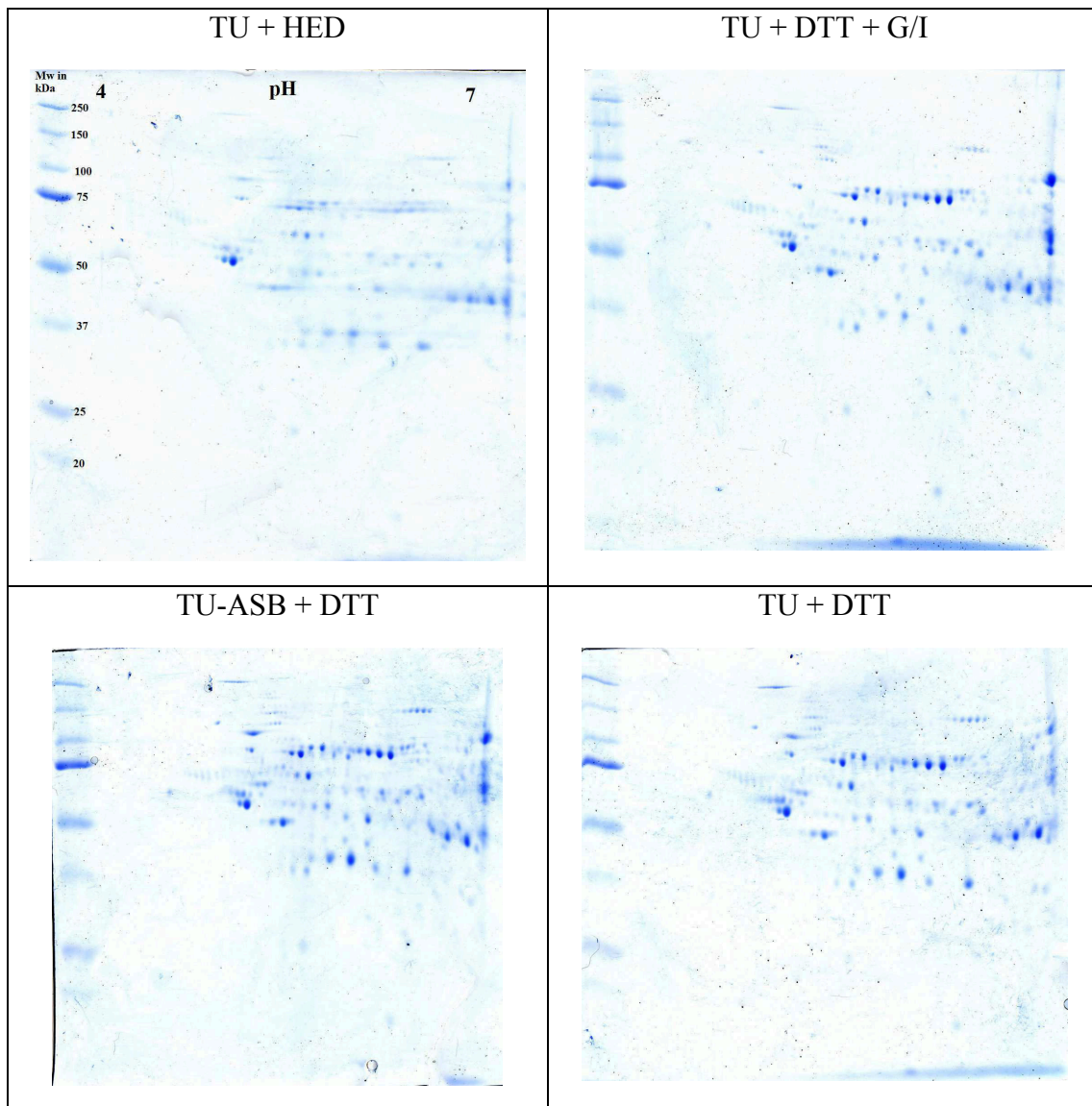


Abbildung 9: 10%ige SDS-Gele mit jeweils 125 µg Protein / Gel wurden mit verschiedenen Pufferkonditionen (s. Bildüberschriften) hergestellt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Man erkennt, dass die beiden unteren 2-D-Gele sowohl mehr Proteinspot aufweisen, als auch die bessere Auflösungen (und damit Differenzierung der Proteinspots) ermöglichen. Die angezeigten pH-Bereiche und Molekulargewichtswerte im ersten Gel sind repräsentativ für alle 2D-Gele.

Diese Gele wurden wiederum bezüglich ihrer Quantität und Qualität der Proteinspots untersucht, mit den beiden aussichtsreichen Puffervarianten (TU-ASB + DTT bzw. TU + DTT) anschließend eine präparative 2D-PAGE (250 µg Protein / Gel) durchgeführt (Abbildung 10). Durch die erhöhte Proteinmenge konnte man die Unterschiede zwischen den beiden Puffervarianten besser erkennen, da mehr und intensivere Spots zu detektieren waren.

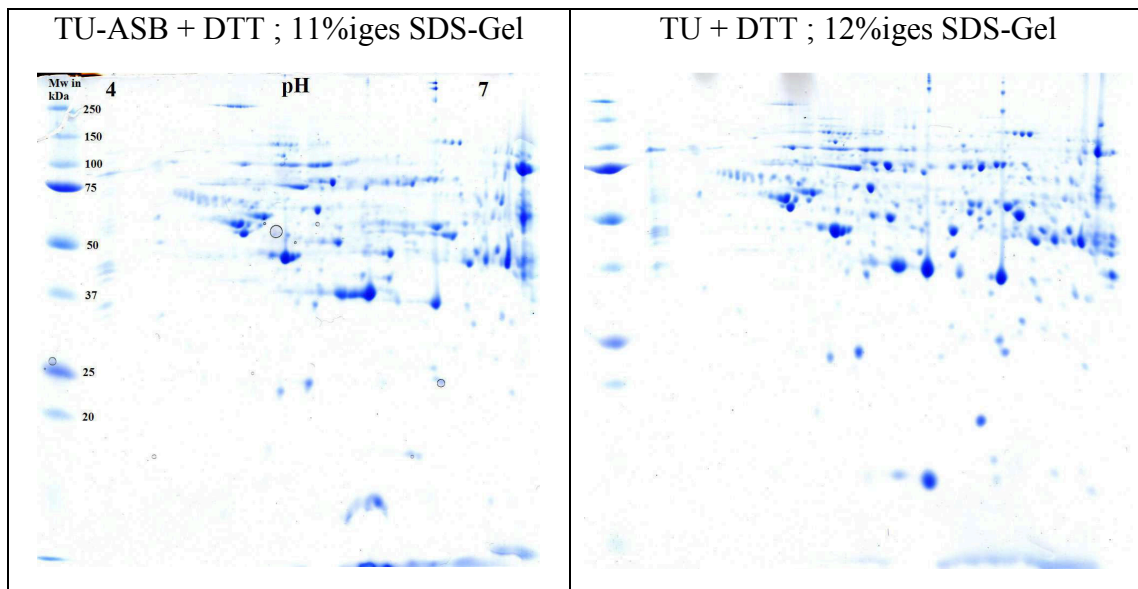


Abbildung 10: Coomassiegefärbte SDS-Gele nach vollendeter 2D-PAGE, mit Konditionen entsprechend den Bildüberschriften. Auf dem linken Gel sieht man deutlich mehr und besser aufgelöste Proteinspots. Die angezeigten pH-Bereiche und Molekulargewichtswerte im ersten Gel sind repräsentativ für alle 2D-Gele.

An diesen Gelen kann man erkennen, dass mit Hilfe des TU-DTT-Puffers schärfere Proteinspots entstehen und die Ergebnisse denen mit TU-ASB-DTT-Puffer in Punkto Qualität und Quantität überlegen sind.

3.2.2 SDS-Gel-Konditionen

Gleichzeitig mit den Puffertests wurden, zur Optimierung der zweiten Dimension der 2D-PAGE, SDS-Gele mit unterschiedlicher Prozentigkeit getestet (s. Abbildung 10). Die Prozentigkeit eines SDS-Gels bestimmt die Dichte des 3-dimensionalen Netzwerks, durch das sich die Proteine bewegen müssen. Diese Prozentigkeit wird bestimmt durch das Verhältnis von Bisacrylamid und Acrylamid. Je höher die Prozentigkeit, umso dichter ist das Netzwerk.

Man erkennt, dass das 11%ige SDS-Gel den besten Kompromiss zwischen Auflösung im hoch- und niedermolekularen Bereich bietet.

3.2.3 Applizierte Proteinmengen

Ein weiterer Punkt, den es zu optimieren galt, war die Proteinmenge, die auf das 2D-Gel aufgetragen wurde. Sowohl zu wenig (geringe Proteinmengen können nicht detektiert werden), als auch zu viel Protein (große Proteinspots verlaufen und werden unscharf) ist dabei von Nachteil. Es wurden 150, 200 und 250 µg Protein / Gel getestet (s. Abbildung 11). Dabei zeigte sich, dass bei 250 µg / Gel deutlich die meisten Spots erkennbar sind,

ohne dass diese verlaufen. Dadurch, dass die Probenmenge limitiert war (Tierversuche), konnte nicht noch mehr Protein / Gel aufgetragen werden, da ansonsten nicht die entsprechende Anzahl technischer Replikate hätte hergestellt werden können.

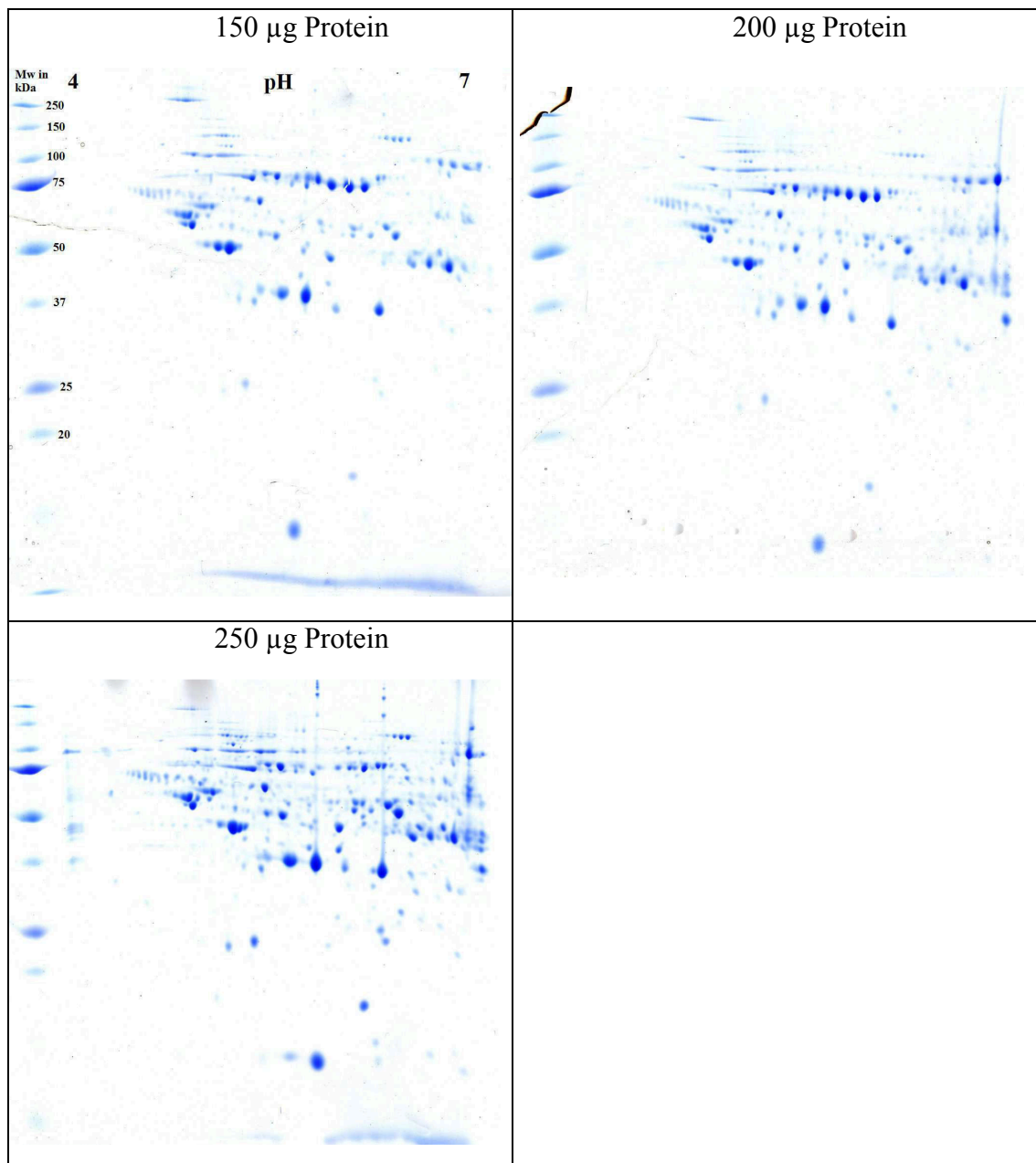


Abbildung 11: Coomassiegefärbte 2D-Gele mit jeweils unterschiedlicher Proteinmenge (150, 200 und 250 µg). Bei der Verwendung von 250 µg Protein pro Gel zeigen sich die meisten Proteinspots. Es wurde der TU-DTT-Puffer, sowie jeweils 11%ige SDS-Gele verwendet. Die angezeigten pH-Bereiche und Molekulargewichtswerte im ersten Gel sind repräsentativ für alle 2D-Gele.

Unter den optimierten Bedingungen (TU + DTT-Puffer, 11%iges SDS-Gel, 250 µg Protein / Gel) wurden nun die insgesamt 66 Gele (sechs Zeitpunkte à drei bzw. vier biologische Replikate (Versuchstiere) und jeweils drei technische Replikate pro

Versuchstier) zur differentiellen Analyse erstellt. Abbildung 12 zeigt ein exemplarisches Beispiel für die Kontrollgruppe 40. Man kann erkennen, dass die Proteinspots scharf begrenzt und in den meisten Fällen auch klar gegeneinander abgrenzbar sind.

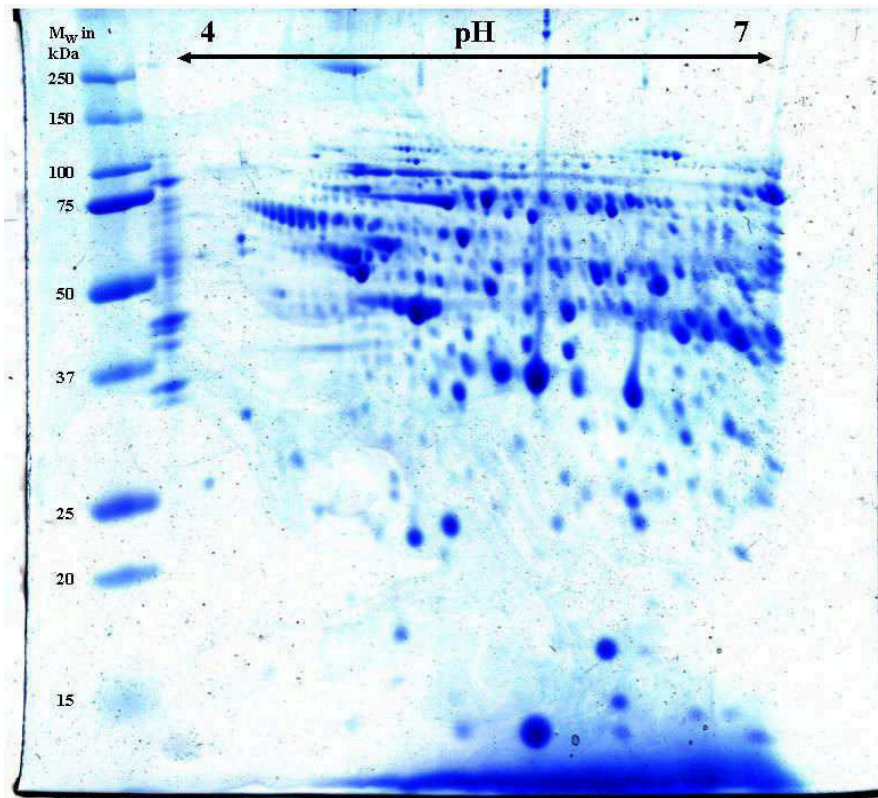


Abbildung 12: Repräsentatives 2D-Gel aus der Gruppe Kontrolle 40 mit ca. 350 erkennbaren Proteinspots.

3.2.4 Zoom-Gele

Einige der als signifikant veränderten Spots (s. Abschnitt 3.2.7) waren in den Gelen mit einer pH-Auftrennung von 4-7 sehr klein und mit dem bloßen Auge kaum zu erkennen. Damit auch diese Spots ausgestanzt und verdaut werden konnten, wurden entsprechende Protein-Pellets auf IPG-Strips aufgetragen, die ebenfalls 7 cm lang waren, aber einen kleineren pH-Bereich auftrennten (pH 4,7-5,9 bzw. pH 5,5-6,7).

Wie man in Abbildung 13 erkennt, sind deutlich weniger Spots auf dem Zoom-Gel vorhanden, als man erwarten würde (vgl. dazu Abbildung 12 im pH-Bereich 5,5-7). Der wahrscheinlichste Grund dafür ist, dass der gleiche Rehydratationspuffer verwendet wurde wie für die IPG-Strips mit einer pI-Auftrennung von pH 4-7. Um verwertbare Ergebnisse zu erhalten, müsste man zunächst experimentell die Pufferkonditionen

bestimmen, die für die jeweiligen pH-Bereiche optimal wären. Aus Zeitgründen konnte diese Idee im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

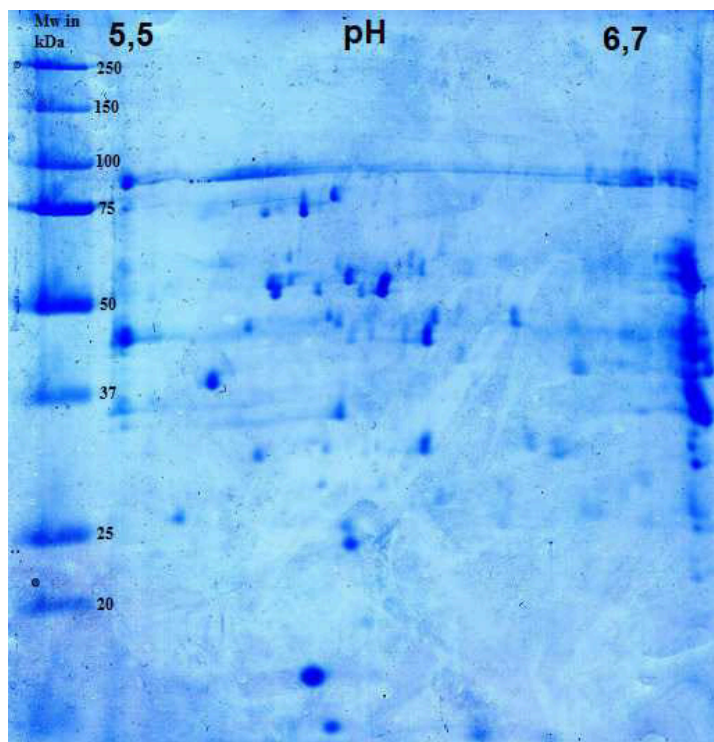


Abbildung 13: Coomassiegefärbtes 2D-Gel mit Auftrennung in einem pH-Bereich von pH 5,5-6,7.

3.2.5 Auswertung der 2D-PAGE

Zur Auswertung der 2-D Gele wurde die ImageMaster Software Melanie 6.0 (GE Healthcare) verwendet. Nachdem die Spots, wie im Material und Methoden-Teil beschrieben, detektiert und markiert waren, wurden die technischen Replikate eines Organs miteinander verglichen. Dabei konnten immer mindestens 85% der Spots eines Gels in den jeweils anderen wiedergefunden werden. Auch das %Volumen (entspricht der Grundfläche eines Spots multipliziert mit dessen Intensität, normalisiert auf das Gesamtvolumen aller Spots in diesem Gel) der jeweiligen Spots stimmte zu mindestens 85% überein. Abbildung 14 zeigt beispielhaft den Vergleich der %Volumen zweier technischer Replikate aus der Organgruppe 84. Auf Grundlage u.a. dieser Vergleiche konnte der Fehler der Methode auf $\leq 15\%$ bestimmt werden.

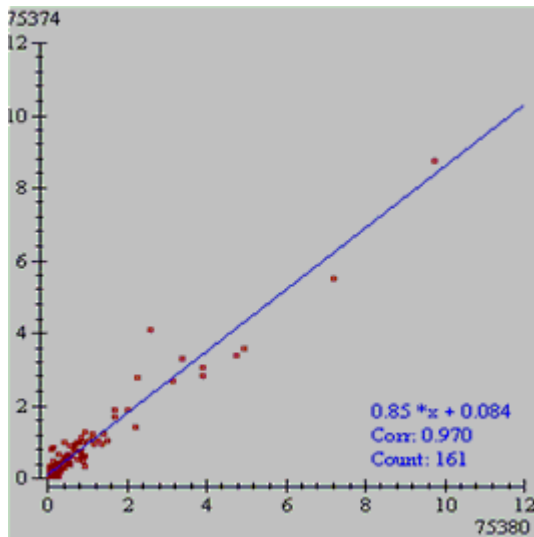


Abbildung 14: Vergleich der %Volumen zweier technischer Replikate aus der Organgruppe 84. Die eingetragenen Punkte haben in Abszissen-Richtung den %Volumen-Wert aus dem Gel 75380 und in Ordinaten-Richtung den aus 75374. Man kann die 97%ige Korrelation der beiden Werte ablesen. Da das Gel 75380 allgemein stärker gefärbt ist, hat die Ausgleichsgerade eine Steigung von $0,85 \cdot x$. Count = Anzahl der in die Berechnung eingegangen Spots.

Aus den jeweils gleichen Spots der technischen Replikate wurde dann, mit Hilfe des ImageMaster-Programms, ein so genanntes synthetisches Gel erstellt. In diesem synthetischen Gel hatten die Spots als %Volumen jeweils den arithmetischen Mittelwert der einzelnen technischen Replikate. Das synthetische Gel wurde als repräsentativ für das jeweilige Organ angesehen.

Da für jeden Behandlungszeitpunkt drei bzw. vier Organe zur Verfügung standen, wurde aus den jeweiligen Werten der synthetischen Gele die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung berechnet, und als repräsentativ für den jeweiligen Behandlungszeitpunkt angesehen, s. Abbildung 16.

3.2.6 Definition signifikanter Spotvolumenveränderungen

Als nächstes musste definiert werden, ab wann eine Veränderung im Spotvolumen auf eine Änderung der Proteinexpression bzw. -translokation, bedingt durch die Anästhetikabehandlung, zurückzuführen ist. Da es keine einheitlichen Maßstäbe dazu gibt, haben wir folgende Kriterien angelegt:

1. Es wurde das Verhältnis zwischen einem beliebigen Zeitpunkt (außer Kontrolle) und Kontrolle 40 berechnet - dieses musste größer zwei sein. Das Verhältnis berechnet sich aus dem Mittelwert minus Standardabweichung des Zeitpunktes mit dem größeren %Volumen (s. 'a' in Abbildung 15) dividiert durch den Mittelwert plus Standardabweichung des Zeitpunktes mit dem kleineren Spotvolumen (s. 'b' in Abbildung 15).

$$\text{Verhältnis} = \frac{\text{Mittelwert} - \text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert} + \text{Standardabweichung}}$$

Ein Verhältnis kleiner eins bedeutet ein Überlappen der Werte. Aufgrund des errechneten methodischen Fehlers von 15% muss das Verhältnis mindestens einen Wert von 1.15 übersteigen. Das heißt bei einem Verhältnis größer zwei weisen die beiden Spotvolumen eine entsprechend große Differenz auf (vgl. Abbildung 15).

2. Spots die dem Kriterium unter Punkt 1 entsprachen, wurden ferner darauf geprüft, ob das Verhältnis größer 2 auch zwischen Kontrolle 40 und Kontrolle bestand. War dies der Fall wurde der entsprechende Spot aus dem Pool entfernt, da dies auf eine behandlungsunabhängige Änderung des Spotvolumens hinweist.
3. Bei den übrig gebliebenen Spots wurde nun geprüft, wie homogen die Einzelwerte der biologischen Replikate waren, aus denen der Mittelwert für den gesamten Behandlungszeitpunkt berechnet wurde. Dazu wurde die Intra-Class-Ratio bestimmt, die sich aus dem Spotvolumen dividiert durch den Mittelwert ergibt. War diese >2 oder $<0,5$ wurden die Spots aus dem Pool entfernt, weil die Einzelergebnisse nicht homogen verteilt waren.

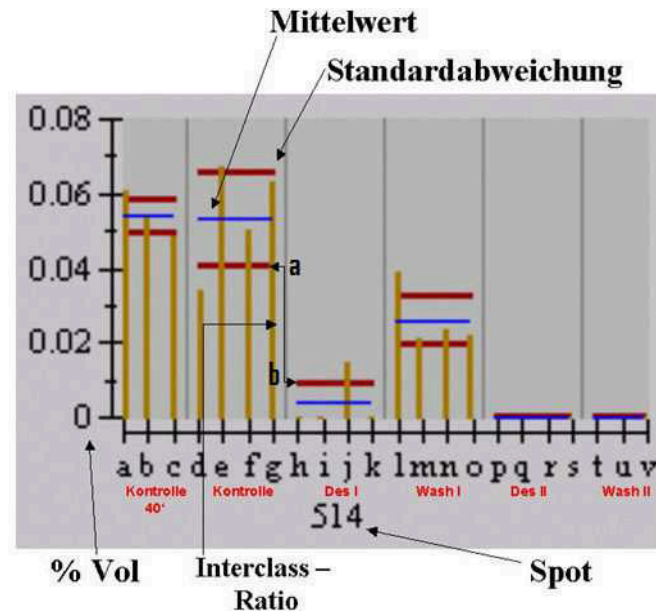


Abbildung 15: Intra- und Inter-Class Histogramme des Spots 514. Mit schwarzen Pfeilen sind die verschiedenen Parameter markiert, die zur Ermittlung der signifikanten Spotvolumenveränderungen nötig sind.

Einen Überblick über die verschiedenen Ebenen der Auswertung gibt Abbildung 16.

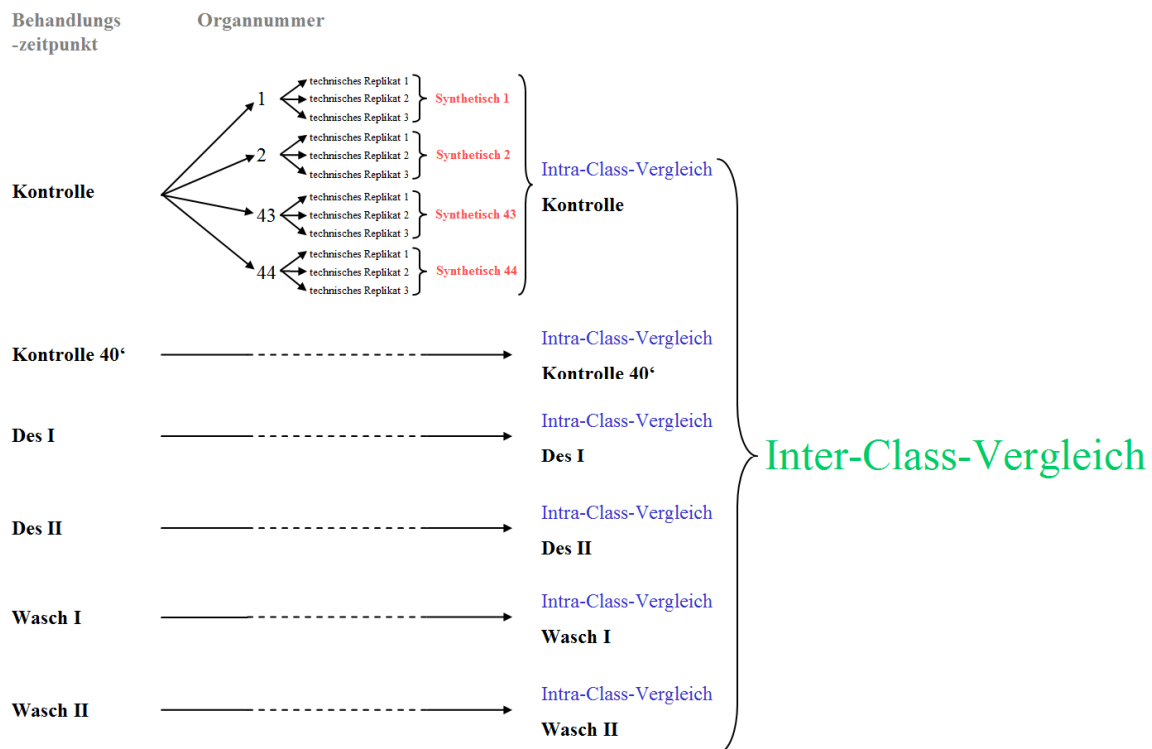


Abbildung 16: Verschiedene Ebenen der Auswertung mit der ImageMaster Software.

3.2.7 Signifikant veränderte Spots

Nach Anlegen der beschriebenen Kriterien konnten insgesamt 15 Proteinspots detektiert werden, die im Verlauf der DES-PC eine veränderte Expression aufwiesen (s. Abbildung 18). Alle Spots zeigten in der entsprechenden Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ein vermindertes Spotvolumen (s. Abbildung 19).

Abbildung 17 zeigt exemplarisch an zwei Spots, dass diese Spotvolumenveränderung z.T. auch mit bloßem Auge im SDS-Gel sichtbar waren.

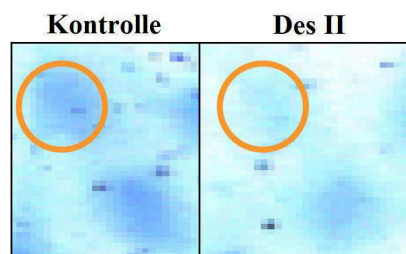


Abbildung 17: Diese Abbildung zeigt beispielhaft den Vergleich zweier Spots unterschiedlicher Behandlungszeitpunkte, bei denen eine signifikante Spotvolumenveränderung vorliegt, die bereits mit dem bloßen Auge sichtbar ist

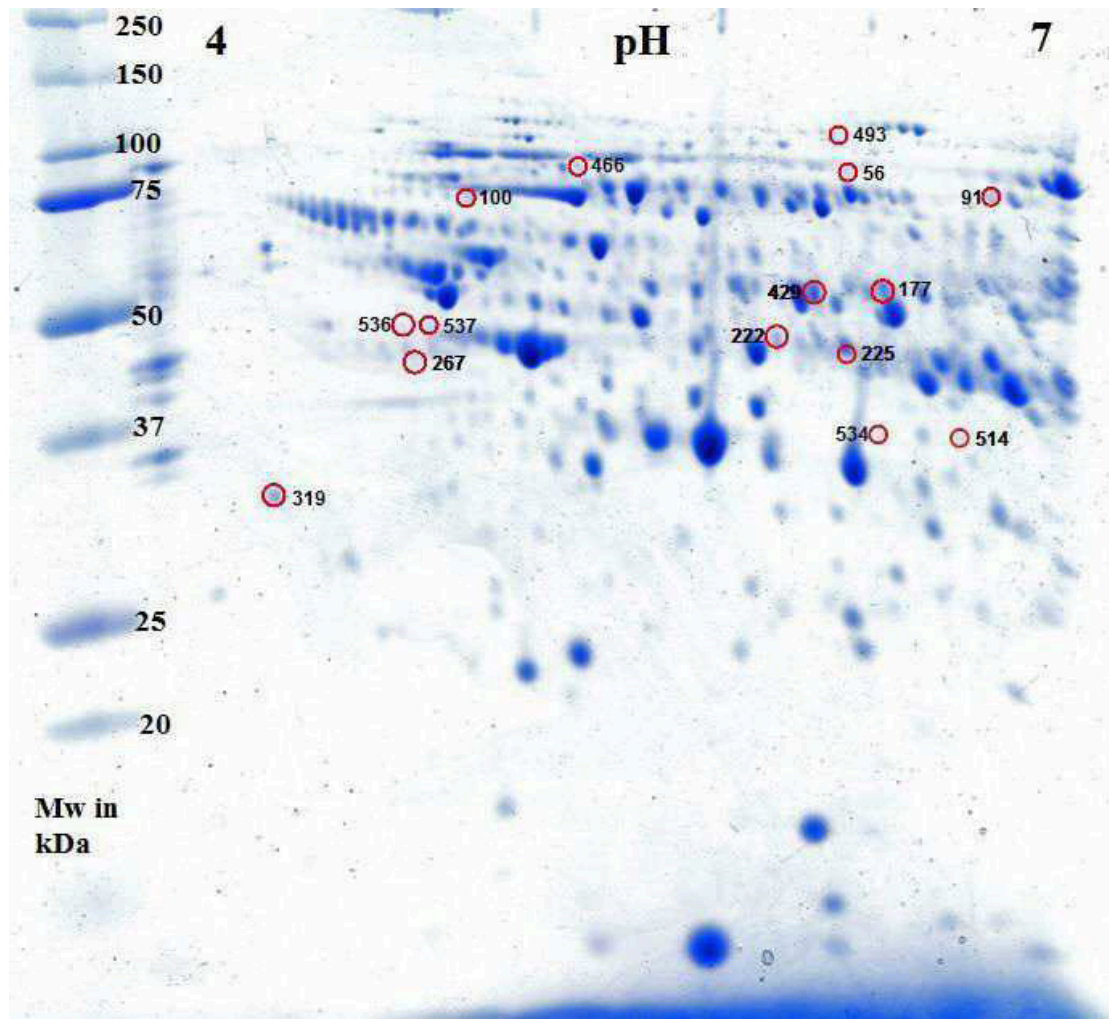


Abbildung 18: Coomassiegefärbtes 2D-Gel der Gruppe Kontrolle 40, fokussiert im pH-Bereich 4-7. Signifikant veränderten Spots sind markiert und mit der jeweiligen Spot ID versehen.

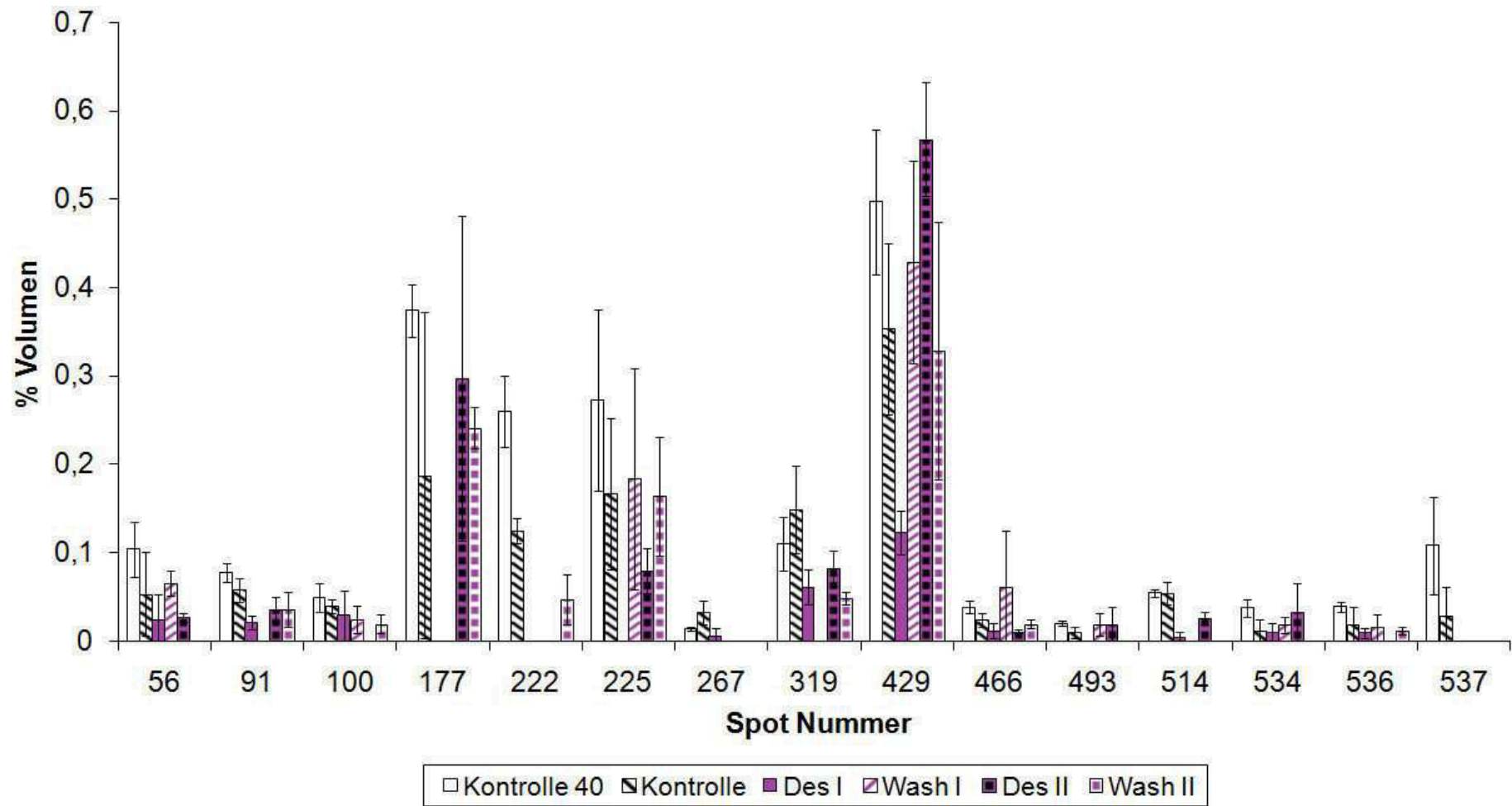


Abbildung 19: Spotvolumen der differentiell exprimierten Proteine im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte, inklusive Standardabweichung. Die einzelnen Spotvolumen repräsentieren den Mittelwert der biologischen Replikate des jeweiligen Zeitpunktes. Das heißt sowohl technische, als auch biologische Replikate finden in dieser Grafik Beachtung.

3.3 Massenspektrometrische Identifikation der Proteine

Die als signifikant identifizierten, ausgeschnittenen und verdauten Proteinspots wurden im nächsten Schritt massenspektrometrisch untersucht (vergleiche Material und Methoden-Teil, Kapitel 2.6-2.8). Dabei wurde von jeder Probe zunächst ein Übersichtsspektrum erstellt (s. Abbildung 6, Seite 29), welches einen Überblick über die, aus dem tryptischen Verdau entstandenen, Peptide gab. Von diesen Peptid-Ionen wurde anschließend ein MS/MS-Spektrum aufgenommen. Abbildung 20 zeigt beispielhaft das Fragmentspektrum des Peptids der Masse $m/z = 549,81^{++}$ aus dem Verdau des Spots 225. In diesem Fall hatte das Peptid die Sequenz: VDIIEGVK.

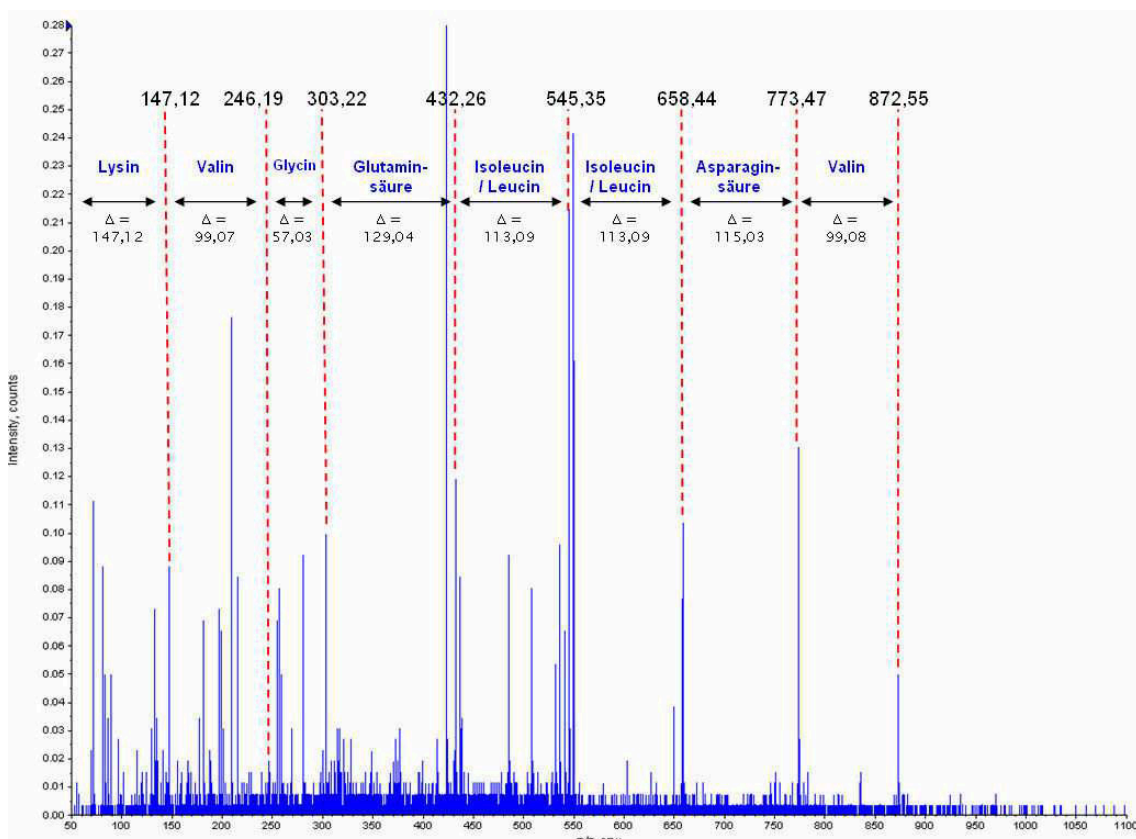


Abbildung 20: MS/MS-Spektrum des Peptids $[M+2H]^{2+} = 549,81$ aus Spot 225. Die Aminosäuresequenz des Peptids lässt sich aus den markierten Signalen der y-Fragmentserie ablesen. Es ergibt sich die Aminosäuresequenz VDIIEGVK.

Da es keine etablierten Vorschriften dafür gibt, welche Kriterien erfüllt sein müssen damit ein Protein als eindeutig massenspektrometrisch identifiziert gilt, mussten diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit definiert werden. Folgende Identifikationsmöglichkeiten sind derzeit möglich:

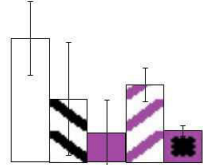
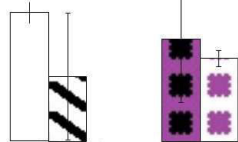
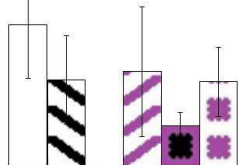
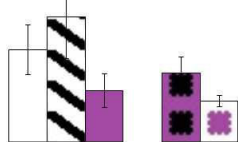
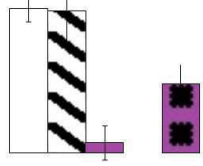
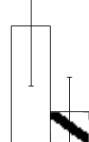
1. Über die Identifikation der einzelnen Peptide kann auf das Ursprungsprotein zurück geschlossen werden. Bestimmte Peptide (= Aminosäuresequenzen) bzw. Peptidkombinationen kommen nur in einem Protein vor, sodass nur dieses als Ausgangsprotein in Frage kommt. Je länger dabei die einzelnen Aminosäuresequenzen sind, umso eindeutiger ist das Ergebnis. Im Allgemeinen gilt ein Protein als identifiziert, wenn eine Sequenzabdeckung von mindestens 20% vorliegt. In dem obigen Beispiel handelte es sich um ein Peptid des Proteins Succinat Coenzym A Ligase.
2. Eine weitere Möglichkeit einen Hinweis auf das Ausgangsprotein zu erhalten ist der Peptide Mass Fingerprint (PMF). Dabei werden die Massen der Peptid-Ionen die man im Übersichtsspektrum erhält mit denen verglichen, die bei einem theoretischen Verdau des Proteins entstehen. Diese Methode kann aber nicht als Ersatz, sondern nur als Ergänzung zur MS/MS-Analyse gesehen werden.
3. Hat man ein potentielles Ursprungsprotein gefunden, kann man zur weiteren Verifizierung den isoelektrischen Punkt sowie die Masse des Proteins mit denen vergleichen, die sich aus dem SDS-Gel auslesen lassen. Dabei ist anzumerken, dass mehrere Faktoren dazu führen können, dass die experimentell gesammelten Daten nicht mit denen der Datenbank übereinstimmen:
 - während der isoelektrischen Fokussierung ist das zu untersuchende Protein nicht bis zu seinem Zielpunkt ($\text{pH} = \text{pI}$) gelangt, z.B. weil das Fokussierungsprotokoll für dieses Protein zu kurz war (vgl. 2.3.1)
 - bei dem Protein handelt es sich um eine Isoform oder Splicevariante, welche nicht in der Datenbank enthalten ist. Von dem in der Datenbank vorhandenem unterscheidet es sich z.B. nur durch eine Aminosäure, was aber entsprechende Auswirkungen auf den pI haben kann.
4. Ein weiterer Verifizierungsschritt ist der Abgleich der gefundenen Peptidsequenz mit einer weiteren Datenbank, z.B. der BLAST-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Nur Ergebnisse die mehrere der obigen Kriterien erfüllten und somit kein Zweifel an der Eindeutigkeit ihrer Richtigkeit besteht, wurden im folgenden Abschnitt als identifizierte Proteine angegeben.

3.4 Identifizierte Proteine

Von den 15 signifikant veränderten Proteinen konnten sechs eindeutig identifiziert werden. Diese sind samt ihres Expressionsmusters in Tabelle 13 aufgeführt. Bei den anderen neun Proteinspots (Spots 91, 100, 222, 267, 429, 493, 534 und 536; vgl. Abbildung 18) war es nicht möglich die zu Grunde liegenden Proteine zu identifizieren.

Tabelle 13: Zeigt die identifizierten Proteine mit jeweils zugehöriger Spotnummer und entsprechendem Expressionsmuster. Weiß = Kontrolle 40 ; schwarz gestreift = Kontrolle ; lila = Des I ; lila gestreift = Wasch I ; lila/schwarz = Des II ; weiß/lila = Wasch II

Spotnummer	Protein	Expressionsmuster
56	Albumin	
177	Selenium Binding Protein 1	
225	Succinate-Coenzyme A Ligase, ADP-forming, beta subunit	
319	Complement Component 1, q subcomponent binding protein	
514	Inorganic Pyrophosphatase 2, isoform CRA_a	
537	NADH Dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1,75 kDa	

Nähere Angaben zur Identifizierung der einzelnen Proteine (identifizierte Sequenzabschnitte, Vergleich der theoretischen und experimentell ermittelten isoelektrischen Punkte etc.) finden sich im Anhang.

Das nicht alle Proteinspots identifiziert werden konnten, hatte vor allem zwei Gründe:

- Die Spots wiesen so wenig Protein / Spot auf, dass sie mit bloßem Auge im Gel kaum sichtbar waren. Damit war es nicht möglich die Spots aus dem Gel auszuschneiden. Auch ein Nachfärben der Gele mit Coomassie-Färbung oder die Verwendung von Zoom-Strips (vgl. Kapitel 3.2.4) brachten keine Abhilfe.
- Es war so wenig Protein in der Probe, dass die Menge unter der Nachweisgrenze des Massenspektrometers lag.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, kardiale Proteine zu identifizieren die eine potentielle Rolle im Signalweg der Desfluran-induzierten Präkonditionierung spielen. Hierzu wurde ein proteomanalytischer Ansatz gewählt. Im Speziellen wurde die zytosolische Proteinfraction innerhalb eines pI-Bereichs von pH 4-7 untersucht.

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Methode der 2D-PAGE verwendet. Bevor die Analyse der Proben begonnen werden konnte, musste diese Methode an die Eigenschaften dieser speziellen Proteinfraction adaptiert werden.

Die Proteinidentifikation erfolgte mittels Massenspektrometrie.

Es konnten insgesamt 15 differentiell exprimierte Spots gefunden werden. Bei sechs dieser Spots gelang es, das zu Grunde liegende Protein zu identifizieren.

4.1 Einordnung der Proteine in den Kontext der Präkonditionierung

Von den identifizierten Proteinen ist bisher nur die NADH-Dehydrogenase als Mediator der pharmakologischen Präkonditionierung beschrieben worden (s.u.), aber auch die anderen Proteine können in den Kontext der Präkonditionierung eingeordnet werden.

Albumin

Albumin ist ein sehr bekanntes und vielseitiges Protein. Es macht etwa 60% der Plasmaproteine aus und dient unter anderem als unspezifisches Transportprotein.

Albumin wurde in den letzten Jahren bereits im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung bzw. der Fern-Präkonditionierung beschrieben⁹⁷. In der Studie von Lang *et al.* wurde das Blut der Versuchstiere untersucht und man fand dort eine, gegenüber der Kontrolle, erhöhte Albuminkonzentration in den Präkonditionierungsgruppen. Präkonditioniert wurde durch dreimaligen Verschluss der Herzkranzgefäße à fünf Minuten, unterbrochen durch je fünfminütige Pausen.

In einer modifizierten Form steht das Albumin ebenfalls im wissenschaftlichen Fokus. Das 'ischemia modified albumin' (IMA) wird derzeit als einer der vielversprechendsten Biomarker für die frühe Detektion kardialer Ischämie angesehen, einen aktuellen Überblick geben Sbarouni *et al.*⁹⁸. Allerdings besteht bis heute keine endgültige Vorstellung davon, wie das normale Albumin im Rahmen der Ischämie zum IMA wird. Daher gibt es die Überlegung, dass die Modifikation des Albumins zum IMA einen

endogenen Schutzmechanismus des Körpers darstellt. Lippi *et al.* haben dazu die Theorie aufgestellt, dass sich durch die verminderte Kobalt-Bindungsfähigkeit des IMA, im Vergleich zum normalen Albumin, die Konzentration an freiem Kobalt erhöht und dies protektive Effekte auf das Herz haben könnte⁹⁹. Zu diesem Schluss kamen sie, da Xi *et al.* 2004 zeigen konnten, dass Cobaltchlorid (CoCl_2) eine Kardioprotektion im Sinne einer Präkonditionierung hervorruft¹⁰⁰. Mit Hilfe dieses Modells könnte man die Spekulation aufstellen, dass die in der vorliegenden Arbeit gefundene Abnahme der Albuminmenge in den Präkonditionierungsgruppen dadurch zu Stande kommt, dass normales Albumin zu Schutzzwecken in die IMA-Form überführt wird. Allerdings ist der Kenntnisstand über das IMA noch zu gering ist, um eine solche Interpretation wirklich zuzulassen.

Eine weitere Theorie, die die Verminderung des Albumingehalts im Herzgewebe der Präkonditionierungsgruppen erklären könnte leitet sich aus der Beobachtung ab, dass der Vorgang der Ischämie/Reperfusion zu Schäden des Endothels führt und somit die Durchlässigkeit für Plasmaproteine, wie das Albumin, erhöht (nachzulesen in einem guten Übersichtsartikel von Carden *et al.*¹⁰¹). In den präkonditionierten Versuchsgruppen fiel die Endothelschädigung geringer aus, womit weniger Albumin in das Gewebe gelänge. Die verminderten Albuminmengen wären somit ein Hinweis für den endothelprotektiven Effekt der Desfluran-induzierten Präkonditionierung.

Bekannt ist Albumin außerdem als Anti-Akut-Phase-Protein, d.h. im Zuge von Entzündungs- oder Stressreaktionen des Körpers wird die Synthese des Albumin vermindert, um mehr Kapazitäten für die so genannten Akut-Phase-Proteine (z.B. C-reaktives Protein) bereitstellen zu können. Zwar wurden während der Tierversuche zu dieser Arbeit alle Bemühungen unternommen, den Stress für die Versuchstiere möglichst gering zu halten, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass mögliche Stressreaktionen zu einer eben solchen Veränderung des Albumingehalts führten. Gegen dieses Argument spricht jedoch, dass keine Veränderungen in den scheinoperierten Kontrollgruppen nachzuweisen waren.

Neben diesen Überlegungen muss beachtet werden, dass es sich bei Albumin um ein Serumprotein handelt. Es sollte daher normalerweise im Herzmuskelgewebe nicht zu finden sein. Durch die Art und Weise der Probengewinnung in dieser Arbeit kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich eine gewisse Menge Restblut an oder in den Herzen befand. Dieses wurde dann gegebenenfalls zusammen mit den Herzen

homogenisiert und wäre somit in den Protein-Pellets wiederzufinden. In diesem Fall hätten die unterschiedlichen Mengen des Albumins zu den verschiedenen Zeitpunkten keinerlei Bezug zu der Präkonditionierung. Gegen diese Theorie sprechen allerdings die in dieser Arbeit verwendeten Replikate. Für jeden Behandlungszeitpunkt wurden in dieser Arbeit mehrere biologische Replikate verwendet (vgl. Material und Methoden), die demzufolge getrennt voneinander verarbeitet wurden. Das heißt es müsste sich in jeder Probe eine unterschiedliche Menge Restblut befinden und es sollte sich kein signifikanter Unterschied nur zwischen den Kontroll- und den Präkonditionierungsgruppen ergeben.

Selenium Binding Protein 1

Die physiologische Funktion des Selenium Binding Protein 1 (SBP1) ist noch nicht verstanden. Dadurch dass es bisher kaum Erkenntnisse über die generelle Funktion des Selenium Binding Protein gibt, lassen sich auch keine theoretischen Verknüpfungen zur Präkonditionierung herstellen. Allerdings hat eine britische Arbeitsgruppe, im Rahmen ihrer Forschungen zur ischämischen Präkonditionierung, eine nicht näher beschriebene Regulation des Selenium Binding Protein 1 feststellen können¹⁰².

Succinate Coenzyme A Ligase

Die Succinate Coenzyme A Ligase (kurz: Succinat-CoA-Ligase) ist bekannt durch ihre Funktion innerhalb des Zitrat-Zyklus. Dort katalysiert sie die Hydrolyse der Thioesterbindung des Succinyl-CoA zu Succinat. Die frei werdende Energie wird dabei im Sinne einer Substratkettenphosphorylierung in Form von GTP gespeichert.

Mit der Beteiligung am Zitrat-Zyklus, einem der wichtigsten Prozesse im Rahmen des Energie-Metabolismus der Zelle, ist eine Regulation dieses Enzyms im Rahmen der Präkonditionierung gut vorstellbar. 2009 wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine Regulation der Succinat-CoA-Ligase im Zusammenhang mit der ischämischen Präkonditionierung gefunden¹⁰².

Im Rahmen der Diskussion der Regulation der NADH-Dehydrogenase (s.u.), wird eine Theorie vorgestellt, nach der eine Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette als Trigger für die pharmakologische Präkonditionierung dient. Der Zitrat-Zyklus steht als Zulieferer von Energieäquivalenten in direktem Zusammenhang mit der mitochondrialen Atmungskette, sodass eine Regulation der Succinat-CoA-Ligase ebenfalls Einfluss auf die Atmungskette hätte. Eine Herunterregulation, wie sie in dieser

Arbeit in den Behandlungsgruppen gefunden wurde, könnte somit eine Inhibierung der Atmungskette imitieren, und dadurch als Trigger für die Präkonditionierung dienen.

Complement Component 1, q subcomponent binding protein

Complement Component 1, q subcomponent binding protein (C1q) ist eine essentielle Komponente des phylogenetisch sehr alten, aber physiologisch noch immer sehr wichtigen Teil des Immunsystems, dem Komplementsystem. 1972 fand man erstmals Hinweise auf die Existenz von C1q-Rezeptoren¹⁰³. Bis heute konnte man viele verschiedene C1q-bindende Proteine finden (einen Überblick geben McGreal *et al.*¹⁰⁴), unter ihnen das 'C1q-binding-protein' mit hoher Affinität für den 'globular head', deswegen abgekürzt mit gC1qbp. Im Laufe der letzten Jahre hat man viele physiologische wie pathologische Prozesse gefunden, in denen das gC1qbp eine Rolle spielt. Darunter bei Entzündungs- und Gerinnungsprozessen, T- und B-Zell-Regulationen sowie der Karzinogenese. Einen Überblick darüber geben Ghebrehiwet *et al.* in ihrem Review-Artikel¹⁰⁵.

Unter den vielen Funktionen die dem Complement Component 1, q subcomponent binding protein (gC1qbp) zugewiesen werden sind zwei, die im Rahmen der Präkonditionierung sehr interessant erscheinen: 1999 wurde nachgewiesen, dass das gC1qbp aus dem Zytosol heraus mit α -adrenergen Rezeptoren interagiert¹⁰⁶. In derselben Arbeit durchgeführte Expressionsstudien legen die Vermutung nahe, dass das gC1qbp die Expression und zelluläre Lokalisation der α -adrenergen Rezeptoren reguliert. Später wurde diese Erkenntnis von Pupo *et al.* spezifiziert. Sie fanden heraus, dass Interaktionen mit den α -adrenergen Rezeptoren 1B und 1D, aber nicht mit den 1A-Adrenozeptoren stattfinden¹⁰⁷. Diese Regulation könnte eine direkte Verbindung mit der Desfluran-Präkonditionierung darstellen, denn wie im Einleitungsteil dargestellt (vgl. Kapitel 1.3.2 ff., sowie Tabelle 1 auf Seite 11), wird diese über α - und β -adrenerge Rezeptoren vermittelt. In dieser Arbeit wurde eine verminderte Proteinmenge in den Präkonditionierungsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen gefunden. Eine mögliche Interpretation dieses Ergebnisses wäre, dass die Desfluran-Applikation eine Interaktion des gC1qbp mit adrenergen Rezeptoren triggert. Dadurch würde sich die Proteinkonzentration des ungebundenen gC1qbp im Zytoplasma verringern und eventuell die Lokalisation der Rezeptoren verändern. Dies wäre dann als eine Art Feedback-Schleife zu sehen, da direkt der Mediator der Desfluran-Präkonditionierung beeinflusst würde.

Da es leider bisher keine weiteren Studien zu der Beeinflussung der adrenergen Rezeptoren durch gC1qbp gab, muss es an dieser Stelle bei der reinen Spekulation über die mögliche Einordnung der gC1qbp in den Signalweg der Präkonditionierung bleiben.

In einem anderen Kontext wurde das gC1qbp von Storz *et al.* 2000 beschrieben. Sie suchten nach möglichen Bindungspartnern der Proteinkinase C und fanden unter anderem das gC1qbp¹⁰⁸. 2002 bestätigten Robles-Flores *et al.* die beobachtete Interaktion und untersuchten außerdem die spezifischen Regulationen der verschiedenen PKC-Isoformen¹⁰⁹. Die Ergebnisse der beiden Gruppen sind jedoch nicht komplett kongruent. Robles-Flores *et al.* fanden eine Aktivitätssteigerung aller Isoformen durch gC1qbp während Storz *et al.* für PKC μ eine inhibitorische Wirkung des gC1qbp auf die Kinaseaktivität beschrieben.

Toma *et al.* konnten zeigen, dass die Isoform PKC ϵ im Signalweg der Desfluran-Präkonditionierung essentiell ist⁶². Wenn nun gC1qbp die PKC ϵ aktiviert, könnte sie eine wichtige Rolle upstream der PKC ϵ im Desfluran-Signalweg spielen. Es sollte daher Ziel fortführender experimenteller Arbeiten sein, diese Vermutung weiter zu untersuchen.

Inorganic Pyrophosphatase 2

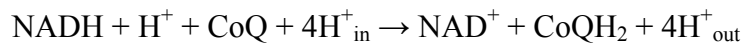
Die Proteinfamilie der Pyrophosphatasen spielt für die Zelle eine lebenswichtige Rolle: In verschiedensten physiologischen Reaktionen wird von einem Nukleosidtriphosphat (z.B. ATP) ein Pyrophosphat abgespalten (PP_i). Dieses PP_i wird dann unmittelbar von den Pyrophosphatasen in zwei Phosphate hydrolysiert. Dadurch wird das PP_i aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt, dies begünstigt die Entstehung des Produktes.

Die genaue Regulation der Pyrophosphatase ist bislang wenig erforscht. Etwas besser untersucht ist die Rolle des anorganischen Pyrophosphats (PP_i), für dessen Regulation die Pyrophosphatase, als abbauendes Enzym, eine entscheidende Rolle spielt. Unter diesen Funktionen des PP_i sind u.a. Interaktionen mit der mitochondrialen Atmungskette^{110,111} und eine Rolle als Phosphor-Donor¹¹². In diesen beiden Bereichen ist eine Regulation im Rahmen einer Präkonditionierung durchaus vorstellbar, da sie Aspekte des Energie-Metabolismus der Zelle betreffen. Leider sind aber auch diese Erkenntnisse nur bedingt auf das hier verwendete Rattenmodell übertragbar, da sie in den meisten Fällen im Feld der Prokaryonten gewonnen wurden. Zwar mehren sich die Anzeichen, dass die dort gefundenen Ergebnisse auch auf dem Gebiet der höheren

Organismen eine Rolle spielen ¹¹³, aber definitive Aussagen sind diesbezüglich nicht zu treffen.

NADH-Dehydrogenase

Die NADH-Dehydrogenase ist gleichzusetzen mit dem Komplex I der Atmungskette und befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran. Die Hauptfunktion des Komplex I ist die Katalyse folgender Reaktion:



Sie trägt damit zum Aufbau des Protonengradienten über der inneren Mitochondrien-Membran bei, dieser wird zur Synthese des ATP benötigt.

Eine weitere, besonders für die Pathophysiologie bedeutende, Rolle spielt die NADH-Dehydrogenase in der Bildung von Radikalen. Innerhalb des Mitochondriums gibt es mehrere radikalbildende Enzyme (einen Überblick geben Venditti *et al.* ¹¹⁴), eines davon ist der Komplex I. Wie Takeshige *et al.* bereits 1979 zeigen konnten, trägt die NADH-Dehydrogenase zur Bildung des hochreaktiven Superoxids bei ¹¹⁵.

Für die NADH-Dehydrogenase gibt es bereits mehrere Untersuchungen, in denen eine Verbindung zu den Mechanismen der Präkonditionierung hergestellt wurde ^{16,116-118}. Der einfachste Zusammenhang den man sich vorstellen könnte wäre, dass durch die ROS-Produktion der NADH-Dehydrogenase die Präkonditionierung direkt getriggert würde (ROS sind ein bereits mehrfach bestätigter Trigger der Präkonditionierung, vgl. Einleitungs-Teil sowie z.B. die Quellen ¹¹⁹⁻¹²¹). Leider ist der Zusammenhang nicht so einfach herzustellen, da Hanley und Mitarbeiter 2002 herausfanden, dass volatile Anästhetika die NADH-Dehydrogenase inhibieren ¹¹⁷. Sie konnten aber im selben Jahr zeigen, dass die beiden Arzneimittel Diazoxid und Pinacidil, beides anerkannte Induktoren der Präkonditionierung ^{122 123}, ebenfalls über eine partielle Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette die protektiven Mechanismen der Präkonditionierung bedingen ¹¹⁶. Sie leiten daraus die Theorie ab, dass es eine Verknüpfung zwischen der partiellen Inhibierung der Atmungskette und der pharmakologischen Präkonditionierung gibt. Es gibt mehrere weitere Aspekte, die für diese Theorie sprechen:

1. Ockaili *et al.* zeigten, dass eine partielle Inhibierung des Komplex II der Atmungskette zu einer Präkonditionierung in Kaninchen führt ¹²⁴.

2. Riepe und Ludolph wiesen nach, dass durch Inhibition der Komplexe I oder II im Gehirn ein protektiver Mechanismus im Sinne einer Präkonditionierung hervorgerufen werden kann ¹²⁵.
3. Jüngst wiesen zwei weitere Arbeitsgruppen den Zusammenhang zwischen einer Regulation der Atmungskettenenzyme (inkl. des Komplex I) sowie der Sevofluran- bzw. Isofluran-induzierten Präkonditionierung nach ^{126,127}

In diesem Zusammenhang kann die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Herunterregulation der NADH-Dehydrogenase dahingehend interpretiert werden, dass auch die Präkonditionierung durch Desfluran über eine partielle Inhibierung der Atmungskette wirkt. Einen ebensolchen Zusammenhang konnten auch Pravdic *et al.* für die Isofluran-induzierte Präkonditionierung finden ¹²⁸.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für vier (Albumin, Succinate Coenzyme A Ligase, Complement Component 1 und NADH-Dehydrogenase) der sieben identifizierten Proteine ein direkter Zusammenhang mit der pharmakologischen Präkonditionierung herstellbar ist.

4.2 Unterschiedliche Regulierungsmuster der identifizierten Proteine

Wodurch sich der Versuchsaufbau dieser Arbeit von denen vieler anderer Arbeiten im Bereich der pharmakologischen Präkonditionierung unterscheidet, ist die Anzahl der gegebenen Zyklen des Pharmakons. Häufig wird das präkonditionierende Pharmakon nur einmal verabreicht, gefolgt von einer Auswaschphase. Die sehr interessanten und bisher wenig erforschten Gesichtspunkte die dabei außer Acht gelassen werden, sind die zeit- und dosisabhängigen Aspekte der Präkonditionierung.

Für die ischämische Präkonditionierung konnte gezeigt werden, dass drei bis vier ischämische Zyklen einen maximalen protektiven Effekt bedingen ¹²⁹⁻¹³¹. Auch für die pharmakologische Präkonditionierung wurden Untersuchungen mit dieser Fragestellung durchgeführt, mit unterschiedlichen Ergebnissen je nach verwendetem Pharmakon ¹³²⁻¹³⁵. Für das mit dem Desfluran verwandte Sevofluran konnte gezeigt werden, dass eine zweifache Gabe, unterbrochen von einer Auswaschphase, der einmaligen, kontinuierlichen Gabe überlegen ist ^{132,134}. Klinische Studien von Frässdorf *et al.* konnten sogar belegen, dass nur die zweimalige Sevoflurangabe (im Vergleich zur einmaligen Gabe) einen kardioprotektiven Effekt triggern kann ^{136,137}.

In der vorliegenden Studie wurde eine Präkonditionierung durch eine zweimalige Gabe von Desfluran (Des I und Des II), gefolgt von jeweils einer Auswasch-Phase (Wasch I und Wasch II) induziert.

Die gefundenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die differentiell exprimierten Proteine z.T. enorme Mengenunterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten aufweisen. Exemplarisch sind in Abbildung 21 noch einmal die Spotvolumina von vier der 15 signifikant veränderten Spots aufgeführt.

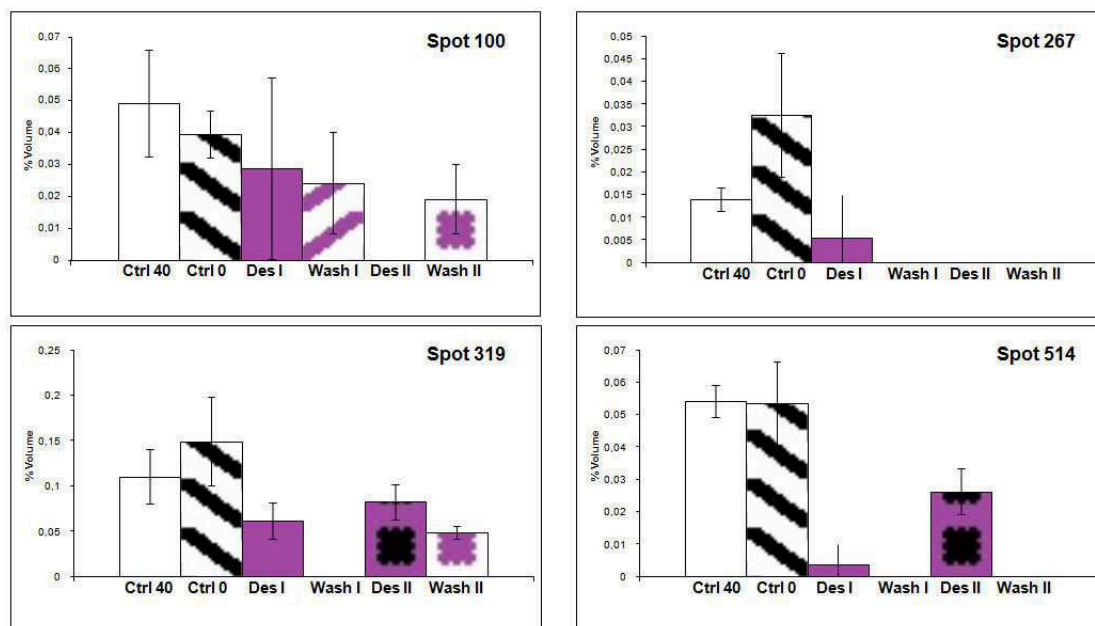


Abbildung 21: Auswahl an differentiell exprimierten Proteinspots mit unterschiedlichen Regulierungsmustern während der DES-PC. Auf der Ordinate ist das %Volumen aufgetragen, auf der Abszisse die Behandlungszeitpunkte.

Man erkennt an diesen vier Beispielen sehr deutlich, wie unterschiedlich die verschiedenen Proteine während der Desflurangaben reguliert werden. Spot 100 zeigt z.B. einzig in der Des II-Phase eine signifikante Änderung des Proteingehalts, während in Spot 267 der Proteingehalt ab der Wasch I-Phase so gering ist, dass er unter die Nachweisgrenze fällt. Der Proteinspot 514 zeigt einen initialen Abfall des Proteingehalts während der Des I- und Wasch I-Phase, gefolgt von einem Anstieg in der Des II-Phase, um abschließend zur Wasch II-Phase wieder unter die Nachweisgrenze zu sinken.

Diese Ergebnisse zeigen eindrücklich, wie schnell Regulationen und Veränderungen, bedingt durch die Präkonditionierung, auf zellulärer Ebene nachzuweisen sind. Signifikante Änderungen des Spotvolumens zum Zeitpunkt Des I scheinen durch die

unmittelbar zuvor erfolgte fünfminütige Desflurangabe bedingt zu sein. Das bedeutet, dass diese Änderungen auf Proteinebene im Minutenbereich ablaufen. Welcher Art diese Änderung sind (Neusynthese von Proteinen, Translokationen oder Modifikationen) kann mit Hilfe dieses Ansatzes nur bedingt bestimmt werden (vgl. Abschnitt 4.3). Doch kann zumindest festgehalten werden, dass die frühe Phase der Präkonditionierung, die wenige Minuten nach dem auslösenden Trigger beginnt, mitbedingt wird durch Änderungen auf Proteomebene.

Wichtig sind die Erkenntnisse über die unterschiedlichen Regulierungsmuster auch für weitere Studien im Bereich der Präkonditionierung. So muss ein besonderes Augenmerk auf die Präkonditionierungszyklen und die verwendete Pharmakonmenge gelegt werden, wenn man funktionelle Studien, z.B. zur Rolle bestimmter Proteine im Signalweg, durchführen möchte. So gibt es offensichtlich Enzyme, die nur zu ganz bestimmten Zeitpunkten eine entsprechende Regulation aufweisen. Möchte man Erkenntnisse zu diesen Proteinen gewinnen muss gesichert sein, dass alle potentiellen Regulationszeitpunkte abgedeckt sind.

4.3 Limitationen und Kritik an der Methode

Ziel der vorliegenden Studie war es, Erkenntnisse darüber zu erlangen, welche Proteine bzw. Proteinregulationen bei der pharmakologischen Präkonditionierung durch das Anästhetikum Desfluran eine Rolle spielen. Um eine möglichst große Aussagekraft zu erhalten wurde für die Experimente ein *in vivo* Rattenmodell verwendet. Die Anwendung eines *in vivo*-Settings ist wichtig in Hinblick auf die externe Validität der Studie, und darin den vielen vergleichbaren *in vitro*-Settings überlegen. Nichtsdestotrotz sind die im Rattenmodell erhaltenen Ergebnisse streng genommen nur für das angewendete Modell gültig, und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen oder gar das klinische Umfeld muss durch Folgestudien bestätigt werden.

4.3.1 Limitationen der 2D-PAGE

Da es vorrangiges Ziel war, möglichst viele Proteine bzw. Regulatoren der Desfluran-Präkonditionierung ausfindig zu machen, waren die 2D-PAGE zur Probenauftrennung und die Proteinidentifikation mittels ESI-MS die Methoden der Wahl. Auf das Problem der eingeschränkten Reproduzierbarkeit wurde im Ergebnis-Teil eingegangen. Es sei an dieser Stelle jedoch noch einmal erwähnt, dass bereits in den Überlegungen zum Studiendesign die Problemfelder der 2D-PAGE beachtet wurden und mit Hilfe

biologischer, wie technischer Replikate und diversen Kontrollinstanzen während der Auswertung, der Fehler der Methode auf 15% beschränkt werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.5).

Ein weiterer Kritikpunkt an der 2D-PAGE ist, dass nur ein Bruchteil der in der Zelle vorhandenen Proteine detektiert werden kann. Wenn man Schätzungen annimmt die pro eukaryotischer Zelle bis zu 50.000 Proteine (inkl. posttranslationaler Modifikationen etc.) angeben, ist offensichtlich, dass bei weitem nicht alle Proteine mittels 2D-PAGE detektiert und aufgetrennt werden können. Doch auch in diesem Punkt wurde versucht, die Methode soweit wie möglich zu optimieren. So wurden die aus den Rattenherzen gewonnenen Proteine zunächst weiter fraktioniert, in eine zytosolische, eine membranständige und eine nukleäre Fraktion. Anschließend wurde für jede einzelne Fraktion eine Auftrennung innerhalb des neutralen pH-Bereichs 4-7 und des basischen Bereichs von pH 6-11 durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die Proteine der zytosolischen Fraktion innerhalb des pH-Bereichs 4-7 untersucht. Die anderen Fraktionen wurden von medizinischen und naturwissenschaftlichen Kollegen aus derselben Arbeitsgruppe bearbeitet (Dr. rer. nat. Nadine Dyballa, Christian Schuh). Für jede Fraktion wurden die komplette Durchführung der 2D-PAGE optimiert (Pufferbedingungen, SDS-Gel-Dichte etc., vgl. Kapitel 3.2). Außerdem wurde eine, nach Kang *et al.* modifizierte, Coomassie-Färbung mit einer Nachweisgrenze von bis zu 10 ng Protein / Spot verwendet⁹⁵, um die Sensitivität der Methode weiter zu erhöhen.

Letztendlich gibt es derzeit keine praktikable Alternative für die vorliegende Fragestellung, als die von uns gewählte. Auch die 'Weiterentwicklung' der 2D-PAGE, die DIGE-Technik (Differential in gel electrophoresis), ist (noch) nicht praktikabel. Im Rahmen der DIGE-Technik werden die Proteinproben mit Hilfe von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wodurch es möglich ist zwei Proben gemeinsam in einem 2D-Gel laufen zu lassen. Dies erlaubt den direkten Vergleich der Proben. Die klassische 2D-PAGE benötigt für den Vergleich zweier Proben zwei 2D-Gele, sodass immer die potentielle Fehlerquelle der technischen Reproduzierbarkeit gegeben ist (zwei Gele werden unabhängig voneinander hergestellt). Ein weiterer Vorteil der DIGE-Technik ist die Nachweisgrenze der Fluoreszenzfarbstoffe, die mit bis zu 0,025 ng Protein angegeben wird, s. Marouga *et al.*¹³⁸. Folgende Gegebenheiten bedingen aber, warum die DIGE-Technik im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Anwendung gekommen ist:

1. Zum Zeitpunkt der Durchführung der experimentellen Studien (2008) standen nur drei Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung, so dass maximal zwei Behandlungszeitpunkte miteinander hätten verglichen werden können (der dritte Farbstoff markiert den mitlaufenden Standard).
2. Die DIGE stellt derzeit noch einen enormen finanziellen Aufwand dar, angefangen bei den teuren Fluoreszenzfarbstoffen bis hin zu speziellen Scannern zur parallelen Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe.

4.3.2 Limitationen des Versuchsaufbaus

Mit Hilfe des hier verwendeten Ansatzes kann nicht beantwortet werden, durch welchen Regulationsmechanismus die signifikant veränderten Proteine beeinflusst werden. So kann der unterschiedliche Proteingehalt, der zu den einzelnen Behandlungszeitpunkten registriert wird, auf viele potentielle Ursachen zurückzuführen sein. Dies führt von Änderungen der Proteinexpression, über Translokationen, Modifikationen bis hin zu Proteindegradierung. Einzig aus der Zusammensetzung der Informationen verschiedener Fraktionen können eventuell Rückschlüsse gezogen werden. So ist z.B. eine Translokation sehr wahrscheinlich, wenn das gleiche Protein in der einen subzellulären Fraktion abnimmt, während es in der anderen zunimmt. Um letztendlich definitive Aussagen über die Zusammenhänge eines bestimmten Proteins im Signalweg der Desfluran-Präkonditionierung zu machen, müssen weitere, funktionale (z.B. durch pharmakologisches Blocken der zu untersuchenden Enzyme) Studien folgen.

4.4 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, Proteine im Signalweg der Desfluran-Präkonditionierung zu identifizieren, deren zeitliche Regulation zu erfassen, und somit auch mögliche Schlüsselproteine für weitergehende Untersuchungen zu finden.

Im Anschluss an diese Arbeit wäre der nächsten Schritt herauszufinden, welche Rolle diese Proteine bei der Präkonditionierung spielen. Zu klären ist, wie sie reguliert werden, ob sie eine essentielle Rolle innerhalb des Signalweges spielen oder ob sie eher einem Nebenweg zuzuordnen sind. Ferner ist von Interesse, welche Interaktionen sie mit anderen Proteinen eingehen. Um der Beantwortung dieser Fragen einen Schritt näher zu kommen sind funktionelle *in vivo* Studien nötig. Das heißt es müssten gezielt solche Proteine ausgesucht werden, von denen erstens ein entsprechender Einfluss auf die Präkonditionierungs-Vorgänge zu erwarten und zweitens eine Blockade überhaupt

möglich ist. Vor allem der zweite Punkt ist als kritisch anzusehen, da es nur für ausgewählte Proteine entsprechende spezifische Blocker gibt. Zusätzlich darf die Blockade des Enzyms nicht zu weit reichende Folgen abseits des Präkonditionierungsvorgangs bedingen, damit valide Untersuchungsergebnisse möglich sind.

Anschließend sind weitere Studien nötig, welche die im Tierexperiment gefundenen Ergebnisse auf den Menschen bzw. in den klinischen Alltag übertragen. Die Präkonditionierung als kardioprotektive Intervention, allen voran die pharmakologische Präkonditionierung, stellt eine sehr potente Methode dar. Wie in der Einleitung bereits dargelegt wurde (vgl. Abschnitt 1.3.4), haben Präkonditionierungsvorgänge den Weg in die klinische Praxis bereits vollzogen, damit wir aber die vielen Vorzüge der Präkonditionierung noch gezielter und effektiver anwenden können, ist ein noch genaueres Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen nötig. Diese Arbeit trägt mit ihren Erkenntnissen einen Teil dazu bei.

Aus methodischer Sicht ist anzustreben die 2D-PAGE weiter zu optimieren, um mehr Proteine detektieren und identifizieren zu können. Auch sollten entsprechende Weiterentwicklungen, speziell die DIGE-Technik, genau geprüft werden, da sie ein enormes Potential in Hinsicht auf Sensitivität und Vergleichbarkeit birgt, und richtig eingesetzt weitere wichtige Erkenntnisse liefern kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Fragestellung: Die Gabe des volatile Anästhetikums Desfluran löst einen kardioprotektiven Effekt, im Sinne eine Präkonditionierung (PK), aus. Viele offene Fragen bestehen in Bezug auf die Mechanismen, die diesem Effekt zu Grunde liegen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, beteiligte Proteine zu identifizieren, sowie deren Regulation, abhängig von Anästhetikadosierung und Applikationshäufigkeit, zu bestimmen. Ein weiteres Ziel stellte die Optimierung der dazu verwendeten Methode, der 2D-PAGE, dar.

Methodik: In einem in-vivo Studiendesign wurden männliche Wistar-Ratten in sechs Gruppen eingeteilt und mit verschiedenen Desflurandosen behandelt. Die Rattenherzen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der PK entnommen, vorfraktioniert und anschließend mit Hilfe der Methode der 2D-PAGE aufgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine der zytosolischen Fraktion mit einem isoelektrischen Punkt im pH-Bereich 4-7 analysiert. Proteinspots die einen signifikanten Unterschied zu den verschiedenen Behandlungszeitpunkten aufwiesen, wurden aus den SDS-Gelen ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert.

Ergebnisse: Es wurden 15 Proteine gefunden, die im Rahmen der Desfluran induzierten pharmakologischen PK akut reguliert werden. Außerdem zeigten sich enorme dosis- und zeitabhängige Effekte auf Proteomebene. Sieben der 15 Proteine konnten identifiziert werden. Von diesen Proteinen wurde bisher keines im Zusammenhang mit der Desfluran-PK, zum Teil aber im Kontext weiterer pharmokologischer bzw. ischämischer PK beschrieben. Der Methoden-Fehler der 2D-PAGE konnte auf $\leq 15\%$ minimiert werden.

Schlussfolgerung: 1. Es wurden neue Proteine im Rahmen der Desfluran-PK gefunden, die nun eine weitergehende Untersuchung benötigen. 2. Anästhetikadosis und – applikationshäufigkeit spielen eine enorme Rolle und lassen sich auf Proteom-Ebene nachweisen 3. Die Methode der 2D-PAGE konnte zu einem effektiven und genauen Tool für das hier angewendete explorative Studiendesign verbessert werden.

6 LITERATUR

1. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. *Fachserie 12 Reihe 4* **2012**, 4-13 (2013).
2. Landesberg, G., Beattie, W.S., Mosseri, M., Jaffe, A.S. & Alpert, J.S. Perioperative myocardial infarction. *Circulation* **119**, 2936-2944 (2009).
3. Landesberg, G., *et al.* Importance of long-duration postoperative ST-segment depression in cardiac morbidity after vascular surgery. *Lancet* **341**, 715-719 (1993).
4. Sun, K.T., *et al.* Simultaneous measurement of myocardial oxygen consumption and blood flow using [1-carbon-11]acetate. *J Nucl Med* **39**, 272-280 (1998).
5. Solaini, G. & Harris, D.A. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* **390**, 377-394 (2005).
6. Ambrosio, G., *et al.* Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem* **268**, 18532-18541 (1993).
7. Rouslin, W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol* **244**, H743-748 (1983).
8. Hardy, L., Clark, J.B., Darley-Usmar, V.M., Smith, D.R. & Stone, D. Reoxygenation-dependent decrease in mitochondrial NADH:CoQ reductase (Complex I) activity in the hypoxic/reoxygenated rat heart. *Biochem J* **274** (Pt 1), 133-137 (1991).
9. Cairns, C.B., Ferroggiaro, A.A., Walther, J.M., Harken, A.H. & Banerjee, A. Postischemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischemia and reperfusion injury. *Circulation* **96**, II-260-265 (1997).
10. Veitch, K., Hombroeckx, A., Caucheteux, D., Pouleur, H. & Hue, L. Global ischaemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischaemic damage. *Biochem J* **281** (Pt 3), 709-715 (1992).
11. Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M. & Ruggiero, F.M. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* **286**, 135-141 (2002).
12. Chen, Y.R. & Zweier, J.L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* **114**, 524-537 (2014).
13. Abe, K., Hayashi, N. & Terada, H. Effect of endogenous nitric oxide on energy metabolism of rat heart mitochondria during ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* **26**, 379-387 (1999).
14. Riobo, N.A., *et al.* Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* **359**, 139-145 (2001).
15. Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G. & Sgarbi, G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 1171-1177 (2010).
16. Lenaz, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* **52**, 159-164 (2001).
17. Kang, P.M. & Izumo, S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res* **86**, 1107-1113 (2000).

18. Levraut, J., Iwase, H., Shao, Z.H., Vanden Hoek, T.L. & Schumacker, P.T. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H549-558 (2003).
19. Beltran, B., *et al.* Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide: a critical step in Fas signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8892-8897 (2002).
20. Brunner, F., *et al.* Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* **57**, 55-62 (2003).
21. Kim, Y.M., Bombeck, C.A. & Billiar, T.R. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* **84**, 253-256 (1999).
22. Liu, L. & Stamler, J.S. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ* **6**, 937-942 (1999).
23. Rakhit, R.D., Mojet, M.H., Marber, M.S. & Duchon, M.R. Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes. *Circulation* **103**, 2617-2623 (2001).
24. Ziolo, M.T., Kohr, M.J. & Wang, H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* **45**, 625-632 (2008).
25. Jones, S.P. & Bolli, R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **40**, 16-23 (2006).
26. Folino, A., Losano, G. & Rastaldo, R. Balance of nitric oxide and reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury and protection. *J Cardiovasc Pharmacol* **62**, 567-575 (2013).
27. Piper, H.M., Kasseckert, S.A., Schluter, K.D. & Abdallah, Y. [Pathophysiology of myocardial reperfusion injury]. *Dtsch Med Wochenschr* **133**, 586-590 (2008).
28. Hunter, D.R., Haworth, R.A. & Southard, J.H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* **251**, 5069-5077 (1976).
29. Honda, H.M. & Ping, P. Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death. *Cardiovasc Drugs Ther* **20**, 425-432 (2006).
30. Brenner, C. & Moulin, M. Physiological roles of the permeability transition pore. *Circ Res* **111**, 1237-1247 (2012).
31. Murry, C.E., Jennings, R.B. & Reimer, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136 (1986).
32. Przyklenk, K. & Kloner, R.A. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis* **40**, 517-547 (1998).
33. Davis, R.F., DeBoer, L.W., Rude, R.E., Lowenstein, E. & Maroko, P.R. The effect of halothane anesthesia on myocardial necrosis, hemodynamic performance, and regional myocardial blood flow in dogs following coronary artery occlusion. *Anesthesiology* **59**, 402-411 (1983).
34. Davis, R.F. & Sidi, A. Effect of isoflurane on the extent of myocardial necrosis and on systemic hemodynamics, regional myocardial blood flow, and regional myocardial metabolism in dogs after coronary artery occlusion. *Anesth Analg* **69**, 575-586 (1989).
35. Cason, B.A., Gamperl, A.K., Slocum, R.E. & Hickey, R.F. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* **87**, 1182-1190 (1997).

36. Kersten, J.R., Schmeling, T.J., Pagel, P.S., Gross, G.J. & Warltier, D.C. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* **87**, 361-370 (1997).
37. Schultz, J.E., Hsu, A.K. & Gross, G.J. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res* **78**, 1100-1104 (1996).
38. Tapuria, N., *et al.* Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *J Surg Res* **150**, 304-330 (2008).
39. Vinten-Johansen, J., *et al.* Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* **100**, 295-310 (2005).
40. Candilio, L., Malik, A. & Hausenloy, D.J. Protection of organs other than the heart by remote ischemic conditioning. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **14**, 193-205 (2013).
41. Kuzuya, T., *et al.* Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* **72**, 1293-1299 (1993).
42. Ninomiya, H., *et al.* Enhanced IPC by activation of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G protein-coupled purinoceptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H1933-1943 (2002).
43. Takeishi, Y., Jalili, T., Ball, N.A. & Walsh, R.A. Responses of cardiac protein kinase C isoforms to distinct pathological stimuli are differentially regulated. *Circ Res* **85**, 264-271 (1999).
44. Zaugg, M., Lucchinetti, E., Uecker, M., Pasch, T. & Schaub, M.C. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth* **91**, 551-565 (2003).
45. Rohmann, S., *et al.* Involvement of ATP-sensitive potassium channels in preconditioning protection. *Basic Res Cardiol* **89**, 563-576 (1994).
46. Ovize, M., Kloner, R.A. & Przyklenk, K. Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol* **266**, H137-146 (1994).
47. De Hert, S.G., Turani, F., Mathur, S. & Stowe, D.F. Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. *Anesth Analg* **100**, 1584-1593 (2005).
48. Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B. & Marban, E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* **89**, 891-898 (2001).
49. Kowaltowski, A.J., Seetharaman, S., Paucek, P. & Garlid, K.D. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H649-657 (2001).
50. Laclau, M.N., *et al.* Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 947-956 (2001).
51. Pain, T., *et al.* Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* **87**, 460-466 (2000).
52. Marinovic, J., Bosnjak, Z.J. & Stadnicka, A. Distinct roles for sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in isoflurane-induced protection against oxidative stress. *Anesthesiology* **105**, 98-104 (2006).

53. Weber, N.C. & Schlack, W. Inhalational anaesthetics and cardioprotection. *Handb Exp Pharmacol*, 187-207 (2008).
54. An, J., Varadarajan, S.G., Novalija, E. & Stowe, D.F. Ischemic and anesthetic preconditioning reduces cytosolic $[Ca^{2+}]$ and improves Ca^{2+} responses in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1508-1523 (2001).
55. Mattheussen, M., Rusy, B.F., Van Aken, H. & Flameng, W. Recovery of function and adenosine triphosphate metabolism following myocardial ischemia induced in the presence of volatile anesthetics. *Anesth Analg* **76**, 69-75 (1993).
56. Toller, W.G., Kersten, J.R., Pagel, P.S., Hettrick, D.A. & Warltier, D.C. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* **91**, 1437-1446 (1999).
57. Warltier, D.C., al-Wathiqui, M.H., Kampine, J.P. & Schmeling, W.T. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology* **69**, 552-565 (1988).
58. Toller, W.G., *et al.* Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* **92**, 1731-1739 (2000).
59. Toller, W.G., Kersten, J.R., Gross, E.R., Pagel, P.S. & Warltier, D.C. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology* **92**, 1400-1407 (2000).
60. Hata, K., Whittaker, P., Kloner, R.A. & Przyklenk, K. Brief antecedent ischemia attenuates platelet-mediated thrombosis in damaged and stenotic canine coronary arteries: role of adenosine. *Circulation* **97**, 692-702 (1998).
61. Siracusano, L., Girasole, V., Alvaro, S. & Chiavarino, N.D. Myocardial preconditioning and cardioprotection by volatile anaesthetics. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **7**, 86-95 (2006).
62. Toma, O., *et al.* Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C epsilon and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo *Anesthesiology* **101**, 1372-1380 (2004).
63. Piriou, V., *et al.* Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth* **89**, 486-491 (2002).
64. Meissner, A., Weber, T.P., Van Aken, H., Zbieranek, K. & Rolf, N. Recovery from myocardial stunning is faster with desflurane compared with propofol in chronically instrumented dogs. *Anesth Analg* **91**, 1333-1338 (2000).
65. Hanouz, J.L., *et al.* Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* **97**, 33-41 (2002).
66. Piriou, V., *et al.* Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* **100**, 581-588 (2004).
67. Tsai, S.K., *et al.* Effect of desflurane-induced preconditioning following ischemia-reperfusion on nitric oxide release in rabbits. *Life Sci* **76**, 651-660 (2004).
68. Biao, Z., Zhanggang, X., Hao, J., Changhong, M. & Jing, C. The in vitro effect of desflurane preconditioning on endothelial adhesion molecules and mRNA expression. *Anesth Analg* **100**, 1007-1013 (2005).
69. Lange, M., *et al.* Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. *Anesthesiology* **105**, 503-510 (2006).

70. Lange, M., *et al.* Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **23**, 607-613 (2009).
71. Hanouz, J.L., *et al.* Reactive oxygen species mediate sevoflurane- and desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesth Analg* **105**, 1534-1539, table of contents (2007).
72. Redel, A., *et al.* Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth Analg* **106**, 384-391, table of contents (2008).
73. Lange, M., *et al.* Differential role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in desflurane-induced preconditioning and cardioprotection by metoprolol: metoprolol blocks desflurane-induced preconditioning. *Anesthesiology* **109**, 72-80 (2008).
74. Lotz, C., *et al.* Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma mediates the second window of anaesthetic-induced preconditioning. *Exp Physiol* **96**, 317-324 (2011).
75. Jazbutyte, V., *et al.* Aromatase inhibition attenuates desflurane-induced preconditioning against acute myocardial infarction in male mouse heart in vivo. *PLoS One* **7**, e42032 (2012).
76. Redel, A., *et al.* Endothelial nitric oxide synthase mediates the first and inducible nitric oxide synthase mediates the second window of desflurane-induced preconditioning. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **27**, 494-501 (2013).
77. Yi, J., Zheng, Y., Miao, C., Tang, J. & Zhu, B. Desflurane preconditioning induces oscillation of NF-kappaB in human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One* **8**, e66576 (2013).
78. Bolli, R., *et al.* Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res* **95**, 125-134 (2004).
79. De Hert, S.G., *et al.* Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* **97**, 42-49 (2002).
80. Bein, B., *et al.* Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function during minimally invasive direct coronary artery bypass surgery. *Anesth Analg* **100**, 610-616, table of contents (2005).
81. Conzen, P.F., Fischer, S., Detter, C. & Peter, K. Sevoflurane provides greater protection of the myocardium than propofol in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology* **99**, 826-833 (2003).
82. Guarracino, F., *et al.* Myocardial damage prevented by volatile anesthetics: a multicenter randomized controlled study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **20**, 477-483 (2006).
83. Tritapepe, L., *et al.* Cardiac protection by volatile anaesthetics: a multicentre randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Eur J Anaesthesiol* **24**, 323-331 (2007).
84. Van Der Linden, P.J., Daper, A., Trenchant, A. & De Hert, S.G. Cardioprotective effects of volatile anesthetics in cardiac surgery. *Anesthesiology* **99**, 516-517 (2003).
85. Cromheecke, S., ten Broecke, P.W., Hendrickx, E., Meeus, R. & De Hert, S.G. Incidence of atrial fibrillation early after cardiac surgery: can choice of the anesthetic regimen influence the incidence? *Acta Anaesthesiol Belg* **56**, 147-154 (2005).

86. De Hert, S.G., *et al.* Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* **101**, 9-20 (2004).
87. El Azab, S.R., *et al.* Effect of sevoflurane on the ex vivo secretion of TNF-alpha during and after coronary artery bypass surgery. *Eur J Anaesthesiol* **20**, 380-384 (2003).
88. Landoni, G., *et al.* Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **21**, 502-511 (2007).
89. Bein, B. Clinical application of the cardioprotective effects of volatile anaesthetics: PRO--get an extra benefit from a proven anaesthetic free of charge. *Eur J Anaesthesiol* **28**, 620-622 (2011).
90. De Hert, S.G. Is anaesthetic cardioprotection clinically relevant? Another futile search for a magic bullet? *Eur J Anaesthesiol* **28**, 616-617 (2011).
91. Van Rompaey, N. & Barvais, L. Clinical application of the cardioprotective effects of volatile anaesthetics: CON--total intravenous anaesthesia or not total intravenous anaesthesia to anaesthetise a cardiac patient? *Eur J Anaesthesiol* **28**, 623-627 (2011).
92. Fleisher, L.A., *et al.* ACC/AHA 2007 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery). *Anesth Analg* **106**, 685-712 (2008).
93. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
94. Gorg, A., *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-1053 (2000).
95. Kang. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bulletin of the Korean Society* **23**, 1511-1512 (2002).
96. Klose, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243 (1975).
97. Lang, S.C., *et al.* Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol* **101**, 149-158 (2006).
98. Sbarouni, E., Georgiadou, P. & Voudris, V. Ischemia modified albumin changes - review and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* **49**, 177-184 (2010).
99. Lippi, G., Montagnana, M. & Guidi, G.C. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia? *Int J Cardiol* **108**, 410-411 (2006).
100. Xi, L., Taher, M., Yin, C., Salloum, F. & Kukreja, R.C. Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1alpha and AP-1 and iNOS signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2369-2375 (2004).
101. Carden, D.L. & Granger, D.N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* **190**, 255-266 (2000).

102. Mayr, M., *et al.* Proteomic and metabolomic analysis of cardioprotection: Interplay between protein kinase C epsilon and delta in regulating glucose metabolism of murine hearts. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 268-277 (2009).
103. Dickler, H.B. & Kunkel, H.G. Interaction of aggregated γ -globulin with B lymphocytes. *J Exp Med* **136**, 191-196 (1972).
104. McGreal, E. & Gasque, P. Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem Soc Trans* **30**, 1010-1014 (2002).
105. Ghebrehiwet, B. & Peerschke, E.I. cC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection. *Mol Immunol* **41**, 173-183 (2004).
106. Xu, Z., Hirasawa, A., Shinoura, H. & Tsujimoto, G. Interaction of the α (1B)-adrenergic receptor with gC1q-R, a multifunctional protein. *J Biol Chem* **274**, 21149-21154 (1999).
107. Pupo, A.S. & Minneman, K.P. Specific interactions between gC1qR and α 1-adrenoceptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res* **23**, 185-195 (2003).
108. Storz, P., *et al.* Protein kinase C [micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32. *J Biol Chem* **275**, 24601-24607 (2000).
109. Robles-Flores, M., *et al.* p32 (gC1qBP) is a general protein kinase C (PKC)-binding protein; interaction and cellular localization of P32-PKC complexes in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **277**, 5247-5255 (2002).
110. Mansurova, S.E. Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta* **977**, 237-247 (1989).
111. Garcia, J.J., Gomez-Puyou, A., Maldonado, E. & Tuena De Gomez-Puyou, M. Acceleration of unisite catalysis of mitochondrial F1-adenosinetriphosphatase by ATP, ADP and pyrophosphate -- hydrolysis and release of the previously bound [γ -32P]ATP. *Eur J Biochem* **249**, 622-629 (1997).
112. da Silva, L.P., Lindahl, M., Lundin, M. & Baltscheffsky, H. Protein phosphorylation by inorganic pyrophosphate in yeast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **178**, 1359-1364 (1991).
113. Terkeltaub, R.A. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1-C11 (2001).
114. Venditti, P., Di Stefano, L. & Di Meo, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* **13**, 71-82 (2013).
115. Takeshige, K. & Minakami, S. NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem J* **180**, 129-135 (1979).
116. Hanley, P.J., Mickel, M., Loffler, M., Brandt, U. & Daut, J. K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J Physiol* **542**, 735-741 (2002).
117. Hanley, P.J., Ray, J., Brandt, U. & Daut, J. Halothane, isoflurane and sevoflurane inhibit NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of cardiac mitochondria. *J Physiol* **544**, 687-693 (2002).
118. Kim, N., *et al.* Potential biomarkers for ischemic heart damage identified in mitochondrial proteins by comparative proteomics. *Proteomics* **6**, 1237-1249 (2006).
119. Mullenheim, J., *et al.* Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology* **96**, 934-940 (2002).
120. Novalija, E., *et al.* Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H44-52 (2002).

121. Tanaka, K., *et al.* Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* **97**, 1485-1490 (2002).
122. Garlid, K.D., *et al.* Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* **81**, 1072-1082 (1997).
123. Cole, W.C., McPherson, C.D. & Sontag, D. ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* **69**, 571-581 (1991).
124. Ockaili, R.A., Bhargava, P. & Kukreja, R.C. Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in hearts: role of mitochondrial K(ATP) channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2406-2411 (2001).
125. Riepe, M.W. & Ludolph, A.C. Chemical preconditioning: a cytoprotective strategy. *Mol Cell Biochem* **174**, 249-254 (1997).
126. Xiao, Y.Y., Chang, Y.T., Ran, K. & Liu, J.P. Delayed preconditioning by sevoflurane elicits changes in the mitochondrial proteome in ischemia-reperfused rat hearts. *Anesth Analg* **113**, 224-232 (2011).
127. Bienengraeber, M., *et al.* Quantitative characterization of changes in the cardiac mitochondrial proteome during anesthetic preconditioning and ischemia. *Physiol Genomics* **45**, 163-170 (2013).
128. Pravdic, D., *et al.* Complex I and ATP synthase mediate membrane depolarization and matrix acidification by isoflurane in mitochondria. *Eur J Pharmacol* **690**, 149-157 (2012).
129. Bolli, R. The early and late phases of preconditioning against myocardial stunning and the essential role of oxyradicals in the late phase: an overview. *Basic Res Cardiol* **91**, 57-63 (1996).
130. Seyfarth, M., Richardt, G., Mizsnyak, A., Kurz, T. & Schomig, A. Transient ischemia reduces norepinephrine release during sustained ischemia. Neural preconditioning in isolated rat heart. *Circ Res* **78**, 573-580 (1996).
131. Iliodromitis, E.K., Kremastinos, D.T., Katritsis, D.G., Papadopoulos, C.C. & Hearse, D.J. Multiple cycles of preconditioning cause loss of protection in open-chest rabbits. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 915-920 (1997).
132. Riess, M.L., Kevin, L.G., Camara, A.K., Heisner, J.S. & Stowe, D.F. Dual exposure to sevoflurane improves anesthetic preconditioning in intact hearts. *Anesthesiology* **100**, 569-574 (2004).
133. Obal, D., *et al.* Role of protein kinase C-epsilon (PKCepsilon) in isoflurane-induced cardioprotection. *Br J Anaesth* **94**, 166-173 (2005).
134. Bein, B., *et al.* The effects of interrupted or continuous administration of sevoflurane on preconditioning before cardio-pulmonary bypass in coronary artery surgery: comparison with continuous propofol. *Anaesthesia* **63**, 1046-1055 (2008).
135. Huhn, R., *et al.* Helium-induced late preconditioning in the rat heart in vivo. *Br J Anaesth* (2009).
136. Frassdorf, J., *et al.* Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **137**, 1436-1442, 1442 e1431-1432 (2009).
137. Fräßdorf, J., *et al.* Sevoflurane-induced preconditioning: impact of protocol and aprotinin administration on infarct size and endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation in the rat heart in vivo. *Anesthesiology* **113**, 1289-1298 (2010).

138. Marouga, R., David, S. & Hawkins, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* **382**, 669-678 (2005).

7 ANHANG

7.1 Identifizierte Proteine

Spot 56

Proteinname: **Albumin** [Rattus norvegicus] ; P02770

identifizierte Peptide:			
m/z	Ladung	Masse	Aminosäuresequenz
963,44	3+	2888,32	YMCENQATISSKLQACCDKPVLQK
650,30	3+	1948,90	AADKDNCFATEGPNLVAR + Carbamidomethyl (C)
654,00	3+	1960,00	YTQKAPQVSTPTLVEAAR

Proteinsequenz:

Met-Lys-Trp-Val-Thr-Phe-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Ile-Ser-Gly-Ser-Ala-Phe-Ser-Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Arg-Glu-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Ile-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-Glu-Gln-His-Phe-Lys-Gly-Leu-Val-Leu-Ile-Ala-Phe-Ser-Gln-Tyr-Leu-Gln-Lys-Cys-Pro-Tyr-Glu-Glu-His-Ile-Lys-Leu-Val-Gln-Glu-Val-Thr-Asp-Phe-Ala-Lys-Thr-Cys-Val-Ala-Asp-Glu-Asn-Ala-Glu-Asn-Cys-Asp-Lys-Ser-Ile-His-Thr-Leu-Phe-Gly-Asp-Lys-Leu-Cys-Ala-Ile-Pro-Lys-Leu-Arg-Asp-Asn-Tyr-Gly-Glu-Leu-Ala-Asp-Cys-Cys-Ala-Lys-Gln-Glu-Pro-Glu-Arg-Asn-Glu-Cys-Phe-Leu-Gln-His-Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Pro-Phe-Gln-Arg-Pro-Glu-Ala-Glu-Ala-Met-Cys-Thr-Ser-Phe-Gln-Glu-Asn-Pro-Thr-Ser-Phe-Leu-Gly-His-Tyr-Leu-His-Glu-Val-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Phe-Tyr-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Ala-Glu-Lys-Tyr-Asn-Glu-Val-Leu-Thr-Gln-Cys-Cys-Thr-Glu-Ser-Asp-Lys-Ala-Ala-Cys-Leu-Thr-Pro-Lys-Leu-Asp-Ala-Val-Lys-Glu-Lys-Ala-Leu-Val-Ala-Ala-Val-Arg-Gln-Arg-Met-Lys-Cys-Ser-Ser-Met-Gln-Arg-Phe-Gly-Glu-Arg-Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Met-Ser-Gln-Arg-Phe-Pro-Asn-Ala-Glu-Phe-Ala-Glu-Ile-Thr-Lys-Leu-Ala-Thr-Asp-Val-Thr-Lys-Ile-Asn-Lys-Glu-Cys-Cys-His-Gly-Asp-Leu-Leu-Glu-Cys-Ala-Asp-Asp-Arg-Ala-Glu-Leu-Ala-Lys-Tyr-Met-Cys-Glu-Asn-Gln-Ala-Thr-Ile-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln-Ala-Cys-Cys-Asp-Lys-Pro-Val-Leu-Gln-Lys-Ser-Gln-Cys-Leu-Ala-Glu-Ile-Glu-His-Asp-Asn-Ile-Pro-Ala-Asp-Leu-Pro-Ser-Ile-Ala-Ala-Asp-Phe-Val-Glu-Asp-Lys-Glu-Val-Cys-Lys-Asn-Tyr-Ala-Glu-Ala-Lys-Asp-Val-Phe-Leu-Gly-Thr-Phe-Leu-Tyr-Glu-Tyr-Ser-Arg-Arg-His-Pro-Asp-Tyr-Ser-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Ala-Lys-Lys-Tyr-Glu-Ala-Thr-Leu-Glu-Lys-Cys-Cys-Ala-Glu-Gly-Asp-Pro-Pro-Ala-Cys-Tyr-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Glu-Phe-Gln-Pro-Leu-Val-Glu-Glu-Pro-Lys-Asn-Leu-Val-Lys-Thr-Asn-Cys-Glu-Leu-Tyr-Glu-Lys-Leu-Gly-Glu-Tyr-Gly-Phe-Gln-Asn-Ala-Val-Leu-Val-Arg-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ala-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-Pro-Thr-Leu-Val-Glu-Ala-Ala-Arg-Asn-Leu-Gly-Arg-Val-Gly-Thr-Lys-Cys-Cys-Thr-Leu-Pro-Glu-Ala-Gln-Arg-Leu-Pro-Cys-Val-Glu-Asp-Tyr-Leu-Ser-Ala-Ile-Leu-Asn-Arg-Leu-Cys-Val-Leu-His-Glu-Lys-Thr-Pro-Val-Ser-Glu-Lys-Val-Thr-Lys-Cys-Cys-Ser-Gly-Ser-Leu-Val-Glu-Arg-Arg-Pro-Cys-Phe-Ser-Ala-Leu-Thr-Val-Asp-Glu-Thr-Tyr-Val-Pro-Lys-Glu-Phe-Lys-Ala-Glu-Thr-Phe-Thr-Phe-His-Ser-Asp-Ile-Cys-Thr-Leu-Pro-Asp-Lys-Glu-Lys-Gln-Ile-Lys-Lys-Gln-Thr-Ala-Leu-Ala-Glu-Leu-Val-Lys-His-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr-Glu-Asp-Gln-Leu-Lys-Thr-Val-Met-Gly-Asp-Phe-Ala-Gln-Phe-Val-Asp-Lys-Cys-Cys-Lys-Ala-Ala-Asp-Lys-Asp-Asn-Cys-Phe-Ala-Thr-Glu-Gly-Pro-Asn-Leu-Val-Ala-Arg-Ser-Lys-Glu-Ala-Leu-Ala

Sequenzabdeckung: 10,5%

isoelektrischer Punkt: theoretisch: 6,09 experimentell: ~6

Masse: theoretisch: 68.714 Da experimentell: ~80.000 Da

Spot 177

Proteinname: **Selenium Binding Protein 1 ; Q8VIF7**

identifizierte Peptide:			
m/z	Ladung	Masse	Aminosäuresequenz
811,71	3+	2433,13	FLHDPDATQGFVGCALSSNIQR + Carbamidomethyl (C)
959,43	2+	1917,86	NTGIEAPDYLATVDVDPK

Proteinsequenz:

Met-Ala-Thr-Lys-Cys-Thr-Lys-Cys-Gly-Pro-Gly-Tyr-Ala-Thr-Pro-Leu-Glu-Ala-Met-Lys-Gly-Pro-Arg-Glu-Glu-Ile-Val-Tyr-Leu-Pro-Cys-Ile-Tyr-Arg-Asn-Thr-Gly-Ile-Glu-Ala-Pro-Asp-Tyr-Leu-Ala-Thr-Val-Asp-Val-Asp-Pro-Lys-Ser-Pro-His-Tyr-Ser-Gln-Val-Ile-His-Arg-Leu-Pro-Met-Pro-His-Leu-Lys-Asp-Glu-Leu-His-His-Ser-Gly-Trp-Asn-Thr-Cys-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Asp-Ser-Thr-Lys-Ser-Arg-Asp-Lys-Leu-Ile-Leu-Pro-Ser-Ile-Ile-Ser-Ser-Arg-Ile-Tyr-Val-Val-Asp-Val-Gly-Ser-Glu-Pro-Arg-Ala-Pro-Lys-Leu-His-Lys-Val-Ile-Glu-Pro-Asn-Glu-Ile-His-Ala-Lys-Cys-Asn-Leu-Gly-Asn-Leu-His-Thr-Ser-His-Cys-Leu-Ala-Ser-Gly-Glu-Val-Met-Ile-Ser-Ser-Leu-Gly-Asp-Pro-Gln-Gly-Asn-Gly-Lys-Gly-Phe-Val-Leu-Leu-Asp-Gly-Glu-Thr-Phe-Glu-Val-Lys-Gly-Thr-Trp-Glu-Lys-Pro-Gly-Gly-Glu-Ala-Pro-Met-Gly-Tyr-Asp-Phe-Trp-Tyr-Gln-Pro-Arg-His-Asn-Ile-Met-Val-Ser-Thr-Glu-Trp-Ala-Ala-Pro-Asn-Val-Phe-Lys-Asp-Gly-Phe-Asn-Pro-Ala-His-Val-Glu-Ala-Gly-Leu-Tyr-Gly-Ser-His-Ile-His-Val-Trp-Asp-Trp-Gln-Arg-His-Glu-Ile-Ile-Gln-Thr-Leu-Gln-Met-Lys-Asp-Gly-Leu-Ile-Pro-Leu-Glu-Ile-Arg-Phe-Leu-His-Asp-Pro-Asp-Ala-Thr-Gln-Gly-Phe-Val-Gly-Cys-Ala-Leu-Ser-Ser-Asn-Ile-Gln-Arg-Phe-Tyr-Lys-Asn-Glu-Gly-Gly-Thr-Trp-Ser-Val-Glu-Lys-Val-Ile-Gln-Val-Pro-Ser-Lys-Lys-Val-Lys-Gly-Trp-Met-Leu-Pro-Glu-Met-Pro-Gly-Leu-Ile-Thr-Asp-Ile-Leu-Leu-Ser-Leu-Asp-Asp-Arg-Phe-Leu-Tyr-Phe-Ser-Asn-Trp-Leu-His-Gly-Asp-Ile-Arg-Gln-Tyr-Asp-Ile-Ser-Asn-Pro-Lys-Lys-Pro-Arg-Leu-Thr-Gly-Gln-Ile-Phe-Leu-Gly-Gly-Ser-Ile-Val-Lys-Gly-Gly-Ser-Val-Gln-Val-Leu-Glu-Asp-Gln-Glu-Leu-Thr-Cys-Gln-Pro-Glu-Pro-Leu-Val-Val-Lys-Gly-Lys-Arg-Val-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Met-Ile-Gln-Leu-Ser-Leu-Asp-Gly-Lys-Arg-Leu-Tyr-Val-Thr-Thr-Ser-Leu-Tyr-Ser-Ala-Trp-Asp-Lys-Gln-Phe-Tyr-Pro-Asn-Leu-Ile-Arg-Gly-Gly-Ser-Val-Met-Leu-Gln-Ile-Asp-Val-Asp-Thr-Ala-Asn-Gly-Gly-Leu-Lys-Leu-Asn-Pro-Asn-Phe-Leu-Val-Asp-Phe-Gly-Lys-Glu-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Leu-Ala-His-Glu-Leu-Arg-Tyr-Pro-Gly-Gly-Asp-Cys-Ser-Ser-Asp-Ile-Trp-Ile

Sequenzabdeckung: 9,3%

isoelektrischer Punkt: theoretisch: 6,10 experimentell: ~6

Masse: theoretisch: 52.498 Da experimentell: ~55.000 Da

Spot 225

Proteinname: **Succinate-Coenzyme A Ligase, ADP-forming, beta subunit [Rattus norvegicus]**

identifizierte Peptide:			
m/z	Ladung	Masse	Aminosäuresequenz
510,27	2+	1019,54	IVFSPEEAK
549,81	2+	1098,62	EPVDIIIEGVK
667,33	2+	1333,66	ILACDDLDEAAK + Carbamidomethyl (C)

Proteinsequenz:

Met-Ala-Ala-Ser-Met-Phe-Phe-Gly-Arg-Gln-Leu-Ala-Ala-Ala-Ala-Leu-Arg-Ser-His-Arg-Ser-Gln-Thr-Thr-Val-Arg-Ala-Thr-Ala-Gln-Ala-Leu-Gly-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Asn-Lys-His-Gly-Phe-Gln-Met-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Arg-Ser-Leu-Ser-Leu-His-Glu-Tyr-Leu-Ser-Met-Glu-Leu-Leu-Gln-Glu-Ala-Gly-Val-Ser-Val-Pro-Lys-Gly-Phe-Val-Ala-Lys-Ser-Ser-Ser-Asp-Glu-Ala-Tyr-Ala-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly-Ser-Lys-Asp-Val-Val-Ile-Lys-Ala-Gln-Val-Leu-Ala-Gly-Gly-Arg-Gly-Lys-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Gly-Leu-Lys-Gly-Gly-Val-Lys-Ile-Val-Phe-Ser-Pro-Glu-Glu-Ala-Lys-Ala-Val-Ser-Ser-Gln-Met-Ile-Gly-Gln-Lys-Leu-Ile-Thr-Lys-Gln-Thr-Gly-Ala-Lys-Gly-Arg-Ile-Cys-Asn-Gln-Val-Leu-Val-Cys-Glu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Arg-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Phe-Ala-Ile-Thr-Met-Glu-Arg-Ser-Phe-Gln-Gly-Pro-Val-Leu-Ile-Gly-Ser-Ser-Gln-Gly-Gly-Val-Asn-Ile-Glu-Asp-Val-Ala-Ala-Glu-Asn-Pro-Glu-Ala-Ile-Val-Lys-Glu-Pro-Val-Asp-Ile-Ile-Glu-Gly-Val-Lys-Lys-Glu-Gln-Ala-Val-Thr-Leu-Ala-Lys-Lys-Met-Gly-Phe-Pro-Ser-Asn-Ile-Val-Asp-Ser-Ala-Ala-Glu-Asn-Met-Ile-Lys-Leu-Tyr-Asn-Leu-Phe-Leu-Lys-Tyr-Asp-Ala-Thr-Met-Val-Glu-Ile-Asn-Pro-Met-Val-Glu-Asp-Ala-Asp-Gly-Lys-Val-Leu-Cys-Met-Asp-Ala-Lys-Ile-Asn-Phe-Asp-Ser-Asn-Ser-Ala-Tyr-Arg-Gln-Lys-Lys-Ile-Phe-Ala-Leu-Gln-Asp-Trp-Ser-Gln-Glu-Asp-Glu-Arg-Asp-Lys-Asp-Ala-Ala-Asp-Ala-Asp-Ile-Asn-Tyr-Ile-Gly-Leu-Asp-Gly-Asn-Ile-Gly-Cys-Leu-Val-Asn-Gly-Ala-Gly-Leu-Ala-Met-Ala-Thr-Met-Asp-Ile-Ile-Lys-Leu-His-Gly-Gly-Thr-Pro-Ala-Asn-Phe-Leu-Asp-Val-Gly-Gly-Gly-Ala-Thr-Val-His-Gln-Val-Thr-Glu-Ala-Phe-Lys-Leu-Ile-Thr-Ser-Asp-Lys-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Val-Asn-Ile-Phe-Gly-Gly-Ile-Met-Arg-Cys-Asp-Ile-Ile-Ala-Gln-Gly-Ile-Val-Met-Ala-Val-Lys-Asp-Leu-Glu-Ile-Arg-Ile-Pro-Val-Val-Val-Arg-Leu-Gln-Gly-Thr-Arg-Val-Asp-Asp-Ala-Lys-Ala-Leu-Ile-Ala-Asp-Ser-Gly-Leu-Lys-Ile-Leu-Ala-Cys-Asp-Asp-Leu-Asp-Glu-Ala-Ala-Lys-Met-Val-Val-Lys-Leu-Ser-Glu-Ile-Val-Thr-Leu-Ala-Lys-Glu-Ala-His-Val-Asp-Val-Lys-Phe-Gln-Leu-Pro-Ile-

Sequenzabdeckung: 8,0%

Peptide Mass Fingerprint (PMF): 25,4% Sequenzabdeckung

isoelektrischer Punkt: theoretisch: 7,57 experimentell: ~6

Masse: theoretisch: 50.274 Da experimentell: ~48.000 Da

Spot 319

Proteinname: Complement Component 1, q subcomponent binding protein [Rattus norvegicus]

identifizierte Peptide:			
m/z	Ladung	Masse	Aminosäuresequenz
566,33	3+	1696,99	AFVEFLTDEIKEEK
749,71	3+	2247,10	AEEQEPELTSTPNFVVEVTK
771,35	2+	1541,69	EVSFQTTGDSEWR
954,80	3+	2862,38	ITVTFNINNSIPPTFDGEEEPSQGQK

Proteinsequenz:

Met-Leu-Pro-Leu-Leu-Arg-Cys-Val-Pro-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Ala-Ala-Thr-Gly-Leu-Arg-Ala-Ser-Ile-Pro-Ala-Pro-Pro-Leu-Arg-His-Leu-Leu-Gln-Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Cys-Leu-Arg-Pro-Phe-Gly-Leu-Leu-Ser-Val-Arg-Ala-Gly-Ser-Ala-Arg-Arg-Ser-Gly-Leu-Leu-Gln-Pro-Pro-Val-Pro-Cys-Ala-Cys-Gly-Cys-Gly-Ala-Leu-His-Thr-Glu-Gly-Asp-Lys-Ala-Phe-Val-Glu-Phe-Leu-Thr-Asp-Glu-Ile-Lys-Glu-Glu-Lys-Lys-Ile-Gln-Lys-His-Lys-Ser-Leu-Pro-Lys-Met-Ser-Gly-Asp-Trp-Glu-Leu-Glu-Val-Asn-Gly-Thr-Glu-Ala-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys-Val-Ala-Gly-Glu-Lys-Ile-Thr-Val-Thr-Phe-Asn-Ile-Asn-Asn-Ser-Ile-Pro-Pro-Thr-Phe-Asp-Gly-Glu-Glu-Glu-Pro-Ser-Gln-Gly-Gln-Lys-Ala-Glu-Glu-Gln-Glu-Pro-Glu-Leu-Thr-Ser-Thr-Pro-Asn-Phe-Val-Val-Glu-Val-Thr-Lys-Thr-Asp-Gly-Lys-Lys-Thr-Leu-Val-Leu-Asp-Cys-His-Tyr-Pro-Glu-Asp-Glu-Ile-Gly-His-Glu-Asp-Glu-Ala-Glu-Ser-Asp-Ile-Phe-Ser-Ile-Lys-Glu-Val-Ser-Phe-Gln-Thr-Thr-Gly-Asp-Ser-Glu-Trp-Arg-Asp-Thr-Asn-Tyr-Thr-Leu-Asn-Thr-Asp-Ser-Leu-Asp-Trp-Ala-Leu-Tyr-Asp-His-Leu-Met-Asp-Phe-Leu-Ala-Asp-Arg-Gly-Val-Asp-Asn-Thr-Phe-Ala-Asp-Glu-Leu-Val-Glu-Leu-Ser-Thr-Ala-Leu-Glu-His-Gln-Glu-Tyr-Ile-Thr-Phe-Leu-Glu-Asp-Leu-Lys-Ser-Phe-Val-Lys-Ser-Gln-His

Sequenzabdeckung: 28,3%

isoelektrischer Punkt: theoretisch: 4,77 experimentell: ~4,5

Masse: theoretisch: 30.978 Da experimentell: ~33.000 Da

Spot 514

Proteinname: **Inorganic Pyrophosphatase 2, isoform CRA_a** [Rattus norvegicus]

identifizierte Peptide:			
m/z	Ladung	Masse	Aminosäuresequenz
658,33	3+	1972,99	<u>ME</u> IATEEPLNPIKQDTK + Oxidation (M)
696,37	2+	1391,74	SLVESIPTPS <u>M</u> SK + Oxidation (M)

Proteinsequenz:

Met-Arg-Ala-Leu-Leu-Pro-Leu-Leu-Ser-Val-Gly-Arg-Gly-Trp-Arg-Val-Gly-Ala-Ala-Ala-Leu-Pro-Pro-Arg-Arg-Val-Met-Ser-Leu-Tyr-Arg-Thr-Glu-Glu-Leu-Gly-His-Pro-Arg-Ser-Lys-Asp-Tyr-Arg-Leu-Phe-Phe-Lys-His-Val-Ala-Gly-His-Tyr-Ile-Ser-Pro-Phe-His-Asp-Ile-Pro-Leu-Lys-Ala-Asp-Cys-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Ile-Pro-Arg-Lys-Lys-Ala-Arg-Asn-Asp-Glu-Tyr-Lys-Ala-Ser-Phe-Asn-Met-Val-Val-Glu-Ile-Pro-Arg-Trp-Thr-Asn-Ala-Lys-Met-Glu-Ile-Ala-Thr-Glu-Glu-Pro-Leu-Asn-Pro-Ile-Lys-Gln-Asp-Thr-Lys-Asn-Gly-Arg-Leu-Arg-Tyr-Thr-Pro-Asn-Ile-Phe-Pro-His-Lys-Gly-Tyr-Ile-Trp-Asn-Tyr-Gly-Ala-Leu-Pro-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Gly-Asp-Val-Val-His-Val-Lys-Ile-Leu-Gly-Thr-Leu-Ala-Leu-Ile-Asp-Gln-Ser-Glu-Thr-Asp-Trp-Lys-Ile-Ile-Ala-Ile-Asn-Val-Asn-Asp-Pro-Glu-Ala-Glu-Lys-Phe-His-Asp-Ile-Asp-Asp-Val-Lys-Lys-Phe-Lys-Pro-Gly-Tyr-Leu-Glu-Ala-Thr-Val-Asn-Trp-Phe-Arg-Leu-Tyr-Lys-Val-Pro-Asp-Gly-Lys-Pro-Glu-Asn-Lys-Phe-Ala-Phe-Asn-Gly-Glu-Phe-Lys-Asn-Lys-Ala-Phe-Ala-Leu-Glu-Val-Ile-Asn-Ser-Ala-His-Glu-His-Trp-Lys-Glu-Met-Val-Met-Lys-Lys-Cys-Asp-Lys-Gly-Ala-Ile-Ser-Cys-Val-Asn-Val-His-Ile-Cys-Asp-Ser-Pro-Phe-His-Cys-Thr-Thr-Glu-Glu-Ala-Arg-Ser-Leu-Val-Glu-Ser-Ile-Pro-Thr-Pro-Ser-Met-Ser-Lys-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Glu-Glu-Val-Trp-His-Phe-Leu-Arg-Asn

Sequenzabdeckung: 11,3%

PMF: 30,6% Sequenzabdeckung

isoelektrischer Punkt: theoretisch: 8,17 experimentell: ~6,2

Masse: theoretisch: 34618 Da experimentell: ~37.000 Da

Spot 537

Proteinname: **NADH Dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa** [Rattus norvegicus] ; Q66HF1

identifizierte Peptide:			
m/z	Ladung	Masse	Aminosäuresequenz
1062,50	3+	3185,50	LGEVSPNLVRYDDVEEADYFQQASELAK

Proteinsequenz:

Met-Leu-Arg-Ile-Pro-Val-Lys-Arg-Ala-Leu-Ile-Gly-Leu-Ser-Lys-Ser-Pro-Lys-Gly-Tyr-Val-Arg-Ser-Thr-Gly-Thr-Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Ile-Glu-Val-Phe-Val-Asp-Gly-Gln-Ser-Val-Met-Val-Glu-Pro-Gly-Thr-Thr-Val-Leu-Gln-Ala-Cys-Glu-Lys-Val-Gly-Met-Gln-Ile-Pro-Arg-Phe-Cys-Tyr-His-Glu-Arg-Leu-Ser-Val-Ala-Gly-Asn-Cys-Arg-Met-Cys-Leu-Val-Glu-Ile-Glu-Lys-Ala-Pro-Lys-Val-Val-Ala-Ala-Cys-Ala-Met-Pro-Val-Met-Lys-Gly-Trp-Asn-Ile-Leu-Thr-Asn-Ser-Glu-Lys-Ser-Lys-Lys-Ala-Arg-Glu-Gly-Val-Met-Glu-Phe-Leu-Leu-Ala-Asn-His-Pro-Leu-Asp-Cys-Pro-Ile-Cys-Asp-Gln-Gly-Gly-Glu-Cys-Asp-Leu-Gln-Asp-Gln-Ser-Met-Met-Phe-Gly-Ser-Asp-Arg-Ser-Arg-Phe-Leu-Gly-Gly-Lys-Arg-Ala-Val-Glu-Asp-Lys-Asn-Ile-Gly-Pro-Leu-Val-Lys-Thr-Ile-Met-Thr-Arg-Cys-Ile-Gln-Cys-Thr-Arg-Cys-Ile-Arg-Phe-Ala-Ser-Glu-Ile-Ala-Gly-Val-Asp-Asp-Leu-Gly-Thr-Thr-Gly-Arg-Gly-Asn-Asp-Met-Gln-Val-Gly-Thr-Tyr-Ile-Glu-Lys-Met-Phe-Met-Ser-Glu-Leu-Ser-Gly-Asn-Ile-Ile-Asp-Ile-Cys-Pro-Val-Gly-Ala-Leu-Thr-Ser-Lys-Pro-Tyr-Ala-Phe-Thr-Ala-Arg-Pro-Trp-Glu-Thr-Arg-Lys-Thr-Glu-Ser-Ile-Asp-Val-Met-Asp-Ala-Val-Gly-Ser-Asn-Ile-Val-Val-Ser-Thr-Arg-Thr-Gly-Glu-Val-Met-Arg-Ile-Leu-Pro-Arg-Met-His-Glu-Asp-Ile-Asn-Glu-Glu-Trp-Ile-Ser-Asp-Lys-Thr-Arg-Phe-Ala-Tyr-Asp-Gly-Leu-Lys-Arg-Gln-Arg-Leu-Thr-Glu-Pro-Met-Val-Arg-Asn-Glu-Lys-Gly-Leu-Leu-Thr-Tyr-Thr-Ser-Trp-Glu-Asp-Ala-Leu-Ser-Arg-Val-Ala-Gly-Met-Leu-Gln-Ser-Phe-Glu-Gly-Lys-Ala-Val-Ala-Ala-Ile-Ala-Gly-Gly-Leu-Val-Asp-Ala-Glu-Ala-Leu-Val-Ala-Leu-Lys-Asp-Leu-Leu-Asn-Lys-Val-Asp-Ser-Asp-Thr-Leu-Cys-Thr-Glu-Glu-Ile-Phe-Pro-Asn-Glu-Gly-Ala-Gly-Thr-Asp-Leu-Arg-Ser-Asn-Tyr-Leu-Leu-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Gly-Val-Glu-Glu-Ala-Asp-Val-Val-Leu-Leu-Val-Gly-Thr-Asn-Pro-Arg-Phe-Glu-Ala-Pro-Leu-Phe-Asn-Ala-Arg-Ile-Arg-Lys-Ser-Trp-Leu-His-Asn-Asp-Leu-Lys-Val-Ala-Leu-Ile-Gly-Ser-Pro-Val-Asp-Leu-Thr-Tyr-Arg-Tyr-Asp-His-Leu-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Ile-Leu-Gln-Asp-Ile-Ala-Ser-Gly-Asn-His-Glu-Phe-Ser-Lys-Val-Leu-Asn-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Met-Val-Val-Leu-Gly-Ser-Ser-Ala-Leu-Gln-Arg-Asp-Asp-Gly-Ala-Ala-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Ile-Ala-Gln-Lys-Ile-Arg-Val-Ala-Ser-Gly-Ala-Ala-Ala-Glu-Trp-Lys-Val-Met-Asn-Ile-Leu-His-Arg-Ile-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Ala-Leu-Asp-Leu-Gly-Tyr-Lys-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Arg-Lys-Asn-Pro-Pro-Lys-Leu-Leu-Phe-Leu-Leu-Gly-Ala-Asp-Gly-Gly-Cys-Ile-Thr-Arg-Gln-Asp-Leu-Pro-Lys-Asp-Cys-Phe-Ile-Val-Tyr-Gln-Gly-His-His-Gly-Asp-Val-Gly-Ala-Pro-Ile-Ala-Asp-Val-Ile-Leu-Pro-Gly-Ala-Ala-Tyr-Thr-Glu-Lys-Ser-Ala-Thr-Tyr-Val-Asn-Thr-Glu-Gly-Arg-Ala-Gln-Gln-Thr-Lys-Val-Ala-Val-Thr-Pro-Pro-Gly-Leu-Ala-Arg-Glu-Asp-Trp-Lys-Ile-Ile-Arg-Ala-Leu-Ser-Glu-Ile-Ala-Gly-Ile-Thr-Leu-Pro-Tyr-Asp-Thr-Leu-Asp-Gln-Val-Arg-Asn-Arg-Leu-Gly-Glu-Val-Ser-Pro-Asn-Leu-Val-Arg-Tyr-Asp-Asp-Val-Glu-Glu-Ala-Asp-Tyr-Phe-Gln-Gln-Ala-Ser-Glu-Leu-Ala-Lys-Leu-Val-Asp-Gln-Glu-Phe-Leu-Ala-Asp-Pro-Leu-Val-Pro-Pro-Gln-Leu-Thr-Ile-Lys-Asp-Phe-Tyr-Met-Thr-Asp-Ser-Ile-Ser-Arg-Ala-Ser-Gln-Thr-Met-Ala-Lys-Cys-Val-Lys-Ala-Val-Thr-Glu-Gly-Ala-Gln-Ala-Val-Glu-Glu-Pro-Ser-Ile-Cys

Sequenzabdeckung: 4,1%

isoelektrischer Punkt: theoretisch: 5,65 experimentell: ~5,1

Masse: theoretisch: 79.362Da experimentell: ~45.000 Da

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D-PAGE = 2 dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

ADP = Adenosindiphosphat

ASB = Aminosulfbetain

ATP = Adenosintriphosphat

BSA = bovines Serumalbumin

DES-PC = Desfluran Präkonditionierung

DIGE = Differential in gel electrophoresis

DTT = Dithiothreitol

ESI = Elektrosprayionisation

GTP = Guanosintriphosphat

HED = Hydroxyethyldisulfid

IAA = Iodacetamid

ICD = International Classifications of Diseases

IEF = Isoelektrische Fokussierung

IM = innere Mitochondrienmembran

IMA = Ischemia Modified Albumin

IPG = immobililine pH-Gradient

MAC = minimale alveoläre Konzentration

MPT = Mitochondrial Permealibility Transtion

MS = Massenspektrometer

NAD = Nicotinamidadenindinukleotid

NO = Stickstoffmonoxid

PKC = Protein Kinase C

PMF = Peptide Mass Fingerprint

PP_i = Pyrophosphat

ROS = reactive oxygen species

SDS = Sodiumdodecylsulfat

SBP = Selenium Binding Protein

TCA = Trichloressigsäure

TOF = Time of Flight

TU = Thiourea

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

10 LEBENSLAUF

Angaben zur Person:

Name	Vogt
Vorname	Hendrik
Geboren am/in	14.01.1986 in Essen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul-/Hochschulbildung:

1992 – 1996	Grundschule in Essen
1996 – 2005	Don-Bosco Gymnasium in Essen Abschluss Allgemeine Hochschulreife
2005 – 2012	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
2007	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)
2008	Stipendiat des Graduiertenkollegs 1089 der Heinrich-Heine Universität
2012	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Approbation als Arzt

11 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schlack für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die kritische Beurteilung meiner Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Metzger für die hervorragende Betreuung, die kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und die, zu allen Zeiten, offene Tür.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Dyballa, die mir vom ersten Gel an im Labor zur Seite stand, unglaublich viel Zeit und Geduld in meine Betreuung investierte und mir mit guten, konstruktiven Vorschlägen weiterhalf.

Vielen Dank auch an Frau Dr. rer. nat. Hauck-Weber, die auf niederländischer Seite meine Betreuung übernahm, stets ein offenes Ohr hatte und für die kritische Begutachtung meiner Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an das Graduiertenkolleg 1089 unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Gödecke, das mich als Stipendiat aufnahm und mir mit kreativen und konstruktiven Ideen weiterhalf.

Meinen Mitarbeitern und Kollegen im BMFZ bin ich ebenfalls zu besonderem Dank verpflichtet. Sie unterstützen mich wo immer es möglich war und wir hatten viel Spaß im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und engen Freunden danken, die während der gesamten Zeit für mich da waren und mich motivierten wenn es nötig war, vor allem während des langwierigen Schreibprozesses.